

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

Raquel Aurora Hernández Espinosa

Lizeth Geovanna Mejía Ortiz

Universidad de Nariño
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Programa de Biología
San Juan de Pasto
2013

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

Raquel Aurora Hernández Espinosa

Lizeth Geovanna Mejía Ortiz

Asesora

Ph. D. Carol Yovanna Rosero Galindo

Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo
Modalidad Trabajo de Investigación

Universidad de Nariño
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Programa de Biología
San Juan de Pasto
2013

“Las ideas y conclusiones aportados en el trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1° del acuerdo N° 324 de Octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre, 2013



**ACUERDO NÚMERO 162 DE 2013
(Noviembre 25)**

Por la cual se asigna a un Trabajo de Grado la distinción de **LAUREADO**.

EL CONSEJO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO, en uso de sus atribuciones reglamentarias y estatutarias, y,

CONSIDERANDO:

Que el Comité Curricular y de Investigaciones del Departamento de Biología, mediante Proposición No.089 de 25 de noviembre de 2013, solicita a este organismo otorgarle la distinción de **LAUREADO** al trabajo de grado titulado **“ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE GANADO BOVINO LECHERO DEL TROPICO ALTO DE NARIÑO MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES HETEROLOGOS DE TIPO MICROSATELITE”**;

Que el día miércoles 20 de noviembre de 2013, en jornada de sustentaciones realizadas a partir de las 8: 00 a.m, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales , las estudiantes **RAQUEL AURORA HERNÁNDEZ ESPINOSA Y LIZETH GIOVANNA MEJÍA ORTIZ**; sustentaron el proyecto de Trabajo de Grado titulado **“ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE GANADO BOVINO LECHERO DEL TROPICO ALTO DE NARIÑO MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES HETEROLOGOS DE TIPO MICROSATELITE”**;

Que los Doctores Edith Mariela Burbano y Alvaro Pazos Moncayo, jurados evaluadores de dicho trabajo, concedieron una calificación de 60 puntos en el trabajo escrito y 40 puntos en la sustentación oral;

Que la Doctora Carol Yovanna Rosero Galindo como asesora y jurado del trabajo de grado de las estudiantes concedió una calificación de 40 puntos en el trabajo escrito, 30 puntos en la sustentación oral y 30 puntos en la evaluación de competencias en investigación;

Que una vez promediadas las calificaciones del trabajo escrito, sustentación y competencias en investigación emitidas por el jurado incluyendo la asesora que funge como jurado, se obtiene un puntaje final de 100 puntos, lo cual corresponde cualitativamente a Trabajo de Grado con mención **LAUREADO**;

Que los Doctores Edith Mariela Burbano, Alvaro Pazos Moncayo y Carol Yovanna Rosero Galindo, han emitido los conceptos mediante los cuales se argumenta la calificación de Trabajo de Grado con mención **LAUREADO** otorgado a las estudiantes **RAQUEL AURORA HERNÁNDEZ ESPINOSA Y LIZETH GIOVANNA MEJÍA ORTIZ**;

Que el trabajo de grado desarrollado por las estudiantes describe claramente, el problema de investigación, es pertinente y descrito con coherencia;

Que el marco teórico es sustentado por una bibliografía actualizada que además sitúa el problema de investigación en el contexto regional;

Que el objetivo general y los objetivos específicos propuestos son logrados a cabalidad;

Que la metodología y los materiales utilizados en el trabajo de investigación se encuentran descritos detalladamente;

Que los resultados se presentan con claridad y el análisis de los datos está soportado completamente;

Que el alcance de los objetivos permite que los resultados del trabajo puedan ser aplicados a la realidad de nuestra región;

Que el trabajo abre un nuevo campo en la recuperación de la raza bovina criolla, abriendo un campo a nuevas alternativas sostenibles de producción;

Que el trabajo en conjunto refleja un gran conocimiento de las estudiantes en las áreas relacionadas con la Biología Molecular y Genética, todas ellas aplicadas con rigor científico para innovar y aportar a la generación de conocimiento científico;

Que el trabajo desarrollado es de gran calidad, tanto por su relevancia científica, como por los resultados obtenidos y se notó la dedicación de las estudiantes para la presentación objetiva y clara de sus datos, como también en la discusión de los mismos;

Que las estudiantes alcanzaron competencias de investigación como la proposición efectiva de herramientas robustas para la estimación de la diversidad genética de las poblaciones de estudio, alta capacidad de análisis de datos moleculares, capacidad crítica para interpretación de resultados, habilidad escrita en documentos científicos y trabajo en equipo;

Que la metodología empleada en el estudio fue robusta y su ejecución altamente dispendiosa lo que permitió evaluar la capacidad de respuesta de las estudiantes ante eventos no deseados en investigación como lo es dificultades de orden público para la toma de muestras y la obtención de bandas inespecíficas en la amplificación por PCR de sistemas microsatélites;

Que la rigurosidad científica realizada por las estudiantes para la aplicación de la metodología permitió cumplir a cabalidad los objetivos formulados en su investigación;

Que los resultados obtenidos en el estudio son innovadores y se convierten en un estudio pionero para el Trópico Alto de Nariño en relación al direccionamiento diferencial de la mejora genética para bovinos de leche y a la conservación de hábitats naturales de otras especies asociadas a los sistemas de cría;

Que en la sustentación se presentaron los resultados de forma clara, ordenada y concisa, se demostró dominio del tema por parte de las estudiantes y capacidad para resolver todas las preguntas de manera adecuada;

Que la manera de explicar los resultados ayudo al entendimiento de su importancia y entender la pertinencia en avanzar en la conservación de la raza bovina criolla en nuestra región;

Que el trabajo desarrollado es pionero en el tema de investigación, la aplicación de sus resultados y de las herramientas genéticas aportara a futuras investigaciones tendientes a la conservación de la diversidad de criollos en nuestro Departamento;

Que este consejo consideró viable la petición y;

ACUERDA:

Artículo 1º. Otorgar la distinción de **LAUREADO**, al trabajo de grado titulado **“ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE GANADO BOVINO LECHERO DEL TROPICO ALTO DE NARIÑO MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES HETEROLOGOS DE TIPO MICROSATELITE”**, sustentado por las egresadas **RAQUEL AURORA HERNÁNDEZ ESPINOSA Y LIZETH GIOVANNA MEJÍA ORTIZ**, del Programa de Biología; de acuerdo a la parte motiva del presente Acuerdo.

Artículo 2º la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología y OCARA, anotarán lo de su cargo.

COMUNÍQUESE Y CÚMPLASE.

San Juan de Pasto, 25 días del mes de noviembre de 2013.


PABLO FERNÁNDEZ IZQUIERDO
Presidente


DÚVI CASTILLO
Secretaria Académica

Dedico este trabajo a mi familia, quienes me han guiado paso a paso a través de esta larga travesía que es la vida, me han apoyado y creer en mí a pesar de todo. Gracias, porque sus esfuerzos han dado frutos, y gracias por enseñarme que con voluntad y pasión es posible lograr las metas que nos proponemos en la vida.

Raquel Hernández.

Dedico esta investigación a mis padres quienes han sido mis modelos de vida y de lucha continua, a mi hermana y mi sobrino quienes con su cariño y compañía han hecho de los momentos difíciles llevaderos. Gracias papas por sus esfuerzos continuos por convertirme en una gran persona y profesional y apoyarme en este camino que hoy culmina pero que da inicio a una nueva etapa en mi vida.

Lizeth Mejía

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar presente en cada momento de nuestras vidas.

A la vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados por la financiación de la Investigación.

Al grupo de Investigación en Mejoramiento Genético Animal, liderado por el Doctor Carlos Solarte, por el apoyo brindado en el desarrollo de la investigación y el acompañamiento en la revisión de bases de datos, toma de muestras y por el acceso al Laboratorio de Biología molecular.

A nuestra Directora de Trabajo de Grado, Carol Rosero por su amistad, consejos, paciencia, enseñanzas y por transmitirnos su amor por la genética y la investigación.

A los profesores Mariela Burbano y Álvaro Pazos, jurados de este proyecto; por su apoyo y orientación durante el desarrollo de la investigación.

Al profesor Jhon Jairo Calderón por sus regaños, consejos y por brindarnos su amistad incondicional y por despertar nuestro espíritu investigativo.

A nuestros compañeros de investigación Esmeralda, Paola, Miguel y Juan Pablo por su compañía durante las arduas jornadas de trabajo en el laboratorio y por su aporte en el análisis de datos, pero sobretodo por su amistad y afecto.

A nuestros compañeros de carrera Felipe, Ricardo, Roger, Carlos, Lorena, Alexandra, Camilo y Christian, quienes nos enseñaron a amar la biología, y que se convirtieron en verdaderos amigos con quienes compartimos miles de experiencias que nunca olvidaremos.

A nuestros padres y familiares por su apoyo incondicional y comprensión que hicieron posible la culminación de esta etapa de nuestras vidas.

RESUMEN

El mejoramiento genético en animales domésticos ha permitido la selección de fenotipos con los mejores atributos, incrementando la cantidad de razas y la diversidad genética contenida en ellas, permitiendo que se adapten. En el trópico Alto de Nariño, la diversidad genética de la subespecie *Bos taurus*, está representada por razas europeas y ganado criollo o razas locales que adquirieron características adaptativas como tolerancia al calor, resistencia a enfermedades infecciosas, alta eficiencia reproductiva y longevidad. Sin embargo, sus poblaciones han disminuido debido a cruzamientos dirigidos a incrementar el volumen de producción de leche, mediante la introducción de razas especializadas. En el presente estudio, se evaluó la diversidad genética de las razas bovinas lecheras del Trópico Alto de Nariño, holstein, jersey, criollo, normando y pardo, para conocer su estado genético actual y el grado de absorción del núcleo criollo, mediante la amplificación de once loci microsatélites que resultaron ser polimórficos y altamente informativos. Los patrones alélicos para las razas fueron similares con heterocigosidad observada alta y diversidad genética mayor para la raza criolla. Se encontraron distancias genéticas pequeñas entre razas y poca estructura ($F_{ST}=0.0663$), las razas criollo y holstein (0,006), con el valor más alto de identidad (0,87) se agruparon en un clúster. El análisis de agrupamiento bayesiano, mostró mezcla genética entre razas y un 56% de absorción del núcleo criollo por la raza holstein. Los resultados permitieron inferir que la alta diversidad genética ha sido el resultado de procesos de mezcla entre razas, adaptación a diferentes ambientes y presión moderada. Sin embargo, refleja un continuo flujo genético entre razas, que evidencia la realización de cruces dirigidos al incremento de productividad y en detrimento de la pureza del criollo, hecho que puede incidir en su capacidad adaptativa, de ahí que se hace necesario el desarrollo de estrategias que permitan conservar su pureza.

PALABRAS CLAVE: criollo, diversidad, absorción, adaptación, mejoramiento, microsatélite.

ABSTRACT

In domestic animals, like cattle, the genetic improvement has allowed the selection of best features, this increased the number of races, and their genetic diversity. These races are adapted to adverse conditions. In the high tropic of Nariño, genetic diversity of *Bos Taurus* is represented by European races, and the creoles who are adapted to tropical conditions. They acquired resistance to heat and moisture and to diseases and they have high reproductive efficiency and longevity. However, the populations of creoles have decreased because the controlled crosses are destined to increase the volume of milk production, by the introduction of specialized breeds. In the present study, was made a genetic diversity analysis of the cattle dairy breeds in the high tropic of Nariño, to evaluate their genetic status and the grade of absorption of creole breed. There were used eleven microsatellites for the holstein, creole, jersey, normando and pardo suizo breeds. The results have shown that all of the evaluated *loci* were polymorphic and high informative. The allelic patterns for all breeds were similar, creole breed was the breed with the highest values of observed heterocigosity and genetic diversity. The genetic distance analysis show low genetic differentiation ($F_{ST} = 0,0663$; $p < 0,05$) for the total population, with the lower differentiation between holstein and creole (0,006), they also had the highest identity value (0,87). This result was corroborated when was performed the Bayesian grouping, who detect the absorption of creole by holstein breed (absorption percentage of 56%), this suggest a management guided to increase the milk volume of production. This has decreased the purity of creole breed and this fact can decrease the genetic variability and made a loss of the adaptive advantages of this breed. Because this it's necessary to implement conservation strategies for creole breed.

Key words: creole, diversity, absorption, adaptation, improvement, microsatellite.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo General.....	24
2.2. Objetivos Específicos	24
2.2.1. Objetivo específico 1	24
2.2.2. Objetivo específico 2	24
3. MARCO TEÓRICO.....	25
3.1. CONCEPTO Y NECESIDADES DE PRESERVACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD.....	25
3.1.1. Conservación de la diversidad genética del agro.....	26
3.1.2. Estrategias para la conservación de razas bovinas criollas en Colombia	27
3.2. RECURSOS ZOOGENÉTICOS Y RAZAS	28
3.2.1. Flujo de los recursos zoogenéticos y sus repercusiones en la Diversidad	29
3.2.2. Características fenotípicas de las razas bovinas del Trópico alto de Nariño	30
3.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA MOLECULAR	32
3.3.1. Marcadores moleculares y sus aplicaciones.....	32
3.3.2. Marcadores microsatélites o STR.....	33
3.3.2.1. Técnicas para la caracterización alélica de STR	34
3.4. DIVERSIDAD GENÉTICA	34
3.4.1. Medidas de la diversidad genética.....	35
3.4.1.1. Cálculo de frecuencias alélicas	35
3.4.1.2. Contenido de información polimórfica (PIC)	35
3.4.2. Heterocigosis.....	36
3.4.2.1. Heterocigosidad observada (<i>H_o</i>).....	36
3.4.2.2. Heterocigosidad esperada o diversidad genética (<i>H_e</i>)	36
3.4.3. Equilibrio Hardy-Weinberg.....	36
3.4.4. Estructura de la población	37
3.4.4.1. Índices de Fijación.....	37
3.4.5. Distancias genéticas.....	38
4. ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN	39
5. METODOLOGÍA.....	45
5.1. ÁREA DE ESTUDIO	45
5.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA	47
5.3. FASE DE CAMPO	48
5.3.1. Toma de muestras de sangre.....	48
5.4. FASE DE LABORATORIO	48
5.4.1. Extracción y Cuantificación del DNA	48

5.4.1.1. Protocolo de extracción por <i>Salting out</i>	48
5.4.1.2. Protocolo de extracción a partir de tarjeta FTA.....	49
5.4.1.3. Cuantificación de DNA	49
5.4.2. Estandarización y selección de marcadores microsatélites	49
5.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	50
5.4.4. Genotipificación	52
5.5. ANÁLISIS DE DATOS	52
5.5.1. Análisis multiloci	52
5.5.2. Análisis estadístico en cumplimiento del Objetivo 1	53
5.5.3. Análisis estadístico en cumplimiento del Objetivo 2.....	54
6. RESULTADOS	55
6.1. EXTRACCIÓN DE DNA.....	55
6.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN	56
6.3. VARIABILIDAD GENÉTICA.....	61
6.4. DIVERSIDAD GENÉTICA	63
6.4.1. Equilibrio Hardy-Weinberg	66
6.5. DISTANCIA GENÉTICA	67
6.6. ESTRUCTURA GENÉTICA.....	68
6.7. GRADO DE ABSORCIÓN DEL NÚCLEO CRIOLLO	69
7. DISCUSIÓN	71
7.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS <i>LOC</i> /MICROSATÉLITES.....	71
7.2. DIVERSIDAD GENÉTICA	73
7.3. EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG	74
7.4. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE LAS POBLACIONES	75
7.5. GRADO DE ABSORCIÓN DEL NÚCLEO RACIAL CRIOLLO	77
CONCLUSIONES	79
PERSPECTIVAS	80
BIBLIOGRAFÍA.....	81

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Descripción fenotípica de las razas lecheras del trópico alto de Nariño.	30
Tabla 2. Microsatélites para DNA de ganado vacuno. Nombre de cada <i>locus</i> , secuencia directa y reversa de la pareja de cebadores, tamaño del fragmento esperado en pares de bases (pb) referencia del grupo de autores que describen el uso del <i>locus</i> respectivo.	49
Tabla 3. Componentes de PCR para la amplificación de microsatélites de ganado vacuno, para un volumen final de 25 μ l.	50
Tabla 4. Componentes de PCR para la reacción múltiplex especificado por la casa comercial <i>Applied Biosystems</i> .	52
Tabla 5. Lista de cebadores evaluados en el primer ensayo y temperatura de alineamiento para la amplificación de los <i>loci</i> microsatélites.	56
Tabla 6. Contenido de información polimórfica (PIC) y número de alelos por <i>locus</i> y por población.	63
Tabla 7. Estimación de la presencia de alelos nulos para cada <i>locus</i> usando el método descrito por Brookfield (1996).	63
Tabla 8. Diversidad genética para cada población y para cada <i>locus</i> .	64
Tabla 9. Valores F_{IS} para cada marcador ordenados por signo y magnitud.	65
Tabla 10. Alelos exclusivos y sus frecuencias para cada raza y <i>locus</i> .	66
Tabla 11. Equilibrio Hardy-Weinberg para cada <i>locus</i> y para cada raza ($P > 0,05$ acepta que la población está en equilibrio Hardy-Weinberg).	67
Tabla 12. Distancias genéticas entre pares de poblaciones, con los valores de identidad (arriba de la diagonal) y las distancias genéticas (debajo de la diagonal) según Nei (1972).	67
Tabla 13. Valores de F_{ST} entre pares de poblaciones.	69

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Razas presentes en el trópico alto de Nariño. A. jersey, B. pardo suizo, C. normando, D. holstein, E. criollo.	31
Figura 2. Ubicación geográfica de los tres distritos lecheros en el trópico alto del departamento de Nariño-Colombia.	45
Figura 3. Localización satelital y coordenadas planas (latitud (N), longitud (W) de los distritos lecheros en el trópico alto de Nariño.	46
Figura 4. Programa de amplificación para las regiones microsatélites de ganado bovino.	51
Figura 5. Gel de agarosa al 2% para verificación de DNA total extraído a partir de muestras de sangre de la especie <i>Bos taurus</i> .	55
Figura 6. Amplificación de la región microsatélite INRA063 en un gel de Agarosa al 4%.	57
Figura 7. Visualización de amplificados en gel de poliacrilamida al 6%, para los <i>loci</i> microsatélites CSSM66 y BM1818 a una temperatura de alineamiento de 54°C.	57
Figura 8. Visualización de amplificación en Agarosa al 2%, para el <i>locus</i> microsatélite BM1818 para la subespecie <i>Bos Taurus</i> , usando un gradiente de temperatura de 54 a 61°C.	59
Figura 9. Electroferogramas mostrando la amplificación de regiones microsatélites del genoma de la subespecie <i>Bos taurus</i> , utilizando el kit <i>Stockmarks for Cattle Bovine Genotyping Kit (Applied Biosystems)</i> , obtenido en el programa Genemapper V.4.1.	60
Figura 10. Electroferograma mostrando el patrón de algunos alelos para el locus TGLA227 marcado con el <i>dye</i> FAM (Genemapper v.4.1.)	61
Figura 11. Electroferograma mostrando de algunos alelos para el locus TGLA122 marcado con el <i>dye</i> JOE (Genemapper v.4.1.).	62
Figura 12. Electroferograma mostrando el patrón de algunos alelos para el locus ETH3 marcado con el <i>dye</i> NED (Genemapper v.4.1.).	62

Figura 13. Dendrograma por agrupamiento UPGMA modificado del método Neighbor de Phylip v.3.5. para las poblaciones de <i>Bos Taurus</i> en el trópico alto de Nariño.	68
Figura 14. Magnitud de λK en función de K dada para una media de 10 corridas independientes con 100.000 iteraciones. El valor que sobresale representa el valor real de K (# de poblaciones).	70
Figura 15. Agrupamiento de 115 individuos de las cinco razas bovinas inferido por el método estadístico Bayesiano usando el programa Structure y teniendo en cuenta 5 grupos.	71
Figura 16. Asignación probabilística de individuos por población a grupos homogéneos. Cada individuo está representado por una columna y las divisiones muestran la proporción que comparte dicho individuo con un grupo particular, teniendo en cuenta 2 grupos.	72
Figura 17. Patrones alélicos para las cinco razas de estudio	76

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Descripción del protocolo de extracción de DNA de Salting Out a partir de muestras de sangre.	91
Anexo B. Protocolo de Extracción de DNA a partir de muestra sanguínea usando el kit FTA ® de Whatman Bioscience	92
Anexo C. Microsatélites para DNA de ganado vacuno, utilizados en la etapa de estandarización de amplificación por PCR. Nombre de cada locus, secuencia directa y reversa de la pareja de cebadores, tamaño del fragmento esperado en pares de bases (pb) referencia del grupo de autores que describen el uso del locus respectivo y temperatura de alineamiento reportada para cada cebador.	93

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Equilibrio Hardy-Weinberg: Es un modelo teórico para genética de poblaciones. El concepto de equilibrio en el modelo se basa en las siguientes hipótesis:

1. La población es panmíctica (todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar).
2. La población es suficientemente grande (para minimizar las diferencias existentes entre los individuos).
3. La población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay pérdida ni ganancia de alelos).
4. Las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación.

Bajo estas circunstancias las poblaciones genéticas se mantienen en equilibrio.

Desequilibrio de ligamiento: Cuando los alelos de diferentes loci se encuentran ligados no existe una segregación independiente de los mismos, lo que hace que se observen genotipos comunes entre individuos. Un caso extremo ocurre cuando los loci se encuentran en el mismo cromosoma y muy cercanos por lo que la frecuencia de recombinación es muy baja. Sin embargo, en poblaciones naturales adaptadas a un medio ambiente se pueden dar asociaciones entre alelos de diferentes loci en diferentes cromosomas debido a selección natural.

Deriva génica: Es un “sorteo” de genes durante la transmisión de gametos de los padres a los hijos en cada generación. La mayoría de los organismos son diploides, es decir, tienen dos ejemplares de cada gen y los gametos de estos organismos portan solo uno de los dos alelos de cada gen. El que un gameto lleve un alelo u otro es una cuestión probabilística, en cada generación esperamos una fluctuación al azar de las frecuencias alélicas en las poblaciones. Si en algún momento durante esta conducta fluctuante un tipo de los alelos no llega a transmitirse a la siguiente generación, entonces este alelo se habrá perdido para siempre. El resultado de la deriva suele ser la pérdida de variabilidad genética, siendo un proceso que contrarresta la entrada de variabilidad genética por mutaciones.

Introgresión genética: es la dispersión de uno o más genes de una especie en otras, a consecuencia de un proceso de hibridación interespecífica seguida de retrocruzamiento con una o ambas de las especies parentales.

Mapa de ligamiento: También llamados mapas meióticos, se basan en que, durante la meiosis, los loci que se encuentran en diferentes cromosomas se separan al azar en los gametos, mientras que los que se encuentran en un mismo cromosoma tienden a co-segregar, al menos que un evento de recombinación rompa esa asociación de tipo "parental". La presencia de este fenómeno de entrecruzamiento (del inglés crossing-over) se visualiza en los cromosomas como una estructura llamada quiasma. Un mapa de ligamiento es un arreglo lineal de sitios polimórficos sobre un cromosoma, deducido de experimentos de recombinación genética, implica un ordenamiento de marcadores y genes estableciendo distancias genéticas entre ellos.

Panmixia: todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar.

1. INTRODUCCIÓN

El proceso de domesticación y mejoramiento genético de animales permite la selección de fenotipos con mejores atributos, resultando en una gran variedad de razas. Esta diversidad genética permite identificar la adaptación de los animales a enfermedades, parásitos, diversas condiciones climáticas, de alimentación y otros factores como las cambiantes exigencias del mercado (Pizarro *et al.*, 2009); y a su vez, esta variedad de razas, que se usan ya sea en la explotación agropecuaria, la cría convencional o la ingeniería genética, constituyen “per se” un patrimonio de inestimable valor, al poseer una combinación única de genes (Bejarano *et al.*, 2012). La pérdida de la diversidad genética no sólo pone en riesgo de desaparición a ciertas razas, sino que además limita los progresos del mejoramiento genético a desarrollarse en el futuro (Pizarro *et al.*, 2009) y reduce la posibilidad para hacer frente a nuevas condiciones ambientales. Debido a esto, en las últimas décadas del siglo XX fue constatado que el uso y preservación de los recursos genéticos son inseparables (Barker, 2001), de manera que hay un consenso de la importancia de las razas domésticas en la biodiversidad mundial explicado por el acervo genético contenido en aquellas razas que fueron introducidas hace décadas y que cumplen con un proceso de adaptación ambiental en las zonas donde han sido introducidas.

La diversidad genética de bovinos en Colombia está representada por una amplia variedad de razas de origen Europeo (*Bos taurus taurus*) introducidas por los españoles desde el siglo XV, algunas de las cuales lograron adaptarse exitosamente a las difíciles condiciones tropicales. De estas, el ganado criollo adquirió características adaptativas de gran importancia, como tolerancia al calor y la humedad, resistencia a ciertas enfermedades infecciosas, alta eficiencia reproductiva y longevidad, lo cual incrementó su valor como recurso genético (Barrera *et al.*, 2006). Sin embargo, en los últimos treinta años, las poblaciones de ganado bovino y en especial de razas criollas disminuyeron drásticamente, debido a la falta de información del estado genético de dichas poblaciones y por ende de un conocimiento base para el control de las relaciones de parentesco entre los individuos que conlleva con frecuencia a la realización de apareamientos consanguíneos que afectan de forma significativa la variabilidad genética y la productividad de las poblaciones (Novoa *et al.*, 2010). Además de esto, la variabilidad genética en el grupo criollo tiende a disminuir debido en gran parte a la práctica de cruzamientos dirigidos destinados a incrementar principalmente la productividad, hecho que lleva a que este grupo racial sea absorbido por razas especializadas con lo que se pierde la oportunidad de aprovechar los rasgos adaptativos de este tipo de ganado (Bejarano *et al.*, 2012).

En el trópico alto de Nariño, el criterio básico de selección es el volumen de producción, razón que conlleva a la pérdida de diversidad genética con la continua realización de cruzamientos dirigidos al incremento del litro de leche por día, objetivo que se consigue mediante la introducción de la raza holstein (Pizarro, 2009), quien por sus altos volúmenes de producción es la más difundida y utilizada en prácticamente todos los sistemas de lechería especializada llevando a que las poblaciones de criollos disminuyan en esta zona (Sastre, 2003). De esta manera, cruzamientos preferenciales con individuos considerados mayormente productivos están ocasionando una erosión genética en muchas poblaciones (Moreno *et al.*, 2007).

Sin embargo, a partir del 2006 el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural detectó la necesidad de reorientar el proceso selectivo en procura de obtener una mejor calidad composicional de la leche y mayor eficiencia reproductiva, es así como en Colombia ya se observan iniciativas que brindan una mayor remuneración económica a productores de leche cuando presenta una alta calidad y mayor contenido proteico (Moreno *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta ese indicador, la raza criolla a pesar de presentar niveles de producción más bajos tiene un proceso adaptativo importante de resistencia al estrés en climas tropicales y es más eficiente en el uso de los recursos que le ofrece su ambiente, en comparación con otras razas especializadas como la holstein y la jersey (Martínez *et al.*, 2008). Además, su importancia se hizo evidente en estudios previos realizados por el Programa de Mejoramiento Genético de la Universidad de Nariño, en los cuales se evaluó la proteína láctea Kappa-Caseína (CSN3), por medio de herramientas moleculares, evidenciando una mayor calidad composicional para criollos y una calidad menor para holstein (Solarte *et al.*, 2009).

Ante los avances de la genética molecular, los méritos antes descritos podrían conferir a la raza criolla la posibilidad de contribuir en forma estratégica para que los sistemas de producción animal, sobre todo aquellos en los ecosistemas tropicales, sean sustentables (Tewolde, 2007). De ahí que el conocimiento de la diversidad genética se hace fundamental para el mejoramiento genético sustentable y donde un elemento clave para fomentar estrategias hacia su conservación es la caracterización de las razas con el fin de formar un cuadro general de la diversidad genética existente (Alves, 2007).

En este sentido, Hanott y Jianlin (2005) citados por Alves (2007) concluyen que una documentación de la diversidad de los recursos genéticos animales debe ser una prioridad, siendo el principal objetivo el mantenimiento de la máxima diversidad genética con el mínimo incremento posible de consanguinidad por generación. Para ello una de las primeras etapas de un programa de conservación de razas, consiste en la evaluación de su variabilidad genética y la distribución de ésta entre sus poblaciones, así como la posible detección de alelos raros que indiquen la presencia de variantes genéticas únicas (Rusell *et al.*, 2000). Teniendo

en cuenta lo anterior, existe una necesidad de ampliar el conocimiento sobre la diversidad genética de las razas bovinas y en especial del grupo racial “criollo” en el trópico alto de Nariño, pues hasta la fecha, el estudio del estado genético de las diferentes razas en relación a parámetros como frecuencia genética y diversidad genética entre y dentro de las poblaciones de bovinos para el Sur de Colombia es aún insuficiente. (Escobar *et al.*, 2009)

En la actualidad muchos estudios de conservación de razas se basan en los análisis genéticos, a través del estudio de marcadores moleculares de DNA. Entre estos marcadores se cita el uso de los microsatélites o *short-sequence repeat tandem* (SRT), que presentan un elevado polimorfismo en todo el genoma y suministran amplia información sobre la diversidad genética, las fuerzas micro-evolutivas que modifican las frecuencias alélicas en cada población así como el nivel de consanguinidad existente (Galetti 2010 citado por Ayala, 2013), razón por la cual son los marcadores más comúnmente usados en estudios de caracterización genética en ganado (Alves, 2007). Adicionalmente, su estudio permite establecer correlaciones entre la variación genética presente en las poblaciones bovinas y los caracteres de producción evaluados previamente por el Programa de Mejoramiento Genético de la Universidad de Nariño.

Esta investigación se desarrolló con el fin de determinar el estado actual de la diversidad genética de las razas de la especie *Bos taurus* más importantes del Trópico Alto de Nariño, permitiendo cubrir un vacío en el estado actual del conocimiento mediante la disposición de información complementaria para el diseño futuro de programas de selección y mejoramiento, facilitando la dirección de apareamientos y el aprovechamiento de las ventajas adaptativas del criollo, sobre todo en el mejoramiento de los rasgos limitantes de la productividad entre los que se destacan la calidad composicional de la leche, longevidad y fertilidad, logrando un consecuente incremento de la productividad y competitividad pero así mismo, disminuyendo en alguna medida el efecto que la ganadería ejerce sobre el medio ambiente, minimizando las zonas utilizadas para pasturaje y mantenimiento del ganado bovino que ocasionan erosión del suelo y pérdida de la vegetación.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de la diversidad genética de las poblaciones bovinas de la especie de *Bos taurus* del Trópico Alto de Nariño

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estimar la diversidad genética entre y dentro de los núcleos raciales holstein, normando, pardo suizo, jersey y criollo en el Trópico Alto de Nariño.
- ✓ Establecer el grado de absorción del núcleo criollo de la región.

3. MARCO TEÓRICO

La historia del ganado bovino en América comienza 500 años atrás con los viajes de Cristóbal Colón; en ellos se introdujeron a República Dominicana y Haití los primeros animales de origen *Bos taurus* provenientes de la Península Ibérica, los cuales dieron origen a las hoy denominadas razas criollas (Barrera *et al.*, 2006).

En la actualidad, los bovinos criollos lecheros tropicales se encuentran distribuidos desde zonas muy bajas como en el trópico húmedo hasta los ecosistemas Andinos, con evidencia de evolución diferencial para cada caso (Tewolde, 2007). Debido al grado de adaptación que presentan para cada zona en la que evolucionaron, se considera que poseen un conjunto de genes para cada ambiente específico así como un potencial para la producción lechera a base de pastos. Las razas criollas presentan un menor volumen de producción, pero con una mayor calidad (sólidos totales) y resistencia al estrés de los climas tropicales, en comparación con otras razas especializadas (holstein y jersey) que han sustituido paulatinamente a estas nativas con fines productivos y aunque no existen reportes de su aporte a la producción de leche, se considera que su conservación y desarrollo es de vital importancia como proceso productivo alternativo en hatos bovinos del trópico alto (Vilaboa *et al.*, 2012).

3.1. CONCEPTO Y NECESIDADES DE PRESERVACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD

De acuerdo con la es (*Food and Agriculture Organization*), la Organización para la Alimentación y la Agricultura de la ONU, se define la biodiversidad o diversidad biológica, como “la variación de la vida en todas sus formas, niveles y combinaciones, incluyendo la diversidad genética, la diversidad en las especies y la diversidad en los ecosistemas”. Se puede por tanto estudiar la diversidad en todos los niveles: la de especies dentro de ecosistemas, la de razas o poblaciones dentro de especies, o la existente dentro de esas poblaciones, donde se entiende a la diversidad global como la combinación de todas esas fuentes de variabilidad (FAO, 2010).

Aunque en el caso de las especies silvestres existe un interés particular por preservar la biodiversidad fundamentalmente por su valor biológico y porque son importantes para lograr la sostenibilidad de los ecosistemas, las especies domésticas contribuyen a la diversidad en general y en particular a la producción alimenticia para el ser humano. Actualmente, casi dos mil millones de personas dependen del consumo al menos parcial, de animales domésticos para su supervivencia, y un 12% de ellas lo hace casi completamente (Riethmuller, 2003).

Esta diversidad de animales domésticos comprende los recursos genéticos de las especies, razas y variedades que revisten interés agrícola, siendo las razas el componente principal de esta diversidad, principalmente por ser el resultado de diversificación genética dentro de las especies durante la evolución (Martínez, 2008). La diversidad genética de razas domésticas ha permitido que a lo largo de varios siglos se seleccionen animales con una amplia variedad de características que respondan a los cambios del medio ambiente y a nuevas amenazas de enfermedades y a las necesidades cambiantes del mercado. Lo anterior resultó en el desarrollo de las 4500-5000 razas actuales (FAO, 2010). Sin embargo, durante los últimos 50 años, debido a los rápidos cambios en sistemas de producción, fuerzas de mercado y cruces indiscriminados con otras razas, un importante número de razas se han perdido (Martínez, 2008) y cerca del 30% de todas los núcleos de ganado están en peligro de extinción.

La ganadería del mundo, basada en la explotación de unas pocas razas altamente especializadas, disminuye la variabilidad en las razas o líneas altamente productivas que reemplazan de manera progresiva a las razas locales que se encuentran adaptadas a estos ambientes (FAO, 2010). Este es el caso de la especie *Bos taurus* cuya capacidad adaptativa y variedad de razas ofrece alternativas para diversos modelos de producción, lo anterior hace necesario que se establezcan esquemas de evaluación sistemáticos de la capacidad productiva de las poblaciones locales. El conocimiento de su genoma y las innovaciones tecnológicas que lo acompañan como el uso de herramientas de biología molecular (marcadores moleculares) posibilita estudiar la diversidad genética de las poblaciones de esta especie, y la selección directa de animales que lleven la mejor combinación de genes, facilitando de esta forma las decisiones en programas de mejoramiento y selección de genotipos (González, 2011)

3.1.1. Conservación de la diversidad genética del agro

La necesidad de conservar la diversidad genética ha tomado alta relevancia en los últimos años, y estamentos como la FAO, el Convenio de Diversidad Biológica, la Cumbre de Río de Janeiro entre otros coinciden en que dicha conservación debe estar unida a un desarrollo sostenible de los recursos genéticos como estamentos que reflejan la diversidad y a su adecuado uso (Martínez, 2008).

Se hace necesario entonces el conocimiento de los recursos genéticos propios de estas razas, debido principalmente a que se desconocen las necesidades futuras y contar con un reservorio de variación genética que permitirá reforzar la resistencia o la tolerancia encontradas en las poblaciones ganaderas para ser usada como una herramienta adicional de lucha contra las enfermedades infecciosas o parasitarias, variaciones en la disponibilidad y calidad de alimento y/o agua y otros factores limitantes (Ruiz, 2010).

Así, el conocimiento de los recursos genéticos aportados por las razas criollas se hace necesario, pues estos grupos raciales se encuentran adaptados a su entorno local como resultado de selección natural y a pesar de tener capacidades productivas menores en comparación con razas altamente especializadas, son muy eficientes en el uso de los recursos disponibles y se consideran sostenibles a largo plazo; estas razas que evolucionaron con bajos niveles de manejo reproductivo exhiben un alto grado de variabilidad genética, resistencia a enfermedades tropicales y altos niveles de fertilidad (Villasmil *et al.*, 2008). Características no encontradas en animales importados provenientes de razas que se caracterizan por su mayor productividad (Hannote & Jianlin, 2005)

A partir de la década de 1950, los esfuerzos para mejorar la producción en países en desarrollo, basada en la importación de razas mejoradas genéticamente para ser usadas como puras o para el cruzamiento con las razas locales, este proceso asumía que el ambiente de producción se modificaría para alta producción y bajo estrés de manera que las poblaciones debieran adaptarse al nuevo ambiente. Sin embargo, no se consideró la falta de adaptación de las nuevas razas (FAO, 2010), hecho que dio paso a que la sustitución de razas y cruzamientos dirigidos destinados a incrementar principalmente el volumen de producción potenciara la pérdida de características adaptativas de las razas locales y por ende la disminución de variabilidad genética presente en las poblaciones existentes (Barker, 2001).

La pérdida de variabilidad genética puede llevar a una especie o raza a la extinción, por lo tanto una mala política de conservación de la diversidad genética, o en el peor de los casos, la ausencia de ella, podría provocar un progresivo deterioro de la raza. Cuando se trata con poblaciones de tamaño reducido y no se lleva a cabo una estrategia de apareamientos dirigidos para obtener mínima consanguinidad o mínimo parentesco, se corre el riesgo de aumentar los niveles de endogamia. Ésta a su vez provoca que haya un descenso en los niveles reproductivos y disminuya la tasa de crecimiento de la población (Martínez, 2008). De allí que el mantenimiento de la diversidad sea un objetivo prioritario en los programas de conservación (Fernández *et al.*, 2004). Poseer recursos genéticos de poblaciones genéticamente heterogéneas garantiza la adaptación y viabilidad de una especie o una raza a entornos de producción variables, razón por la que la conservación de la diversidad genética se convierte entonces en una salvaguarda frente a cualquier reto adaptativo proveniente de alteraciones en las circunstancias de producción, manejo y supervivencia de las especies domésticas (Hannote *et al.*, 2005).

3.1.2. Estrategias para la conservación de razas bovinas criollas en Colombia

El cruce absorbente de razas llevó a que hace aproximadamente 60 años se hiciera la sustitución completa de bovinos criollos en Colombia, esto debido a

que las razas de los países industrializados se consideraban más productivas, pero sin tener en cuenta que estas razas especializadas no se encontraban adaptadas a las condiciones ambientales de la región Ecuatorial del país, hecho que les impidió sobrevivir bien en los climas tropicales (Ruiz, 2010). Lo anterior llevó a que en 1994, Colombia se comprometiera a conformar la creación de bancos de germoplasma con fines de recuperación y mejora de las razas bovinas criollas apoyando su conservación y uso (Anzola, 2002 citado en Ruíz, 2010). En años recientes se ha desarrollado el Programa Nacional de Fomento de Bovinos Criollos que promueve la utilización de las razas de bovinos criollos adaptados al clima colombiano, promoviendo así la cría de estas razas en el país (Álvarez *et al.*, 2009).

3.2. RECURSOS ZOOGENÉTICOS Y RAZAS

Los recursos zoogenéticos se definen como aquellas especies animales usadas en la producción de alimentos y la agricultura (Rivas *et al.*, 2007). Turton en 1974 definió una raza como un grupo homogéneo, subespecífico de ganado doméstico con características externas definibles e identificables que les permiten ser separados por evaluación visual de otros grupos definidos similarmente dentro de la misma especie, o como un grupo homogéneo donde la separación geográfica de los grupos fenotípicamente similares ha llevado a la aceptación general de su identidad separada (Barker, 2001). Por su parte, la FAO en 2010 definió una raza como un grupo subespecífico de ganado doméstico con características externas definibles e identificables que permiten separarlo por inspección visual de otros grupos definidos de manera semejante dentro de la misma especie (FAO, 2010).

Las definiciones de raza en el contexto de los países desarrollados han incluido diferentes conceptos como el de “animales que comparten una pauta común de uso, un determinado grado de uniformidad en su fenotipo y acervo génico común”; y el de “grupos intraespecíficos diferenciados, cuyos miembros comparten características particulares que los distinguen de otros grupos” (FAO, 2010). Sin embargo, de acuerdo con Jay Lush no existe una definición perfecta, puesto que una raza ha sido considerada como un grupo de animales domésticos, de acuerdo a lo consensuado entre los criadores (Lush, 1994), donde el problema está en el límite que proponen los ganaderos y los técnicos que lo reconocen y se han propuesto diferentes magnitudes de identidad entre grupos de animales a distintos niveles en una misma especie (Sastre, 2003).

Por otro lado, en muchas regiones en desarrollo, la definición de raza se ha hecho más difícil, debido a que las poblaciones que se aíslan del resto, ya sea por razones geográficas, ecológicas o culturales, tienden a diferenciarse como consecuencia de la selección natural y artificial, así como por la deriva genética. Entonces, los nombres utilizados para distinguir poblaciones de ganado no

necesariamente corresponden a la diversidad genética subyacente e incluso en muchos casos los animales no corresponden a ninguna raza reconocida, aunque puede haber términos locales que se refieran a poblaciones distintas. Cuando resulta difícil distinguir poblaciones genéticamente diversas, los estudios moleculares pueden contribuir a la definición de razas separadas y grupos de razas (Alderson, 2003).

Así entonces, cada raza ha evolucionado a través de mutación, deriva genética y a través de adaptación separada con diferentes presiones de selección impuestas por el clima, nutrición variable, enfermedades endémicas, parásitos y criterios impuestos por el hombre denominado selección artificial (Alderson, 2003). El significado de razas no es solo su identidad separada; cada una comprende un único set de combinación de genes y cada una tiene una adaptabilidad específica (Barker, 2001).

3.2.1. Flujo de los recursos zoogenéticos y sus repercusiones en la diversidad

El flujo de genes definido para las especies domésticas, como el movimiento e intercambio de razas de animales y germoplasma, se ha producido desde hace mucho tiempo en las especies ganaderas y son consecuencia de diferentes factores que incluyen consideraciones culturales, militares, organizativas, de instituciones políticas, tecnológicas, de investigación; cuya importancia relativa ha variado durante el curso de la historia. Sin embargo, la información disponible de como se ha dado este flujo sigue siendo superficial e incompleta (Mergenthaler, 2006).

Estos flujos pueden aumentar o reducir la diversidad, el tipo de repercusión depende de diferentes factores, como la adecuación medioambiental del país receptor, o las estructuras organizativas tanto del país receptor como del emisor (FAO, 2010). Durante las primeras fases del flujo de genes que abarcan el periodo de inicio de la cría de ganado en la prehistoria hasta mediados del siglo XX, el flujo génico generalmente aumentaba la diversidad. Sin embargo, durante las últimas cuatro o cinco décadas, la evolución y la expansión de la producción de ganado intensiva y la exportación de sistemas de producción completos han conducido a la reducción de la diversidad mediante la sustitución a gran escala de las razas locales por una pequeña cantidad de razas prósperas mundialmente (Shrestha, 2005).

Dichas razas suelen ser de origen europeo e incluyen los núcleos holstein y jersey; este proceso se encuentra en un estado avanzado en Europa y América del Norte, pero ahora se está repitiendo en muchos países en desarrollo que hasta el momento habían conservado un gran número de razas locales (Tisdell, 2005). Cuantificar las repercusiones de este proceso ha resultado difícil en gran parte debido a que no se han recopilado los datos necesarios.

En definitiva, la progresiva sustitución de las razas locales se acelerará en muchos países en desarrollo a menos que se tomen medidas especiales para su conservación, proporcionando a los criadores de ganado el apoyo adecuado. El modo en que el flujo de genes afectará la diversidad en el futuro, dependerá de los marcos político y legislativo que se encuentren en proceso (FAO, 2010).

3.2.2. Características fenotípicas de las razas bovinas del Trópico Alto de Nariño

El ganado bovino lechero del Trópico alto de Nariño comprende diferentes razas que han sido rentables productivamente, y que se han venido utilizando en los últimos años en las fincas ganaderas presentes en el departamento. A continuación se describen las características más importantes de las principales razas lecheras de la región:

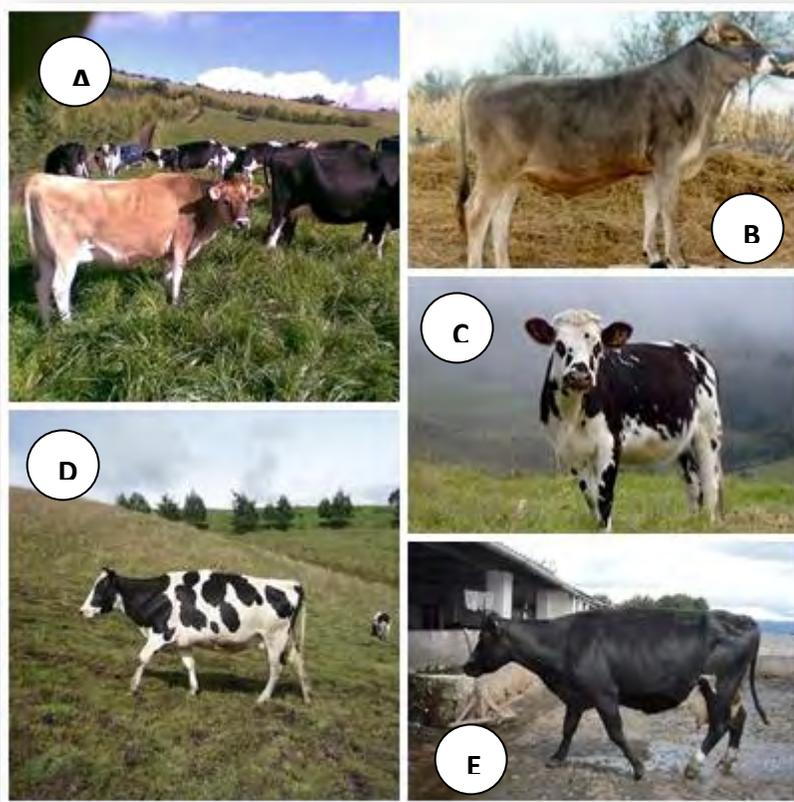
Tabla 1. Descripción fenotípica de las razas lecheras del Trópico Alto de Nariño

Raza	Origen	Descripción fenotípica	Capacidad productiva	Composición de leche	Situación en el trópico alto de Nariño
Holstein	Holanda: Frisia occidental y país bajo del Norte o North Holland	Grande, elegante y fuerte, peso promedio de 650 Kg. Pelaje blanco y negro o blanco y rojo (Figura 1)	6570.1 L de leche por lactancia de 305 días	Pobre en grasa y proteína (3.5% en promedio), comparada con otras razas	91.23% de las poblaciones absorbidas por esta raza sobre núcleos criollos locales, con rasgos fenotípicos predominantemente holstein
Normando	Península de Normandía en el norte de Francia	Grande, con buena capacidad torácica y abdominal, pelvis larga y ancha, ligeramente inclinada, línea superior, recta y muscular y sólidos aplomos que soportan el conjunto (Figura 1)	4600 L de leche por lactancia de 305 días	Proteínas más aptas para la transformación quesera, permitiendo rendimientos en queso superiores entre un 15% y un 25%	Es la raza con mayor número de ejemplares después de la Holstein con introducción notoria en la última década, con objetivo de mejorar el contenido proteico, la calidad composicional de la leche y la fertilidad
Pardo Suizo	Alpes suizos	Mediana con pesos de hasta 650Kg en hembras y 1.000Kg en machos. Pelaje característico de color café parduzco que varía de habano claro hasta el café oscuro (Figura1).	5185 L de leche por lactancia de 305 días	El alto contenido de grasa y proteína de la leche, permite elaborar subproductos de alta calidad, como quesos, yogurt, mantequilla con 3.98% de grasa y 3.43% de proteína	Son muy pocos los hatos que conservan núcleos puros pardo suizo. El mestizaje con la holstein es bastante común en la zona.
Jersey	Isla Jersey en el canal de la Mancha	Pequeña, con peso promedio en la madurez entre 350-430 Kg. Sus colores van	5950 L de leche por lactancia de 305 días	Alto contenido de grasa, proteínas y sólidos totales.	Existe un núcleo pequeño de explotación lechera, lo que genera una base de datos reducida.

		desde el bayo claro, pasando por el marrón, hasta el casi negro, aceptándose las manchas (Figura1).			
Criollo	Se incluyen los animales que comercialmente no se consideran una raza pura o mestiza	Negra, pequeño, en comparación a las razas europeas y el sistema mamario es de menor tamaño, con malas inserciones anteriores y posteriores y pezones de tamaño variable (Figura1).	Marcadamente inferior	No evaluado	Se presume que los núcleos han sido absorbidos por la raza Holstein.

*Fuente: Solarte *et al.* (2009)

Figura 2. Razas presentes en el Trópico Alto de Nariño. A. Jersey, B. Pardo Suizo, C. Normando, D. Holstein, E. Criollo. Fotos tomadas por el grupo de Mejoramiento Genético Animal, Universidad de Nariño, 2010.



3.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA MOLECULAR

La caracterización genética molecular permite el análisis de polimorfismos o variaciones que se dan en determinadas moléculas proteicas y en marcadores de DNA, y que permiten medir la variación genética a nivel poblacional ya sea entre pares de poblaciones o dentro de las mismas, además de determinar relaciones genéticas entre ellas. Debido al bajo nivel de polimorfismo observado en las proteínas, lo cual conduce a una aplicabilidad limitada en los estudios de diversidad, los marcadores moleculares de DNA son los más escogidos para hacer caracterización genética molecular (Martínez, 2008).

Este proceso comprende la toma de muestras sobre el terreno de material biológico, extracción del DNA de las muestras, almacenamiento, ensayos de laboratorio (p. ej., genotipificación o secuenciado), análisis de los datos y mantenimiento de una base de datos de información genética molecular (Martínez, 2008).

De acuerdo con la FAO en 2005, los resultados de los estudios de caracterización molecular son necesarios para determinar los parámetros de diversidad dentro de una raza y entre razas, proporcionar información sobre relaciones evolutivas (árboles filogenéticos) y determinar centros de origen y rutas migratorias, identificar relaciones de parentesco y genéticas (p. ej., huella de DNA) dentro de las poblaciones y apoyar la mejora genética de las poblaciones animales mediante el uso de marcadores.

3.3.1. Marcadores moleculares y sus aplicaciones

Los marcadores moleculares o genéticos son *loci* que presentan características detectables que difieren de un individuo a otro dentro del DNA, se presentan en el individuo durante toda su vida (Ruiz, 2010) lo que constituye una ventaja para realizar análisis genéticos pues se encuentran presentes en el mismo sitio del genoma generación tras generación (Uffo *et al.*, 2002). Así mismo, pueden ser considerados como un conjunto de técnicas que permiten visualizar la presencia de variantes alélicas que se producen por mutaciones y se establecen durante el tiempo evolutivo (Ayala, 2013), y están enfocadas a determinar la organización de la estructura genética en las poblaciones o individuos de interés (Ruíz, 2010).

Entre las aplicaciones de los marcadores moleculares en mejoramiento genético se pueden diferenciar tres categorías: 1) las de corto plazo como son la identificación y discriminación de genotipos, 2) las de mediano plazo que permiten cuantificar la variabilidad genética a nivel de secuencias de DNA y su correlación con la expresión fenotípica en mapeo genético; y 3) las de largo plazo donde la información generada es integrada en las metodologías de selección y recombinación (Martinez, 2008). Gracias al uso de marcadores moleculares se ha

facilitado la construcción de mapas genéticos y la clonación de genes que pueden ser usados en mejoramiento.

3.3.2. Marcadores microsatélites o STR

En la actualidad se dispone de diversos tipos de marcadores moleculares para evaluar la diversidad genética en animales, y los más usados son los microsatélites que son secuencias cortas que se encuentran repetidas en tándem (10-50 veces) e intercaladas a lo largo de todo el genoma (Litt y Luti, 1989), este tipo de marcadores son altamente polimórficos debido a la longitud de la secuencia repetida, además se clasifican dentro de los marcadores codominantes lo que significa que son bastante informativos pues en ellos puede distinguirse el patrón homocigoto del heterocigoto (Ayala, 2013) y son más eficientes en estudios de genética de poblaciones porque permiten detectar variaciones directas en el DNA, son estables y no presentan caracteres pleiotrópicos (Piñero, 2008).

Se ha estimado que la tasa de mutación en microsatélites varía entre 10^{-2} y 10^{-5} por generación, con un alto grado de polimorfismo que se explica por acumulación de mutaciones producidas por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación de DNA (Romero, 2009).

Dentro de las desventajas en el uso de microsatélites las más usuales son errores en la genotipificación, que pueden generarse en cada paso del muestreo desde la extracción de DNA hasta el análisis estadístico. Uno de los errores más frecuentes es la no amplificación de alelos o alelos nulos también conocida como “dropout”, causada por sustituciones, deleciones o inserciones en los sitios de unión de los cebadores (Ayala, 2013). La falla estocástica de la amplificación de un alelo lleva a que los individuos heterocigotos aparezcan como homocigotos, que se traduce en la presencia de un exceso de homocigotos en los análisis de datos. La situación anterior también puede verse más frecuentemente en *loci* con alelos de tamaño muy diferente, este efecto es producido debido a que uno de los alelos (generalmente el más pequeño) inicia la amplificación antes que el otro, llevando a visualizar un alelo pequeño con un pico más alto que el alelo grande en los resultados del electroferograma o a que el alelo grande no sea visible cuando la cantidad de DNA es baja. Puede darse también amplificaciones inespecíficas que muchas veces se malinterpretan como alelos verdaderos llevando a inferencias erróneas de los resultados (Quiroz, 2007).

Sin embargo, el empleo de los marcadores microsatélites en el estudio de poblaciones de ganado criollo han revelado altos niveles de polimorfismo y diferencias en las medidas de diversidad genética para cada población considerada, lo que contribuye al conocimiento de la estructura genética de las poblaciones de razas taurinas y constituye una valiosa herramienta para el diseño de planes de conservación (Villasmil, 2008; Moreno, 2001).

3.3.2.1. Técnicas para la caracterización alélica de STR

Se distinguen tres etapas usadas para la caracterización de microsatélites, la primera de ellas es la extracción de DNA cuyo protocolo depende del tipo de tejido que se use. Este proceso consta de 2 fases, una de lisis celular y solubilización del DNA y otra de eliminación de productos acompañantes también llamada purificación (Martinez, 2008). A continuación en la segunda etapa y una vez obtenido el DNA molde los microsatélites son amplificados mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos complementarios a las secuencias únicas que flanquean la secuencia repetida (secuencia “blanco”) que además son muy conservados entre individuos de la misma especie e incluso de diferentes especies. Cada *locus* es analizado individualmente al utilizarse el par de cebadores construido específicamente para su amplificación (Mburu & Hanotte, 2005).

La última etapa que consiste en identificación de variantes alélicas de microsatélites puede hacerse de varias formas, una de ellas es la electroforesis en gel de poliacrilamida que permiten una resolución de un solo nucleótido, otra técnica que se está usando en la actualidad es la secuenciación que permite determinar las secuencias y tamaños de fragmentos cuantificando la fluorescencia emitida por cebadores marcados con fluorocromos (Martinez, 2008).

3.4. DIVERSIDAD GENÉTICA

Se define diversidad genética como toda la variación biológica hereditaria acumulada durante el proceso evolutivo gracias a acumulación de mutaciones en las secuencias nucleotídicas de DNA, y que a su vez se ve influenciada por fuerzas evolutivas que pueden disminuir o aumentar la variación (Freenan y Herron, 2002 citados en Ayala, 2013). La diversidad genética tiene como función mantener un reservorio de condiciones de variación que permitan a una especie hacerle frente a cambios en el medio en el que se desarrolla, esta capacidad se traduce en adaptación y supervivencia; y cambios que dan origen a un proceso evolutivo que permite que los genes implicados contribuyan a la diversidad genética total. Así, mientras que los genes encargados de procesos bioquímicos fundamentales se conservan y muestran poca variación, cuando en una especie existe una gran variabilidad genética las posibilidades de reponerse a una crisis son mayores.

Con la domesticación la diversidad genética se ve incrementada en principio, formando razas en cada región agroecológica, pero en el momento en que los sistemas de producción se hacen uniformes se requieren individuos más parecidos, por lo que los programas de selección son la principal causa de la pérdida de diversidad genética dentro de la población, esto significa que la variación disminuye y por lo tanto también lo hace la capacidad de adaptación de la especie (Quiroz, 2007).

3.4.1. Medidas de diversidad genética

Tradicionalmente los marcadores moleculares se han utilizado para calcular una serie de parámetros relacionados con la diversidad, tanto la existente dentro de una raza como la que se presenta entre distintas razas. Son indicadores de la diversidad dentro de razas (Martínez *et al.*, 2008).

3.4.1.1. Cálculo de frecuencias alélicas

Se puede definir frecuencia alélica como el cociente entre el número de alelos iguales de una población y el número total de alelos. El cálculo de las frecuencias alélicas se hace por recuento directo de los alelos presentes, asumiendo que la observación de un solo alelo corresponde a un homocigoto, por lo tanto que no hay alelos nulos. Asumiendo que existe Equilibrio Hardy-Weinberg, la varianza de una frecuencia alélica puede describirse mediante la expresión binomial:

$$\sigma_x^2 = \frac{x(1-x)}{2n}$$

x : frecuencia alélica y n : número de individuos de la muestra. El error estándar (SE) de la frecuencia alélica se obtiene mediante la raíz cuadrada de la varianza (Nei 1987). Para una frecuencia dada, el error estándar disminuye a medida que aumenta el tamaño de la muestra, pero se acerca a cero asintóticamente a partir de unos 30 individuos. Se puede considerar, por tanto, que un tamaño óptimo de muestra sería de 30 a 60 individuos (Martínez, 2008).

3.4.1.2. Contenido de información polimórfica (PIC)

El contenido de información polimórfica (*PIC*) es un parámetro introducido por Botstein y colaboradores en 1980, como un indicador de la calidad de un marcador en estudios de cartografía génica. Su valor depende del número de alelos y de la distribución de frecuencias de tal forma que se expresa como:

Los marcadores con valores de PIC superiores a 0.5 se consideran muy informativos, los que tienen valores entre 0.25 y 0.5 medianamente informativos y los que muestran valores inferiores a 0.25 poco informativos. El cálculo de este parámetro refleja el polimorfismo detectado lo que permite hacer una valoración de la calidad de un marcador para estudios genéticos. Sin embargo, dada su sensibilidad al número de alelos y de sus frecuencias, la información que aporta no es suficiente para basar en ella la elección de un marcador u otro.

3.4.2. Heterocigosis

Se trata de una valoración de la medida de diversidad genética medida como la frecuencia media de individuos heterocigotos por *locus*.

3.4.2.1. Heterocigosidad observada (H_o)

Es la proporción de individuos heterocigotos existentes para un determinado marcador, o su promedio para un conjunto de marcadores observada en una muestra de una población. Puede calcularse directamente a partir de los genotipos encontrados en la población para todos los *loci* (\hat{H}_o), o por recuento directo (H_o).

3.4.2.2. Heterocigosidad esperada o Diversidad genética (H_e)

Es la probabilidad matemática de que 2 alelos tomados al azar de la población sean diferentes (Crow y Kimura, 1970 citados por Rosero, 2010). En una población en equilibrio Hardy-Weinberg la frecuencia de heterocigotos está dada por $2pq$. Es equivalente a la Heterocigosidad observada asumiendo que las poblaciones se encuentran en equilibrio.

Este estadístico es muy informativo ya que indica la riqueza genética que posee una población, o una especie independientemente de cuál sea el sistema de reproducción o de la acción de la selección natural sobre las frecuencias de los genotipos, además de que puede revelar si durante la historia de la población ha existido algún evento que le haya perdido variabilidad genética (Villasmil *et al.*, 2008).

3.4.3. Equilibrio Hardy-Weinberg

El Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) establece teóricamente que: en una población de gran tamaño donde los individuos se aparean al azar, y todos son igualmente viables y fecundos, las frecuencias genotípicas no cambian después de una generación y que las frecuencias genotípicas de un *locus* pueden representarse en función de las frecuencias alélicas (Ayala, 2013). Esto significa que una población diploide está en HWE para un *locus* genético polimórfico si la proporción de genotipos observados en la población puede ser completamente definida por las frecuencias alélicas del *locus* en cuestión. En otras palabras, los alelos del *locus* están distribuidos al azar en la población y no existe asociación entre el par de alelos que un hijo recibe de sus padres.

Todo lo anterior teniendo en cuenta que la población se caracterice por la ausencia de fuerzas evolutivas como selección, deriva génica, flujo génico y mutación. En los estudios sobre variación genética debe determinarse si hay desviaciones significativas del HWE en los *loci* estudiados, pues si la proporción de genotipos para un solo *locus* no está en HWE, se puede atribuir a que ha

habido selección que ha afectado dicho *locus* o a la existencia de alelos nulos, pero si son varios *loci* independientes los que se desvían significativamente del HWE, este fenómeno puede deberse a que dentro de la población existen subdivisiones, a que existe migración o flujo de genes desde una fuente externa o se están produciendo apareamientos dirigidos (no aleatorios) (Bjornstad *et al.*, 2002).

La diferencia entre la heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada calculada a partir de las frecuencias alélicas asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg puede usarse para detectar desequilibrios en la estructura de una población. No obstante, un método mucho más exacto es comparar la distribución de genotipos observados con la distribución esperada si la población estuviera en HWE. Cualquier desviación significativa indicará que la población está subdividida, que existe una consanguinidad significativa o que existe un flujo de genes de otra población. Estas circunstancias pueden ser estudiadas usando test exactos o procedimientos de proporción de verosimilitud. Estos análisis son necesarios debido al gran número de alelos de los microsatélites y al elevado número de posibles genotipos (Quiroz, 2007).

3.4.4. Estructura de la población

Se habla de que dos poblaciones se encuentran estructuradas cuando existe diferencia en las frecuencias alélicas, esta diferenciación puede deberse a que la selección natural favoreció diferentes genotipos en diferentes poblaciones o a que procesos aleatorios en la transmisión de alelos de una generación a otra o por diferencias en las frecuencias alélicas de los fundadores de las poblaciones (Hartl y Clark, 1997 citados en Ayala, 2013). Para medir la estructura de una población se puede usar el estadístico F_{ST} que se basa en el modelo mutacional de alelos infinitos o el R_{ST} . Que al usar el modelo mutacional paso a paso se amolda más al uso de microsatélites.

3.4.4.1. Índices de Fijación

Para evaluar el efecto que tiene la subdivisión de las poblaciones en la estructura genética de las mismas se han desarrollado varios métodos y el más utilizado es el de los estadísticos F propuestos por Wright (1951), quien define tres coeficientes F distintos, basados en un modelo de un *locus* con dos alelos, relacionados directamente con los tres niveles que presenta una población subdividida, es decir, distribuyendo la variación genética a nivel poblacional (T), de subpoblaciones (S) y a nivel individual (I) (Hartl y Clark, 1989; Hedrick, 2000 citados en Colin, 2006).

El índice F_{ST} , conocido como índice de fijación subpoblacional, mide la diferenciación genética entre las poblaciones. Varía entre 0 (no existe diferenciación) a 1 (diferenciación completa, fijación de alelos. Wright (1978) sugirió unas pautas generales para la interpretación del F_{ST} , de acuerdo con las

cuales un F_{ST} mayor a 0.25 indicaría una diferenciación muy grande, donde se estaría presentando un proceso de especiación (Cañón *et al.*, 2001). Puede ser usado también el índice G_{ST} propuesto por (Nei, 1973), que se define como la proporción de diversidad genética que se encuentra entre poblaciones y se considera análogo a F_{ST} cuando se estudian *loci* multialélicos.

F_{IS} , también llamado coeficiente de endogamia, mide la reducción en la heterocigosis de un individuo debido al apareamiento no azaroso dentro de su subpoblación, es decir, da una medida del nivel de endogamia dentro de las subpoblaciones. Varía entre -1 (Exogamia) a $+1$ (Endogamia). Un valor de 0 indicaría el estado de panmixia donde se cumplirían todos los supuestos del equilibrio Hardy – Weinberg.

El índice F_{IT} denominado como coeficiente de endogamia total de un individuo, mide la reducción en la heterocigosis de ese individuo con respecto a la población total. También es usado el estadístico R_{ST} de Slatkin (1995), específicamente creado para medir la heterogeneidad genética con microsatélites (Slatkin *et al.*, 1996).

3.4.5. Distancias genéticas

Permiten medir el grado de diferenciación existente entre las distintas poblaciones, razas o especies que se tienen en el momento actual; así mismo, se puede además hacer inferencia de la historia filogenética de la especie. De esta manera, se puede definir una distancia genética entre pares de unidades, de forma que cuanto mayor sea la distancia entre ellas, más separadas estarán en términos evolutivos, más distintas serán genética y (presumiblemente) fenotípicamente y mayor será la diversidad entre razas de la que se dispondrá (Barker, 2001).

Medidas de distancia basadas en el estadístico F_{ST} de Wright son más apropiadas para procesos evolutivos a corto plazo como es el caso de divergencia entre variedades, especialmente si el tamaño efectivo de las poblaciones varía en el tiempo y entre razas (Reynolds, 1983; Vega Pla, 2001 citados en Sastre, 2003).

4. ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN

La selección genética en la especie bovina está basada en la mejora de caracteres controlados por múltiples *loci*, seleccionando así los individuos más destacados de cada raza y con mejores atributos para la realización de cruzamientos dirigidos por inseminación (Uffo *et al.*, 2006). Los avances en estudios de la importancia que tienen algunos genes sobre caracteres productivos permiten predecir con objetividad cuales características pueden usarse en el futuro.

Los estudios genéticos en bovinos se basaron inicialmente en el cariotipo (Basrur y Moon, 1967), seguido de los mapas de ligamiento y gracias al avance tecnológico se hizo la caracterización del genoma completo, que permite identificar animales con mayores aptitudes para diversas características de interés económico, incluyendo la calidad de la leche.

Estudios que describen la diversidad genética de las poblaciones bovinas, las cuales son caracterizadas fenotípica y genéticamente para priorizar su conservación (Talle *et al.*, 2005 citado en Piñero, 2008) cobraron relevancia en años recientes. Los estudios de diversidad genética por lo general, tienen como objetivo estimar parámetros que permitan analizar la variabilidad genética dentro y entre poblaciones, logrado a través de la determinación de las frecuencias alélicas por población y por *locus*, el cálculo de la heterocigosidad observada y esperada, la determinación de las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos y los análisis de estructura de la población (Ginja, 2002).

Los primeros marcadores desarrollados a finales de los 70 se basaron en la identificación de proteínas (antígenos e isoenzimas), con ello se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, razas y poblaciones de distinto origen geográfico (Rodríguez *et al.*, 2002) permitiendo la realización de estudios para detectar hibridación de *Bos taurus* y *Bos indicus* (Ceriotti *et al.*, 2003 citado por Valiente, 2007). Un uso de importancia de los polimorfismos proteicos es su uso como marcadores genéticos de características de importancia económica, como la β -caseína y la β -lactoglobulina (Clutton, 1999)

Las técnicas modernas de biología molecular permiten el desarrollo de otros métodos de detección del polimorfismo genético directamente sobre el DNA. En el 2004, la FAO evaluó el estado de la investigación en genética molecular de bovinos y encontró la utilización de varios tipos de marcadores moleculares principalmente los microsatélites (88%), los bioquímicos (25%), grupos sanguíneos (21%) RFLP (17%), AFLP (8%) y SNP (13%). Además de los citados

anteriormente, otros marcadores se consideran herramientas fundamentales para el conocimiento de genes de interés económico como los denominados *locus* de carácter cuantitativo o QTLs (Rodríguez *et al.*, 2002) de aplicación directa en los programas de mejora a través de la selección asistida por marcadores (Brunner *et al.*, 2003; Lara *et al.*, 2002)

Los marcadores moleculares se emplean en trabajos muy diversos como en la caracterización racial estableciendo relaciones entre diversas razas bovinas (Cañón *et al.*, 2001); la detección de posibles “cuellos de botella” (Spencer *et al.*, 2000), consanguinidad (Pariset *et al.*, 2003), migración (Hanotte *et al.*, 2002), filogenia (MacHug *et al.*, 1997); y estudios relacionados con el tamaño efectivo de las poblaciones (Hayes *et al.*, 2003). También han resultado muy útiles en la selección asistida por marcadores y la generación de mapas cromosómicos (Zhang *et al.*, 2004).

A partir del estudio realizado por Vaiman *et al.*, (1994) que está basado en el cariotipo del genoma bovino, se han dado pasos a la utilización de marcadores moleculares para conocer el estado genético de poblaciones bovinas y su relación con características productivas. La ventaja que tiene el uso de los marcadores moleculares, en estudios de variación genética, es su carácter multiloci que permite estimar la diferenciación genética entre y dentro de las poblaciones bovinas (Ciampolini *et al.*, 2006), flujo génico a través del número de migrantes (Nm) e identidad genética (Gómez *et al.*, 2008), desequilibrio de ligamiento y correlaciones entre las distancias genética y geográfica (Cañón *et al.*, 2001; Rusell *et al.*, 2000). En 1995, Kemp y colaboradores (Ruiz, 2010), reportaron un panel de nuevos marcadores microsatélites polimórficos para las especies bovina, ovina y caprina, identificando un grupo de 18 marcadores polimórficos en las tres especies que cubren 14 cromosomas bovinos, este grupo de marcadores resultaron adecuados para el análisis de distancias genéticas y control de parentesco. Varios *loci* microsatélites se han identificado en varias especies de animales domésticos, y continuamente se han encontrado nuevos, más de 120 han sido mapeados en bovinos y más del doble de estos son conocidos (Zhang *et al.*, 2004).

Durante varios años, se publican investigaciones acerca de la relación entre diferentes razas bovinas empleando microsatélites. MacHugh y colaboradores (1997), analizaron 20 microsatélites en diferentes poblaciones bovinas africanas, europeas y asiáticas, y encontró que 10 de esos marcadores evaluados presentaron diferente distribución alélica cuando fueron analizados en poblaciones de raza cebú y taurus, mostrando alelos únicos presentes en diferentes frecuencias, en estas dos poblaciones. La presencia de alelos cebú específicos, refleja una amplia diferencia entre poblaciones taurinas y cebuínas, lo que confirmó la hipótesis del origen separado de domesticación para estos dos grupos (Loftus *et al.*, 2004 citado por Ruiz, 2010).

En el 2002, Hansen y colaboradores, realizaron un estudio de diversidad genética en varias razas canadienses (pardo suizo, holstein y jersey), mediante 15 microsatélites, en donde el promedio de alelos por *locus* fue de 6 en las razas evaluadas, excepto en pardo suizo que presentó un valor de 5, lo que sugiere según la FAO que junto con los valores de heterocigosidad, estos marcadores son adecuados para estimar distancias genéticas.

Maudet, Luikart, y Tarbelet (2002) emplearon 32 microsatélites, para estudiar la variabilidad genética en seis razas nativas francesas y una raza foránea (holstein). Dentro de los resultados obtenidos se observó un déficit marcado de heterocigosidad observada en los individuos pertenecientes a la raza holstein, indicativo de la intensiva selección humana por la utilización de inseminación artificial y el reducido número de reproductores de esta raza en Francia (Ruiz, 2010).

En el año 2006 Cervini y colaboradores realizan un estudio sobre la variabilidad genética de 10 marcadores microsatélites en la caracterización de una raza brasilera de *Bos indicus*. En este estudio, las frecuencias alélicas revelaron que en la muestra analizada los marcadores no fueron igualmente polimórficos y las probabilidades de exclusión y el contenido de información polimórfica contenido en el mismo *loci* en esta raza fueron menores que en las razas de *Bos taurus*. Se destacan además significativas desviaciones del equilibrio Hardy–Weinberg para seis *loci*, causada por la deficiencia de heterocigotos, hecho que responde a diferentes factores, incluyendo alelos nulos, apareamiento selectivo, efecto Wahlund, selección en contra de los heterocigotos, endogamia o una combinación de estos (Cervini *et al.*, 2006)

En 2007, Quiroz, realizó una caracterización genética de los bovinos criollos mexicanos y su relación con otras poblaciones bovinas, estudiando 27 microsatélites y determinó la variabilidad intra e inter poblacional y las relaciones genéticas entre poblaciones. Los resultados demostraron que los bovinos criollos mexicanos muestran una estructura genética común que podría considerarse como uniforme, con algunas diferencias en cada región geográfica, producto de la introgresión de otras razas, que a pesar de ello, no los hace perder su identidad. Las razas mexicanas se muestran especialmente cercanas genéticamente a las poblaciones criollas latinoamericanas estudiadas (Quiroz, 2007).

Moreno y colaboradores (2001) iniciaron el estudio de relaciones filogenéticas y diversidad genética en razas criollas colombianas. Uno de los primeros estudios se realizó para determinar la variabilidad genética presente en siete razas criollas colombianas junto con la raza cebú, mediante el empleo de 5 marcadores moleculares tipo microsatélite. El valor de la heterocigosidad promedio fue de 0.57 y el número de alelos fue de 8.8, siendo valores altos comparados con otras poblaciones de otros lugares del mundo. El árbol filogenético construido muestra dos grandes grupos, uno formado por la raza

Casanareño y cebú y otro por las demás razas estudiadas. Esto puede explicarse por un posible mestizaje entre las razas cebú y Casanareño, debido a que no se conservan los núcleos de animales considerados como puros.

En el año 2012, Bejarano y colaboradores determinaron la variabilidad genética de la raza Romosinuano distribuida en diferentes zonas geográficas de Colombia analizando 12 marcadores microsatélites donde los índices de fijación indicaron un déficit de heterocigotos. En general se encontró que existe una alta variabilidad genética entre las poblaciones, pero valores moderados de homocigosidad dentro de ellas, por lo que indican que es necesario dar más relevancia al manejo de este flujo genético para reducir la consanguinidad (Bejarano *et al.*, 2012)

Estudios realizados en el trópico alto de Nariño determinaron que la raza predominante en la región es la holstein, donde el 8.77% de las fincas tienen animales con algún registro en la Asociación Holstein de Colombia y el 91.23% restante corresponde a los predios constituidos por animales absorbidos por dicha raza sobre núcleos criollos locales, con rasgos fenotípicos predominantemente holstein y comercialmente considerados como tales. Además, se han llevado a cabo estudios de identificación molecular de los genotipos de las fracciones proteicas de la leche en hembras *Bos taurus* y su relación con las variables productivas (Producción de leche, % de grasa, % de proteína, menor tiempo de coagulación, consistencia de la cuajada), reproductivas y de rendimiento quesero, utilizando la técnica PCR-RFLPs para la amplificación de los genes de las fracciones proteicas $\alpha 1$ -Cs, $\alpha 2$ -Cs y β -Cs. La información molecular de las caseínas permitió establecer que para la fracción Alfa-S1 el genotipo BB asociado con la característica producción de leche fue el de mayor frecuencia, mientras que para la fracción Alfa-S2 el genotipo AA presentó una frecuencia de 93.7%, valor cercano a la fijación y en cuanto a la Beta-caseína, el genotipo más abundante fue el AA con una frecuencia de 85.1%, asociado también con producción de leche. Además el análisis molecular de varianza indicó para la raza holstein, ausencia de estructura genética y valores altos de endogamia hecho que evidencia alto parentesco entre individuos (Solarte *et al.*, 2009).

Adicionalmente se han determinado las frecuencias alélicas del gen kappa caseína (K-Cs) en la población bovina lechera del trópico alto de Nariño mediante la técnica PCR-SSCP, encontrando para la raza holstein una frecuencia superior del alelo A asociado con alta producción y baja calidad composicional de la leche especialmente en contenido proteico, con respecto a la frecuencia del alelo B al que se asocia un comportamiento contrario al del alelo A. La alta frecuencia del alelo A en los distritos de Pasto y Guachucal se explica por la selección indirecta a favor de dicho alelo, puesto que en estas zonas, desde hace varios años el criterio selectivo de mayor importancia es el volumen de leche por lactancia. En el distrito de Pupiales la situación fue algo diferente, ya que se observó una menor frecuencia del alelo A. Estos resultados se explican, en parte, por el tipo de animal

predominante en este distrito, que corresponde al mestizo entre holstein y el denominado “criollo”, lo que conduce a suponer razonablemente que el núcleo “criollo” posee frecuencias alélicas más altas para el alelo B.

Los resultados obtenidos en estos estudios, permitieron detectar una clara presencia de mestizaje de las razas taurinas especializadas en producción de leche con los criollos, al punto que ese núcleo se encuentra prácticamente absorbido y se hace necesaria la caracterización genética de las poblaciones presentes utilizando marcadores heterólogos de tipo microsatélite, con el fin de conocer el grado de absorción en el que se encuentra la población criolla del trópico alto de Nariño.

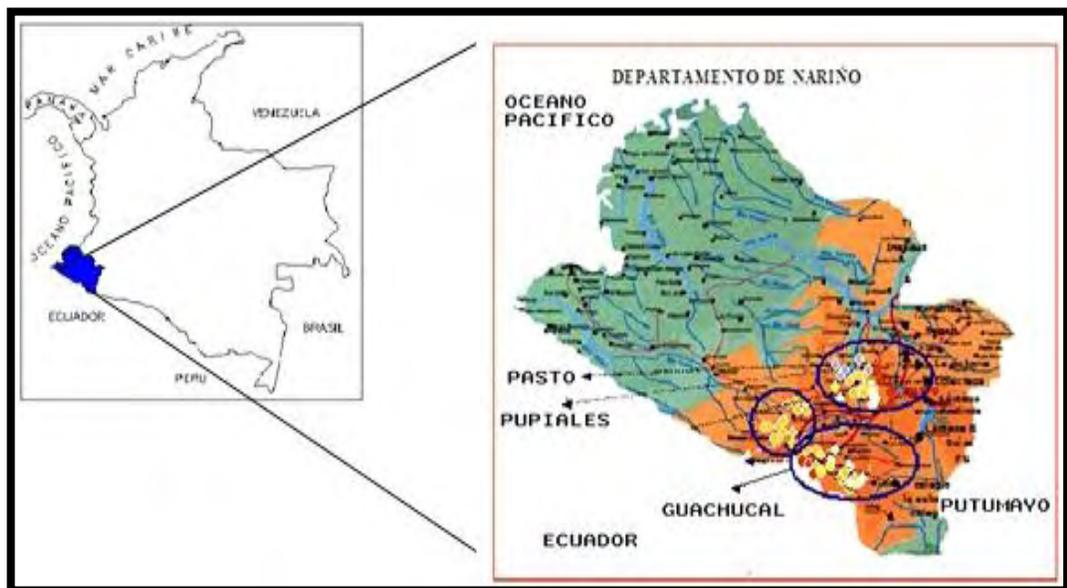
5. METODOLOGÍA

5.1. ÁREA DE ESTUDIO

El departamento de Nariño se encuentra localizado al suroccidente de Colombia (Figura 2). Limita al norte con el departamento del Cauca, al sur con la República de Ecuador, al oriente con los departamentos de Putumayo y Cauca, y al occidente con el océano Pacífico (Delgado *et al.*, 2007). Hace parte de la franja del Chocó biogeográfico (0-1000m), en el lado occidental, el piedemonte costero del Pacífico (1000-2500 m.s.n.m.), los andes del norte (2500-4700 m.s.n.m.) y las estribaciones superiores de la Amazonía (300-2800 m.s.n.m.) hacia el lado oriental. Esta confluencia de características hace que el departamento posea una gran riqueza biológica representada en diferentes ecosistemas como la zona costera, el piedemonte pacífico y amazónico, la alta y media montaña, bosques secos, humedales y páramos, entre otros (Delgado *et al.*, 2007).

El presente estudio se realizó en el trópico alto de Nariño en los distritos lecheros de Pasto, Pupiales y Guachucal (Figura 3 y Figura 3), región que corresponde a la zona ecológica de bosque pluvial tropical de acuerdo con la evaluación de los recursos forestales mundiales, 2000 (Solarte *et al.*, 2009).

Figura 2. Ubicación geográfica de los tres distritos lecheros en el Trópico Alto del departamento de Nariño-Colombia.



Fuente: Solarte *et al.*, 2009.

La denominación de distrito lechero obedece a un criterio administrativo establecido por la Cooperativa de Productos Lácteos de Nariño - Colácteos, donde se agrupan diferentes municipios (Solarte *et al.*, 2009). El distrito Pasto está ubicado a una altura de 2527 m.s.n.m., con una precipitación media de 960 mm/año y una temperatura media de 14°C, comprende los hatos de los municipios de Pasto, Tangua, Yacuanquer y Buesaco. El distrito Pupiales se encuentra a una altura de 2900 m.s.n.m., con una precipitación media de 960 mm/año y una temperatura media de 11°C, a este distrito pertenecen los hatos localizados en los municipios de Pupiales, Ipiales, Aldana y Carlosama. Finalmente, el distrito Guachucal se localiza a una altura de 3087 m.s.n.m., presenta una precipitación media de 940 mm/año y una temperatura media de 4°C; en este distrito se incluyen las fincas localizadas en los municipios de Guachucal, Cumbal, Túquerres y Sapuyes.

De acuerdo con el Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC), los suelos del trópico alto de Nariño son moderadamente profundos, texturas moderadamente gruesas y medias, drenajes imperfectos, fuertemente ácidos, baja a moderada fertilidad, alta materia orgánica, buena capacidad de laboreo y mecanización. En esta región las principales limitantes son las frecuentes heladas; en algunos suelos la mediana o alta saturación de aluminio; baja fertilidad y poca retención de humedad. Estas condiciones conllevan a que su dedicación sea en pastos generalmente para ganadería intensiva, aunque los niveles de explotación dependen de las particularidades de cada sector (Solarte *et al.*, 2009).

Figura 3. Localización satelital y coordenadas planas (latitud (N= primer valor), longitud (W= segundo valor) para cada distrito lechero en el trópico alto de Nariño.



Fuente: Solarte *et al.*, 2009.

5.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para la caracterización molecular de los cinco núcleos de las razas holstein, normando, pardo suizo, jersey y criollo se tomaron aleatoriamente 30 ejemplares de cada raza, muestreados en los distritos lecheros de Pasto, Pupiales y Guachucal, para un total de 150 individuos.

El número de fincas por distrito y el número de animales en cada finca se determinó en proporción al total de fincas y de animales por distrito, con base en el censo realizado por Colácteos en el año 2006 y la actualización de la base de datos obtenida por el Programa de Mejoramiento Genético (Solarte *et al.*, 2009), donde se determina que en los distritos de Pasto, Pupiales y Guachucal hay un total de 50, 113 y 133 fincas respectivamente.

El tamaño de la muestra se estimó considerando dos estadísticos; acorde con lo indicado por Chakraborty (1992) para organismos diploides y asumiendo la existencia de poblaciones en panmixia, se estima que usualmente de 100 a 150 individuos pueden proveer un muestreo adecuado para un *locus* genético, esto sobre la base del criterio de la frecuencia mínima alélica (Chakraborty, 1996).

De igual manera se consideró el siguiente estadístico para definir el tamaño de la muestra (Solarte *et al.*, 2003).

$$n = \frac{Z^2 P (1-P) N}{E^2 N + Z^2 P (1-P)}$$

n = Tamaño de la muestra

Z = Grado de confiabilidad del 95%

N = Población o universo

E = Margen de error máximo admisible del 5%

P = Proporción de la población 0,9%

Teniendo como base una población total de 1000 hembras procedentes de hatos lecheros, cuyos propietarios están asociados a Colácteos y que a su vez hacen parte de la base de datos del Programa de Mejoramiento Genético asistido con marcadores de DNA y dirigido a la obtención de un modelo bovino lechero para el Trópico Alto de Nariño, se estima que el tamaño de la muestra es equivalente a 121 hembras, número que se encuentra dentro del tamaño considerado por Chakraborty. Los muestreos se realizaron bajo un acta de consentimiento informado, de acuerdo con el formato recomendado por el Comité de Ética de la Universidad de Nariño.

5.3. FASE DE CAMPO

5.3.1. Toma de muestras de sangre

Cada muestra de sangre se tomó de la vena coccígea media mediante punción con una aguja estéril número 21, de manera que se extrajeron 5 ml de sangre total, que fueron almacenados en tubos Vacutainer® heparinizados con EDTA como anticoagulante. Las muestras se transportaron en nevera con hielo seco hasta el laboratorio de Mejoramiento Genético Animal de la Universidad de Nariño, donde se almacenaron a una temperatura promedio de 4°C por un período de 4 horas antes de realizar la extracción de DNA.

Adicionalmente, se tomaron muestras de una parte de tejido sanguíneo en tarjetas FTA®, para ello se impregnó rápida y cuidadosamente el fluido en uno de los pozos de la tarjeta a partir de la aguja estéril. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente en un lugar aséptico, para evitar contaminación, luego se envolvieron en papel aluminio y se conservaron a temperatura ambiente siendo una de las principales ventajas que tiene este método de almacenamiento de muestras, ya que dadas las condiciones de campo, la colección directa de sangre está condicionada a un sistema de almacenamiento refrigerado para evitar el daño y la baja calidad del DNA (Solarte *et al.*, 2009) y se almacenaron en un lugar fresco y ausente de humedad para continuar su procesamiento en el laboratorio. Este procedimiento fue realizado para la conservación de tejido sanguíneo por un tiempo más prolongado, esto debido a que las tarjetas FTA permiten conservar el tejido por aproximadamente 5 años a temperatura ambiente (Solarte *et al.*, 2009).

5.4. FASE DE LABORATORIO

5.4.1. Extracción y Cuantificación del DNA.

Para la obtención de DNA a partir de muestras de sangre se utilizaron dos protocolos de extracción de acuerdo con el método de conservación usado posterior a la extracción del tejido sanguíneo.

5.4.1.1. Protocolo de extracción por *Salting out*

Un primer protocolo de *salting out* (Sambrook y Rusell, 2001), con algunas modificaciones realizadas en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Animal (Solarte *et al.*, 2009) a partir de muestras de sangre conservadas en medio EDTA (Anexo A). Este protocolo comprende dos pasos: uno de ruptura de la membrana celular y nuclear para lo cual la muestra homogenizada se trató con el tampón de extracción (EDTA, Tris-HCl y NaCl) y otro paso de digestión de las membranas con la adición de detergente el cual promueve la emulsión de lípidos y proteínas favoreciendo su solubilización y posterior eliminación. Posterior a esta etapa, el

DNA se separa del detergente; para la solución acuosa se trata primero con NaCl en concentración elevada, para finalmente realizar su precipitación mediante alcohol frío y su posterior recuperación mediante centrifugación.

5.4.1.2. Protocolo de extracción a partir de tarjetas FTA

El segundo protocolo de extracción de DNA a partir de muestras de sangre conservadas en tarjetas FTA usando el kit FTA ® de *Whatman Bioscience*, de acuerdo con las especificaciones de la casa fabricante (Anexo B).

5.4.1.3. Cuantificación de DNA

La cuantificación de DNA se llevó a cabo en un espectrofotómetro (Jenway, Genova), por medio de la relación de absorbancia a 260nm y 280nm para la cuantificación y la cualificación de la muestra. Posteriormente alícuotas de DNA con concentración 50ng/µl fueron realizadas y almacenadas a -20°C.

En los casos en que la cantidad disponible de DNA fue escasa, se empleó el método de la placa de agarosa con bromuro de Etidio, que permite calcular la cantidad de ácidos nucleicos a partir de la intensidad de la fluorescencia emitida por el bromuro de Etidio irradiado con luz UV, comparándola con unos patrones de concentración. Para todos estos casos, el material genético obtenido se cuantificó por comparación de tamaños conocidos con DNA de timo de ternera purificado (ng/µl), en tres diluciones: 100ng/µl, 50ng/µl y 25ng/µl. La comparación visual se realizó sobre un gel de agarosa al 2% y bromuro de Etidio como colorante.

5.4.2. Estandarización y selección de los marcadores microsatélites.

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

Tabla 2. Microsatélites para DNA de ganado vacuno. Nombre de cada *locus*, secuencia directa y reversa de la pareja de cebadores, tamaño del fragmento esperado en pares de bases (pb), fluorocromo con el que fue marcado (Dye) y referencia del grupo de autores que describen el uso del *locus* respectivo.

<i>Loci</i>	Cebadores directo y reverso 5' 3'	Tamaño del amplificado (pb)	Dye	Referencia
TGLA227	CGA ATT CCA AAT CTG TTA ATT TGC T ACA GAC AGA AAC TCA ATG AAA GCA	64 - 115	FAM	Barendse <i>et al</i> , 1992
TGLA53	GCT TTC AGA AAT AGT TTG CAT TCA ATC TTC ACA TGA TAT TAC AGC AGC	147-197	FAM	Barendse <i>et al</i> , 1992
BM2113	CGT GCC TTC TAC CAA ATA CCC	116-146	FAM	Bisho <i>et al</i> ,

	CTT CCT GAC AGA AGC AAC ACC			1994
ETH10	GTT CAG GAC TGG CCC TGC TAA CA CCT CCA GCC CAC TTT CTC TTC TC	198-234	FAM	Toldo <i>et al.</i> , 1993
TGLA126	CTA ATT TAG AAT GAG AGA GGC TTC T TTG GTC TCT ATT CTC TGA ATA TTC C	104-133	JOE	Barendse <i>et al.</i> , 1992
TGLA122	AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA C AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA C	130-193	JOE	Barendse <i>et al.</i> , 1992
ETH3	GAA CCT GCC TCT CCT GCA TTG G ACT CTG CCT GTG GCC AAG TAG G	90-135	NED	Toldo <i>et al.</i> , 1993
INRA23	GAG TAG AGC TAC AAG ATA AAC TTC TAA CTA CAG GGT GTT AGA TGA ACT C	193-235	JOE	Vaiman <i>et al.</i> , 1992
ETH225	GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT	133-165	NED	Steffen <i>et al.</i> , 1993
BM1824	GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG	170-218	NED	Bishop <i>et al.</i> , 1994
SPS115	AAA GTG ACA CAA CAG CTT CTC AG AAC GAG TGT CCT AGT TGG CTG TG	235-265	FAM	Barendse <i>et al.</i> , 1992

Fuente: (Moreno *et al.*, 2001)

5.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Protocolo A: En un primer ensayo, se realizó un protocolo de estandarización de PCR usando las condiciones de amplificación que se muestran en la tabla 3 para los *loci* microsatélites: ETH10, ETH225, HEL9, ILSTS006, INRA063, TGLA122, TGLA227, BM1824, BM2113, CSSM66 Y ETH3. (Anexo C).

Tabla 3. Componentes de PCR para la amplificación de microsatélites de ganado vacuno, para un volumen final de 25 μ l.

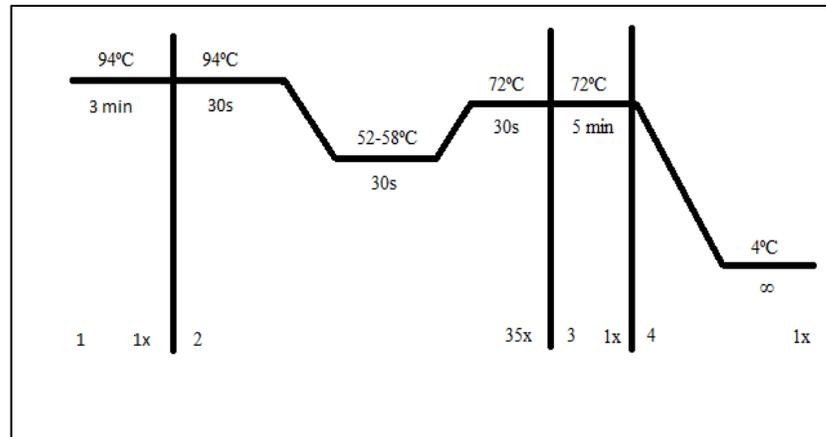
COMPONENTE DE PCR*	CONCENTRACION STOCK	CONCENTRACION DE TRABAJO	VOLUMEN RX
DNA	50ng	5ng	2.5 μ L
Buffer PCR	10X	1X	2.5 μ L
dNTP's	100mM	1.0mM	0.25 μ L
MgCl ₂	25mM	2.5mM	2.5 μ L
Primer F	10 μ M	0.4 μ M	1 μ L
Prime R	10 μ M	0.4 μ M	1 μ L
Taq polimerasa	500U/ μ l	1U/ μ l	0.05 μ L
H ₂ O			15.425 μ L
Volumen total por reacción = 25 μ l			

Fuente: (Barrera *et al.*, 2006; Serrano *et al.*, 2004) *Kit *GoTaqPolymerase* de Promega.

Para los controles negativos se utilizaron todos los componentes de PCR excepto DNA. Como control positivo se verificó la presencia de bandas en el tamaño reportado para cada cebador.

La reacción de amplificación para cada uno de los cebadores se llevó a cabo en un termociclador *Mycler* de Biorad® por separado, con el programa de amplificación indicado en la Figura 5; la temperatura de alineamiento varió según lo reportado para cada uno de los cebadores estudiados (Anexo 3).

Figura 4. Programa de amplificación para las regiones microsátélites de ganado bovino. 1. Fase de denaturación inicial, 2. Fase de alineamiento, 3. Fase de extensión final, 4. Fase de mantenimiento.



Fuente: (Zhou *et al.*, 2005); Pandey *et al.*, 2006).

Posteriormente, los productos de la amplificación se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (Acilamida: Bisacrilamida en proporciones 19:1) con Úrea 8M como agente desnaturalizante y usando Nitrato de Plata e Hidróxido de Sodio como reactivos de tinción y revelado.

Protocolo B: Mediante el uso del kit *Stockmarks for Cattle Bovine Genotyping (Applied Biosystems)* se llevó a cabo una reacción multiplex para la amplificación de los once *loci* microsátélites (Tabla 2), usando un primer directo marcado con un fluorocromo, y un primer reverso no marcado para cada uno. Los productos amplificados fueron identificados por detección de fluorescencia. Este proceso se realizó para cada individuo con el fin de minimizar la posibilidad de amplificaciones inespecíficas o reacción cruzada, esto de acuerdo con lo reportado por la casa fabricante, tal como se indica en la tabla 4.

Tabla 4. Componentes de PCR para los once microsátélites en una reacción múltiplex.

COMPONENTE DE PCR	VOLUMEN 1 MUESTRA
Buffer de PCR StockMarks	3.0 μ L
Mezcla de dNTP's	4.0 μ L
Mezcla de cebadores	5.5 μ L
DNA Polimerasa AmpliTaq Gold	0.5 μ L
H ₂ O	1 μ L
Volumen final	14 μ L

Se transfirieron 14 μ L de la mezcla de los componentes descritos en la tabla 4 a un tubo de 200 μ L, que contenía 1 μ L de DNA en una concentración de 50 a 75 ng/ μ L según especificaciones del fabricante.

La reacción de amplificación de las muestras a analizar se llevó a cabo en el termociclador *Mycler* de Biorad®, usando una fase de denaturación inicial de 15 min a 95°C, seguido por 31 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 61°C y 1 min a 72°C. Una extensión final fue programada a 72°C por 1 h y luego a 25 °C por 2 h.

5.4.4. Genotipificación

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% adicionando a 5 μ L de cada muestra 3 μ L de Buffer de carga, la condición de corrida fue de 110V durante 40 minutos.

Los fragmentos amplificados por PCR fueron enviados a genotipificación mediante electroforesis capilar en secuenciador automático ABI 3500 al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, usando EL *Dye Set* DS-32 (Filter Set F): fluorocromos 5-FAM, JOE, NED y el *GeneScan-500 ROX Size Standard* (*Applied Biosystems*) para determinar el tamaño de los alelos.

5.5. ANÁLISIS DE DATOS

5.5.1. Análisis multiloci.

El tamaño de los alelos fue determinado por medio del programa Genemapper versión 4.1.5. Para la generación de los electroferogramas que permitieron determinar el tamaño de cada alelo, se creó un panel que contenía

información de nombre, fragmento esperado (pb) y color del fluorocromo con el que fue marcado cada microsatélite. Los microsatélites que podrían sobrelaparse en tamaño, fueron marcados con un fluorocromo de diferente color, según las especificaciones del kit *Stockmarks for cattle bovine genotyping* de *Applied Biosystems*.

5.5.2. Análisis estadístico en cumplimiento del Objetivo 1

Con el fin de medir la diversidad genética se utilizó el programa Microchecker v.2.2.3, para la revisión de posibles patrones de corrida electroforética (*stuttering*) en el tamaño de bandas, la amplificación predominante de alelos pequeños (*dropout*) y detección de alelos nulos (ausencia de bandas), realizando el ajuste de las frecuencias alélicas. El programa se basa en las desviaciones de las distribuciones de homocigotos y heterocigotos por *locus* para identificar la presencia de errores de genotipado (Martínez y Figueras, 2012). Con el fin de verificar el polimorfismo de los *loci* microsatélites se calculó el contenido de información polimórfica (PIC) para cada uno mediante el programa Cervus v.3.0. Posteriormente, se calculó el número promedio de alelos por *locus* (N_a) así como el número efectivo de alelos (N_e) o Diversidad genética de Gregorius (1978) definida como la capacidad de un alelo de pasar a la siguiente generación y se calculó también la diversidad génica de Nei (H), a partir de las frecuencias alélicas obtenidas con los programas FSTAT v.2.9.3 y GenAEx versión 6.1. (Zambrano, 2010). Además se obtuvieron los estimadores de heterocigosidad de Nei, el índice de fijación (F_{IS}), utilizando el programa FSTAT v.2.9.3.

La desviación de los sistemas microsatélites con respecto al equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) para cada *locus*, para cada población se calcularon mediante el programa Arlequín versión 3.01 (Schneider *et al.*, 2006) usando el método de Cadenas de Markov para 10000 permutaciones (Guo & Thompson, 1992), este método evalúa desviaciones con respecto a la heterocigosidad esperada que asume todos los supuestos del modelo, usando una serie de ensayos en cadena con el fin de estimar la probabilidad de que un *locus* se encuentre desviado del equilibrio; determinar si existe o no este equilibrio es un primer paso para detectar posibles fuerzas evolutivas actuando o que actuaron, en las poblaciones de las especies estudiadas modificando sus frecuencias genotípicas.

La estimación de la estructura genética fue realizada por dos métodos, el método Bayesiano empleando el programa Structure v 2.23 (Falush & Pritchard, 2007) y realizando un Análisis de varianza molecular-AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) ejecutando 10.000 permutaciones con el programa Arlequín versión 2006 (Schneider *et al.*, 2006). Debido a que en marcadores como microsatélites, las tasas de mutación pueden ser muy altas, lo que puede disminuir F_{ST} y sobreestimar el número de migrantes Nm , se definió F_{ST} en términos de tiempos de coalescencia entre alelos (entendido como el grado de parentesco entre alelos,

aproximándose a un ancestro alélico común) y se calculó el R_{ST} (Slatkin, 1991), específicamente utilizada para medir la heterogeneidad genética con microsatélites, es relativamente insensible a tasas de mutación y más apropiado para *loci* que mutan en forma de paso a paso (*step-wisemodel*).

Por último, con la información de la distancia genética según Nei en 1978, se construyó un dendrograma por agrupamiento UPGMA que asume evolución de OTUs a la misma tasa y que el cambio en un sitio nucleotídico no afecta la distribución de los demás, siendo un modelo donde la tasa de evolución entre OTUs es relativamente constante, modificado del método NEIGHBOR de PHYLIP Versión 3.5 y empleando el programa POPGEN versión 1.32 (Yeh *et al.*, 1999).

5.5.3. Análisis estadístico en cumplimiento del Objetivo 2

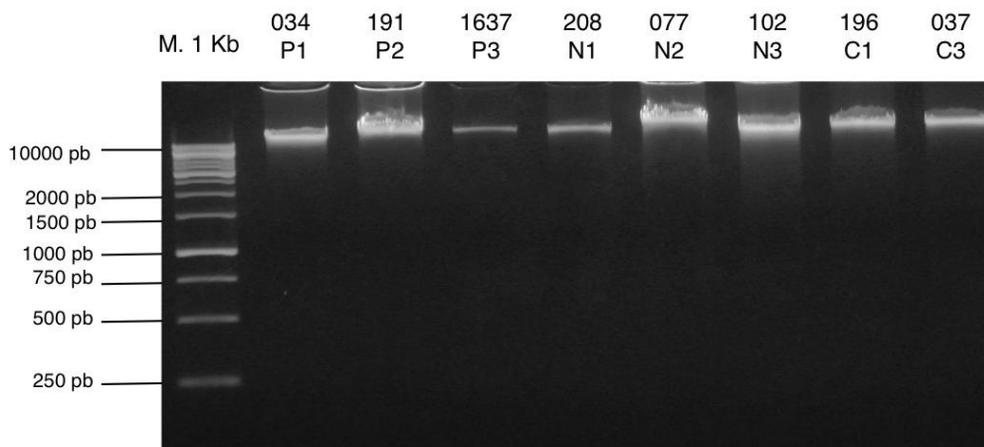
Para estimar la pureza racial o grado de absorción o introgresión de la población criolla se utilizó el coeficiente Q, coeficiente de membresía, basado en un método de agrupamiento utilizando el programa Structure v.2.2.3. (Falush y Pritchard, 2007) que permite inferir la estructura de la población usando la matriz de genotipos obtenida mediante el análisis de los electroferogramas que fueron visualizados previamente en el programa Genemapper v. 4.

6. RESULTADOS

6.1. EXTRACCIÓN DE DNA

El protocolo de extracción de *Salting out* con modificaciones realizadas en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Animal presentó buenos resultados al permitir obtener DNA de buena calidad (Figura 5). Además al ser visualizado en geles de agarosa al 2%, el DNA extraído no evidenció degradación en la mayoría de las muestras. La degradación observada como barridos en el gel de Agarosa para algunas de las muestras fue asociada a una homogenización muy fuerte y a una eliminación de proteínas y RNA deficiente, por esto las muestras que presentaron esta característica fueron tratadas con RNAsa a una concentración de 19.6 mg/ml y se dejaron en incubación a una temperatura de 37°C durante 1 hora (Zavala, 2005), obteniendo así una mejor calidad de DNA.

Figura 5. Gel de Agarosa al 2% para verificación de DNA total extraído a partir de muestras de sangre de la subespecie *Bos taurus*. (M) marcador de 1kb de Fermentas. Muestras H. holstein, J. jersey, P. pardo suizo, N. normando y C. criollo; 1. Distrito Pasto, 2. Distrito Pupiales, 3. Distrito Guachucal. Condiciones de corrida: 100V, 45 min, en buffer TAE1X, usando cámara de electroforesis horizontal Gentech.



Fuente: Esta investigación.

La verificación de la calidad del DNA obtenido a partir de muestras de sangre, en base a la relación de absorbancia a 260 y 280 nm, indicó un rango promedio de 1,6 a 2.0. La concentración del DNA presentó una alta variación de

30 a 1200 ng/μl. el DNA total fue diluido con el fin de alcanzar una concentración de 50 a 75 ng/μl para ser utilizado en los protocolos de amplificación. Las muestras que presentaron una concentración inferior a 50 ng/μl se usaron sin ser diluidas.

El ensayo de extracción de DNA con el kit FTA, indicó que el método de conservación de muestras de sangre en FTA fue efectivo para el análisis molecular. La composición de las tarjetas permite obtener DNA, sin embargo como no es posible estimar la cantidad presente en cada uno de los discos FTA, fue necesario estandarizar esta técnica con un número diferente de discos por reacción, determinando que el ensayo realizado a partir de la extracción con cuatro discos fue el más efectivo para obtener amplificadores positivos. Con el fin de obtener una cantidad suficiente de DNA, en el protocolo de extracción con el kit los discos fueron sometidos a calentamiento con 30 μl de agua ultrapura durante 30 minutos a 95°C utilizando 1μl de este producto en el mix de PCR como se describió en el protocolo B. El éxito obtenido en la amplificación de la reacción multiplex para muestras extraídas con el Kit se determinó finalmente en la visualización de los electroferogramas (Figuras 11,12 y 13).

6.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN

Los ensayos de amplificación utilizando las condiciones del protocolo A para los *loci* microsatélites ETH10, ETH225, HEL9, ILSTS006, INRA063, TGLA122, TGLA227, BM1824, BM2113, BM1818, CSSM66 Y ETH3 (Anexo 3), permitieron determinar en primera instancia la temperatura de alineamiento como se indica en la tabla 5, obteniendo productos amplificados que fueron correspondientes entre sí respecto a su tamaño molecular, cuantificado en pares de bases, y, que fueron visualizados en geles de agarosa al 4% (Figura 6).

Tabla 5. Lista de cebadores evaluados en el primer ensayo y temperatura de alineamiento para la amplificación de los *loci* microsatélites.

Cebador	Temperatura de alineamiento (°C)
BM1818	54
BM1824	55
BM2113	58
CSSM66	54
ETH3	60
ETH10	54
ETH225	57
HEL9	57
ILSTS006	57
INRA063	55

TGLA122	60
TGLA227	60

Fuente: Esta investigación.

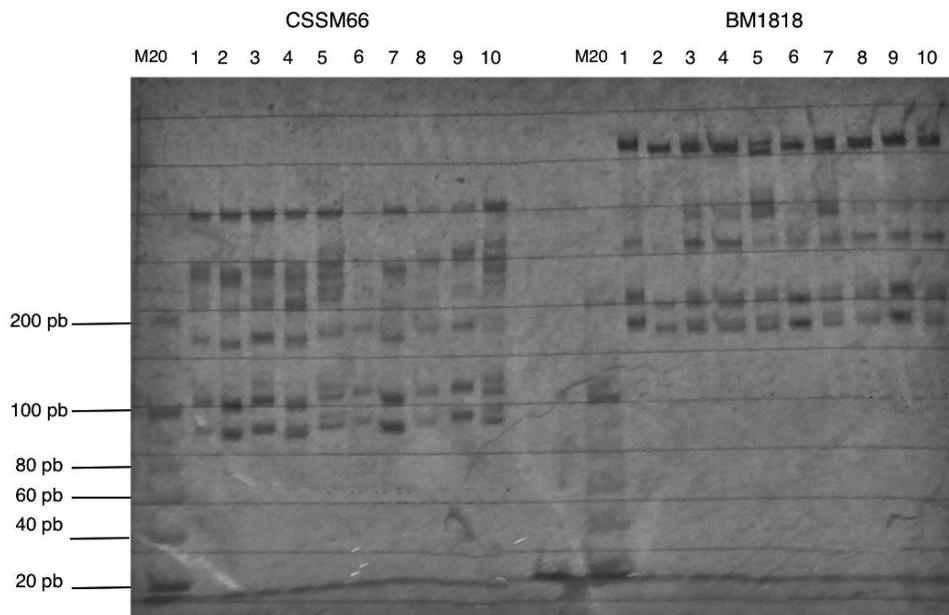
Figura 6. Amplificación de la región microsatélite INRA063 en un gel de Agarosa al 4%, tamaño de fragmento esperado 167-189pb. (M) marcador de 50pb (Fermentas), muestras 1411-1577 pertenecientes a la raza holstein, y la muestra 1427 corresponde a la raza normando. Corrida electroforética 80V, 40 min; en buffer TAE1X, usando cámara horizontal Gentech.



Fuente: Esta investigación.

Posteriormente, al someter los productos de la amplificación a electroforesis en gel de poliacrilamida (19:1) desnaturalizante al 6% y 8M de úrea (Biorad), para diferenciar el tamaño molecular de los alelos se observaron bandas inespecíficas en todos los microsatélites evaluados. En la figura 7, se observa un ensayo realizado para los cebadores BM1818 y CSSM66 para una temperatura de alineamiento de 54°C, donde se evidencia la presencia de amplificados en el tamaño de fragmento esperado y de bandas inespecíficas por fuera de este rango.

Figura 7. Visualización de amplificados en gel de poliacrilamida al 6%, para los *loci* microsatélites CSSM66 y BM1818 a una temperatura de alineamiento de 54°C fragmento de tamaño esperado de 171-209pb y 248-278pb respectivamente. Muestras 1-9 pertenecen a individuos de la raza holstein y la muestra 10 a un individuo de la raza normando. Corrida electroforética a 250V, 90 min, con precorrida a 120V por 20 min, en buffer TBE1X, en cámara de electroforesis vertical GENTECH.

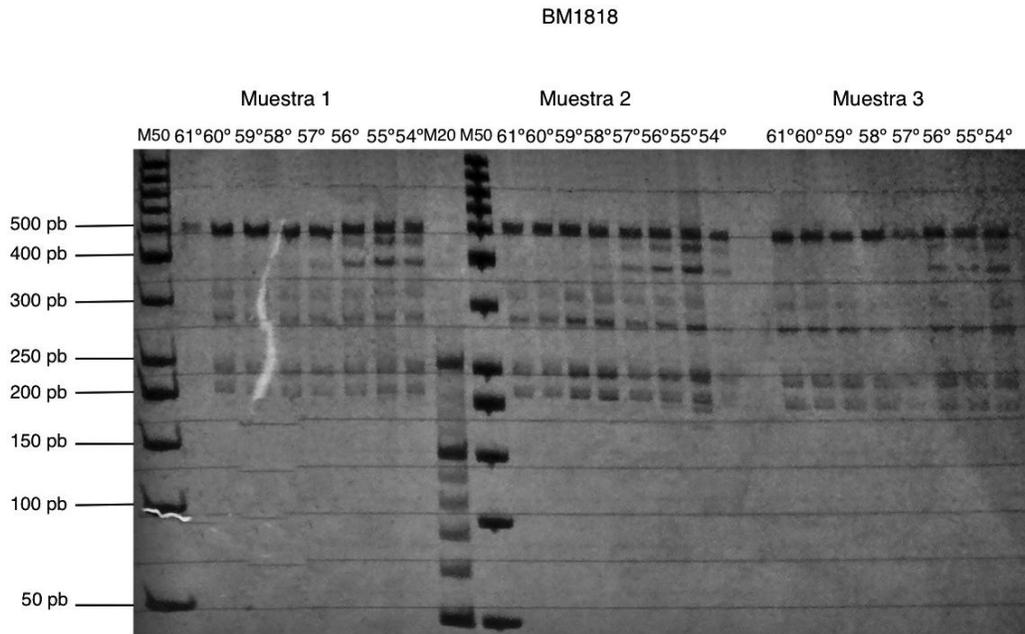


Fuente: Esta investigación.

Debido a la obtención de resultados negativos con las temperaturas reportadas, se hicieron variaciones a las temperaturas de alineamiento, considerando que a una temperatura muy baja se obtendría un PCR menos específico y si es más alta la especificidad sería mayor, aunque si es demasiado alta no se obtendrían amplificadas, pues la unión de los oligonucleótidos con sus sitios complementarios sería poco estable y la polimerasa no podría iniciar la síntesis (Eguiarte *et al.*, 2007).

Para encontrar la temperatura de alineamiento adecuada para cada uno de los cebadores, en la fase de optimización de las condiciones de amplificación en el termociclador se experimentó un gradiente de temperatura de alineamiento para cada uno de los pares de cebadores a partir de la temperatura mínima reportada para el *locus* aumentando en un grado centígrado el gradiente ensayando ocho temperaturas. El gradiente comprendió desde un rango de temperatura mínima de 52°C a 60°C para el caso del *locus* HEL9 a un rango mayor de temperatura de 57°C a 65°C para los *loci* microsatélites ETH10 y ETH225. Sin embargo en la visualización de los amplificados en geles de poliacrilamida no se obtuvieron resultados significativos para la determinación del tamaño molecular de los alelos para cada uno de los microsatélites pero se destacó que para la mayoría de los *loci*, se observó una mejor amplificación a temperaturas que oscilan entre los 57°C y 60°C. En la figura 8 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos, con el ensayo de amplificación del *locus* BM1818, donde se observan bandas inespecíficas por fuera del rango de tamaño esperado y se evidencia que la inespecificidad disminuye entre los 57 y los 60°C.

Figura 8. Amplificación del *locus* microsatélite BM1818 para la subespecie *Bos Taurus*, usando un gradiente de temperatura de 54 a 61°C. Tamaño de fragmento esperado de 248 a 278pb. Corrida electroforética a 250V, 90 min; con precorrida a 120V por 20 min, en buffer TBE1X, usando cámara de electroforesis vertical GENTECH.



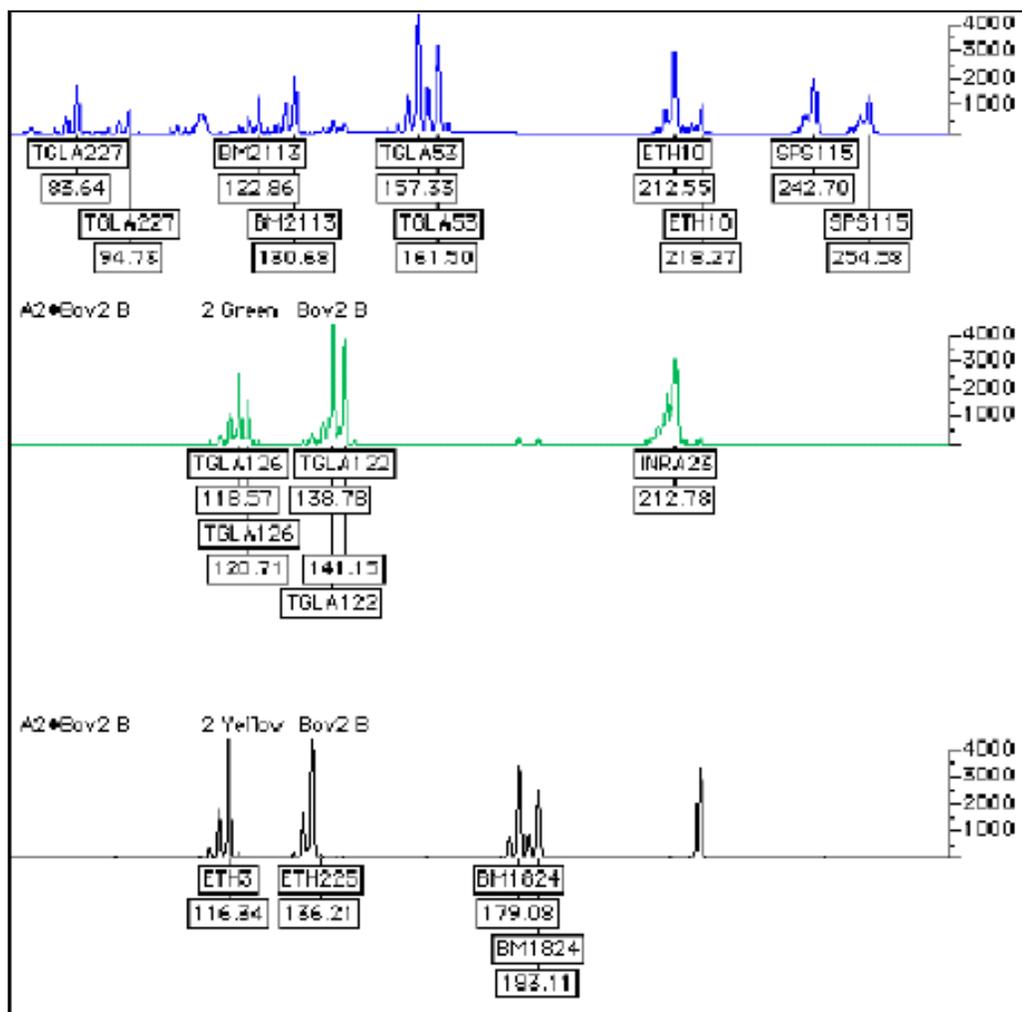
Fuente: Esta investigación.

Con el fin de optimizar las condiciones de amplificación se ajustó además la concentración de $MgCl_2$ para cada ensayo en particular, ya que dicha concentración puede tener efecto tanto en la especificidad como en el rendimiento de la reacción (Eguiarte *et al.*, 2007). En general, concentraciones insuficientes de Mg^{+2} dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas. Con base en esto, se realizaron modificaciones de la concentración de este cofactor de la reacción, para los cebadores BM1824, BM2113 y TGLA48 se modificó a una concentración de 1.2 mM; ETH3, ETH10, ETH225, TGLA126 y TGLA227 a 1.5 mM; TGLA53 y TGLA122 a 2.0 mM de acuerdo con lo reportado por (Zhou *et al.*, 2005). Sin embargo, para este ensayo no se obtuvo una correcta amplificación puesto que en la visualización en geles de poliacrilamida se continuó observando inespecificidad en la amplificación y en algunos casos no hubieron amplificados positivos.

Dada la amplificación inespecífica obtenida a partir del uso de cebadores liofilizados (IDT), se adquirió el kit *Stockmarks for Cattle Bovine Genotyping*

(Applied Biosystems), ampliamente reportado por otros autores para el estudio de poblaciones bovinas (Escobar *et al.*, 2009; Sergiu *et al.*, 2002). Como se describió previamente en el protocolo B, de los 11 microsatélites testados todos resultaron en la amplificación satisfactoria de un fragmento de tamaño esperado después de la reacción de PCR, los resultados evidenciaron la amplificación de múltiples fragmentos a partir de los cuales se realizaron los análisis genéticos y que fueron visualizados mediante el análisis de electroferogramas que muestran el polimorfismo en cada locus y el patrón característico de cada uno de sus alelos (Figura 9).

Figura 9. Electroferogramas mostrando la amplificación de regiones microsatélites del genoma de la subespecie *Bos taurus*, utilizando el kit *Stockmarks for Cattle Bovine Genotyping (Applied Biosystems)*, obtenido en el programa Genemapper V.4.1.

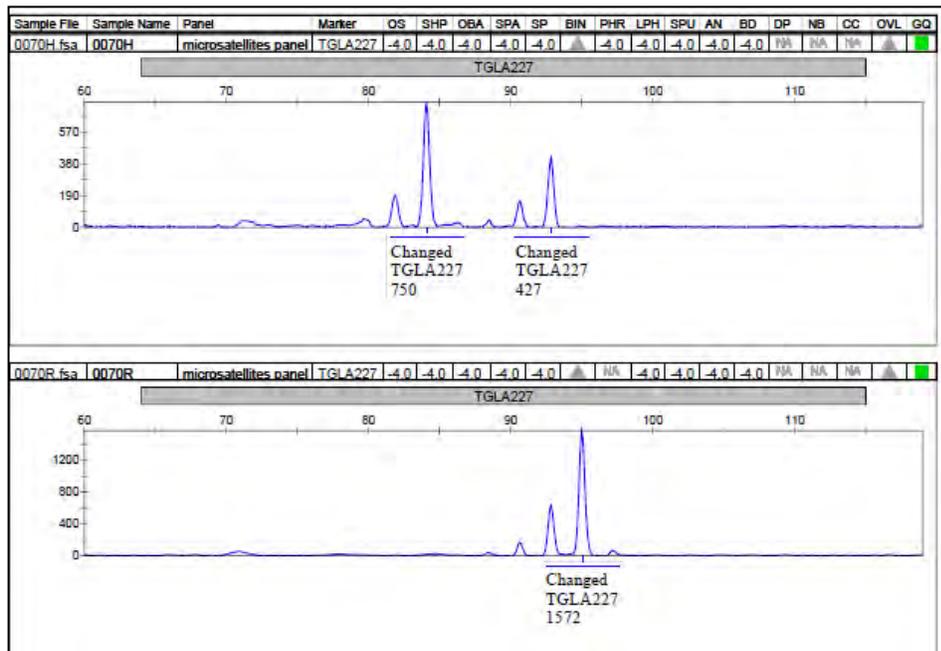


Para realizar el análisis genético se eliminaron dieciséis muestras no informativas, es decir, que no presentaron amplificaciones positivas para ningún *locus*, después de usar el protocolo de PCR mediante el Kit; se determinó que las muestras que no fueron consideradas corresponden a individuos de la raza holstein del distrito Pasto (N=9), del distrito de Pupiales (N=5) y a individuos de la raza pardo suizo procedentes del distrito de Guachucal (N=1). Este hecho redujo el número de individuos por población, y por esta razón el análisis genético comparativo se realizó sólo entre razas.

6.3. VARIABILIDAD GENÉTICA

Los electroferogramas muestran el polimorfismo para cada locus y el patrón característico de cada uno de sus alelos, con dos picos bien diferenciados para un genotipo heterocigoto y un solo pico para un genotipo homocigoto. Una vez generados los electroferogramas se identificaron 120 muestras de las 150 analizadas, con patrones claros y picos bien diferenciados (Figuras 10,11 y 12).

Figura 10. Electroferograma mostrando el patrón de algunos alelos para el locus TGLA227 marcado con el dye FAM (Genemapper v.4.1.).



Fuente: Esta investigación.

Figura 11. Electroferograma mostrando de algunos alelos para el *locus* TGLA122 marcado con el *dye* JOE (Genemapper v.4.1.).

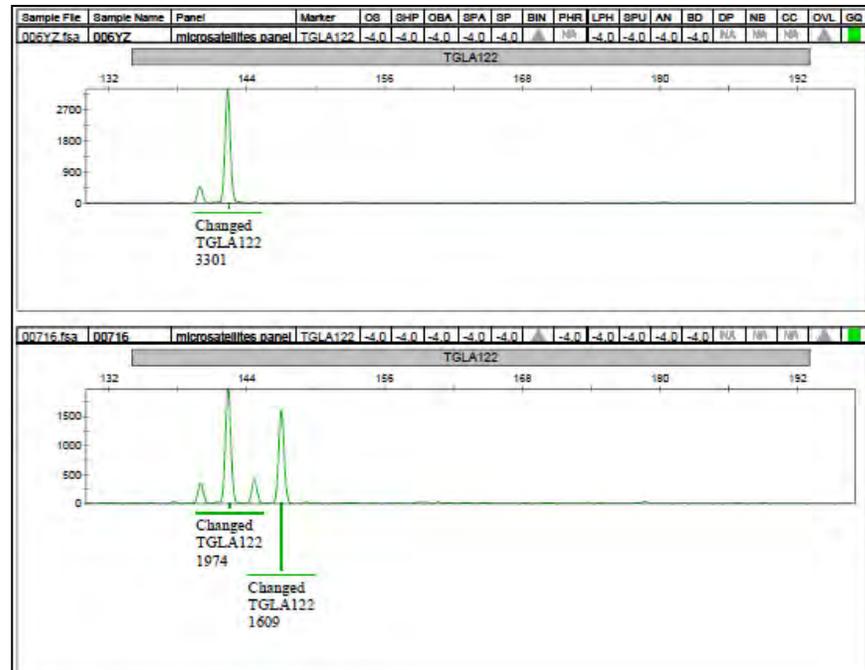
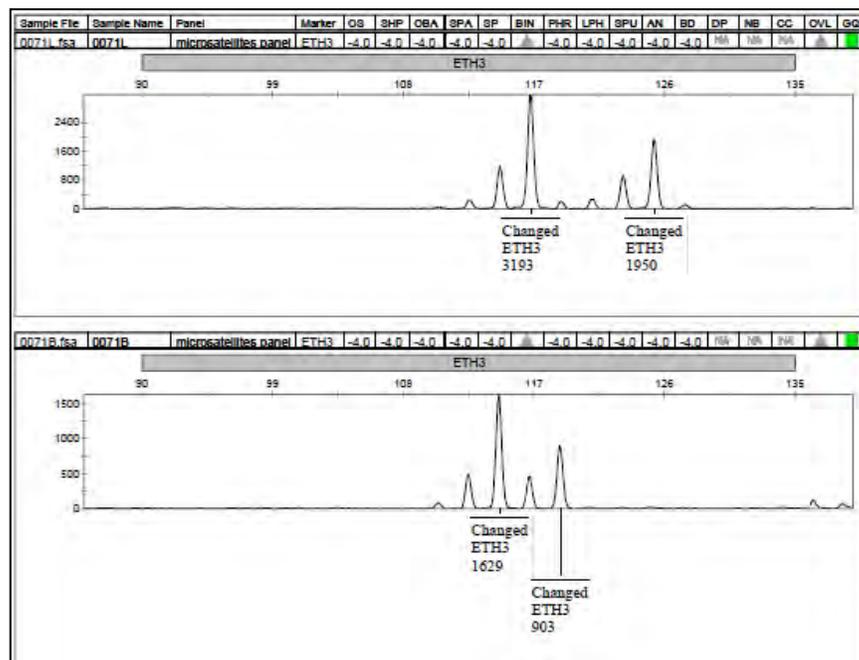


Figura 12. Electroferograma mostrando el patrón de algunos alelos para el *locus* ETH3 marcado con el *dye* NED (Genemapper v.4.1.).



Se determinó además, el contenido de información polimórfica para cada *locus* (Tabla 6) y se encontró que el *locus* TGLA227 fue el más polimórfico con un valor de 0.873, un número total de alelos de 19 y un número promedio de alelos por *locus* de 10. De acuerdo a los valores encontrados se consideró a todos los *loci* analizados como altamente informativos con valores mayores de 0.50.

Tabla 6. Contenido de información polimórfica (PIC) y número de alelos (Na) por *locus*.

<i>Locus</i>	Na	PIC
BM1824	7	0,775
BM2113	11	0,795
ETH3	11	0,655
ETH10	8	0,642
ETH225	7	0,751
INRA23	11	0,830
SPS115	6	0,607
TGLA53	11	0,792
TGLA122	12	0,721
TGLA126	7	0,584
TGLA227	19	0,873
NPA	10	

6.4. DIVERSIDAD GENÉTICA

El análisis para determinar la existencia de posibles patrones de corrida electroforética (*stuttering*) y amplificación predominante de alelos pequeños (*dropout*), mostraron resultados negativos para ambos casos en todos los *loci* utilizados. Se estimó además, la presencia de alelos nulos para todos los *loci* y se encontró que están presentes para el sistema microsatélite, TGLA53 (Tabla 7).

Tabla 7. Estimación de la presencia de alelos nulos para cada *locus* usando el método descrito por Brookfield (1996), usando el programa Microchecker v.2.2.3.

<i>Locus</i>	Presencia de alelos nulos	Oosterhaut	Brookfield 1
BM1824	No	-0,0877	-0,0713
BM2113	No	-0,559	-0,0487
ETH3	No	-0,865	-0,0734
ETH10	No	-0,012	-0,0056
ETH225	No	-0,0875	-0,0669
INRA23	No	0,0637	0,0537
SPS115	No	-0,0471	-0,0435
TGLA53	Si	0,1727	0,1445
TGLA122	No	0,0509	0,0247
TGLA126	No	-0,137	-0,0911
TGLA227	No	-0,0707	-0,0639

Las estimaciones de diversidad genética estuvieron basadas en el número de alelos, las heterocigosidades observada y esperada y la riqueza de alelos. Se encontró mayor diversidad genética en la raza criollo ($N_a=8$; $H_o=0,78$) y los menores valores se encontraron en la raza normando ($N_a=6$; $H_o=0,64$). Para todas las razas se evidenciaron altos niveles de heterocigosidad observada por *locus*, con un valor promedio de 0,7.

Tabla 8. Diversidad genética para cada población y para cada *locus*.

Población	<i>Locus</i>	N	N_a	N_e	R_s	H_o	H_e	F_{is}
criollo	BM1824	18	5	4	4,030	0,889	0,770	-0,1263
	BM2113	20	9	6	4,841	0,900	0,821	-0,0704
	ETH3	24	9	5	4,440	0,917	0,786	-0,1461
	ETH10	15	7	4	4,247	0,733	0,751	0,0581
	ETH225	22	7	4	4,129	0,864	0,751	-0,1271
	INRA23	16	6	5	4,445	0,688	0,797	0,1688
	SPS115	11	5	3	3,354	0,636	0,595	-0,0549
	TGLA53	19	8	3	4,031	0,421	0,697	0,4182
	TGLA122	16	8	4	4,614	0,750	0,771	0,0601
	TGLA126	21	6	3	3,480	0,810	0,671	-0,1826
	TGLA227	23	14	9	5,881	1,000	0,888	-0,1036
Promedio	19	8	5	4,32	0,78	0,75	-0,01	
holstein	BM1824	11	5	4	3,941	0,909	0,740	-0,1824
	BM2113	12	6	4	4,275	0,833	0,747	-0,0732
	ETH3	13	7	4	4,263	0,769	0,725	-0,0213
	ETH10	8	6	4	4,250	1,000	0,734	-0,3023
	ETH225	13	4	4	3,713	0,769	0,743	0,0041
	INRA23	8	5	3	3,753	0,625	0,688	0,1566
	SPS115	7	4	2	3,242	0,571	0,541	-0,0219
	TGLA53	10	6	5	4,759	0,300	0,810	0,6604
	TGLA122	12	8	4	4,731	0,833	0,767	-0,0427
	<i>Locus</i>	N	N_a	N_e	R_s	H_o	H_e	F_{is}
	TGLA227	12	7	5	4,664	0,833	0,792	-0,0092
Promedio	11	6	4	4,11	0,74	0,72	0,01	
jersey	BM1824	21	5	4	3,921	0,714	0,745	0,0654
	BM2113	25	7	3	3,922	0,680	0,670	0,0049
	ETH3	27	5	2	2,850	0,519	0,540	0,0582
	ETH10	21	5	3	3,004	0,571	0,624	0,1078
	ETH225	26	6	4	3,753	0,692	0,724	0,0635
	INRA23	20	9	6	4,817	0,800	0,818	0,0470
	SPS115	18	6	3	3,459	0,722	0,667	0,0204
	TGLA53	21	8	4	4,302	0,619	0,772	0,2216
	TGLA122	20	7	4	4,222	0,850	0,748	-0,1119
	TGLA126	27	3	2	2,268	0,630	0,529	-0,1724
	TGLA227	27	9	4	4,113	0,741	0,714	-0,0186
Promedio	23	6	4	3,69	0,69	0,69	0,03	
normando	BM824	17	5	5	4,298	0,824	0,794	-0,0067
	BM2113	25	8	6	4,972	0,600	0,836	0,3010
	ETH3	27	8	3	3,614	0,667	0,677	0,0341

	<i>Locus</i>	N	Na	Ne	Rs	Ho	He	F_{IS}
	ETH10	7	4	3	3,142	0,714	0,622	-0,0714
	ETH225	24	7	5	4,514	0,833	0,806	0,4444
	INRA23	6	5	2	3,667	0,333	0,528	-0,0549
	SPS115	4	2	2	2,000	0,250	0,469	0,6604
	TGLA53	19	7	5	4,408	0,421	0,776	0,4783
	TGLA122	13	8	5	4,748	0,769	0,796	0,0734
	TGLA126	26	5	3	3,390	0,769	0,662	-0,1429
	TGLA227	27	12	6	5,075	0,852	0,829	-0,0093
	Promedio	18	6	4	3,98	0,64	0,71	0,16
pardo	BM824	13	7	5	4,592	0,923	0,793	-0,1250
	BM2113	15	7	4	4,428	0,667	0,764	0,1617
	ETH3	24	8	2	3,405	0,583	0,559	-0,0222
	ETH10	8	5	3	3,667	0,500	0,625	0,2632
	ETH225	21	6	4	4,228	0,810	0,774	-0,0889
	INRA23	8	6	4	4,374	0,875	0,758	0,5714
	SPS115	6	4	3	3,558	0,500	0,653	0,3182
	TGLA53	12	5	3	3,221	0,333	0,639	0,5111
	TGLA122	16	5	2	2,842	0,438	0,459	0,0789
	TGLA126	20	5	2	2,749	0,650	0,580	-0,0953
	TGLA227	25	13	10	6,114	0,960	0,903	-0,0425
	Promedio	15	6	4	3,93	0,658	0,682	0,139

Fuente: Esta investigación.

El cálculo de F_{IS} , para medir endogamia en las poblaciones, es un análisis estadístico que toma valores que van de -1 a 1; donde signos negativos evidencian exceso de heterocigotos y signos positivos indican exceso de homocigotos. Valores entre 0 y 0,005 describen bajos niveles de endogamia, valores entre 0,006 y 0,15 moderados, entre 0,16 y 0,25 altos y muy altos cuando son mayores que 0,25 (Hartl, 1988 citado en Martínez, 2008).

En este estudio se encontraron valores negativos de endogamia para los *loci* BM1824, ETH3, ETH10, ETH225, TGLA122, TGLA126 y TGLA227 y valores positivos para los *loci* BM2113, INRA23, SPS115 y TGLA53 donde se encontró marcado exceso de homocigotos para el *locus* TGLA53 (Tabla 9). El F_{IS} promedio fue 0,012.

Tabla 9. Valores F_{IS} para cada *locus* ordenado por signo y magnitud.

<i>Locus</i>	Valor de F_{IS}
BM1824	-0,109
BM2113	0,041
ETH3	-0,051
ETH10	-0,048
ETH225	-0,045
INRA23	0,074
SPS115	0,083
TGLA53	0,433
TGLA122	-0,028

TGLA126	-0,156
TGLA227	-0,063

Fuente: Esta investigación.

El análisis para alelos exclusivos mostró que la mayor cantidad se encuentra en la raza criolla (8) con frecuencias que varían entre 0,042 y 0,021. La raza que exhibió menor cantidad de alelos exclusivos fue holstein (Tabla 10).

Tabla 10. Alelos exclusivos y sus frecuencias para cada raza y *locus*.

Raza	<i>Locus</i>	Alelo	Frecuencia
criollo	BM2113	141	0,025
	ETH3	121	0,042
	ETH3	129	0,021
	TGLA53	184	0,026
	TGLA122	166	0,031
	TGLA126	127	0,024
	TGLA227	68	0,022
	TGLA227	86	0,022
holstein	ETH10	214	0,063
jersey	INRA23	217	0,025
	SPS115	248	0,028
	TGLA122	170	0,100
normando	BM2113	119	0,040
	INRA23	193	0,667
	INRA23	215	0,083
	TGLA53	192	0,079
	TGLA227	96	0,019
	TGLA227	104	0,019
pardo	TGLA122	146	0,063
	TGLA126	129	0,025
	TGLA227	108	0,040

Fuente: Esta investigación.

6.4.1. Equilibrio Hardy-Weinberg

Se detectaron desviaciones al equilibrio Hardy-Weinberg para el *locus* TGLA53 que presentó valores de p significativos para todas las razas ($p < 0,05$) como se puede ver en la Tabla 11, las causas para la ausencia de equilibrio se explica por la presencia de alelos nulos y el exceso de homocigotos ($F_{IS} = 0,433$) encontrados para este *locus*. Para la raza normando se detectó desviación para el

locus INRA23, esto concuerda con el valor de F_{IS} (-0.0549) donde se encontró que este *locus* tiene moderado exceso de heterocigotos. Asimismo, se detectó desviación para el *locus* BM2113 en la raza pardo suizo, hecho que también concuerda con el valor de F_{IS} (0.1617) que indica exceso de homocigotos para este marcador. Los *loci* restantes presentaron valores que indican equilibrio Hardy-Weinberg en todas las razas.

Tabla 11. Equilibrio Hardy-Weinberg para cada *locus* y para cada raza ($P > 0,05$ acepta que la población está en equilibrio Hardy-Weinberg).

<i>Loci</i>	P-valor				
	Criollo	Holstein	Jersey	Normando	Pardo
BM1824	0.73211	0.84937	0.54375	0.22811	0.66685
BM2113	0.22594	0.95666	0.15267	0.06188	0.04111
ETH3	0.31766	0.75952	0.86807	0.13765	0.89297
ETH10	0.26568	0.23994	0.87528	1.00000	0.12977
ETH225	0.29354	0.33422	0.10782	0.13820	0.10440
INRA23	0.06319	0.12304	0.75838	0.03020	0.36475
SPS115	0.52965	0.43792	0.20334	0.43037	0.34085
TGLA53	0.01125	0.00039	0.00509	0.00008	0.02128
TGLA122	0.44130	0.90709	0.88740	0.42879	0.58261
TGLA126	0.71986	0.15550	0.21210	0.85230	0.58487
TGLA227	0.46433	0.59290	0.91300	0.42688	0.55979

Fuente: Esta investigación.

6.5. DISTANCIA GENÉTICA

Se calcularon las distancias genéticas de Nei (1972) como se muestra en la Tabla 12, y con los resultados obtenidos se construyó un dendrograma mediante agrupamiento UPGMA modificado del método Neighbor de Phylip v.3.5. (Figura 13).

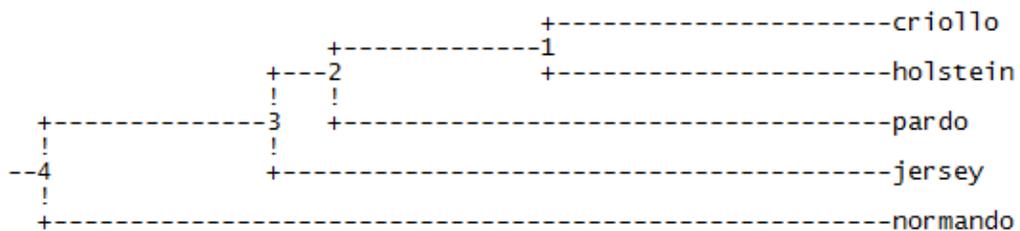
Tabla 12. Distancias genéticas entre pares de poblaciones, con los valores de identidad (arriba de la diagonal) y las distancias genéticas (debajo de la diagonal) según Nei (1972).

	criollo	holstein	jersey	normando	pardo
Criollo	*	0.8797	0.7966	0.7238	0.8330
Holstein	0.1282	*	0.7957	0.7270	0.7994
Jersey	0.2274	0.2285	*	0.7242	0.8045
normando	0.3233	0.3188	0.3226	*	0.7640
Pardo	0.1828	0.2239	0.2175	0.2692	*

Fuente: Esta investigación.

El dendrograma mostró coincidencias con lo encontrado para las distancias genéticas, donde las razas más cercanas genéticamente fueron criollo y holstein (0.1282), que además mostraron el valor de identidad más alto (0.8797); mientras que las razas con menor cercanía fueron criollo y normando (0.3233) con el valor de identidad más bajo (0.7238).

Figura 13. Dendrograma por agrupamiento UPGMA modificado del método NEIGHBOR de PHYLIP v.3.5. para las poblaciones de *Bos Taurus* en el trópico alto de Nariño.



6.6. ESTRUCTURA GENÉTICA

Se calculó el índice de fijación F_{ST} para ver diferenciación y posible estructura genética entre las poblaciones estudiadas, los valores obtenidos se describen en la tabla 13, se encontró que los valores no mostraron diferencias significativas entre razas. El F_{ST} encontrado equivale a una variación del 6.63% ($F_{ST}=0,0633$). Con el fin de confirmar el porcentaje de variación entre poblaciones, se calculó el índice R_{ST} como estimador específico para marcadores microsatélites y se encontró que el valor obtenido es $<$ que para F_{ST} ($R_{ST} = 0,0569$).

De acuerdo a la clasificación de Wright (1943) valores de F_{ST} iguales a 0-0,05 indican pequeña diferenciación genética; entre 0.06-0,15 diferenciación genética moderada, a partir de 0,16-0,25 presentan alta diferenciación genética y valores mayores de 0,25 evidencian diferenciación genética muy grande. La significancia estadística de la prueba fue significativa con un $P < 0.05$. En este estudio se encontró que el F_{ST} para la población total (0,0663) indica una diferenciación moderada.

Al analizar pares de poblaciones para los valores de F_{ST} (Tabla 13), la prueba evidenció diferenciación genética moderada entre las razas criollo y jersey ($F_{ST}=0,122$) y el menor valor de diferenciación se presentó entre criollo y holstein ($F_{ST}=0,006$).

Tabla 13. Valores de F_{ST} entre pares de poblaciones.

Población	F_{ST}				
	criollo	holstein	jersey	normando	pardo
criollo	0.00000	*			
holstein	0.00613	0.00000	*		
jersey	0.12202	0.08991	0.00000	*	
normando	0.03871	-0.00741	0.07033	0.00000	*
pardo	0.04086	0.01222	0.07184	0.02003	0.0000

Fuente: Esta investigación.

El análisis molecular de varianza (AMOVA) mostró que la mayor parte de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones. Donde el 5,26% de la variación total está atribuido a diferencias entre poblaciones y el 94,74% a la diferenciación encontrada dentro de las poblaciones (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis de varianza molecular AMOVA.

Origen de variación	Df	SS	Estimativa de Varianza	%
Entre poblaciones	4	9,984	0.03936 Va	5.26
Dentro poblaciones	225	159,459	0.70871 Vb	94.74
Total	229	169,443	0.74807	

Df =grados de libertad, SS= suma de cuadrados, %= porcentaje de variación.

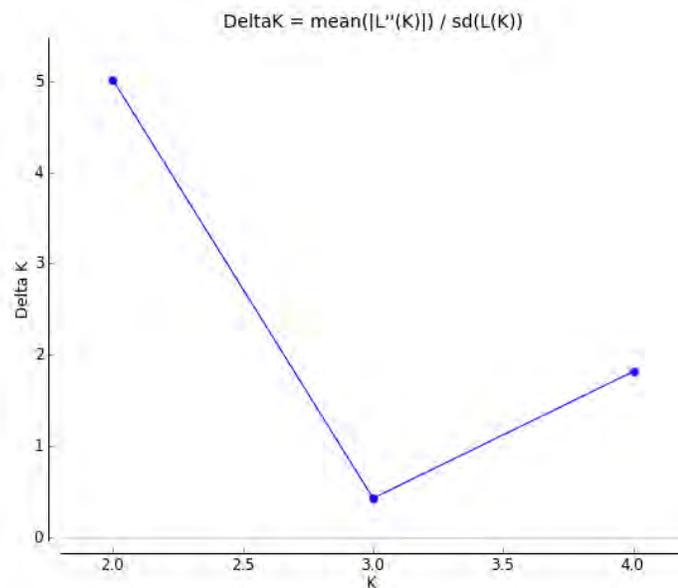
Fuente: Esta investigación.

La estructura genética de las poblaciones también fue analizada utilizando estadística bayesiana, implementada por el programa STRUCTURE. Realizando dos análisis; la asignación de individuos a clúster, que relaciona los individuos más parecidos genéticamente y segundo determinando el número real de poblaciones desde el punto de vista genético. El análisis se realizó utilizando el algoritmo bayesiano suponiendo que las frecuencias alélicas están correlacionadas y que las poblaciones en estudio están mezcladas.

El análisis se realizó considerando dos agrupamientos; primero considerando a cada una de las razas como un grupo o población y segundo tomando a los individuos de la raza holstein y criolla como un grupo o población y las razas restantes como un segundo grupo, esto con base a los resultados encontrados por el análisis de distancias genéticas y diferenciación. Para cada agrupamiento se realizó una serie de corridas para cada valor de K (No. de poblaciones) entre 1 y 5.

De acuerdo al resultado de probabilidad para ambas consideraciones, se determinó que el agrupamiento con la mayor probabilidad fue $K=2$ con un grado de mezcla (α) de 0,30; valor que indica que la mayoría de los individuos tienen pertenencia genética a una población u otra (Evanno *et al.*, 2005) (Figura 14).

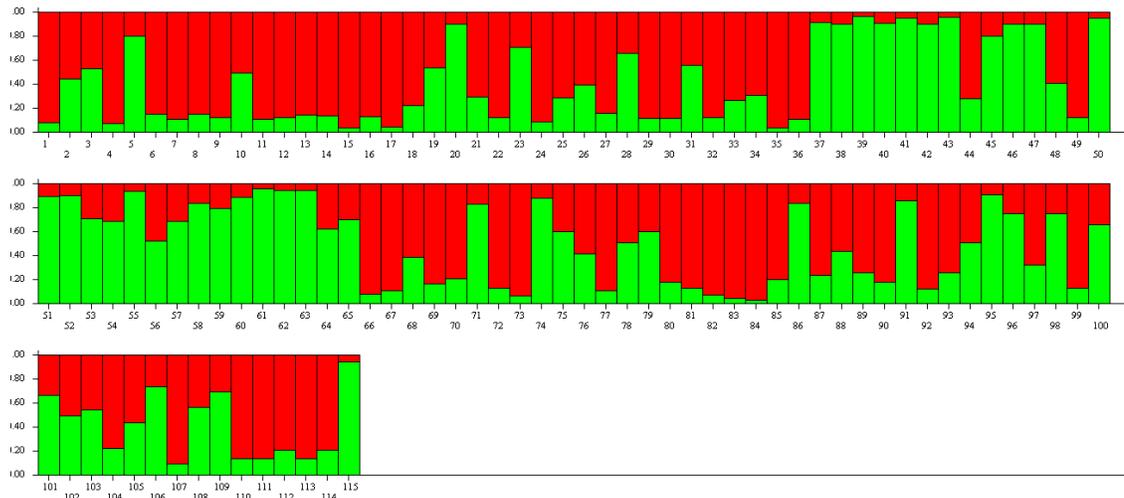
Figura 14. Magnitud de ΔK en función de K dada para una media de 10 corridas independientes con 100.000 iteraciones. El valor que sobresale representa el valor real de K (# de poblaciones). Obtenido por el programa Structure *Harvester website*.



Fuente: Esta investigación.

Los resultados de la asignación de individuos a clúster para ambos ensayos de agrupamiento indicaron que las 5 poblaciones incluidas en este estudio quedaron finalmente distribuidas en 2 clústeres o grupos donde todos los individuos muestran un patrón de mezcla entre ellos, donde las razas criollo y holstein presentan el mismo patrón y una fuerte coincidencia genética, en comparación con las otras razas evaluadas. La raza jersey presentó la menor coincidencia genética, como se puede ver en la Figura 15, donde cada individuo está representado por una columna y las divisiones muestran la proporción que comparte dicho individuo con un clúster inferido.

Figura 15. Agrupamiento de 115 individuos de las cinco razas bovinas inferido por el método estadístico Bayesiano usando el programa Structure y teniendo en cuenta 5 grupos. 1-24: criollo, 25-37: holstein, 38-64: jersey, 65-102: normando, 113-115: pardo.



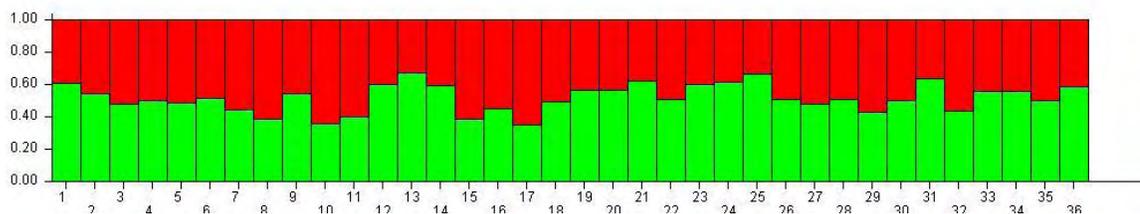
Fuente: Esta investigación.

6.7. GRADO DE ABSORCIÓN DEL NÚCLEO RACIAL CRIOLLO

Con el fin de determinar el grado de absorción del núcleo racial criollo se realizó un tercer análisis de agrupamiento con las razas holstein y criollo, considerándolas como 2 poblaciones.

El porcentaje de absorción o pureza racial del núcleo criollo, se midió tomando el coeficiente de membresía (Q) de los individuos de la raza criolla que presentaban valores superiores a 0,60 que los incluía dentro del clúster de la raza holstein. Con base en esto, se determinó que el porcentaje de absorción fue del 56%.

Figura 16. Asignación probabilística de individuos por población a grupos homogéneos. Cada individuo está representado por una columna y las divisiones muestran la proporción que comparte dicho individuo con un grupo particular, teniendo en cuenta 2 grupos. 1-24=criollo, 25-36=holstein.



Fuente: Esta investigación.

7. DISCUSIÓN

7.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS LOC/MICROSATÉLITES

Los 11 microsatélites empleados en este estudio fueron seleccionados por su uso en el estudio de la genética molecular de estos animales domésticos en Colombia. La FAO ha establecido un mínimo de 20 *loci* para la estimación de la diversidad genética, sin embargo estos 11 marcadores en 11 cromosomas son representativos para explicar la diversidad para todo el genoma bovino (Novoa *et al.*, 2010)

En el presente estudio, se encontró que la población bovina del trópico alto de Nariño es polimórfica para los 11 *loci* microsatélites amplificados a partir de una reacción múltiplex. Autores como (Escobar *et al.*, 2009) reportan para razas de ganado Cebú colombianas (*Bos indicus*) un éxito de amplificación similar para los microsatélites evaluados. Para la subespecie *Bos taurus*, se han reportado estudios genéticos con microsatélites altamente polimórficos reflejando un éxito de amplificación del 100% para la especie (Barrera *et al.*, 2006; Ruiz, 2010). Sin embargo, se observaron dificultades en la amplificación, vía PCR, hecho que se puede explicar por factores asociados con la calidad de DNA obtenido para dichas muestras.

Los valores del contenido de información polimórfica (PIC) obtenidos (superiores a 0,5) indicaron que todos los microsatélites son muy informativos y por tanto útiles para detectar variabilidad genética en esta especie.

Para el *locus* TGLA53, se observó la presencia de alelos nulos, que de acuerdo a lo reportado en ganado bovino, puede presentarse por el alto número de polimorfismos encontrados para este marcador genético (Alves, 2007). Sin embargo, la presencia de alelos nulos, se considera como una limitación en el uso de microsatélites para estudios poblacionales que pueden estar relacionados con errores en la genotipificación, constituyéndose en un error que está ligado a la secuencia de DNA y que puede ser generado por una mutación cercana a un marcador, si esta secuencia flanqueante que está involucrada en el proceso de detección del marcador, impide una amplificación eficiente. De esta forma, un genotipo heterocigoto puede ser registrado erróneamente como un individuo homocigoto al no amplificar uno de sus alelos (Shaw *et al.* 1999 citado por Ayala, 2013) lo que se hace evidente en que para este locus la heterocigosidad observada sea significativamente menor a la esperada por este déficit de heterocigotos.

7.2. DIVERSIDAD GENÉTICA

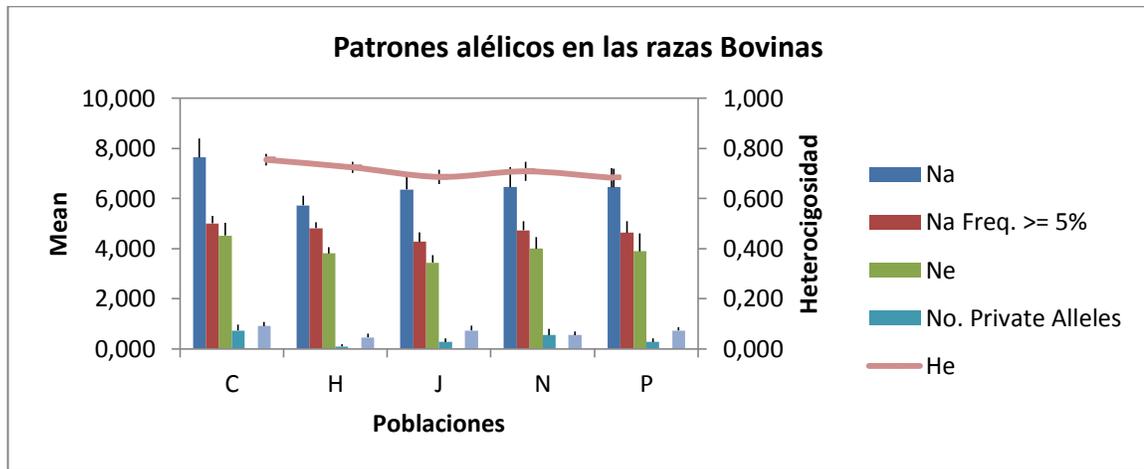
El análisis para los once *loci* STRs, evidenció que la diversidad genética medida en el número efectivo de alelos (N_a) y heterocigosidad observada (H_o), con valores promedios de 10 y 0.7 respectivamente, fue mayor para la raza criolla y menor para la raza normando, pero en general se refleja un alto nivel de heterocigosidad. En efecto, en estudios realizados con poblaciones de bovinos en Brasil, los genotipos obtenidos demostraron que existe una cantidad significativa de variabilidad genética tanto dentro de las razas taurinas especializadas como de las razas localmente adaptadas, encontrando que las razas criollas poseen una riqueza alélica distintamente más alta que las razas especializadas (Alves, 2007).

A pesar de que la introducción de los bovinos en las Américas fue probablemente la más reciente de la historia y el tamaño efectivo de la población reducido, la mezcla de razas de orígenes geográficos distintas siguiendo las migraciones humanas, en conjunto con las condiciones ambientales diversas encontradas en un país tropical, asociada a una moderada presión selectiva, dió origen al estado actual de la diversidad genética de estas razas y puede explicar los altos niveles de diversidad observados en las investigaciones realizadas para bovinos. Por otro lado, en razas donde se ha encontrado una riqueza alélica menor y baja heterocigosidad observada puede estar relacionada con un proceso intensivo de mejoramiento genético (Alves, 2007)

Niveles altos de diversidad se esperarían, en razas donde se ejerce baja presión de selección tales como aislamiento geográfico y manipulación biológica (Barrera *et al.*, 2006) y donde se llevan a cabo patrones de manejo tradicionales, como lo observado para el departamento de Nariño, donde se empiezan a realizar estudios y a incorporar Programas de Mejora Genética en años muy recientes.

La heterocigosidad es alta para todos los marcadores superiores a 0.6, este valor de heterocigosidad fue reportado en un estudio reciente para razas bovinas europeas en un estudio con microsátélites para el año 2013, donde se encontraron valores de heterocigosidad entre 0.58 y 0.77 (Sergiu *et al.*, 2013). En la figura 17, los patrones alélicos indican un comportamiento similar en las poblaciones, con una heterocigosidad alta, y un número de alelos mayor para la raza criolla. Así mismo se observan alelos privados para todas las poblaciones. Los altos niveles de diversidad observados en bovinos y principalmente en bovinos criollos, permite sugerir al igual que otros estudios realizados en América Latina (Alves, 2007), en Colombia (Ruiz, 2010) y en un estudio reciente de criollos colombianos (Bejarano *et al.*, 2012) que las razas bovinas y especialmente la raza criolla constituyen un importante reservorio de diversidad genética para mejoramiento y conservación.

Figura 17. Patrones alélicos para las cinco razas de estudio. C, raza criolla; H, raza holstein; J, raza jersey; N, raza normando y P, raza pardo suizo.



Fuente: Esta investigación.

En el estudio realizado por Bejarano *et al.*, (2012), en la raza criolla Romosinuano, se encontró que el número de alelos por *locus* cambio significativamente siendo el microsatélite TGLA227 el que presentó el mayor número de alelos (22), mientras que el menor número de alelos se encontró para el *locus* SPS115 con 9 alelos.

Para el presente estudio se encontró, para el *locus* TGLA227 el mayor número de alelos, 19 alelos para el total de las muestras analizadas, 8 para la raza criolla y 6 alelos para las razas holstein, jersey y pardo suizo. Resultados similares a los encontrados en este estudio fueron reportados por Boujenane y Ouragh, 2010 donde se consideró al *locus* TGLA227 como uno de los *loci* con el más alto contenido de información polimórfica (PIC); este *locus* también presenta además un valor alto de heterocigosidad por lo que se considera altamente informativo, esto se debe a que los sistemas más informativos son aquellos que teniendo un número suficiente de alelos poseen además sus frecuencias equilibradas. En concordancia, otros estudios han determinado que el nivel de polimorfismo de los *loci* microsatélites TGLA227 e INRA023 para *Bos taurus* es mucho más alto que en *Bos indicus* (Alves, 2007)

El número de alelos encontrados oscila entre un mínimo de 6 y un máximo de 19 con un promedio de 10 alelos por *locus*. El número promedio de alelos por *locus* detectado, resultó ser relativamente superior al 5.56 reportado para la raza criolla Colombiana Casanare (NPA=5.56), sin embargo es inferior al encontrado en estudios realizados con ganado taurino (*Bos taurus*) y cebuino (*Bos indicus*) donde se ha encontrado un NPA de 15 (Cervini *et al.*, 2006). Este valor podría explicarse por el alto número de animales muestreados, considerando que a mayor número de animales muestreados se incrementa la posibilidad de detectar

un mayor número de alelos en la población con una frecuencia baja (Bejarano *et al.*, 2012).

Finalmente, la mayor presencia de alelos exclusivos (8) encontrados para la raza criolla, podría estar correlacionado con la antigüedad de la raza y su capacidad adaptativa por dispersión y colonización que evidencia la presencia de polimorfismos ancestrales, como sugieren Westerbergh y Saura (1994), Elisens y Crawford citados en Borgen (1997). Sin embargo, a pesar de que los alelos exclusivos son muestra de diferenciación genética, las frecuencias alélicas de los encontrados en este estudio para la raza criolla no superan el 10% del total y por lo tanto no pueden dar evidencia contundente de dicha diferenciación (Donoso, 2004). Esto concuerda con lo encontrado en el análisis de distancias genéticas y cálculo de F_{ST} (0,0663), datos que explican diferenciación moderada entre las poblaciones de estudio. No obstante, cabe la posibilidad de que alelos exclusivos en otra población como la holstein, podrían no haberse detectado por efecto del número muestral.

7.3. EQUILIBRIO HARDY – WEINBERG

Como es posible observar en la tabla 10, las proporciones genotípicas están de acuerdo con el equilibrio Hardy-Weinberg, para ocho de los once *loci* microsatélites ya que no presentaron valores de P significativo. El *locus* TGLA53 presentó para las cinco razas desvíos significativos del equilibrio Hardy-Weinberg donde el valor de F_{IS} cercano a 1, indicó un exceso de homocigotos. En otro estudio en Colombia donde se trabajó con este sistema multiplex, se encontró una significativa desviación del equilibrio Hardy-Weinberg para este *locus*, también asociado a un déficit de heterocigotos (Escobar *et al.*, 2009). Se señalan importantes factores que conllevan a este déficit de heterocigotos, incluyendo la presencia de alelos nulos, endogamia, efecto wahlund y selección en contra de los heterocigotos (Escobar *et al.*, 2009).

En nuestro estudio para este *locus* en particular, se detectó la presencia de alelos nulos que son una causa común en estudios con microsatélites como la fuente del déficit de heterocigotos. Una posible explicación para la aparición de alelos nulos, podría ser la baja eficiencia de hibridación del cebador utilizado debido a puntos de mutación en uno o más sitios de alineamiento (Avisé, 2004 citado por Ayala 2013). Además, es posible que para este *locus*, durante el análisis de los electroferogramas, los picos de los diferentes alelos se observaron muy próximos unos de otros imposibilitando su distinción y por eso haya ocurrido una clasificación errónea de individuos tanto heterocigotos como homocigotos, esto a razón de que se considera que entre los errores de genotipificación, el error más común del 60–80% es debido a factores humanos como la interpretación errónea de los picos de los alelos (Pompanon *et al.*, 2005). En el caso del *locus* INRA23 también se observó un desvío significativo de equilibrio Hardy-Weinberg, para una sola raza, y donde el valor de F_{IS} negativo indicó que se debía a un

moderado exceso de heterocigotos. Algunos autores señalan como posibles causas además de los errores en la genotipificación, a la selección por sobredominancia o al cruzamiento entre las poblaciones (Egito *et al.*, 2007).

Para el resto de *loci* microsatélites testados, se observan valores de F_{IS} cercanos a cero. Autores como Ruiz (2010), consideran que el valor de F_{IS} debe ser lo más aproximado posible a cero cuando las poblaciones son homogéneas y el muestreo está bien realizado.

En estudios hechos en razas taurinas y cebuínas por su parte, se han encontrado razas que con un coeficiente de endogamia más alto y significativo (Escobar *et al.*, 2009). Este resultado muy probablemente refleja un manejo reproductivo más intenso al que son sometidas estas razas, con el uso de un relativo número pequeño de toros de alto valor como donadores de semen en las prácticas de reproducción asistida. Así, la variabilidad genética medida como heterocigosidad tiende a ser mayor en las razas donde no se ha ejercido una selección artificial intensa como lo demuestran los resultados de este estudio.

7.4. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE LAS POBLACIONES

El análisis de varianza molecular reveló que la mayor parte de la variación genética observada en las poblaciones analizadas, es el resultado de las diferencias existentes entre los individuos dentro de las razas (94.74% valor inferido por el AMOVA). Este comportamiento se encontró en numerosos estudios, donde más del 90% de la variación se ha encontrado dentro de las razas. Este resultado es confirmado por el valor del índice F_{ST} que demuestra una diferenciación genética moderada, indicando que las razas no presentan estructuración genética. Este estimativo fue determinado mediante el estadístico F_{ST} como el R_{ST} , el valor más alto de diferenciación obtenido con el índice sugiere que la moderada diferenciación entre las razas involucra principalmente las frecuencias alélicas más que las diferencias en el tamaño de los alelos debido al comportamiento mutacional de los microsatélites (Cervini *et al.*, 2006).

El análisis de distancias genéticas y la diferenciación entre pares de F_{ST} mostraron la misma tendencia, con una menor distancia entre las razas criollo y holstein (0.1282) y la mayor distancia entre las razas criolla con respecto a jersey y normando. El dendrograma confirma las observaciones anteriores, indicando que aunque las distancias entre taurinos son muy pequeñas se evidencia el agrupamiento entre las razas holstein y criollo, siendo las razas más próximas a este clúster, jersey y pardo suizo. Se ha encontrado para el departamento del Valle del Cauca, que las distancias genéticas superiores a 0.32, confirman la separación entre subespecies *Bos indicus* y *Bos taurus*, donde se observaron los niveles más altos de diferenciación. Las distancias dentro de *Bos taurus* para este departamento también fueron bajas siendo los grupos más próximos holstein y la

raza criolla Hartón del Valle (Escobar *et al.*, 2009). Ahora bien, todas las estimaciones de diferenciación entre pares de poblaciones (F_{ST}) fueron significativas y mostraron la misma tendencia que las distancias genéticas.

La alta similaridad (87%) y el nivel bajo de diferenciación entre los individuos de la raza holstein y criolla, revela que no están estructuradas genéticamente, hecho que se puede explicar por un intenso flujo genético reciente o a un pasado común. Para el trópico alto de Nariño, es posible detectar que esta similaridad entre estas dos razas puede deberse a que posiblemente compartieron reproductores en un tiempo reciente y por tanto que la mayoría de los individuos que fueron estudiados hayan sido el resultado del cruce entre ellas. Así mismo, fue posible encontrar que en las fincas lecheras del departamento de Nariño, la denominación de la raza criolla se hace fenotípicamente puesto que no se cuenta con registros y por lo tanto pueden asignarse como criollos a individuos que ya han presentado cruces con la raza holstein.

Este análisis de agrupamiento, puede estar reflejando el manejo de estas razas dentro de los actuales sistemas de producción. Como se ha mencionado, a partir de su introducción, la raza criolla ha ido adquiriendo importantes características como su potencial de adaptación a diversos ecosistemas, resistencia a ciertas enfermedades infecciosas, facilidad para aprovechar mejor los recursos de su difícil ambiente, alta eficiencia reproductiva y sostenibilidad a largo plazo (Barrera *et al.*, 2006). Además, estudios realizados para Colombia y para el trópico alto de Nariño indican que la raza criolla se caracteriza por presentar un alto nivel composicional en la leche pero un bajo nivel de producción (litro leche/día) (Solarte *et al.*, 2009), de tal manera que para la ganadería de leche en Nariño ha sido principal incrementar el nivel de producción, lo que conlleva al cruce con razas especializadas como la holstein. Esta situación se ha hecho evidente en una recopilación de estudios realizada por Tewolde (2007) para los sistemas de producción animal en los Trópicos de América Latina.

La introducción de las razas jersey y normando se ha hecho con el propósito fundamental de mejorar la calidad de la leche en cuanto a grasa, proteínas y sólidos totales, haciendo cruzamientos con la raza holstein, lo que se evidencia en su similaridad y cercanía con el clúster que conforma esta raza especializada.

Los análisis desarrollados en el software Structure soportan la presencia de dos poblaciones genéticas ($k=2$), que claramente demuestran un agrupamiento de las razas criolla y holstein, puesto que la mayor proporción del genoma de los individuos de estas razas representado por su coeficiente de membresía se asigna a la misma población. En general las cinco razas analizadas en este estudio no podrían considerarse como poblaciones puras, puesto que es posible observar para todos los casos mezcla genética en mayor o menor medida (Figura 16).

Para el caso particular del trópico alto de Nariño, el criterio básico de selección es el volumen de producción, que conlleva a la práctica de cruzamientos dirigidos destinados a incrementar principalmente el volumen de litro de leche /día. De ahí, que se han realizado cruces entre razas teniendo como base a la holstein, que por sus altos volúmenes de producción es la raza más difundida y utilizada en prácticamente todos los sistemas de lechería especializados, hecho que se ha observado en estudios previos realizados por el Programa de Mejoramiento Genético Animal (Solarte *et al*, 2009).

Por otro lado se confirma mediante este análisis, la ausencia de sub-estructura genética para cada raza. Esto puede esperarse debido al reciente establecimiento de dichas razas en Colombia y a la alta tasa de migración entre localidades como consecuencia de las prácticas comerciales con estos animales dentro del departamento. Estas prácticas promueven el flujo génico entre regiones distantes resultando en una homogenización recurrente de las frecuencias alélicas.

La raza jersey por su parte, presenta un comportamiento característico, puesto que los individuos de esta raza presentaron valores de membresía que los incluyeron en otro clúster, sin embargo sigue existiendo mezcla. Esto puede estar reflejando que la raza jersey en el Trópico alto de Nariño, no es tan difundida puesto que su introducción ha sido reciente y se pueden encontrar en la actualidad, un mayor número de hatos puros.

7.5. GRADO DE ABSORCIÓN DEL NÚCLEO RACIAL CRIOLLO

Para estimar la pureza racial de las poblaciones se utilizó un modelo basado en el método de agrupamiento (Q coeficiente membresía) que permite inferir la estructura de la población. Para la raza criolla, se determinó un grado de absorción del 56% representado en los individuos con un coeficiente de membresía superior al 0.6 que los incluyó en el clúster correspondiente a la raza holstein y por tanto se demuestra un alto nivel de absorción del núcleo criollo por parte de esta raza especializada.

Lo anterior, se ha hecho evidente en estudios previos realizados con razas criollas en Colombia, que desde el punto de vista citogenético indican un alto grado de introgresión genética de *Bos indicus* y de razas especializadas de *Bos taurus* en ganado criollo colombiano (Sánchez *et al.*, 2008).

Estos resultados permiten inferir que en el trópico alto de Nariño, se incurre con frecuencia en la realización de cruzamientos dirigidos con razas especializadas como la holstein, destinados al incremento del volumen de producción, lo que conlleva a una disminución continua de la pureza del núcleo racial criollo.

En efecto, es evidente que la introducción de genes foráneos, en las razas de ganado criollo colombiano va en detrimento de la pureza de las mismas y puede tener incidencia en la capacidad adaptativa propia de estos núcleos. Esta situación se presenta puesto que persiste la idea equivocada de que el mejoramiento del bovino criollo debe ser realizado a través del cruzamiento con ejemplares importados y no a través de la selección y mejora de los criollos.

La diversidad genética de las razas criollas puede permitir desarrollar nuevas características en respuestas a cambios en el ambiente, enfermedades o las condiciones del mercado. Además, poseen combinaciones genéticas y adaptaciones especiales a ambientes extremos (elevadas temperaturas, altitud, exposición a enfermedades, etc.) que no se encuentran en otras razas. Sin embargo, las razas cruzadas no siempre están tan adaptadas como las originales. Caracteres como resistencia a enfermedades, forrajes pobres, etc. pueden perderse fácilmente, poniendo de manifiesto la importancia de mantener las razas criollas en pureza o recuperarlas en caso de haber sido mezcladas (Amador, 2013).

La mezcla genética que se observó en el estudio, evidencia el flujo genético continuo que hay entre las razas, sin embargo a pesar de que se considera que este parámetro es importante porque permite mantener la diversidad genética, desde el punto de vista de la conservación las razas criollas son componentes importantes de la biodiversidad y su conservación requiere de su mantenimiento en pureza. Un nuevo influjo de material genético procedente de otra raza puede amenazar a la población causando una extinción genómica. Dicha extinción no implica necesariamente la pérdida de alelos, pues se hizo evidente que la raza criolla presenta el mayor número de alelos con respecto a otras razas, sino que puede manifestarse como la pérdida de combinaciones de alelos en diferentes *loci* (haplotipos), que suelen ser la base de las adaptaciones locales (Amador, 2013). Así mismo, el mantenimiento de las poblaciones puras puede ser esencial para asegurar la conservación de genotipos que como se ha determinado en estudios para el trópico alto de Nariño, están relacionados con una alta calidad de la leche (Solarte *et al.*, 2009).

Es por ello que algunos autores como Bejarano y colaboradores (2012) y Lirón y colaboradores (2002), recomiendan que sea necesario restringir el uso de germoplasma importado (de razas especializadas como la holstein) e iniciar programas de selección en las poblaciones de razas criollas bovinas. De no iniciarse programas de mejoramiento genético, a largo plazo, se perdería la adaptación lograda por selección natural y la posibilidad de desarrollar razas tropicales competitivas y eficientes (Bejarano *et al.*, 2012; Lirón *et al.*, 2002)

CONCLUSIONES

La población bovina del Trópico Alto de Nariño, fue polimórfica para los once microsatélites amplificados a partir de la reacción multiplex, que presentaron un PIC superior a 0.5 resultando altamente informativos para evaluar de manera eficaz la variabilidad y la estructura genética de las razas de estudio.

La alta diversidad encontrada en la razas, medida en el número de alelos y la heterocigosidad observada, es similar a la encontrada para razas de *Bos taurus* en América Latina y Colombia, explicado por un proceso de miscegenación de razas de distintos orígenes geográficos en conjunto con las condiciones ambientales diversas encontradas en un país tropical, asociada a una moderada presión selectiva. Por su parte, la raza criolla presentó la heterocigosidad y el número de alelos más alta de las razas estudiadas evidenciando su historia de adaptación a las condiciones ambientales y bajo manejo selectivo en el Trópico Alto de Nariño.

Los estimativos del índice F_{ST} indican que las razas presentan una moderada diferenciación genética en correspondencia con los análisis de agrupamiento que indican una mezcla genética entre las razas, hecho que se puede explicar por un intenso flujo genético reciente o a un pasado común. Estos análisis permitieron soportar la presencia de dos poblaciones genéticas, con un claro agrupamiento de las razas holstein y criolla.

El núcleo racial criollo presenta un alto nivel de absorción (56%) por parte de la raza holstein, que evidencia la realización de cruces dirigidos al incremento del nivel de producción y en detrimento de la pureza de la raza criolla. Este resultado posiblemente puede incidir en la capacidad adaptativa de la misma, de ahí que se hace necesario el desarrollo de estrategias que permitan conservar la pureza de la raza criolla o recuperarla a partir de los individuos que ya han sido mezclados.

PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN

Gracias a la obtención de información del estado genético de las poblaciones bovinas en el trópico alto de Nariño es posible crear propuestas de apareamiento, con base en la información de estructura de las poblaciones evaluadas. Estas estrategias de mejoramiento genético deben ir asociadas a las condiciones ambientales y al manejo de los sistemas de producciones actuales, guiadas a la conservación de criollos con el fin de que la absorción por parte del núcleo holstein no siga en curso.

Con el fin de lograr estrategias de conservación, es importante alertar a la comunidad ganadera presente en los distritos lecheros, acerca de las condiciones genéticas que se están presentando en las razas bovinas tanto foráneas como el núcleo criollo. Pueden ofrecerse cursos de manejo entre poblaciones, que permitan la reducción de cruzamientos dirigidos absorbentes, y que estén guiados a la conservación de un núcleo criollo puro.

Además, es factible la evaluación de toros criollos con el fin de determinar cuáles de ellos reúnen las mejores condiciones para ser usados como reproductores y así obtener progenies puras.

BIBLIOGRAFÍA

- Alderson, L. (2003). Criteria for the recognition and prioritisation of breeds of special genetic importance. *Animal Genetic Resources Information*, 33, 1–9.
- Álvarez, L., Martínez, A., Muñoz, J., & Delgado, J. (2009). Caracterización genética del ganado criollo colombiano, mediante 27 microsatélites. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias*, 22(3), 451–452.
- Alves, A. (2007). *Diversidade Genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial : subsídios para a conservação*. Universidade de Brasília.
- Amador, C. (2013). *Estrategias de manejo poblacional para revertir introgresión de genes exógenos*. Universidad complutense de Madrid.
- Ayala, P. (2013). *Caracterización genética de la población ex situ del Mico León Negro (Leontopithecus chrysopygus) (Primates, Callithricidae), utilizando marcadores homologos de tipo microsatelite, en la Fundación Parque Zoológico de Sao Paulo y en el Parque Ecologico de .* Universidad de Nariño.
- Barker, J. S. F. (2001). Conservation and management of genetic diversity: a domestic animal perspective. *Canadian Journal of Forest Research*, 31(4), 588–595.
doi:10.1139/cjfr-31-4-588
- Barrera, G., Martinez, R., Perez, J., Polanco, N., & Ariza, F. (2006). Evaluación de la variabilidad genética en ganado Criollo Colombiano mediante 12 marcadores microsatélites. *Animal Genetic Resources Information*, (38), 35–45.
- Basrur, P., & Moon, Y. (1967). Chromosomes of cattle, bison, and their hybrid, the cattalo. *American journal of veterinary research*, 28(126), 1319–1325.
- Bejarano, D., Pedraza, A., Rocha, F., & Martinez, R. (2012). Variabilidad genética en subpoblaciones comerciales de la raza criolla colombiana Romosinuano. *Genética, Reproducción y mejoramiento Animal*, 13(1), 97–107.
- Bjornstad, G., & Roed, K. (2002). Evaluation of factors affecting individual assignment precision using microsatellite data from horse breeds and simulated breed crosses. *Animal Genetic Resources Information*, 33, 264–270.
- Borgen, L. (1997). Genetic differentiation in endemic Lobularia (Brassicaceae) in the Canary Islands. *Nord. Journal Botany*, 16, 487–503.

- Boujenane, I., & Ouragh, L. (2010). Genetic Analysis of native Moroccan cattle. *Livestock Research for Rural Development*, 22(154).
- Brunner, R., Sanftleben, H., Goldammer, T., Kuhn, C., Weikard, R., Kata, S., Schwein, M. (2003). The telomeric region of BTA18 containing a potential QTL region for health in cattle exhibits high similarity to the HSA19q region in humans small star, filled. *Genomics*, 81(3), 270–278.
- Cañón, J., Alexandrino, P., Bessab, I., Carleos, C., Carretero, Y., Dunnera, S., Moazami, K. (2001). Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genet. Sel. Evol.*, 33, 311–332.
- Cervini, M., Henrique-silva, F., Mortari, N., & Jr, E. M. (2006). Genetic variability of 10 microsatellite markers in the characterization of Brazilian Nelore cattle (*Bos indicus*). *Genetics and molecular Biology*, 29(3), 486–490.
- Chakraborty, R. (1996). Sample size requirements for addressing the population genetic issues of forensic use of DNA typing. *Journal of Human Biology*, 64, 141–159.
- Ciampolini, R., Cetic, V., Ciani, E., Mazzanti, E., Fosella, X., Marron, F., Presciuttini, S. (2006). Statistical analysis of individual assignment tests among four cattle breeds using fifteen STR loci. *Journal of animal science*, 84(1), 11–19.
- Clutton, J. (1999). *A natural history of domesticated mammals* (segunda., p. 238). Cambridge.
- Colin, R. (2006). *Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de Agave xylonacantha (AGAVACEAE) utilizando ISSR como marcador molecular*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Delgado, A., Ruiz, S., Arevalo, L., Castillo, G., Viles, N., Calderon, J., Ramos, R. (2007). *Plan de Acción en Biodiversidad del departamento de Nariño 2006 – 2030 - Propuesta Técnica*. Corponariño, Gobernación de Nariño - Secretaría de Agricultura, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Unidad Administrativa Esp. (L. Arevalo & S. Ruiz, Eds.) (Primera., p. 525). San Juan de Pasto.
- Donoso, C. (2004). *Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina*. (Universitaria, Ed.) (ilustrated., p. 420). Santiago de Chile.
- Egito, A. a, Paiva, S. R., Albuquerque, M. D. S. M., Mariante, A. S., Almeida, L. D., Castro, S. R., & Grattapaglia, D. (2007). Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. *BMC genetics*, 8(83), 1–14. doi:10.1186/1471-2156-8-83

- Eguiarte, L., Souza, V., & Aguirre, X. (2007). *Ecología molecular*. (R. Marcó, Ed.) (Primera Ed., p. 592). Ciudad de Mexico.
- Escobar, C., Olivera, M., Ostos, H., & Guerra, T. (2009). Genetic variability of the zebu cattle breed (*Bos indicus*) in the departament of Huila, Colombia using microsatellite molecular markers. *Acta Biologica Colombiana*, 14(3), 173–180.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14, 2611–20. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application. *Genetics*, 131, 479–491.
- Falush, D., & Pritchard, J. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 574–578.
- FAO. (2010). *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura*. (B. Rischkowsk & P. Dafydd, Eds.) (p. 596). Roma.
- Fernández, J., Toro, M., & Caballero, A. (2004). Managing individuals' contributions to maximize the allelic diversity maintained in small, conserved populations. *Conservation Biology*, 18(5), 1358–1367.
- Gómez, L., Priest, K., Rauw, W., Okomo, M., Thain, D., Bruce, B., Beattie, C. (2008). The value of DNA paternity identification in beef cattle: Examples from Nevada's free-range ranches. *Journal of animal science*, 86(1), 17–24.
- González, E. G. (2011). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2-3), 377–388. doi:10.3989/graellsia.2003.v59.i2-3.253
- Guo, S., y Thompson, E. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48, 361–372.
- Hannote, O., & Jianlin, U. (2005). Genetic characterization of livestock populations and its use in conservation decision making. In J. Ruane & A. Sorunino (Eds.), *The role of Biotechnology in exploring and protecting agricultural genetics resources* (pp. 89–95). Roma.
- Lara, M., Gama, L., Bufarah, G., Sereno, J., Celegato, E., & De Abreu, U. (2002). Genetic polymorphism at the K-casein locus in Panteneiro cattle. *Archivos de Zootecnia*, 51, 99–105.

- Lirón, J. P., Ripoli, M. V, Luca, J. C. De, & Giovambattista, G. (2002). Analysis of genetic diversity and population structure in Argentine and Bolivian Creole cattle using five loci related to milk production. *Genetics and molecular Biology*, 25(4), 413–419.
- Litt, M., y Luty, J. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Journal Human Genetic*, 44, 397–401.
- Lush, J. (1994). *The genetic of populations*. (L. S. University, Ed.) (Special Re., p. 294). Iowa.
- MacHug, D., Loftus, E., Bradley, D., & Shriver, M. (1997). Microsatellite Dna variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle. *Genetics*, 146, 1071–1086.
- Martinez, D. G. (2008). *Diversidad genética y establecimiento de prioridades en esquemas de conservación: ejemplos de aplicación en la raza de Lidia*. Universidad Complutense de Madrid.
- Martínez, R. a, García, D., Gallego, J. L., Onofre, G., Pérez, J., & Cañón, J. (2008). Genetic variability in Colombian Creole cattle populations estimated by pedigree information. *Journal of animal science*, 86(3), 545–52. doi:10.2527/jas.2007-0175
- Maudet, C., Luikart, G., & Tarbelet, P. (2002). Genetic diversity and assignment tests among seven french cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *Journal of animal science*, 80, 942–950.
- Mburu, D., & Hanotte, O. (2005). A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics. Nairobi: International Atomic Energy Agency.
- Mergenthaler, M., Momm, H., & Valle Zárate, A. (2006). Global gene flow in cattle. *Gene flow in animal genetic resources: a study on status, impact and trends*, 4, 241 – 280.
- Moreno, F., Carvajal, G., Bermudez, N., Derr, J. N., Berdugo, J., Barrera, J., ... Scott, D. (2001). Diversidad genética y relaciones filogenéticas del ganado criollo colombiano. *CORPOICA*, 3(2), 17–23.
- Moreno, M., Cerón, M., & Corrales, J. (2007). Asociación de k-caseína y b-lactoglobulina con características de calidad de la leche en las razas holstein y jersey en Antioquía, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias*, 20(4).
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321–3323.

- Novoa, M., & Usaquén, W. (2010). Population genetic analysis of the Brahman cattle (*Bos indicus*) in Colombia with microsatellite markers. *Journal of animal breeding and genetics*, 127(2), 161–8. doi:10.1111/j.1439-0388.2009.00811.x
- Pariset, L., Capuccio, I., & Valentini, A. (2003). Use of microsatellite for genetic variation and inbreeding analysis in sard sheep flocks of central Italy. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120, 425–432.
- Piñero, D. (2008). El conocimiento de la variabilidad genética. In CONABIO (Ed.), *Capital natural de México* (Primera., pp. 425–435). Ciudad de México.
- Pizarro, G., Mujica, F., & Felmer, R. (2009). Estructura poblacional y diversidad genética de rebaños bovinos de carne del sur de Chile. *AgroSur*, 37(1), 60–83.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., & Taberlet, P. (2005). Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature reviews. Genetics*, 6(11), 847–59. doi:10.1038/nrg1707
- Quiroz, J. (2007). *Caracterización genética de los bovinos criollos mexicanos y su relación con otras poblaciones bovinas*. Universidad de Córdoba.
- Riethmuller, P. (2003). The social impact of livestock: a developing country perspective. *Animal Science*, 34(4), 245–253.
- Rivas, E., Veli, E., Aquino, Y., Rivas, V., Pastor, V., & Estrada, R. (2007). Acciones para la caracterización y conservación del bovino criollo Peruano (*Bos taurus*). *Animal Genetic Resources Information*, (40), 33–42.
- Rodríguez, S., Southey, B., Heyen, D., & Lewin, H. (2002). Detection of quantitative trait loci influencing dairy traits using a model for longitudinal data. *Journal of dairy science*, 85(10), 2681–91.
- Rosero, C. (2010). *Análisis molecular de la Estructura Genética y aislamiento por distancia del vector primario de malaria Anopheles darlingi en Colombia*. Universidad del Valle.
- Ruiz, L. (2010). *Determinación de la variabilidad genética en subpoblaciones comerciales de ganado criollo colombiano de raza romosinuano mediante marcadores moleculares tipo microsatélite*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Rusell, D., Rios, J., Erosa, G., Remmenga, D., & Hawkins, D. (2000). Genetic differentiation among geographically isolated populations of Criollo cattle and their divergence from other *Bos taurus* breeds. *Journal of animal sciencena*, 78(9), 2314–2322.
- Sambrook, J., y Rusell, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Press, Ed.) (Tercera ed., p. 2028). New York.

- Sánchez, C., Jiménez, L., & Bueno, M. (2008). INTROGRESIÓN GENÉTICA DE *Bos indicus* (BOVIDAE) EN BOVINOS CRIOLLOS COLOMBIANOS DE ORIGEN *Bos taurus*. *Acta Biológica Colombiana*, 13(1), 131–142.
- Sastre, H. (2003). *Descripción, situación actual y estrategias de conservación de la raza bovina colombiana criolla casanare*. Universidad de Córdoba.
- Schneider, S., Excoffier, L., y Laval, G. (2005). Arlequin: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, 1, 47–50. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2658868&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sergiu, G., y Marieta, C. (2013). Genetic Characterization of Romanian Local Breeds Using Microsatellite Markers. In M. Caliskan (Ed.), *Analysis of genetic variation in animals* (Primera Ed., pp. 28–44). Turkey.
- Serrano, G. M., Alves, A., Mcmanus, C., & Mariante, S. (2004). Genetic diversity and population structure. *Pesq. agropec. bras.*, 39(1), 543–549.
- Shrestha, J. (2005). Conserving domestic animal diversity among composite populations. *Small Ruminant Research*, 56, 3–20.
- Slatkin, M. (1991). Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetical Research*, 58(2), 167–175.
- Slatkin, M., y Excoffier, L. (1996). Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. *Heredity*, 76, 377–383.
- Solarte, C., Garcia, H., & Imues, M. (2003). *Bioestadística: Aplicaciones es producción y salud animal*. (UDENAR, Ed.) (Primera., p. 274). San Juan de Pasto.
- Solarte, E., Rosero, C., Erazo, J., Zambrano, G., Cardenas, H., & Burgos, W. (2009). Frecuencias alélicas del gen Kappa caseína en la raza Holstein del trópico alto de Nariño – Colombia. *Livestock Research for Rural Development*, 21(1).
- Spencer, C., Neigel, E., & Leberg, L. (2000). Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. *Molecular Ecology*, 9, 1517–1528.
- Tewolde, A. (2007). *Los Criollos bovinos y los sistemas de producción animal en los trópicos de América Latina* (pp. 13–14). Ciudad Victoria.
- Tisdell, E. (2005). Amenazas a la diversidad genética del ganado. In *Situación de la Biodiversidad en el Sector Ganadero* (pp. 121–148).

- Uffo, O., Martín, I., Martínez, S., Ronda, R., Osta, R., Rodellar, C., & Zaragoza, P. (2006). Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. *AGRI*, 39(1), 15–24.
- Uffo, O., & Martinez, S. (2002). Amplificación por PCR de los genes que codifican para lactoalbúmina, la lactoglobulina y la K-caseína de una vaca alta productora de leche y dos de sus descendientes e identificación de las variantes alélicas por RFLP. *Revista de Salud Animal*, (24), 22–26.
- Vilaboa, A., Quirós, M., Díaz, P., & Zetina, P. (2012). Situación del bovino criollo lechero tropical (CLT) en México, Nicaragua y Costa Rica. *Archivos de Zootecnia*, 61, 31–39.
- Villasmil, Y., Bravo, R., Cuellar, L., Contreras, G., Jordana, J., & Aranguren, J. (2008). Genetic Diversity of Limonero Creole Breed Using Microsatellites. *Revista científica, FCV-LUZ*, 18(4), 415–423.
- Yeh, F., Yang, C., & Boyle, T. (1999). Microsoft Window-based Freeware for population Genetic Analysis (POPGENE).
- Zavala, J. (2005). *Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular*. (UADY, Ed.) (Septima Ed., p. 195). México.
- Zhang, C., Hernandez, C., & Wiener, P. (2004). Mapping of multiple quantitative trait loci affecting bovine spongiform encephalopathy. *Genetics*, 167, 1863–1872.
- Zhou, G., Zho, Q., & Guo, S. (2005). Genetic diversity analysis of five cattle breeds native to China using microsatellite. *Journal of Genetics*, 84, 77–80.

Anexo A. Protocolo de extracción de DNA de *Salting Out* a partir de muestras de sangre.

Inicialmente 500 µl de sangre conservada en medio EDTA se mezclaron con 500 µl de solución de lisis I (0.32M de sacarosa, 10 mM de Tris-HCl pH=7.5, 5 mM de MgCl₂ y 1% de Tritón X-100). Una vez adicionada la solución de lisis I, se homogenizó por inversión y se incubó a temperatura ambiente, durante 5 min.

Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a temperatura ambiente a 14000 r.p.m. durante 1 min. A continuación, se descartó el sobrenadante, evitando perder el botón formado por centrifugación. Luego se adicionaron 1 ml de solución de lisis I y se mezcló por inversión hasta homogenizar completamente el material. Posterior a la homogenización, se centrifugó nuevamente 1 min a 14000 r.p.m. y se realizaron repeticiones de los pasos de lisis y centrifugación, hasta lograr un precipitado de color blanco.

Posteriormente se adicionó al precipitado 400 µl de solución de lisis II (10 mM de Tris-HCl pH=7.5, 10 mM de EDTA pH=8.0, 50mM de NaCl y 0.2% de SDS) y 20 µl de proteinasa K (10 µg/ µl). La solución homogenizada se incubó por 30 min a 56° C, pasado el tiempo de incubación se adicionaron 300 µl de solución de NaCl 5M, y se homogenizó la solución por vórtex durante 60s. En este paso se empleó un equipo vórtex para homogenizar la solución durante 60 segundos.

Luego se realizó centrifugación por 20 min a 13500 r.p.m. y 350 µl del sobrenadante se adicionaron a un tubo que contenía previamente 900 µl de etanol absoluto frío, para visualizar la formación de la malla de DNA. Con el fin de optimizar la aparición de la malla de DNA, se incubó por 48 horas a -20°C.

Pasado en tiempo de incubación, la solución se centrifugó durante 20 min a 13500 r.p.m. y se hizo un lavado final con etanol al 70% y una posterior centrifugación. El precipitado de DNA se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 µl de buffer de conservación TE (1 mM de Tris-HCl pH=7.5 y 0.1 mM de EDTA pH=8.0) y se almacenó a -20°C.

Anexo B. Protocolo de Extracción de DNA a partir de muestra sanguínea usando el kit FTA® de *Whatman Bioscience*

Sobre una base estéril (*Harris Cutting Mat*) se extrajo cuidadosamente un disco de 1.2 mm de la tarjeta FTA® con ayuda del sacabocados Micro-punch del kit. El disco se transfirió a un tubo de 1.5 ml para continuar con el proceso de purificación del DNA como lo describe la casa fabricante. En el tubo que contenía el disco, se adicionó 200 µl de reagente (FTA® *Purification reagent*) y mientras se agitaba por inversión se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos.

Luego, se descartó el reagente, evitando remover el disco del tubo. Este proceso de adición, incubación y descarte del reagente se repitió dos veces más. Posteriormente, se lavó el DNA contenido en el disco adicionando 200 µl de Buffer TE (10mM Tris-HCL, 0.1 mM EDTA, pH 8.0), y se incubó por cinco minutos, agitando por inversión. Pasado el tiempo de incubación el buffer fue descartado, repitiendo este proceso dos veces. Finalmente, el disco se transfirió a tubos de 0,2 ml y se conservaron en este tubo para su posterior amplificación, forma de poder evaluar extracción de DNA para este método.

Anexo C. Microsatélites para DNA de ganado vacuno, utilizados en la etapa de estandarización de amplificación por PCR. Nombre de cada locus, secuencia directa y reversa de la pareja de cebadores, tamaño del fragmento esperado en pares de bases (pb) referencia del grupo de autores que describen el uso del locus respectivo y temperatura de alineamiento reportada para cada cebador.

Loci	Cebadores directo y reverso	Tamaño del amplificado (pb)	T de alineamiento (°C)	Referencias
BM1818	AGCTGGGAATATAACCAAAGG AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	248-278	54 ,58	<i>Bishop et al., 1994</i>
BM1824	GAGCAAGGTGTTTTCCAATC CATTCTCCAAGTCTTCCTTG	176-197	55	<i>Bishop et al., 1994</i>
BM2113	GCTGCCTTCTACCAAATACCC CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	122-156	58	<i>Bishop et al., 1994</i>
CSSM66	ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	171-209	54	<i>Barendse et al., 1994</i>
ETH3	GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	103-133	57	<i>Solinas Toldo et al., 1993</i>
ETH10	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA CCTCCAGCCACTTTCTCTTCTC	207-231	54, 58	<i>Solinas Toldo et al., 1993</i>
ETH225	GATCACCTTGCCACTATTTCT ACATGACAGCCAGCTGCTACT	131-159	57, 58	<i>Steffen y col., 1993</i>
HEL9	CCCATTGAGTCTTCAGAGGT CACATCCATGTTCTCACCAC	141-173	52 ,57	<i>Kaukinen y Varvio, 1993</i>
ILSTS006	TGTCTGTATTTCTGCTGTGG ACACGGAAGCGATCTAAACG	277-309	55, 56	<i>Brezinsky y col., 1993b</i>
INRA063	ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC AAACCACAGAAATGCTTGAAG	167-189	55, 56	<i>Vaiman et al., 1994</i>
TGLA122	CCCTCCTCCAGGTAATCAGC AATCACATGGCAAATAAGTACATAC	136-184	60	<i>Barendse et al., 1994</i>
TGLA227	CGAATTCCAAATCTGTAAATTTGCT ACAGACAGAAACTCAATGAAAGCA	75-105	60	<i>Kappes et al., 1997</i>