

DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GANADO HARTÓN DEL VALLE Y SUS
RELACIONES CON HOLSTEIN Y BRAHMAN, MEDIANTE
EL USO DE MARCADORES MOLECULARES

LUZ ANGELA ALVAREZ FRANCO

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
SANTIAGO DE CALI
2008

DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GANADO HARTÓN DEL VALLE Y SUS
RELACIONES CON HOLSTEIN Y BRAHMAN, MEDIANTE
EL USO DE MARCADORES MOLECULARES

LUZ ANGELA ALVAREZ FRANCO

Doctorado en Ciencias - Biología

Director

Victor Vera Alonso PhD
Universidad Nacional de Colombia

Codirectores

Heiber Cárdenas Henao PhD (C)
Guillermo Barreto Rodríguez PhD
Universidad del Valle

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
SANTIAGO DE CALI
2008

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Santiago de Cali, julio de 2008

DEDICO:

A mi esposo Iñaki y mis hijos Amaia e Iñaki, quienes son la razón de mi vida.

A mi madre y a Maritxu.

A Irenarco Casas A., Humberto Arango B. y Jaime Eduardo Muñoz F. quienes me inculcaron el deseo de aprender y me enseñaron lo hermoso de enseñar.

A mi querida Universidad Nacional de Colombia, a quien le debo todos mis logros profesionales

AGRADECIMIENTOS

A mis directores Dres Víctor Vera A, Heiber Cárdenas y Guillermo Barreto por su amistad y sus enseñanzas y por haberme dado la oportunidad de concluir este trabajo.

A Héctor Díaz Antúnez, quien bajo mi dirección, realizó parte de este trabajo en la Maestría en Producción Animal Tropical en la Universidad Nacional de Colombia con la tesis Variabilidad de los genes de las proteínas de la leche κ -caseína, β -lactoglobulina y α -lactoalbumina en el ganado criollo Hartón del Valle *Bos taurus*.

A la División de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia (DIPAL) por la financiación del trabajo.

A Andrés Mauricio Posso T. por su generosidad, ayuda incondicional y especialmente por su amistad.

A mis entrañables amigas y compañeras de doctorado Dayana Salas y Laura Cifuentes, por sus enseñanzas, aportes a mi trabajo y especialmente por los momentos de alegría que siempre compartimos.

A Brigitte Those por su amistad incondicional y enseñanzas.

A Juan D. Palacio por haberme abierto las puertas del Instituto Alexander Von Humboldt y su incomparable generosidad.

A Dora Barrios del Instituto Alexander Von Humboldt que fue mi ángel de la guarda y será siempre mi amiga.

A Diana López, Bióloga del Instituto Alexander Von Humboldt.

A mis compañeros del Grupo de Investigación Recursos Zoogenéticos-Palmira.

A los estudiantes de tesis del Laboratorio Biología Molecular UNAL-Palmira Von Humboldt

A Marino Valderrama MVZ y Eduaime Cárdenas MVZ por la ayuda en la consecución de las muestras.

A Adelina Rentarúa, porque sin su ayuda no hubiera podido realizar este trabajo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. OBJETIVOS	21
1.1 OBJETIVO GENERAL	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2. MARCO DE REFERENCIA	22
2.1 EL GANADO HARTÓN DEL VALLE	22
2.1.1 Origen y Estado Actual.	22
2.1.2 Características de la raza.	24
2.1.3 Producción de leche.	25
2.2 IMPORTANCIA DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA ANIMAL	29
2.3 MARCADORES MOLECULARES	32
BIBLIOGRAFÍA	37
CAPITULO I - DIVERSIDAD GENETICA DE LA RAZA HARTON DEL VALLE MEDIANTE MARCADORES MICROSATELITES	
1. INTRODUCCION	43
1.1 ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GANADO MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES	44
2. OBJETIVOS	54
2.1 OBJETIVO GENERAL	54
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54

	pág.
3. MATERIALES Y METODOS	55
3.1 MUESTREO	55
3.2 LOCI MICROSATÉLITES	56
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	58
4. RESULTADOS	60
4.1 MARCADORES MICROSATÉLITES	60
4.2 DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS RAZAS HARTÓN DEL VALLE, BRAHMAN Y HOLSTEIN	62
4.3 RELACIONES ENTRE LAS RAZAS HARTÓN DEL VALLE, BRAHMAN Y HOLSTEIN	65
4.4 VARIABILIDAD GENÉTICA DENTRO DE LA RAZA HARTÓN DEL VALLE	67
5. DISCUSION	71
5.1 DIVERSIDAD ENTRE RAZAS	71
5.2 DISTANCIAS GENÉTICAS Y RELACIONES ENTRE RAZAS	76
5.3 DIVERSIDAD GENÉTICA DENTRO DE LA RAZA HARTÓN DEL VALLE	77
6. CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	82
CAPITULO II - VARIABILIDAD DE LOS GENES DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE κ-CASEINA, β-LACTOGLOBULINA Y α-LACTOALBUMINA EN EL GANADO CRIOLLO HARTON DEL VALLE	
1. INTRODUCCION	90

	pág.
1.1 EL GEN DE K-CASEÍNA	91
1.2 LAS PROTEÍNAS DEL SUERO	93
1.2.1 β -Lactoglobulina	93
1.2.2 α -Lactoalbúmina	94
1.3 ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA	94
2. OBJETIVOS	97
2.1 OBJETIVO GENERAL	97
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	97
3. MATERIALES Y METODOS	98
3.1 ANIMALES	98
3.2 AMPLIFICACIÓN Y DE LOS FRAGMENTOS	99
3.2.1 κ -caseína.	99
3.2.2 β -Lactoglobulina.	101
3.2.3 β -Lactoalbúmina.	102
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	103
4. RESULTADOS	105
4.1 POLIMORFISMOS DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE	105
4.1.1 κ -Caseína (k-CN).	105
4.1.2 Proteínas del suero.	108
4.1.2.1 β -Lactoglobulina.	108
4.1.2.2 α -Lactoalbúmina.	110

	pág.
4.2 VARIABILIDAD GENÉTICA	111
4.2.1 Frecuencias Génicas.	111
4.2.2 Número promedio de alelos (NPA).	113
4.2.3 Diversidad Genética.	114
4.3 DIFERENCIACIÓN Y ESTRUCTURA GENÉTICA	115
4.4 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO	119
5. DISCUSION	121
5.1 POLIMORFISMO DE LOS GENES EN LA RAZA HARTÓN DEL VALLE	121
5.2 DIVERSIDAD GENÉTICA	123
5.3 ESTRUCTURA GENÉTICA Y DIFERENCIACIÓN	124
6. CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFIA	130
CAPITULO III- DIVERSIDAD GENETICA Y ANCESTRALIDAD DEL GANADO HARTON DEL VALLE MEDIANTE ADN MITOCONDRIAL E INTROGRESION MEDIANTE MICROSATELITES DEL CROMOSOMA Y	
1. INTRODUCCIÓN	137
2. OBJETIVOS	142
2.1 OBJETIVO GENERAL	142
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	142
3. MATERIALES Y METODOS	143
3.1 MUESTRAS, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN	143

	pág.
3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	147
4. RESULTADOS	148
4.1 DIVERSIDAD DE LA REGIÓN CONTROL DEL ADN DEL HARTÓN DEL VALLE	148
4.1.1 Haplotipos y linajes.	148
4.2 RELACIONES DEL HARTÓN DEL VALLE CON EL GANADO CRIOLLO COLOMBIANO	155
4.3. RELACIONES DEL HARTÓN DEL VALLE CON RAZAS DEL MUNDO	157
4.4 INTROGRESIÓN DE <i>BOS INDICUS</i> EN GANADO HARTÓN DEL VALLE	162
5. DISCUSION	163
5.1 VARIACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL DEL ADNMT EN EL GANADO HARTÓN DEL VALLE	163
5.2 RELACIÓN DEL HARTÓN DEL VALLE CON OTRAS RAZAS BOVINAS CRIOLLAS Y COLOMBIANAS	165
5.3 RELACIONES DEL HARTÓN DEL VALLE CON RAZAS DEL MUNDO	166
5.4 INTROGRESIÓN DE <i>BOS INDICUS</i> EN GANADO HARTÓN DEL VALLE	167
6. CONCLUSIONES	168
BIBLIOGRAFIA	169
ANEXOS	174

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Patrón de la Raza Hartón del Valle.	26
Tabla 2. Parámetros de la curva de lactancia de vacas Hartón del Valle (HV) y sus cruces con Holstein (H) y Angler (A).	28
Tabla 3. Composición de la leche del ganado Hartón del Valle en dos sistemas de producción.	29
CAPITULO I - DIVERSIDAD GENETICA DE LA RAZA HARTON DEL VALLE MEDIANTE MARCADORES MICROSATELITES	
Tabla 1. Parámetros de Diversidad Genética estimados mediante microsatélites, en razas criollas de América Latina.	52
Tabla 2. Número de muestras por grupo genético, población y sexo de Hartón del Valle, Holstein, Brahman y F ₁ de HV con otras razas (HVC).	55
Tabla 3. Loci microsatélites, localización cromosómica y secuencias de <i>primers</i> utilizados.	57
Tabla 4. Condiciones de amplificación de los 15 microsatélites analizados.	58
Tabla 5. Estadística descriptiva de 15 loci microsatélites para los grupos HV, B, H, HVC y Población Total.	61
Tabla 6. Estadística descriptiva de 15 loci microsatélites en los cuatro grupos genéticos estudiados.	63
Tabla 7. Diferenciación racial para cada locus microsatélite, estimado mediante F _{ST} .	65
Tabla 8. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con diferentes niveles de estructura jerárquica entre <i>Bos taurus</i> (HV, H), <i>Bos indicus</i> (B) y el grupo HVC.	66

	pág.
Tabla 9. Estimaciones de diferenciación genética y distancia entre las razas Brahman, HV, Holstein y HVC.	67
Tabla 10 Estadística descriptiva para 15 loci microsatélites en nueve poblaciones de HV.	68
Tabla 11. Desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weimberg de 15 loci en nueve poblaciones de Hartón del Valle.	69
Tabla 12 Diferenciación genética y distancia entre nueve poblaciones de Hartón del Valle.	70
CAPITULO II - VARIABILIDAD DE LOS GENES DE LAS PROTEINAS DE LA LECHE κ-CASEINA, β-LACTOGLOBULINA Y α-LACTOALBUMINA EN EL GANADO CRIOLLO HARTON DEL VALLE	
Tabla 1. Posiciones y diferencias de aminoácidos de las variantes de la κ -CN.	92
Tabla 2 - Frecuencias génicas para las proteínas de la leche en diferentes razas.	96
Tabla 3. Número de muestras por población y localización.	98
Tabla 4. Condiciones de PCR para el fragmento de 453 pb.	99
Tabla 5. Condiciones de PCR para el fragmento de 551 pb de k-CN	100
Tabla 6. Cortes resultantes de la digestión con enzimas de restricción del fragmento 453 de κ -CN.	101
Tabla 7. Cortes resultantes de la digestión con enzimas de restricción del fragmento 551 de κ -CN.	101
Tabla 8. Condiciones de PCR para β -LA y α -LA.	102
Tabla 9. Patrones de Variación en las secuencias de muestras de k-CN en HV, comparadas con la secuencia patrón X14908 y los alelos reportados en el GenBank.	106

	pág.
Tabla 10. Frecuencias génicas y desviaciones estándar de las variantes alélicas de κ -CN, β -LG y α -LA en once poblaciones de Hartón del Valle.	112
Tabla 11. Estadística descriptiva de κ -Caseína, β -Lactoglobulina y α -Lactoalbúmina para las razas HV, B y H.	113
Tabla 12. Valores estimados de Heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) y significancia de las desviaciones al equilibrio Hardy-Weimberg para κ -CN, β -LG, α -LA, en once poblaciones de Hartón del Valle y los grupos control Holstein y Brahman.	115
Tabla 13. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) entre 11 poblaciones HV, en los loci κ -CN, β -LG y α -LA.	116
Tabla 14. Variación de las frecuencias alélicas explicada por Componentes Principales.	118
Tabla 15. Resultados de desequilibrio de ligamiento entre genes pareados en la población total de HV, y excluyendo la población cruzada (HV*) y los controles B y H.	120
CAPITULO III- DIVERSIDAD GENETICA Y ANCESTRALIDAD DEL GANADO HARTON DEL VALLE MEDIANTE ADN MITOCONDRIAL E INTROGRESION MEDIANTE MICROSATELITES DEL CROMOSOMA Y	
Tabla 1. Razas estudiadas de acuerdo con sus regiones de origen, número de animales muestreados, referencia y número de acceso en GenBank .	145
Tabla 2. Secuencias de la región control del ADNmt, número de haplotipos y linajes observados en 97 animales.	149
Tabla 3. Número y Frecuencia relativa de Linajes T1, T2 y T3 en ganado HV, B, H y HVC	152
Tabla 4. Frecuencias relativas de haplotipos agrupados de acuerdo con el linaje y el hato en la raza Hartón del Valle.	153

	pág.
Tabla 5. Número de haplotipos, diversidad haplotípica y nucleotídica en nueve poblaciones de ganado HV y en las razas B, H y el cruce HVC.	154
Tabla 6. Análisis de varianza molecular entre grupos genéticos (HV, H, B y HVC) y entre nueve poblaciones de Hartón del Valle.	154
Tabla 7. Matriz de distancia basada en el modelo Kimura 2p, entre ganado criollo colombiano, H y B.	157
Tabla 8. Número y proporción (%) de los alelos Y indicus y taurino amplificados con el microsatélite INRA124.	162

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Torete de la raza Hartón del Valle	27
Figura 2. Novilla de la raza Hartón del Valle	27
CAPITULO I - DIVERSIDAD GENETICA DE LA RAZA HARTON DEL VALLE MEDIANTE MARCADORES MICROSATELITES	
Figura 1. Relación Genética entre las razas Brahman, HV, Holstein y HV cruzado mediante el método de UPGMA.	67
Figura 2. Relación genética entre nueve poblaciones de Hartón del Valle estimada mediante el método de UPGMA basado en las distancias de Nei (1978).	70
CAPITULO II – VARIABILIDAD DE LOS GENES DE LAS PROTEINAS DE LA LECHE κ-CASEINA, β-LACTOGLOBULINA Y α- LACTOALBUMINA EN EL GANADO CRIOLLO HARTON DEL VALLE	
Figura 1. Patrones de corrida de las variantes alélicas de κ -CN obtenidas en el fragmento de 453 pb.	107
Figura 2. Patrones de corrida de las seis variantes alélicas de κ -CN obtenidas en el fragmento de 551 pb.	107
Figura 3. Movilidad de las cadenas simples de α -LA a concentraciones de glicerol del 5,0% y 3,75%.	108
Figura 4. Patrón de bandas obtenido con la enzima de restricción <i>HaeIII</i> para las variantes A y B de β -Lactoglobulina.	109
Figura 5. Patrón de bandas obtenido mediante SSCP, para las variantes A y B de β -Lactoglobulina.	109
Figura 6. Patrón de bandas obtenido mediante SSCP para las variantes A y B de α -Lactoalbumina.	110

	pág.
Figura 7. Patrón de bandas obtenido con la enzima de restricción <i>MNII</i> para las variantes A y B de α -Lactoalbúmina en gel de poliacrilamida al 8%.	110
Figura 8. Árbol construido por el método UPGMA a partir de la distancia o coeficiente de coancestría para 11 fincas de ganado criollo Hartón del Valle.	117
Figura 9. Dendrograma construido por el método UPGMA a partir de la distancia o coeficiente de Coancestría (Reynolds <i>et al.</i> , 1983) para 11 fincas de ganado criollo Hartón del Valle, Brahman y Holstein.	117
Figura 10. Diagrama de los primeros tres componentes del Análisis de Componentes Principales a partir de las frecuencias alélicas de tres loci de para proteínas de leche en fincas de ganado criollo Hartón del Valle.	119
 CAPITULO III- DIVERSIDAD GENETICA Y ANCESTRALIDAD DEL GANADO HARTON DEL VALLE MEDIANTE ADN MITOCONDRIAL E INTROGRESION MEDIANTE MICROSATELITES DEL CROMOSOMA Y	
Figura 1. Fragmento de 350 pb de la región control del ADNmt de bovinos Hartón del Valle.	148
Figura 2. Red de Haplotipos de ADNmt en HV, B, H y HVC.	150
Figura 3. Red de Haplotipos de ADNmt de 72 individuos Hartón del Valle construida mediante el método “Median joining” (Bandelt <i>et al.</i> , 1999).	152
Figura 4. Red de haplotipos de 72 secuencias HV comparadas con 74 secuencias de Ganado Criollo Colombiano (GCC).	155
Figura 5. Árbol filogenético de ganado colombiano inferido a partir de una secuencia del D-loop basada en la distancia de Kimura 2p agrupadas por el método Neigborg joining.	156
Figura 6. Red de haplotipos de 72 secuencias HV comparadas con 353 secuencias de todo el mundo	158

	pág.
Figura 7. Árbol filogenético que relaciona el HV con razas ibéricas y africanas.	160
Figura 8. Árbol filogenético que relaciona el HV con razas ibéricas, Africanas y Latinoamericanas.	161

RESUMEN

El estudio se llevó a cabo con el objeto de sentar las bases para futuros trabajos de conservación y mejoramiento de la raza bovina criolla Hartón del Valle (HV), descendiente de los ganados introducidos por los conquistadores españoles en el siglo XV y adaptada al medio. Por el tamaño poblacional se encuentra en la categoría “vulnerable”, el pie de cría es producido por un número reducido de criadores y se ha sometido constantemente a cruzamientos con razas foráneas tanto de *Bos taurus* como de *Bos indicus*. En este trabajo se caracteriza la diversidad ya que ésta representa el punto de partida para lograr alcanzar uno de los objetivos fundamentales de cualquier programa de conservación, como es el mantenimiento de la máxima cantidad de diversidad genética posible. Para ello se evaluó la diversidad genética en la raza, con 15 loci microsatélites, tres proteínas de mayor importancia en la calidad de la leche: κ -Caseína (κ -CN), β -Lactoglobulina (β -LG) y α -Lactoalbúmina (α -LA) y la diversidad y las relaciones con ganado taurino (*Bos taurus*) y con Brahman (*Bos indicus*) a nivel de ADN mitocondrial (ADNmt).

Se realizó una caracterización detallada con los loci ETH225, ETH152, ILSTS005, ILSTS006, INRA005, INRA023, INRA035, INRA063, MM8, MM12, HAUT27, BM1818, BM1824, HEL5 Y HEL13, en un total de 249 individuos distribuidos de la siguiente manera: HV puro (186) provenientes de nueve poblaciones, HV cruzado (HVC, n=32), Holstein (H, n=13) y Brahman (B, n=18). El número total de alelos, en todos los loci analizados fue 144, 142 de los cuales se encontraron en HV, 106 en Brahman, 86 en Holstein y 121 en HVC. La heterocigosidad esperada promedio para HV, B, H y HVC fue de 0.79 ± 0.07 , 0.76 ± 0.08 , 0.73 ± 0.12 y 0.76 ± 0.12 , respectivamente. El rango de heterocigosidad esperada (H_e) entre poblaciones de HV fue de 0.73 y 0.77 con un valor promedio de 0.75 ± 0.01 . El grado de diferenciación genética entre grupos genéticos resultó de 2.9%. El $F_{ST}=0.049$ ($P<0.0001$) entre poblaciones HV fue significativo indicando estructura poblacional; todas las fincas de HV, resultaron ser entidades diferentes. El déficit promedio de heterocigotos para HV fue de 12%.

Para la genotipificación de las proteínas de la leche se tomó una muestra de 245 animales HV, en 11 fincas, H (12) y B (19). Los análisis de PCR-SSCP y PCR-RFLP permitieron discriminar las variantes alélicas de κ -CN, β -LG y α -LA. En la κ -CN se encontraron las variantes A, B, A₁, E, G e I. La frecuencia de las variantes más comunes A y B en la raza HV fueron 0.45 ± 0.02 y 0.29 ± 0.01 , respectivamente. Todas las variantes identificadas en κ -CN se observaron en las diferentes fincas con excepción de las variantes κ -CN E y κ -CN A₁. Las variantes A y B de cada una de las proteínas del suero y sus frecuencias estuvieron en el rango de las descritas en ganado Ibérico y criollo de Sur América. La frecuencia observada de

β -LG A fue de 0.38 ± 0.02 y de 0.62 ± 0.02 para β -LG B y para α -LA A y α -LA B fueron de 0.14 ± 0.01 y 0.85 ± 0.01 , respectivamente. El valor de diversidad génica promedio (H_e) fue de $0,47 \pm 0,01$, que junto con el número de alelos observados, indica que esta raza constituye aún un valioso reservorio de diversidad en genes de las proteínas de la leche.

Para evaluar la diversidad y ancestralidad de la raza HV, se secuenció en 72 animales HV, un fragmento de 350 pb de la región control del ADNmt. De acuerdo con el origen español, se encontró marcada influencia del ADmt europeo (91.7%) y baja participación de taurinos africanos (5.6%). Las secuencias se compararon con secuencias colombianas y de otras razas depositadas en el GenBank; se encontró alta proximidad entre HV con la raza criolla Romosinuano, en menor grado con el Costeño con Cuernos, el Casanareño y el San Martinero y alta diferenciación con el Blancorejinegro y el Chino Santandereano. Las razas españolas más cercanas a HV fueron Tudanca, Rubio Gallego, Negra Serrana, Murciana, Pajuna y Avileña y las portuguesas Garvonesa y Mertolenga. Se evaluó la introgresión de Brahman en el HV con el microsatélite INRA124, en 38 machos HV; el alelo específico de *Bos indicus* (130 pb) estuvo presente únicamente en dos machos HV, ambos provenientes de la misma finca para un porcentaje de introgresión de Cebú en HV del 5%.

ABSTRACT

The Creole bovine breed Hartón del Valle (HV) is descending from livestock introduced in America by Spanish conquerors during the XV century and is adapted to the tropical conditions. Due to its reduced population size, this breed is classified in the category “vulnerable”. The basic breeding is reproduced by a reduced number of breeders and have been frequently crossed with foreign breeds like *Bos taurus* and *Bos indicus*. In this research diversity is characterized due to the fact that, its represented the starting point to reach the objectives of any conservation program like that of keeping the maximum amount of possible diversity. In several farms of the Cauca Valley, Colombian evaluation of the genetic diversity of the breed using 15 microsatellites, from three of protein of higher importance for milk quality: κ -Caseín (κ -CN), β -Lactoglobuline (β -LG) and α -Lactoalbumine (α -LA) and diversity and the relations with *Bos taurus* and *Bos indicus* livestock at mitochondrial DNA level was carried out.

A detailed characterization was due with the loci: ETH225, ETH152, ILSTS005, ILSTS006, INRA005, INRA023, INRA035, INRA063, MM8, MM12, HAUT27, BM1818, BM1824, HEL5 and HEL13 on 249 individuals distributed as follow: HV (186) come from nine populations, HV crossed (HVC, n=32), Holstein (H, n= 13) and Brahman (B, n=18). The total number of alleles in all of the analyzed loci was 144, from which, 142 were found in HV, 106 in B, 86 in H and 121 in HVC. The mean expected heterocigosity for HV, B, H and HVC was 0.79 ± 0.07 , 0.76 ± 0.08 , 0.73 ± 0.12 and 0.76 ± 0.12 , respectively. The rank of the expected heterocigosity (H_e) among population of HV was 0.73 y 0.77 with the mean value of 0.75 ± 0.01 . The grade of genetic differentiation among groups was 2.9%. The $F_{ST}= 0.049$ ($P<0.0001$) among populations of HV was significant, suggesting a population structure. All of farms of HV had different identifies. The mean deficit of heterocigosity for HV was 12%.

For the genetic typification of milk proteins, a sample of 245 animals HV in 12 farms, H (12) and B (19) were taken. The analysis of PCR-SSCP and PCR-RFLP permitted to separate the allelic variant of κ -CN, β -LG y α -LA. In κ -CN the variants A, B, A₁, E, G and were found. The frequency of the variants more common in the breed A and B were 0.45 ± 0.02 and 0.29 ± 0.01 respectively. All of variants identified in κ -CN were observed in different farms, except κ -CN E y κ -CN A₁. The variants A and B of each one of the protein serum and their frequencies were in the rank of those described in *Bos taurus* and creole livestock from South America. The observed frequency of β -LG A was 0.38 ± 0.02 , 0.62 ± 0.02 for β -LG B and 0.14 ± 0.01 and 0.85 ± 0.01 for α -LA A and α -LA B respectively. The value for mean genetic diversity (H_e) was 0.47 ± 0.01 which together with the number of the

observed alleles, suggest that this breed is still a valuable reservoir of genetic diversity of milk protein.

To evaluate diversity and ancestral roots of the breed HV, it was necessary to make sequences of a fragment of 350 bp from the control region of the mitochondrial DNA (mtDNA), in 72 animals. According to their Spanish origin a high influence of the European mtDNA (91.7% and a low participation of *Bos Taurus* from African origin (5.6%). The sequences were compared with the Colombian ones and with the other breeds that have been dropped in the GenBank. A high proximity between with the creole breed Romosinuano was found. In the other hand, a low grade of proximity with the creole breeds Costeño con Cuernos, Casanareño and San Martinero was found. In addition, high differentiation with the creole breeds Blancorejinegro and Chino Santandereano was found. The Spanish breeds more close to HV were Tudanca, Rubio Gallego, Negra Serrana, Murciana, Pajuna and Avileña and the Portuguese ones, Garvonesa and Mertolenga.

INTRODUCCIÓN

El bovino criollo americano descende de animales que llegaron en el segundo viaje de Colón, en 1493, a la isla La Española, hoy República Dominicana y Haití (Primo, 1992). El ganado siguió las rutas de dispersión de los inmigrantes españoles y se expandió por todo el territorio americano en un amplio rango de ambientes, se generó con muy poca intervención humana, una diferenciación gradual de las poblaciones bovinas y se dió origen a diversas razas con gran variabilidad fenotípica (Pinzón, 1984). En estas razas se ha reportado rasgos de interés potencial como la tolerancia al calor y a la humedad, resistencia a enfermedades infecciosas y fertilidad y longevidad altas (Pinzón, 1984; Primo, 1992; Giovambattista *et al*, 2001; Miretti *et al*, 2001).

Colombia posee siete razas de ganado criollo: Romosinuano y Costeño con Cuernos en la Costa Atlántica, Blanco Orejinegro y Chino Santandereano en la zona montañosa, Hartón del Valle (HV) en el Valle del río Cauca y Casanareño y San Martinero en la Orinoquía (Martínez, 2004). En Colombia, la población total de bovinos es de 24 millones; en el Censo Nacional de Razas Criollas se estimó una población de 23.415 bovinos criollos, correspondiente al 0.09% del inventario nacional (Martínez, 1999).

El Hartón del Valle (HV), es uno de estos grupos raciales, originado de los ganados introducidos por los conquistadores españoles en el siglo XV y sometido a un largo proceso de selección natural que le ha conferido adaptaciones a condiciones locales, reflejadas en las altas tasas reproductivas, tolerancia a enfermedades parasitarias y mayor sobrevivencia (Duran *et al*, 1995).

En el último censo de ganado criollo, la población de HV, distribuida en 83 fincas, estaba conformada por 5120 animales puros y 4240 (45%) cruzados con otras razas (Martínez, 1999). Se sospecha una marcada reducción en el inventario, en los últimos años, ocasionada por el cambio de destinación de fincas tradicionalmente ganaderas, hacia el cultivo de la caña de azúcar, por los problemas de orden público en el Norte del Valle que han provocado el cierre de ganaderías y por el cruzamiento con razas foráneas.

De acuerdo con los criterios de la FAO (2007), relacionados con el estado de amenaza, una población se considera “normal” cuando tiene más de 10000 hembras en estado reproductivo y una relación entre sexos superior o igual a 50:1 (FAO, 2007). La raza HV, se encuentra en la categoría “vulnerable”, porque cuenta con 2512 hembras en edad reproductiva y la relación entre sexos es de 33:1 (Martínez, 1999).

El pie de cría producido por un número cada vez más reducido de criadores aumenta los riesgos de consanguinidad, la pérdida de diversidad y la erosión genética. La raza ha sido sometida constantemente a cruzamientos graduales de absorción hacia ganado cebuino o taurino, que han ocasionado disminución en la población pura e introgresión con razas foráneas tanto de *Bos taurus* (principalmente Holstein) como de *Bos indicus* (Brahman).

Desde hace más de 20 años, en la Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira, se ha caracterizado la conformación, el tamaño poblacional, los sistemas de producción, el comportamiento productivo y reproductivo, los parámetros genéticos y el comportamiento en cruzamientos. Se cuenta con un banco de semen y un núcleo de ganado puro. Actualmente, es la única entidad estatal con un programa de conservación de la raza, puesto que ésta no fue incluida en los programas de protección a razas criollas, propiciados por el gobierno colombiano en los años treinta, ni tampoco en el Plan Nacional de Fomento de Razas Criollas del

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural para la protección, mejoramiento, multiplicación y repoblamiento de algunas razas criollas (Resolución 007147 del 15 de marzo del 2004). Desde 1968, la sede Palmira cuenta con un pequeño núcleo de animales puros y desde hace 10 años con un banco de semen.

En el ganado Criollo HV se desconoce la diversidad genética, los grados de estructuración genética y de introgresión con razas foráneas. A pesar de que la aptitud lechera de esta raza ha sido reconocida, no se conoce el polimorfismo ni la frecuencia de los genes de las proteínas de la leche. El desconocimiento de los anteriores parámetros conlleva a que no existan criterios claros para conservación y para el mejoramiento genético de los animales.

Por lo anterior, el presente trabajo evaluó la diversidad genética de la raza HV, usando microsatélites y los genes de las proteínas de mayor importancia en la calidad de la leche (κ -Caseína, β -Lactoglobulina y α -Lactoalbúmina). También evaluó las relaciones con ganado Holstein (*Bos taurus*) y con Brahman (*Bos indicus*), mediante la utilización de los marcadores moleculares ADN mitocondrial, microsatélites autosómicos y del cromosoma Y. Dada la importancia de la raza HV, como recurso potencial en la seguridad alimentaria regional, el conocimiento de la diversidad genética es importante para el mejoramiento y aumento de su productividad, al igual que para su conservación.

Estudios en conservación y el desarrollo de planes de mejoramiento para la utilización de un recurso genético apropiado como el Hartón del Valle son indispensables para alcanzar y mantener sistemas de producción sostenibles, capaces de responder a las necesidades del hombre en la cadena de seguridad alimentaria. Esta investigación concuerda con la Convención de la ONU sobre Diversidad Biológica, firmada por 157 países en 1992, entre ellos Colombia, donde se reconoce la importancia de los recursos genéticos domésticos, la soberanía de cada país sobre sus propios recursos y la obligación de estudiarlos y conservarlos.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la diversidad genética de la raza Hartón del Valle y las relaciones con Holstein (*Bos taurus*) y Brahman (*Bos indicus*), mediante marcadores moleculares.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer un banco de datos con los perfiles genotípicos multilocus y las frecuencias alélicas para la raza Hartón del Valle.
2. Caracterizar los niveles y la distribución de la diversidad genética de la raza criolla, mediante 15 marcadores microsatélites y compararla con las razas Holstein y Brahman.
3. Estimar el polimorfismo genético y la frecuencia de los genes de las proteínas de la leche: κ -Caseína, β -Lactoglobulina y α -Lactoalbúmina, utilizando las técnicas moleculares SSCP y PCR-RFLP en ganado Hartón del Valle, Holstein y Brahman.
4. Determinar la diversidad haplotípica de la región control del ADN Mitocondrial en Hartón del Valle y compararla con Holstein, Brahman.
5. Reconstruir las posibles conexiones del Hartón del Valle con razas ibéricas, latinoamericanas y africanas.
6. Determinar el grado de introgresión con *Bos indicus* mediante microsatélites del cromosoma Y.

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 EL GANADO HARTÓN DEL VALLE

2.1.1 Origen y Estado Actual. La raza Hartón del Valle (HV) tuvo su asentamiento en el Valle geográfico del río Cauca, zona comprendida entre el nacimiento del río en el macizo colombiano y La Virginia, Risaralda (02 00°N a 05 00°N) y entre la línea divisoria de aguas de las cordilleras central y occidental (74 40° W a 77 20° W). Esta cuenca del río Cauca tiene 300 Km. de largo y 50 Km. en su parte más ancha; el área aproximada es de 400.000 hectáreas, con una altitud promedio de 950 m.s.n.m, una temperatura promedio de 24° C (16-32° C) y una precipitación entre 644 y 1636 mm, distribuída entre abril a junio y septiembre a noviembre. Su clasificación corresponde a bosque seco tropical (Casas y Valderrama, 1998)

El bovino criollo americano descende directamente de los animales traídos en el segundo viaje de Colón en 1493. Estos animales, así como posteriores envíos, llegaron a la isla denominada La Española, hoy República Dominicana y Haití. No se conoce con seguridad las razas ancestrales de los criollos americanos: algunos reportes indican que, posiblemente, eran ganados de la zona sur de España, puesto que Sevilla era la ciudad con la exclusividad para organizar los embarques oficiales a América. Otros autores afirman que también salieron barcos desde Galicia en el norte de España y de las Islas Canarias, ruta y escala habitual en los viajes a América (Primo, 1992). Rouse (1977), indica que las razas españolas actuales como la Retinta, la Berrenda, la Cacereña y la Andaluza, podrían ser descendientes de los mismos planteles de los cuales provienen los criollos (Primo, 1992). Las poblaciones fundadoras del ganado criollo en los primeros 50 años de colonización, consistieron de 300 a 1000 animales de origen ibérico, llevados al

sur de Estados Unidos y al Centro y Suramérica. En el curso de unas décadas el ganado se expandió y fueron las únicas poblaciones bovinas en toda América Latina por más de 300 años, hasta la introducción de razas selectas europeas y asiáticas (Wilkins *et al*, 1982).

El HV se originó como los demás bovinos criollos colombianos, en los vacunos ibéricos traídos por los españoles durante la época de la colonia. Llegaron al Valle Geográfico del Cauca por los cuatro puntos cardinales, especialmente por el norte y por el sur. Los que entraron por el norte y por el oriente eran derivados del mismo tronco ancestral desarrollado en la costa Caribe que dio origen al ganado Costeño con Cuernos. Por el sur, llegaron los descendientes de los ganados traídos de Quito por Sebastián de Belalcázar al Patía, Pubenza, Jamundí y Pasto. En 1540, llegaron a Cali algunos ejemplares por el camino de Dagua, procedentes directamente desde La Española y de Nicaragua, vía de Panamá. (Pinzón, 1991)

En el Valle del Cauca, los primeros asentamientos durante la colonia donde prosperaron los vacunos fueron Buga y Cali. En 1745, en la jurisdicción de Buga existían más de 64.000 cabezas y una hacienda llegó a tener 25.000 individuos, pero años después éste número disminuyó considerablemente y hubo necesidad de repoblar con animales del bajo Cauca y de la Costa Atlántica. Se cree que en el HV se encuentran combinadas diferentes razas ibéricas: la Gallega, la Barrosa, la Pirenaica y la Tudanca las cuales se mezclaron entre sí en diversas proporciones para formar la raza Hartón (Pinzón, 1991).

Durante el período de formación de la raza, los ganados permanecieron en forma natural, con muy poca intervención humana, sin régimen especial de alimentación, manejo y selección. En la década de 1880, algunos ganaderos deseosos de mejorar la base bovina criolla mediante cruzamientos con razas selectas, introdujeron en el Valle del Cauca, algunos reproductores pertenecientes a las razas inglesas Durham y Devon para mezclarlos con hatos de HV. De acuerdo

con Pinzón (1991), cuando se inició la importación de razas, gran parte de las ganaderías desaparecieron absorbidas por la raza Holstein y otros grupos de ganado fueron cruzados con la raza Brahman, importada en 1910, para obtener ejemplares mestizos usados para el transporte de la caña de azúcar.

A través del Censo y Caracterización de los Sistemas de Producción del Ganado HV realizado por la Universidad Nacional de Colombia en 1996, se determinó el número de explotaciones, el inventario ganadero y se tipificaron los sistemas de producción predominantes para la zona sur, centro y norte del Departamento del Valle del Cauca y norte del Departamento del Cauca. Se encontró que la población de HV, distribuida en 81 fincas, estaba conformada por 5531 animales puros y 4227 (43%) cruzados con otras razas. Además de cruces con las razas Holstein y Cebú, se encontró cierto porcentaje de mestizaje con Pardo Suizo, Jersey y Angler. El sistema de producción predominante fue el doble propósito (56.8%), seguido de la producción de leche (34%) y por último la producción de carne (9.2%) (Losada, 1998; Roncancio *et al.*, 1997; Escarria *et al.*, 1998).

2.1.2 Características de la raza. La raza criolla HV, persiste dentro del ámbito ganadero regional por sus atributos adaptativos, evidenciados en su capacidad de sobrevivir en climas cálidos, húmedos o secos, con alimentos de baja calidad nutricional y escasez de agua, por sus tasas reproductivas altas y prolongada vida útil, por su menor susceptibilidad a enfermedades parasitarias y una producción de carne y leche razonables (Casas y Valderrama, 1998).

Esta raza es de porte medio con pelaje corto, amarillo o rojizo, con mezclas de negro, hasta llegar a hosco; mucosa, cascos y borla de cola clara o negra, cola desca rnada de inserción alta y con poco pelo en la borla, ísquiones amplios que hacen de la hembra un animal con pocos problemas al parto (González y Arango, 1976). En la Tabla 1 se presentan las características fenotípicas de la raza y en las Figuras 1 y 2 animales representativos de la raza.

2.1.3 Producción de leche. Los estudios para la producción de leche proveen cifras variables que expresan la calidad de los hatos donde han sido tomadas, las diferentes condiciones de manejo, el número de mediciones y el método de evaluación (Casas y Valderrama, 1991). González y Arango (1976) reportaron promedios de producción de leche de 1683 Kg. en un ordeño por día, con presencia del ternero y una duración promedio de 242 días. Archila y Bernal (1983) en ocho hatos, hallaron un promedio de producción de 1846 kg/lactancia en 281 días de duración; los animales ordeñados en presencia del ternero, produjeron 3.2 kg/día, mientras que el promedio diario de producción de hatos ordeñados sin ternero fue mayor (7.1 kg/día).

Casas y Valderrama (1991), reportan promedios de producción de leche de 2200 kg/lactancia en dos ordeños diarios sin ternero y 280 días de duración de la lactancia. Señalan la existencia de vacas con producciones hasta de 3400 kg. en lactancias de 280 días con el 5% de grasa, 3.6% de proteína y 13.5% de sólidos totales. Ortiz (1993) reporta producciones de 1956 ± 546 kg. con una duración media de 298 ± 62 días, para un total de 296 muestras, correspondientes a 134 vacas, de las cuales 15 tuvieron promedios de producción superiores a 3000 Kg. de leche por lactancia. Escobar (1999) encontró en varias fincas del Valle del Cauca, producciones de leche (ajustadas a 305 días) con valores de 1166 ± 228 a 2936 ± 717 kg. Ocampo (2003) reportó una producción de leche de 5.7 kg/vaca/día y 1151 kg/vaca/año con duración de la lactancia de 245 días, en una finca con un sistema de ordeño con ternero.

Tabla 1. Patrón de la Raza Hartón del Valle. Fuente: Casas y Valderrama, (1998).

Apariencia General		Proporcional al cuerpo, tamaño y longitud media.
Cabeza	Perfil	Recto o subcóncavo.
	Frente	Anchura moderada, plana o con ligera concavidad.
	Cuernos	De diámetro y longitud moderada, orientación variable. Blancos con puntas negras o carmelitas o totalmente negros. Topo artificial o natural.
	Orejas	Ovaladas y alerta. Tamaño pequeño a medio sin o con cantidad moderada de pelo.
	Hocico	Amplio, pigmentado total o parcialmente de negro o carmelita. Ollares moderadamente amplios y separados.
Cuerpo	Cuello	Descarnado, armoniosamente unido a la cabeza y al tronco, de piel suelta y plegable, de papada y gola escasa a moderada.
	Pecho	Ancho y profundo
	Dorso y Lomo	Largo, ancho, fuerte, casi nivelado y sin salientes.
	Torax, Costillas, Flanco, Vientre	Tórax profundo, largo y ancho, costillas largas, bien arqueadas y separadas, vientre largo, ancho y profundo.
	Anca	Larga, ancha, casi nivelada, poco o moderadamente musculosa
	Sacro	A nivel de caderas y sin salientes.
	Cola y Borla	Armoniosamente unida al sacro y casi a nivel de la línea dorsal descarnada o delgada rematada en borla negra o carmelita.
Miembros	Anteriores	Espalda larga, descarnada o moderadamente llena, miembros aplomados, huesos largos, fuertes y descarnados.
	Posteriores	Largos, bien conformados, nalgas poco voluminosas moderadamente llenas.
	Pezuñas	Simétricas, bien conformadas y de color negro o carmelita.
Órganos Genitales	Bolsa Escrotal y Testículos	Bien conformados, cubierta de piel fina flexible, pigmentado o no, pelos negros o no, testículos simétricos de buen tamaño.
	Ubre y Pezones	De buen volumen, simétrica, fuertemente unida, larga, ancha y de profundidad moderada, unión posterior ancha. Textura suave pezones uniformes, longitud y tamaño conveniente y a veces arracimados, venas mamarias largas y moderadamente prominentes.
	Prepucio	Reducido a mediano
Pelaje	Color	De amarillo claro (Bayo) al rojizo (cereza), o con mezcla de pelos negros rodeando el hocico, tonalidad clara o no alrededor del hocico, axilas o periné o formando barcinaduras, manchas blancas de extensión reducida en las bragas y/o prepucio.
	Pelos	Finos, cortos o medianos y lustrosos
	Piel	Negra, oscura o carmelita, suelta, fina y aceitosa



Figura 1. Torete de la raza Hartón del Valle (Autor: David Calero)



Figura 2. Novilla de la raza Hartón del Valle (Autor: David Calero)

La curva de lactancia estudiada por Tobar y Varela (1989) en un hato de ganado HV bajo el sistema tradicional de ordeño con apoyo del ternero, fue de la forma $Y = 5.0658(x^{0.1502})e^{-0.0019x}$ con un pico de producción máximo en un rango de 6.3 a 8.3 kg/día, entre los 23 a 47 días después del comienzo de la lactación. Se caracteriza como la curva típica de vacas lecheras cuando están en equilibrio nutricional y con un período seco adecuado para recuperar la condición corporal.

Por su aptitud lechera en zonas cálidas, ha tenido gran acogida para cruzamiento con razas especializadas lecheras como Holstein en Antioquia y el Valle del Cauca y con Pardo Suizo en Tolima y Huila y para carne con Simmental, en el Valle del Cauca (Casas y Valderrama, 1991). Álvarez (1999), comparó el comportamiento de las curvas de lactancia en cruzamientos de HV con Holstein y Angler de origen Alemán (Tabla 2); encontró que el HV presentó el pico de producción a los 28 días posparto, con un rendimiento máximo de 10.6 Kg. Las curvas con mejor desempeño fueron las de vacas con 75% o más porcentaje de Holstein, seguidas de los animales F₁ (Holstein x HV) y el cruce recíproco. Con excepción del grupo (¼ Angler x ¾ HV), las demás curvas mostraron comportamientos superiores al HV.

Tabla 2. Parámetros de la curva de lactancia de vacas Hartón del Valle (HV) y sus cruces con Holstein (H) y Angler (A). Fuente: Álvarez, (1999)

Grupo Genético	N	Pico de producción (días)	Producción en el pico (kg)	Producción total (kg)
HV	755	28	10.6	1873
H	459	39	16.2	3494
¾ H x ¼ HV	369	38	15.5	3091
½ H x HV	124	34	15.4	3161
½ HV x ½ H	74	35	15.6	3148
¾ HV x ¼ H	40	37	13.9	2851
½ A x ½ HV	51	30	12.5	2630
¾ A x ¼ HV	12	30	11.3	2326
¼ A x ¾ HV	8	17	9.6	1070

La calidad de la leche del HV fue estudiada en dos sistemas de producción. La composición promedio general de la leche cumplió con los parámetros mínimos establecidos por la legislación colombiana, siendo superiores la grasa, sólidos totales, sólidos no grasos y cenizas (Tabla 3). La composición de la leche de la raza HV fue superior a la de Holstein y muy similar a las razas Ayrshire y Pardo Suizo (Hurtado, 1998).

Tabla 3. Composición de la leche del ganado Hartón del Valle en dos sistemas de producción. Fuente: Hurtado, (1998)

Componente	Sistema Extensivo	Sistema Pastoreo	Promedio
Acidez (% Acido láctico)	0.18	0.16	0.17
Densidad (gr/cc)	1.03	1.03	1.03
Grasa (%)	4.16	3.82	3.37
Proteína (%)	3.60	3.17	3.37
Sólidos totales	13.6	12.6	13.09
Cenizas %	0.77	0.69	0.72

2.2 IMPORTANCIA DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA ANIMAL

La importancia e interés de la conservación de razas, se puede resumir en cuatro aspectos: el primero de ellos, es de orden genético-productivo, ya que la diversidad es necesaria para mantener la variabilidad de las poblaciones, la cual permite la adaptación a diferentes ambientes, algunas veces adversos (Simons, 1984). El segundo aspecto es de orden científico, debido a que el estudio de cada raza en particular puede ser de interés para detectar posibles genes únicos y valiosos, en el momento actual o en el futuro. El tercero de orden histórico-cultural, dado que la conservación de determinadas razas representan un patrimonio genético de un país y como historia viva y paralela al desarrollo de la población humana y el cuarto de índole ecológico-ambiental, ya que los ecosistemas son el resultado del equilibrio entre clima, flora y fauna, y cualquier factor que afecte

alguno de estos componentes, atenta contra ese equilibrio, deteriora el medio y la simbiosis ecológica de la zona.

La diversidad genética es fundamental para el mejoramiento genético sostenible puesto que facilita una rápida adaptación a cambios necesarios e imprevistos para el desarrollo de los sistemas de producción ya que no es posible predecir con objetividad cuales características podrán ser útiles en el futuro. Por lo tanto, un elemento clave como estrategia de conservación debe ser la caracterización de las razas o poblaciones con el fin de obtener un cuadro general de la diversidad genética existente (Barker, 1994).

La cría y los apareamientos controlados durante miles de años en los animales de granja, combinados con los efectos de la selección natural, han dado como resultado una gran diversidad genética entre las poblaciones ganaderas del mundo. Los animales altamente productivos criados de manera intensiva para proporcionar productos uniformes en condiciones de manejo controladas, coexisten con las razas de múltiples propósitos conservadas por ganaderos y pequeños productores, principalmente en sistemas de producción de bajos insumos externos. El banco mundial de datos para los recursos zoogenéticos para la alimentación y la agricultura de la FAO, contiene información de 7616 razas en 14 especies; se estima que alrededor de 20% de las razas están clasificadas en peligro de extinción y que durante los últimos seis años se extinguieron 62 razas, resultando en la pérdida de casi una raza por mes. Entre las principales amenazas se encuentra la marginación de los sistemas de producción tradicionales y de las razas locales asociadas, impulsada por la rápida dispersión de la producción ganadera intensiva que utiliza una gama reducida de razas, así como las enfermedades epidémicas y los desastres de diferente índole como sequías, inundaciones y conflictos militares (FAO, 2007).

La preocupación por la pérdida de diversidad genética debido a la extinción de razas y poblaciones, ha desencadenado la ejecución de programas mundiales de conservación de Recursos Genéticos Animales (RGA). Con el fin de conocer la situación real de los RGA, la FAO realizó la primera evaluación mundial de biodiversidad ganadera, mediante el informe sobre La Situación de los Recursos Zoogenéticos Mundiales para la Alimentación y la Agricultura, en el cual participaron 169 países. El informe presenta un análisis de la situación de la diversidad en el sector ganadero incluyendo el origen y desarrollo de los recursos zoogenéticos, usos y valores, distribución de los sistemas de producción ganaderos y situaciones de peligro y amenazas de extinción. El informe evalúa la capacidad de la gestión de los RGA a nivel de instituciones, políticas y marcos legales, actividades organizadas de mejora genética y programas de conservación (FAO, 2007).

La pérdida de alelos dentro de las razas o poblaciones es un factor natural continuamente contrareestado por nuevas variaciones producidas por mutación. Sin embargo, los apareamientos preferenciales con individuos considerados superiores y los trabajos de selección impuestos por el hombre, han ocasionado erosión genética en muchas poblaciones, sin que haya una reposición de los alelos perdidos y por consiguiente, la variación genética representada como diferencias entre razas, linajes o poblaciones no puede ser fácilmente regenerada (Barker, 1994).

En las últimas décadas del siglo XX, se ha constatado que el uso y la preservación de los recursos genéticos animales son inseparables. Se ha tomado conciencia de la importancia de las razas domésticas en la diversidad mundial, debido a que los genes y combinaciones de genes que éstas poseen, pueden llegar a ser útiles en el futuro (Barker, 1994).

2.3 MARCADORES MOLECULARES

Hasta las últimas décadas del siglo XX, la caracterización de los RGA se basaba en descriptores morfológicos y productivos (fenotípicos), que resultaban a veces insuficientes para distinguir entre razas puras, puesto que son afectados por el ambiente. Mediante la asociación de datos fenotípicos, polimorfismos moleculares y metodologías estadísticas adecuadas, se puede conocer la condición real de una población y obtener información sobre la evolución de las razas, el desarrollo de “*pools*” génicos y la magnitud de las diferencias entre razas (MacHugh *et al*, 1997; Bruford *et al*. 2003).

Los desarrollos recientes en genética molecular han aportado nuevas herramientas llamadas marcadores moleculares para acceder a los orígenes y la distribución geográfica de la diversidad de los animales de granja. Los polimorfismos proteicos fueron los primeros marcadores utilizados, se realizaron un gran número de estudios, particularmente durante los 1970's, para caracterizar grupos sanguíneos y sistemas aloenzimáticos. Sin embargo, el bajo nivel de polimorfismo observado a nivel proteico redujo su aplicabilidad en estudios de diversidad. Baumung *et al.*, (2004) observaron que los polimorfismos proteicos han sido utilizados en el 29% de las investigaciones en RGA. Actualmente, la técnica está siendo utilizada en conjunto con otras técnicas moleculares (p. e. Ibeagha-Awemu & Erhardt, 2005).

Existen marcadores basados en polimorfismos de ADN con un alto potencial de utilización para la identificación de la paternidad, mapeamiento genético, taxonomía molecular, introgresión de genes, estudios evolutivos, diagnóstico genético precoz y selección asistida por marcadores (Gybson & Smith, 1989). Las técnicas de biología molecular pueden ser usadas como herramientas para la conservación de recursos genéticos, almacenamiento de ADN para futura

utilización y para la identificación de regiones responsables de características de adaptación (Hetzl & Drinkwater, 1992).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las tecnologías de secuenciación de los polimorfismos basados en el ADN, son base de los marcadores más utilizados en la investigación de la diversidad genética, los cuales incluyen secuencias del ADN mitocondrial con herencia materna, polimorfismos de nucleótidos simples (SNP's) y microsatélites del cromosoma Y con herencia paterna y autosómicos con herencia biparental (Hannote *et al.*, 2006).

Los microsatélites son sistemas polialélicos, altamente variables, distribuidos por todo el genoma, compuestos por ADN repetitivo en tándem que son usualmente dinucleótidos simples como (CA)_n (Litt & Luty, 1989). Los polimorfismos se generan por el número de veces que se repite la secuencia (Barker, 1994). Una gran cantidad de microsatélites autosómicos han sido aislados en la mayoría de las especies domésticas. La FAO y el ISAG (*International Society of Animal Genetics*) recomendaron una lista de microsatélites para estudios de diversidad, la cual ha estado disponible para el público. (<http://dad.fao.org/en/refer/library/guidelin/marker.pdf>).

Los microsatélites autosómicos son utilizados para identificación genética de individuos, análisis de parentesco, implementación y monitoreo de programas de conservación *ex situ* (Hannote & Jianlin, 2005), estimaciones de la diversidad poblacional, diferenciación de poblaciones, cálculo de distancias genéticas, estimación de relaciones genéticas (MacHugh *et al.*, 1998; Breneman *et al.*, 2001; Mateus *et al.*, 2004) y de los grados de mestizaje entre razas (Freeman *et al.*, 2004; Freeman *et al.*, 2006). Son altamente sensibles a los cuellos de botella y frecuentemente utilizados para estimaciones de endogamia (Giovambattista *et al.*, 2001; Toro *et al.*, 2003).

Entre las especies domésticas, el ganado bovino ha sido intensamente estudiado con microsatélites (Freeman *et al.*, 2005). El origen y la domesticación de las especies están bien entendidos y hay una fuerte evidencia de que *Bos taurus* y *Bos indicus* tuvieron centros de domesticación diferentes y que el Cercano Oriente fue el primer centro de domesticación del ganado (Loftus *et al.*, 1994; Bradley *et al.*, 1996; MacHugh *et al.*, 1997). La composición genética del ganado moderno, es el resultado de los procesos de migración, mejoramiento y mestizaje, llevado a cabo desde la domesticación (Loftus *et al.*, 1999; Troy *et al.*, 2001; Hanotte *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2003).

El ADN mitocondrial está formado por una cadena sencilla de ADN circular, posee menos de 20 kb en la mayoría de los mamíferos, está localizado en el citoplasma celular dentro de la mitocondria, organela celular responsable de la producción de energía.

Las secuencias de ADN mitocondrial son los marcadores preferidos para estudios de domesticación ya que posee tres características fundamentales: (i) se conserva evolutivamente lo suficientemente para permitir la identificación de la población ancestral, que dio origen a la población en estudio; (ii) es variable y está estructurado geográficamente, lo cual permite la localización aproximada del sitio de domesticación; (iii) evoluciona rápidamente y a una tasa constante lo que permite la datación del origen de determinado polimorfismo (Bruford *et al.*, 2003). El estudio del ADN mitocondrial es utilizado para identificar los probables ancestros salvajes, el número de linajes maternos y el origen geográfico de una población (Hannotte & Jianlin, 2005); permite trazar los patrones geográficos de la diversidad y de la evolución de una especie, la dispersión, el flujo genético, las expansiones demográficas, la deriva genética y la introgresión (Bruford *et al.*, 2003).

Aunque es muy informativo para estudios evolutivos, el ADN mitocondrial posee limitaciones. Como se comporta como un locus único (haplotipo) y es un marcador extranuclear con una dinámica propia, no es un buen indicador para inferir con respecto a la diversidad genética total. Debido a su herencia materna no permite detectar el flujo génico mediado por los machos (Bruford *et al*, 2003).

De acuerdo con estudios de ADN mitocondrial se ha podido verificar la existencia de al menos cinco centros de domesticación: Los Andes (camélidos del nuevo mundo), Noroeste de África (asnos y bovinos taurinos), Oriente medio (bovino, taurino, ovino caprino y suino), Sur de Asia (bufalinos, bovinos indicinos, y gallináceos), Himalaya (Yak) y el centro-norte de Asia (equinos) (Hannotte & Jianlin, 2005).

Estudios citogenéticos han revelado diferencias morfológicas en el cromosoma Y de los bovinos: mientras en los taurinos es submetacéntrico, en los cebuínos es acrocéntrico. Con excepción de la región pseudoautosómica, el cromosoma Y actúa como una unidad simple no recombinante, haploide y específica de los machos, lo cual asegura que las combinaciones de eventos mutacionales originales de los linajes masculinos, se preserven como un haplotipo (Edwards *et al.*, 2000). El ganado doméstico presenta diferencias relacionadas con el sexo en poblaciones mezcladas y pueden revelar los patrones de migración (MacHugh, 1997); los linajes masculinos pueden reflejar historias evolutivas diferentes a las proporcionadas por los linajes maternos (Edwards *et al*, 2000). En los últimos años, se han desarrollado técnicas que permiten distinguir polimorfismos a escala molecular. Bradley *et al.*, (1994) en ganado europeo, mediante el estudio de un microsatélite polimórfico específico del cromosoma Y, demostraron procesos de hibridación mediada por machos, entre ganado cebuino y taurino, puesto que no se encontraron haplotipos mitocondriales de cebú en el ganado africano, sin embargo, el cromosoma Y había penetrado en las poblaciones taurinas.

Hanotte *et al.*, (1997) describió el polimorfismo de un microsatélite del cromosoma Y que presenta dos alelos: uno de 130 pb específico para ganado de origen taurino y otro de 132 bp, específico para origen cebuino. En Africa, Hanotte *et al.*, (2000) analizaron 984 machos de 69 razas indígenas africanas, mediante el microsatélite INRA124. El alelo específico de los taurinos estuvo presente en el 30% de los machos y el específico de cebú en el 70%. Se detectaron zonas de introgresión en el oeste y el sur de África y patrones de introgresión mediada por machos.

En el cromosoma Y, los microsatélites INRA124, INRA126, INRA189 y BM861, conformados por repeticiones del dinucleótido (CA)_n, mostraron polimorfismo en bovinos (*Bos taurus* y *Bos indicus*) y las especies relacionadas Bisonte (*Bos bisón*), Mithan (*Bos bibos*), Búfalos (*Bubalus arnee*) y Yak (*Bos grunniens*). Los microsatélites mostraron alelos putativos cebú-específicos y taurino-específico, útiles para la descripción del flujo genético en poblaciones híbridas (Edwards *et al.*, 2000).

En ganado criollo de Argentina y Bolivia con el microsatélite INRA124 se encontró que el 85% de los machos estudiados portaban el alelo taurino y 15% el cebuino. Todos los machos criollos que tenían un cromosoma Y acrocéntrico, típico de *Bos indicus* tuvieron también el alelo de 124 pb del microsatélite INRA124 y los que presentaron el cromosoma submetacéntrico, portaban el alelo de 126 pb (Giovambattista, *et al.*, 2000).

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ F. L. Á. (1999) Potencial Genético y Productivo del Ganado Criollo Hartón del Valle. En: Memorias del Seminario Censo y Caracterización de los Sistemas de Producción del Ganado Criollo y colombiano. Santa Fe de Bogotá. 158 p.
- ARCHILA, M. y BERNAL, S. (1983) Contribución al estudio del ganado criollo HV. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Santa Fe de Bogotá. 486 p.
- BARKER J. S. (1994) A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. Proc. 5th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. 21:501-508.
- BAUMUNG R., SIMIANER H., HOFFMANN I. (2004) Genetic diversity studies in farm animals – a survey. J. Anim. Breed. Genet. 121: 361–373
- BRADLEY DG, MACHUGH E, CUNNINGHAM P, LOFTUS RT. (1996) Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. Proc Natl Acad Sci USA 93:5131–5.
- BRADLEY DG, MACHUGH DE, LOFTUS RT, SOWRS, HOSTE CH, CUNNINGHAM EP (1994) Zebu taurine variation in Y chromosomal DNA: A sensitive assay for genetic introgression in West African trypanotolerant cattle populations. Anim Genet 25:7–12.
- BRENNEMAN, R. A.; CHASE JR., C. C.; COLEMAN, S. W. (2001) Detection of origin between two bloodlines of Romosinuano cattle using microsatellite screening. Trop. Agric., v.78, p. 255-262.
- BRUFFORD, M. W., BRADLEY, D. G. LUIKART, G. (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nat. Rev. Genet. V.4, n.11, p 900-910.
- CASAS, I.; VALDERRAMA, M (1998) El Bovino Criollo Hartón del Valle. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira-Asociación Nacional de Criadores de Ganado Hartón del Valle. ASOHARTON. Palmira. 54 p.
- DURÁN, C. V.; ALVAREZ L.A.; CAMPOS R. (1995) Conservación, Mejoramiento y Utilización del ganado Criollo Hartón del Valle. Programa de Investigación Universidad Nacional de Colombia. Universidad Nacional de Colombia Palmira. 78 p.

DURAN, C. V. (1997) Proyecto: Conservación, mejoramiento y utilización del ganado criollo HV: Tipificación de los sistemas de producción del ganado HV. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 18p.

EDWARDS C J., GAILLARD C., BRADLEY D G., MACHUGH D. (2000). Y specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species. *Animal Genetics*, 31:127-130.

EGITO A; PAIVA S; ALBUQUERQUE M.S; MARIANTE A; ALMEIDA L.D.; CASTRO S.; GRATTAPAGLIA D. (2007) Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. *BMC Genetics* 8:83

ESCARRIA M. Y CANDIA F. J. (1998) Censo y Caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo HV en los municipios de Bolívar, Roldanillo, Toro y Versalles. Trabajo Dirigido de Grado Carrera de Zootecnia Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. 111 p.

ESCOBAR, M. (1999) Estimación de valores genéticos para características de importancia económica en bovinos en cinco fincas del Valle del Cauca. Trabajo Dirigido de Grado Carrera de Zootecnia Universidad Nacional de Colombia Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 171 p.

FAO (2007) The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture, edited by Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. Rome. 511 p.

FREEMAN, A. R.; HOGGART, C. J.; HANOTTE, O.; BRADLEY, D. G. (2006). Assessing the relative ages of admixture in the bovine hybrid zones of Africa and the Near East using X chromosome haplotype mosaicism. *Genetics*, v.173, n.3, p. 1503-1510.

FREEMAN A. R., BRADLEY D. G., NAGDA G., GIBSON J. P., HANOTTE O. (2005). Combination of multiple microsatellite data sets to investigate genetic diversity and admixture of domestic cattle. *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics*, 37, 1–9 1

FREEMAN, A. R.; MEGHEN, C. M.; MACHUGH, D. E.; LOFTUS, R. T.; ACHUKWI, M. D.; BADO, A.; SAUVEROCHE, B.; BRADLEY, D. G. (2004) Admixture and diversity in West African cattle populations. *Mol. Ecol.*, v.13, n.11, p. 3477-3487.

GONZALEZ, A. M. y ARANGO, B. H. (1976) Estudio del ganado criollo "Hartón" del Valle del Cauca. *Acta Agronómica*. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 24 (1-4).

GIBSON, J. P.; SMITH, C. (1989) The incorporation of biotechnologies into animal breeding strategies. In: M. Moo-Young; L. A. Babink; J. P. Phillips (Ed.). Animal Biotechnology: Comprehensive Biotechnology, The incorporation of biotechnologies into animal breeding strategies, p. 204-231.

GIOVAMBATTISTA G., RIPOLI M V., DE LUCA J C, MIROL J P., DULOUT F N., (2000) Male-mediated introgresión of *Bos indicus* genes into Argentina and Bolivian creole cattle breeds. Animal Genetics, 31:302-305.

GIOVAMBATTISTA, G., RIPOLI, M. V. PERAL-GARCIA, P. BOUZAT, J. L. (2001) Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: the Argentinean Creole cattle. En: Anim. Genet. Vol 32:240-247.

HANOTTE O.; OKOMO M.; VERJEE Y.; REGE E.; TEALE A. (1997) A polymorphic Y chromosome microsatellite locus in cattle. Animal Genetics 28:308-22.

HANOTTE O.; BRADLEY D. G.; OCHIENG J. W.; VERJEE Y.; HILL E. W.; REGE J.E. (2002) African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations. Science 296: 336–339.

HANOTTE O.; JIANLIN H. (2005) Genetic characterization of livestock populations and its use in conservation decision-making. In: The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources. Food and Agriculture Organization Of The United Nations. Rome.

HETZEL D. J.; DRINKWATER R. D. (1992) The use of DNA technologies for the conservation and improvement of animal genetic resources. In: J. Hodges (Ed.). The management of global animal genetic resources. Proceedings of an FAO Expert Consultation. Rome: FAO, The use of DNA technologies for the conservation and improvement of animal genetic resources, p. 309.

HURTADO G. M. (1998) Caracterización físico-química de la leche del ganado criollo Hartón del Valle en dos hatos diferentes en el Valle del Cauca. TRABAJO Dirigido de Grado. Carrera de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. 121 p

IBEAGHA-AWEMU E.; ERHART G. (2005) Genetic structure and differentiation of 12 African *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds, inferred from protein and microsatellite polymorphisms. J.Anim. Breed. Genet., 22, (1):12-20.

KUMAR P.; FREEMAN, A. R.; LOFTUS, R. T.; GAILLARD, C.; FULLER, D. Q.; BRADLEY, D. G. (2003). Admixture analysis of South Asian cattle. Heredity, v.91, n.1, p. 43-50.

KIMURA M.; CROW J. F. (1964). The number of allele that can be maintained in the finite population. *Genetics* 49: 725-738

KIMURA M.; OHTA T. (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in finite populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:2868–2872.

LITT M.; LUTY, J. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in Vitro amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum.*, 44, (3):97-401.

LOFTUS R.T.; MACHUGH D. E.; BRADLEY D. G.; SHARP P.M.; CUNNINGHAM E.P. (1994). Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2757–2761.

LOFTUS R. T.; ERTUGRUL O.; HARBA A. H.; EL-BARODY M. A.; MACHUGH D. E.; PARK S. D.; BRADLEY D. G. (1999) A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East. *Molecular Ecology* 8: 2015–2022.

LOZADA X. (1998) Caracterización del ganado HV en Centro y sur del Dpto. del Valle. Trabajo Dirigido de Grado Carrera de Zootecnia Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. 86 p.

MACHUGH D. E.; SHRIVER M. D.; LOFTUS R. T.; CUNNINGHAM P.; BRADLEY D. G. (1997) Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* 146:1071–86.

MACHUGH D. E.; LOFTUS R. T.; CUNNINGHAM P.; BRADLEY D. G. (1998) Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics* 29: 333–340.

MARTÍNEZ, G. (2004). Razas Bovinas Criollas y colombianas. Boletín Divulgativo No. 13. Meta, Colombia, pp. 20.

MARTÍNEZ, G. (1999). Censo y caracterización de los sistemas de producción de ganado criollo colombiano, Fondo Nacional Del Ganado, ICA, Pronatta, Asobón. 158 p.

MATEUS J. C.; PENEDO M. C.; ALVES V. C.; RAMOS M.; RANGEL-FIGUEIREDO T. (2004) Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle breeds using microsatellites. *Anim. Genet.*, v.35, n.2, p. 106-113.

MIRETTI M.; FERRO J. A.; LARA M. A.; CONTEL P. B. (2001) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) in exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in South American cattle. *Biochem. Genet.* 39:311-324.

OCAMPO L. M. (2003) Validación de un modelo de optimización ex - ante en sistemas de producción de ganado criollo Hartón del Valle, en el departamento del Valle del Cauca. Tesis de Maestría en Producción Animal. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 258 p.

ORTIZ W. (1993) Estudio de parámetros productivos y reproductivos del ganado criollo Hartón del Valle en una finca del Valle del Cauca. Trabajo Dirigido de Grado. Carrera de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 102 p.

PIMENTEL DE MELLO L.; VASCONCELLOS K.; TAMBASCO-TALHARI D.; POZZI A.; LEHMANN COUTINHO L.; CORREIA DE ALMEIDA L. (2003) Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. *Genetics and Molecular Biology*, 26, 2, 133-137

PINZON M. E. (1984); Historia de la ganadería bovina en Colombia. En: Suplemento Ganadero. Banco ganadero Vol. 4, no.1 p.208

----- (1991) Historia de la Ganadería Bovina en Colombia Banco Ganadero Suplemento Ganadero (Banco Ganadero) Vol. 8 Número 1.

PRIMO A. T. (1992) El ganado bovino ibérico en las Américas: 500 años después. 1992. Archivos de Zootecnia, 41(154):421.

ROCANCIO B. D.; MENDOZA F. J. (1997) Tipificación y Caracterización de los sistemas productivos del Ganado Hartón en la zona centro y algunos municipios de la zona norte del Valle del Cauca. Trabajo Dirigido de Grado Carrera de Zootecnia Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. 124 p.

ROUSE J. E. (1977) The Criollo: Spanish cattle in the Americas. Oklahoma: University of Oklahoma Press. p. 303

SIMONS, D. L. (1984) Conservation of animal genetic resources. A review. *Livest. Prod. Sci.* 11, 23-36.

TOBAR C.; VARELA, G. (1989). Estudio de las curvas de crecimiento y lactancia, fertilidad y rentabilidad en la raza HV. Trabajo de Grado. Fac. Cs. Agropec., Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. 118 p.

TORO M. A.; BARRAGAN C.; OVILO C. (2003) Estimation of genetic variability of the founder population in a conservation scheme using microsatellites. *Anim. Genet.*, 34, (3):226-228.

TROY C.; MACHUGH D. E.; BAILEY J. F.; MAGEE D. A.; LOFTUS R. T.; CUNNINGHAM P.; CHAMBERLAIN A. T.; SYKES B. C.; BRADLEY D. G. (2001).

Genetic evidence of Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* 410:1088-1091.

WILKINGS J V., MARTINEZ I., ROJAS F. (1982). El ganado vacuno criollo. Documento 31. Santa Cruz, Bolivia: CIAT

CAPITULO I - DIVERSIDAD GENETICA DE LA RAZA HARTON DEL VALLE MEDIANTE MARCADORES MICROSATELITES

1. INTRODUCCION

El genoma bovino está compuesto de 29 pares de autosomas y dos cromosomas sexuales. Al menos el 50% del genoma bovino está compuesto por secuencias repetitivas no codificantes, cuya función, se cree que tiene un papel importante en el proceso de acoplamiento de exones y en la evolución de nuevas funciones (Vaimann, 1999).

Los microsatélites de ADN son sistemas multialélicos altamente variables, compuestos por ADN repetitivo en tándem, distribuidos por el genoma (Litt & Luty, 1989). Su unidad de repetición es una secuencia específica de una a seis bases; los más comunes y utilizados son los di, tri y tetranucleótidos, repetidos en tándem, hasta 60 veces (Crawford & Cuthbertson, 1996). La variación ocurre en el número de repeticiones dentro del segmento. La repetición más frecuente en el genoma de mamíferos es Poli-A, sin embargo, poli-(TG/CA) es el microsatélite mejor estudiado, debido a la alta variabilidad del número de secuencias repetidas. Estas regiones pueden ser amplificadas, por la técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) utilizando *primers* con parte de la secuencia flanqueadora. La amplificación resulta en productos de diferentes tamaños, en función del número de copias de la secuencia repetitiva delimitada por los *primers* (Almeida *et al.*, 2001). El tamaño de los fragmentos puede ser estimado mediante técnicas estándar de electroforesis (Vaimann, 1999).

Las características que hacen que la mayoría de autores los consideren una herramienta poderosa para estudios genéticos son: un elevado grado de polimorfismo, herencia mendeliana simple, son codominantes, fáciles de medir,

analizar y son confiables, automatizables y presentan alta repetibilidad (Goldstein y Schlötterer, 1999).

Los microsatélites han sido utilizados para mapeo genómico, determinación de la variabilidad genética y de paternidades e investigación de enfermedades (Caskey *et al.*, 1992; Glowatzki-Mullis *et al.*, 1995; Garcia-Moreno *et al.*, 1996). Han sido efectivos para la evaluación de las diferencias entre razas y especies y para determinar la subdivisión poblacional (MacHugh *et al.*, 1994, 1998; Ciampolini *et al.*, 1995). Presentan altas tasas de mutación explicadas por dos modelos: el modelo de mutación neutral de alelos infinitos (IAM), propuesto por Kimura y Crow (1964) y el modelo mutacional Paso a Paso (SMM), propuesto por Kimura y Otha (1978). El IAM propone que a nivel de nucleótidos, el número de posibles alelos en un locus es enorme, puesto que cada nueva mutación crea un nuevo alelo y el SMM en el cual los alelos están representados por los números de repeticiones de nucleótidos (tamaño del alelo) y asume que en un solo evento mutacional aumenta o decrece el tamaño del alelo.

1.1 ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GANADO MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES

En el 2000, la FAO publicó una lista de marcadores moleculares recomendados para las diferentes especies de animales de granja y desde entonces se han desarrollado múltiples trabajos alrededor del mundo. La FAO evaluó el estado de la investigación en genética molecular en bovinos y encontró que se han utilizado varios tipos de marcadores moleculares principalmente los microsatélites (88%), los bioquímicos (25%), grupos sanguíneos (21%), RFLP (17%), AFLP (8%) y SNP (13%) (FAO, 2004).

La mayoría de los estudios poblacionales se han limitado a un pequeño número de razas y a menudo dentro de un país (Li *et al.* 2002; Baumung *et al.* 2004), pero

algunos trabajos han examinado la diversidad y la distribución a nivel regional (Loftus *et al.* 1999; Kantanen *et al.* 2000), a escala de un continente (Hanotte *et al.* 2002) y a nivel intercontinental. A continuación se resumen algunos trabajos de diversidad y la estructura genética. Se reportan evaluaciones entre especies y de razas entre y dentro de continentes.

Ritz *et al.* (2000) estudiaron la filogenia de la tribu Bovini a partir de los polimorfismos de 20 microsatélites en *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Phoepagus*, *Bibos*, *Bison*, *Bubalis* y *Syncerus*. Las agrupaciones obtenidas mediante árboles *Neighbor-joining* revelaron sustanciales divergencias entre especies. Los *Bos taurus* y *Bos indicus* se agruparon juntos, seguidos del *Bos frontalis* (Mitan) y *Bos grunniens* (Yak). Las especies más divergentes fueron *Bubalis bubalis* y *Syncerus caffer*. Concluyen que los géneros *Bos*, *Phoepagus* y *Bibos* deben integrarse y cada grupo debe ser considerado como un subgénero y *Bison*, *Bubalis* y *Syncerus* deben ser clasificados como géneros diferentes.

MacHugh *et al.* (1997) determinaron la variación genética, las relaciones evolutivas y la biogeografía de 20 poblaciones diferentes de África, Europa y Asia con 29 microsatélites. La reconstrucción filogenética y el análisis de componentes principales mostraron una marcada distinción entre el ganado taurino y cebuino, lo que permitió afirmar que el cebú fue domesticado independientemente del *Bos taurus*, entre 610000 y 850000 años. Ellos encontraron diferencias sustanciales entre el ganado cebuino y el taurino en la distribución de los alelos de 10 loci, que fueron útiles para estimar el flujo genético y la introgresión del cebú en las poblaciones africanas.

En Europa se han descrito numerosos trabajos que evalúan diferentes números de razas, algunos de ellos se describen a continuación:

Para investigar la variación genética en las razas europeas Angus, Charolais, Friesian, Hereford, Jersey, y Simmental, MacHugh *et al.*, (1994), con 12

marcadores microsatélites encontraron un rango amplio de heterocigosidad observada desde 0.0-0.91, desviaciones en el equilibrio Hardy-Weimberg en un microsatélite localizado en el gen de la prolactina y desequilibrio de ligamiento en dos loci situados en el complejo mayor de histocompatibilidad.

Moazami-Goudarzi *et al.* (1997), mediante 17 microsatélites y 13 marcadores bioquímicos determinaron la variación genética de 10 razas europeas (Charolais, Limousin, Breton Black Pied, Parthenais, Montbéliard, Vosgien, Maine-Anjou, Normando, Jersey and Holstein). Encontraron 217 alelos con heterocigosidad desde 0.53 en Jersey hasta 0.66 en Parthenais.

Para conocer la estructura genética de seis razas europeas, MacHugh *et al.*, (1998), analizaron 20 microsatélites en 253 animales. Encontraron alto grado de subdivisión genética: las razas continentales (Kerry, Simmental, Charolais y Holstein) se separaron claramente de las provenientes de islas británicas (Jersey, Aberdeen Angus y Hereford).

Cañón *et al.* (2001) evaluaron la diversidad de razas locales europeas para carne con propósitos de conservación. En 18 razas bovinas españolas, portuguesas y francesas encontraron un rango de heterocigosidad observada entre 0.54 en la Pirenaica y 0.72 en la Barrosa. El 7% del total de la variabilidad genética se atribuyó a las diferencias entre razas. Evaluaron cinco metodologías para estimar distancias genéticas, pero la correlación entre ellas no fue significativa. Los resultados permitieron determinar que las razas más importantes para conservar se agruparon en dos conjuntos: uno formado por las razas Mirandesa y Alistana y el otro por las razas Sayaguesa y Tudanca y que la extinción hipotética de uno de éstos “cluster” representó la pérdida de un 17% de diversidad.

Jordana *et al.* (2003) con propósitos de conservación estudiaron la estructura y las relaciones de 18 razas locales del sudeste de Europa (diez de España, cinco de

Portugal y tres de Francia) usando 16 loci microsatélites. Las razas francesas mostraron la mayor uniformidad genética; con excepción de las razas portuguesas Mirandesa y Barrosa, las demás, mostraron deficiencia de heterocigotos. La uniformidad genética entre algunas poblaciones se atribuyó al flujo genético resultante de la cercanía geográfica y las diferencias genéticas entre algunas razas a la deriva genética.

Beja–Pereira *et al.* (2003), en razas bovinas españolas, portuguesas y francesas atribuyeron al flujo genético la similaridad encontrada entre razas ibéricas geográficamente cercanas, mientras que la deriva genética ocasionada por aislamiento reproductivo provocó diferenciación entre las razas Tudanca, Alistana y Mirandesa. El análisis de componentes principales reveló que la diferenciación entre las razas del norte de Iberia fue mayor, que entre las razas geográficamente más distanciadas. Encontraron evidencias leves de influencia genética de razas africanas en las razas del suroeste de Europa.

En razas italianas se estimó la variabilidad genética entre y dentro de las razas Chianina, Marchigiana, Romagnola y Piemontesa, mediante el polimorfismo de 17 microsatélites en 220 animales no relacionados. Para caracterizar las razas y las relaciones entre ellas, analizaron las variaciones en las frecuencias alélicas, los coeficientes Wahlund, el contenido de información polimórfica (PIC) y las desviaciones en el equilibrio Hardy-Weimberg. Los resultados mostraron que la Chianina ocupó una posición intermedia respecto a las otras, la Piemontesa fue la más distante; la Marginiana y la Romagnola mostraron alta similitud (Ciampolini *et al.* 1995).

Pelmann *et al.* (1998), evaluaron las relaciones genéticas de cuatro razas belgas mediante el empleo de un panel de 23 microsatélites y estimaron la heterocigosidad, el PIC, el número efectivo de alelos y las probabilidades de exclusión e identidad genotípica de individuos escogidos al azar. La raza Azul

Belga presentó menor diversidad y la mayor distancia con respecto a las otras razas, la probabilidad de exclusión en todas las razas, considerando 23 microsatélites fue de 0.999, y de 0.98 cuando analizaron los dos sistemas multiplex más polimórficos. Concluyeron que el panel de microsatélites puede ser utilizado con alta confiabilidad, para el control de parentesco.

Martin-Burriel *et al.* (1999) en seis razas nativas españolas con 30 microsatélites encontraron que las razas asturianas presentaron alta similaridad; la raza de Lidia mostró bajos niveles de diversidad y junto con la Menorquina fueron las más divergentes. Los mismos autores, realizaron la caracterización molecular, de cinco razas españolas en peligro de extinción: Betizu (BET), Mallorquina (MAL), Menorquina, Monchina (MON), y Serrana de Teruel (ST) y dos poblaciones de raza de lidia, con 30 microsatélites. La raza BET, población en peligro de extinción, se encontró dividida en dos subpoblaciones, una de las cuales presenta valores de diversidad excepcionalmente bajos y la raza MAL mostró un bajo número de alelos. Aunque los bajos tamaños poblacionales y la deriva genética han provocado una divergencia considerable entre las razas, los análisis filogenéticos realizados mostraron concordancia con el origen geográfico e histórico puesto que MON y BET, ambas del noreste español se agruparon juntas al igual que las dos castas de lidia. Las comparaciones de la población ST con otras razas no amenazadas, sugieren que el alto nivel de desequilibrio de ligamiento encontrado para ésta última, está relacionado con la introgresión de las razas Alpina y/o Pirenaica (Martín-Burriel *et al.*, 2007).

Mediante once sistemas de antígenos de eritrocitos, 8 proteínas y 10 microsatélites, se evaluó la diversidad y la estructura poblacional de 15 razas indígenas del Norte de Europa, dos importadas y tres comerciales. Las razas del norte mostraron niveles similares de heterocigosidad y diversidad alélica; algunas razas presentaron baja diversidad debida al tamaño efectivo reducido y cuellos de botella. Se formaron cuatro grupos definidos: razas indígenas del Norte, razas del

Sur, Ayrshire y Holstein y Jersey. La subdivisión entre razas fue moderada y los bajos niveles de tamaño efectivo hallados permitieron concluir que éstos no son suficientes para prevenir la pérdida de variación genética en éstas poblaciones en peligro de extinción (Kantanen *et al.*, 2000).

Edwards *et al.* (2000) estudiaron las relaciones genéticas de la raza alemana Pustertaler, en peligro de extinción, con otras razas relacionadas y encontraron que la raza Pustertaler era similar tanto en heterocigosidad como en la media del número de alelos, a las otras razas analizadas (Pinzgauer, Vosges y Simmental). Se encontró estrecha relación entre las razas Pustertaler y Pinzgauer, puesto que ésta última contribuyó a la formación de la primera.

En Francia, estudios con microsatélites en cinco razas nativas (Abondance, Tarentaise, Villard de Lans, Montbéliarde, Limousin y Charolais) y una importada (Holstein) fueron comparadas con la Pardo Suizo. Los resultados mostraron que a pesar del bajo tamaño poblacional actual, las razas alpinas presentan una variabilidad genética superior a la raza Holstein. Las razas lecheras francesas y suizas fueron similares, sugiriendo un origen común o cruzamiento entre ellas (Maudet *et al.*, 2002).

Mateus *et al.*, (2004), evaluaron 30 microsatélites en 10 razas nativas portuguesas; en este estudio se encontró equilibrio de Hardy-Weimberg en todas las combinaciones loci/población, excepto en cinco loci de la raza Brava de Lidia y en un locus en la raza Alentejana, que exhibió deficiencia de heterocigotos. Se detectaron 390 alelos, con un rango en el número promedio de alelos por locus de 5.6 a 8.0. El índice F_{ST} de Wright mostró que la proporción promedio explicada por la diferencia entre razas fue del 9%. Los árboles basados en distancia D_A revelaron que las relaciones genéticas fueron consistentes con los orígenes históricos de las razas portuguesas a partir de los grupos evolutivos Pardo

Cóncavo (Arouquesa, Mirandesa, Marinhoa) y Rojo Convexo (Mertolenga, Alentejana, Garvonesa, Minhota).

En Asia y África se reportan algunos trabajos: La diversidad genética de las razas nativas Sahiwal, Haryana y Deoni de la India, fue estimada por Mukesh *et al.*, (2004), mediante H_e de 0.42, 0.53 y 0.70, respectivamente. En Sahiwal, la baja diversidad se atribuyó al tamaño poblacional relativamente bajo. Se encontró un déficit de heterocigotos significativo del 24%. Las razas Haryana y Deoni presentaron mayor similaridad genética en comparación con Sahiwal. El tiempo de divergencia entre Deoni y Haryana fue de 776 años mientras que entre Deoni y Sahiwal de 1296 años.

Para conocer la variación genética de la estructura poblacional del ganado en el oeste de África, se evaluaron 13 microsatélites y 200 individuos de las razas Koreana, China, Negra Japonesa y Holstein. Se encontró la menor diversidad genética en la Negra Japonesa ($H_e=0.471$) y la mayor en la raza China ($H_e= 0.74$). Las razas Koreana y China resultaron ser similares, mientras la Negra Japonesa se diferenció de las otras poblaciones (Kim *et al*, 2002).

Con el objetivo de estudiar la diversidad, la introgresión y las relaciones en razas del este y centro de África se utilizaron nueve razas *Bos indicus* y tres *Bos taurus* de Camerún y Nigeria usando la información de 28 marcadores (16 loci microsatélite, 7 loci de proteínas de la leche y 5 loci de proteínas de la sangre). Incluyeron en el análisis 13 de los 16 microsatélites en tres razas europeas y dos razas indias. Los niveles de diversidad con microsatélites en las razas cebuinas, fueron superiores que en las taurinas, pero con las proteínas fueron similares. Los microsatélites mostraron alelos específicos para el cebú indio, el taurino africano y el taurino europeo. Las proporciones de introgresión del cebú indio en el cebú africano fueron superiores a las halladas en los taurinos africanos y europeos. La reconstrucción filogenética indicó que existen relaciones muy cercanas entre las

razas cebú de Camerún y Nigeria, pero gran divergencia entre los cebúes indios, los taurinos africanos y los europeos.

Freeman *et al.* (2004) en un estudio con microsatélites en 16 poblaciones *Bos taurus* tolerantes a la tripanosomiasis, analizaron el impacto de los factores ecológicos y el efecto del mestizaje en el oeste de África. Encontraron que los altos niveles de introgresión de *Bos indicus* redujeron la resistencia a la enfermedad y resaltaron la importancia de prevenir la dilución de razas taurinas africanas por cruzamiento con ganado cebú.

En la Tabla 1 se resumen los parámetros de diversidad genética hallados mediante el uso de microsatélites, en diferentes trabajos con razas criollas de Latinoamérica.

En Colombia, se han realizado tres trabajos para evaluar la diversidad y las relaciones entre las razas criollas. Moreno *et al.* (2001) estudiaron la diversidad genética de las razas Blancorejinegro (BON), Romosinuano (R), Costeño con cuernos (CCC), San Martinero (S), Chino Santandereano (Ch), Hartón del Valle (H) y Casanareño (Ca) y el Cebú (C) como control externo. Se utilizaron siete microsatélites y se encontró un número promedio de alelos por locus de 8.9, valor mayor que el hallado en razas europeas, similar al estimado en taurinos africanos, cebuinos africanos y asiáticos, pero menor que el reportado para razas españolas. La heterocigosidad promedio observada fue de 0.52. El árbol filogenético agrupó las razas criollas BON, S, R, CCC y H, separándolas de Ch, Ca y C. Bedoya *et al.* (2001) con cinco microsatélites evaluaron la diversidad del ganado criollo Colombiano (Tabla 1). El árbol construido mostró dos grupos: uno con las razas BON, R, CCC, S, CH, y H y otro el ganado Cebú y el criollo Ca. Barrera *et al.* (2006) analizaron una muestra de animales Criollo colombiano, Cebú y la raza española Pirenaica, con 12 microsatélites y encontraron las mayores distancias

genéticas entre las razas de origen *Bos taurus* (criollas y Pirenaica) con respecto a la *Bos indicus*.

Tabla 1. Parámetros de Diversidad Genética estimados mediante microsatélites, en razas criollas de América Latina. Número de datos (N); Número promedio de alelos (NPA); Heterocigosidad esperada (He). * Riqueza alélica

País	Raza	N	No. Sist.	NPA	He	Referencia
Colombia	Criollo colombiano	93	5	8.8	0.67	Bedoya <i>et al.</i> , 2001
	Blanco Orejinegro	40		6.6	0.67	
	Romosinuano	5		3.7	0.52	
	San Martinero	14		5.0	0.73	
	Costeño con cuernos	4		5.0	0.62	
	Chino Santandereano	8		4.2	0.56	
	Casanareño	4		3.0	0.50	
	Hartón del Valle	8		5.0	0.70	
	Criollo Colombiano	43	7	8.9	0.67	Moreno <i>et al.</i> , 2001
	Blanco Orejinegro				0.77	
	Romosinuano				0.32	
	San Martinero				0.86	
	Costeño con cuernos				0.84	
	Chino Santandereano				0.79	
	Casanareño				0.46	
	Hartón del Valle				0.73	
	Criollo Colombiano	60	12	5.5	0.77	Barrera <i>et al.</i> , 2006
	Blancorejinegro				0.80	
	Romosinuano				0.78	
	San Martinero				0.83	
	Costeño con cuernos				0.77	
Casanareño	0.82					
Hartón del Valle	0.81					
Brasil	Criollo Brasileiro				73	
	Caracu	77	22	7.8	0.71*	Egito <i>et al.</i> , 2007
	Criollo Lageano	100	22	9.0	0.76*	Egito <i>et al.</i> , 2007
	Curraleiro	99	22	8.8	0.74*	Egito <i>et al.</i> , 2007
	Mocho Nacional	97	22	8.7	0.77*	Egito <i>et al.</i> , 2007
	Pantaneiro	96	22	9.0	0.78*	Egito <i>et al.</i> , 2007
Argentina	Criollo Argentino	31	9	7.3	0.74	Lirón <i>et al.</i> , 2006
	Patagónico	36	17	4.8	0.62	Martínez <i>et al.</i> , 2005
	Criollo Argentino		8		0.58	Zamorano <i>et al.</i> , 1998
Bolivia	Saavedreño	31	9	7.7	0.78	Lirón <i>et al.</i> , 2006
	Chaqueño	25	9	7.8	0.77	
	Yacumeño	22	9	6.6	0.72	
Uruguay	Criollo uruguayo	19	17	4.2	0.62	Armstrong <i>et al.</i> , 2006

En la raza HV se reporta un solo trabajo realizado para estudiar la diversidad genética. Piedrahita *et al.* (2008) muestrearon 33 animales y 3 individuos Holstein como grupo control, provenientes de 6 fincas, los cuales se analizaron mediante marcadores RAMS (*Random Amplified Microsatellites*). Reportaron un valor de heterocigosidad (He) de 0.26 y una alta diferenciación genética entre las fincas ($F_{ST}=0.39\pm 0.03$, $P<0.001$). Se halló alta identidad genética en dos de los hatos más representativos de la raza. Mediante la distancia insesgada de Nei (1978), los individuos fueron estratificados en 3 grupos: el primer grupo se formó a partir de cuatro fincas de cría de ganado puro, entre los cuales ha habido un intercambio de reproductores; el segundo grupo lo conformaron individuos de las granjas pertenecientes a la Universidad Nacional de Colombia, con un alto “bootstrap” (80%) y el tercero los individuos testigo de raza Holstein. Se concluyó que era necesario estudiar con mayor exactitud las razones de la alta estructura genética de la raza mediante un número de marcadores y un tamaño de muestra mayores.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los niveles de diversidad genética de la raza Hartón del Valle, Holstein y Brahman, mediante 15 marcadores microsatélites.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la diversidad genética de la raza Hartón del Valle.
2. Comparar los niveles de diversidad genética entre nueve poblaciones de Hartón del Valle.
3. Determinar la estructura genética, el grado de endogamia y las relaciones entre nueve poblaciones de Hartón del Valle.
4. Clarificar las relaciones de la raza Hartón del Valle con las razas Holstein (*Bos taurus*) y Brahman (*Bos indicus*).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MUESTREO

Se recolectaron 249 muestras de sangre de animales Hartón del Valle (HV), Holstein (H), Brahman (B) y animales F₁ de HV con otras razas (HVC). Las 186 muestras de HV fueron colectadas en 9 fincas localizadas en el Departamento del Valle del Cauca (Tabla 2), de las cuales el 18% fueron machos. El HVC estaba formado por 32 animales de HV cruzado (HVC), 21 de los cuales eran (HV x H) y el resto eran animales F₁ de HV con Jersey (n=4), Gyr (n=4), Ayrshire (n=1), Blanco Orejinegro (n=1) y Normando (n=1).

Tabla 2. Número de muestras por grupo genético, población y sexo de Hartón del Valle, Holstein, Brahman y F₁ de HV con otras razas (HVC).

Grupo Genético	Numero de Machos	Numero de Hembras	Total	Subpoblación	Código	Municipio
Hartón del Valle	10	18	28	Hacienda El Capricho	EC	Jamundí
	3	8	11	Casa Rincón	CR	Roldadillo
	4	17	21	Universidad Nacional de Colombia	UNAL	Palmira
	3	8	11	Hacienda Gran Capricho	GC	Candelaria
	0	10	10	Hacienda Jamaica	JA	Roldadillo
	1	34	35	Hacienda La Ondina	LO	Roldadillo
	10	18	28	Procampo	PR	Buga
	0	20	20	Hacienda San Rafael	SR	Bugalagrande
	3	19	22	Hacienda Zanjón Hondo	ZH	Tulúa
	34	152	186	Población total	HV	
Holstein	2	11	13	Hacienda Jamaica	H	Roldadillo
Brahman	1	17	18	Hacienda El Capricho, Hacienda Santa Inés	B	Jamudí Roldadillo
HVC	10	22	32	Hacienda Arenales, El Gran Capricho	HVC	Roldadillo Candelaria
Total	47	202	249			

En *vacutainer* con EDTA se tomaron 10 ml de sangre a cada animal mediante punción en la vena coccígea. Para la extracción de ADN se utilizó la metodología de desalamiento (Miller *et al.*, 1998). La cuantificación del ADN se hizo mediante comparación con patrones de ADN del fago Lambda a diferentes concentraciones.

3.2 LOCI MICROSATÉLITES

Se utilizaron 15 microsatélites de un panel de 30 propuesto por FAO (*Food and Agricultural Organization*) para el programa Medición de la Diversidad Recursos Genéticos de Animales de Granja (MoDAD).

<http://dad.fao.org/en/refer/library/guidelin/marker.pdf>

Las secuencias de los *primers* y su localización cromosómica se consignan en la Tabla 3.

Para la amplificación por PCR de los microsatélites individuales se tomaron 50 ng de DNA, en un volumen total de 25 μ l con 0.25 U de Taq polimerasa en una reacción buffer con 50 mM de KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 1.0–2.0 mM MgCl₂; 1% Triton-X-100; 200 mM de dATP, dGTP, dTTP y dCTP y 0.5 μ l de *primers* a 0.3 mM (Tabla 3). El perfil térmico de PCR fue: desnaturalización inicial 4 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 93°C, 30 segundos a 54–65°C (Tabla 4), 45 segundos a 72°C y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los fragmentos amplificados fueron mezclados con 10 μ l de solución de formamida y después del tratamiento por calor a 93°C, una alícuota de 3 μ l de la mezcla fue cargada en un gel denaturante de poliacrilamida al 6%, junto con un marcador de 10 pares de bases y luego teñido con nitrato de plata.

Tabla 3. Loci microsatélites, localización cromosómica y secuencias de *primers* utilizados.

No	Locus	Cromosoma	Secuencia del Primer (5' – 3')	Referencia
1	ETH225 (D9S1)	9	GATCACCTTGCCACTATTTTCCT ACATGACAGCCAGCTGCTACT	Steffen <i>et al.</i> , (1993)
2	ETH152 (D5S1)	5	TACTCGTAGGGCAGGCTGCCTG GAGACCTCAGGGTTGGTGATCAG	Steffen <i>et al.</i> , (1993)
3	ILSTS005 (D10S25)	10	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGTAAAGC	Brezinsky <i>et al.</i> , (1993)
4	HEL5 (D21S15)	21	GCAGGATCACTTGTAGGGA AGACGTTAGTGACATTAAC	Kaukinen & Varvio, (1993)
5	INRA035 (D16S11)	16	ATCCTTTGCAGCCTCCACATTG TTGTGCTTTATGACACTATCCG	Vaiman <i>et al.</i> , (1994)
6	INRA063 (D18S5)	18	ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC AAACCACAGAAATGCTTGAAG	Vaiman <i>et al.</i> , (1994)
7	MM8 (D2S29)	2	CCCAAGGACAGAAAAGACT CTCAAGATAAGACCACACC	Mommens <i>et al.</i> , (1994)
8	MM12 (D9S20)	9	CAAGACAGGTGTTTCAATCT ATCGACTCTGGGGATGATGT	Mommens <i>et al.</i> , (1994)
9	HAUT27 (D26S21)	26	TTTTATGTTTCATTTTTTACTGG AACTGCTGAAATCTCCATCTTA	Thieven <i>et al.</i> (1997).
10	INRA023 (D3S10)	3	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC TAACTACAGGGTGTAGATGAACTCA	Vaiman <i>et al.</i> , (1994)
11	BM1818 (D23S21)	23	AGCTGGGAATATAACCAAAGG AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	Bishop <i>et al.</i> , (1994)
12	BM1824 (D1S34)	1	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC CATTCTCCAAGTCTTCCTTG	Bishop <i>et al.</i> , (1994)
13	HEL13 (D11S15)	11	TAAGGACTTGAGATAAGGAG CCATCTACCTCCATCTTAAC	Kaukinen & Varvio, (1993)
14	ILSTS006 (D7S8)	7	TGTCTGTATTTCTGCTGTGG ACACGGAAGCGATCTAAACG	Brezinsky <i>et al.</i> (1993)
15	INRA005	12	CAATCTGCATGAAGTATAAATAT CTTCAGGCATACCCTACACC	Vaiman <i>et al.</i> , (1992)

Fuente: <http://dad.fao.org/en/refer/library/guidelin/marker.pdf>

Tabla 4. Condiciones de amplificación de los 15 microsatélites analizados.

No	Locus	MgCl ₂	Alineamiento (°C)
1	ETH225	1.5	57
2	ETH152	1.0	62
3	ILSTS005	1.7	58
4	HEL5	1.5	56
5	INRA035	1.0	56
6	INRA063	1.5	58
7	MM8	1.3	58
8	MM12	1.3	58
9	HAUT27	1.5	55
10	INRA023	1.5	54
11	BM1818	1.5	58
12	BM1824	1.5	58
13	HEL13	1.5	54
14	ILSTS006	1.0	58
15	INRA005	1.0	58

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis de la variabilidad genética se realizaron a partir de las frecuencias genotípicas mediante el programa TFPGA® (Miller, 1997). El contenido de loci polimórfico (PIC) y la riqueza alélica fueron estimados mediante el programa FSTAT (Goudet, 2002). Los valores de heterocigosidades observada, esperada y F_{IS} se obtuvieron mediante el software ARLEQUIN ver 3.11 (Excoffier, 2007). La prueba de desviación del equilibrio de Hardy-Weimberg (EHW) de las frecuencias genotípicas fue llevada a cabo utilizando el procedimiento de Guo y Thompson (1992) mediante el software ARLEQUIN ver 3.11 (Excoffier, 2007). La estructura de la población fue analizada a través del estudio del estadístico F_{ST} utilizando el método de Weir and Cockerham (1984) y su significancia mediante la obtención de intervalos de confianza al 95% mediante la metodología *Jackknife* (Efron, 1982) con 1000 replicaciones con el programa TFPGA® (Miller, 1997). El R_{ST} estimador

de la diferenciación poblacional que tiene en cuenta la varianza de los tamaños alélicos, fue calculado con el programa FSTAT (Goudet, 2002). Para el estudio jerárquico de la población (intraracial) se realizó análisis de varianza molecular (AMOVA) incorporado en el programa ARLEQUIN ver 3.11 (Excoffier, 2007). Las distancias y relaciones filogenéticas entre poblaciones se obtuvieron a partir de la distancia insesgada de Nei, (1978) mediante TFPGA® (Miller, 1997) y el F_{ST} por pares de poblaciones con el ARLEQUIN ver 3.11 (Excoffier, 2007). Empleando la distancia insesgada de Nei, (1978) se construyó un dendrograma con el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean).

4. RESULTADOS

4.1 MARCADORES MICROSATÉLITES

Se analizaron 249 animales, de los cuales 186 fueron de la raza Hartón del Valle (HV), y como grupos control 13 animales Holstein (H) y 18 Brahman (B). Además, se incluyó un grupo de 32 animales F₁ cruzados con HV (HVC).

Todos los microsatélites amplificaron y fueron polimórficos. Cuando la muestra de un individuo en un sistema fue amplificada más de dos veces sin obtener bandas, se calificó como alelo nulo, siempre y cuando dicha muestra previamente había amplificado con otros microsatélites. Con excepción de BM181, todos los sistemas presentaron alelos nulos. En el Anexo 1 se presentan las frecuencias génicas para los cuatro grupos genéticos.

El número total de alelos, en todos los loci analizados, fue 144, 142 se encontraron en HV, 106 en B, 86 en H y 121 en HVC (Tabla 5). El número promedio de alelos por locus microsatélite en la población total, fue de 9.6 con un rango de valores desde 7 para INRA5 e INRA 35 hasta 12 en los loci INRA23, ETH 152 y MM12.

La población HV presentó un número promedio de alelos de 9.46, mayor que el observado en los grupos HVC (8.06), B (7.13) y H (5.73). El rango del número de alelos para HV osciló desde 7 (INRA5, INRA23, ILSTS005) hasta 12 (INRA23, ETH152 y MM12); la raza B mostró un rango desde 4 (INRA063) hasta 9 alelos (HEL5, ETH152 y HEL13) y la raza H desde 3 (ILSTS005) hasta 9 (HEL5).

Tabla 5. Estadística descriptiva de 15 loci microsatélites para los grupos HV, B, H, HVC y Población Total (PT): Número de alelos (NA), Riqueza alélica (RA), basada en una muestra de 12 individuos tomados al azar estimado con el software FSTAT 2.9.3.2 (2002), Contenido de información polimórfica (PIC), Número promedio de alelos (NPA), Número de muestras (N).

Locus	HV		B		H		HVC		PT		
	NA	RA	PIC								
BM1818	9	5.9	8	7.2	5	4.9	8	4.8	9	5.9	0.73
BM1824	8	5.3	5	4.5	5	4.9	7	5.4	9	5.2	0.71
INRA063	9	7.0	4	3.9	5	4.9	7	3.8	9	7.0	0.79
ILSTS006	10	7.1	8	7.5	5	5.0	7	5.4	10	6.9	0.81
INRA 5	7	5.1	5	5.0	4	3.9	5	4.8	7	5.1	0.67
INRA 23	12	8.8	8	7.5	9	8.8	9	7.5	12	8.9	0.85
HAUTH27	9	6.9	8	7.2	7	7.0	8	6.8	9	7.1	0.81
HEL 5	10	8.4	9	8.3	9	8.9	10	8.1	10	8.7	0.87
ETH152	12	8.3	9	7.4	6	5.9	11	7.1	12	8.3	0.85
INRA35	7	4.7	7	6.7	2	2.0	6	4.1	7	5.0	0.58
HEL13	10	7.0	9	8.5	6	5.8	8	5.7	10	7.3	0.79
ILSTS005	7	5.3	5	4.5	3	3.0	7	3.5	8	5.4	0.66
ETH225	11	7.6	8	7.4	8	7.8	9	6.0	11	7.7	0.83
MM12	12	8.4	8	7.2	5	4.9	10	5.9	12	8.5	0.82
MM8	9	7.4	6	5.3	7	6.8	9	8.2	9	7.4	0.78
Total	142		107		86		121		144		0.79
NPA	9.46	6.9	7.13	6.5	5.73	5.6	8.06	5.8	9.60	7.0	
Desviación	1.7	1.3	1.6	1.5	2.0	2.0	1.6	1.5	1.6	1.4	
N	186	12	18	12	13	12	32	12	249	12	

La riqueza alélica (RA) fue estimada con una muestra uniforme de 12 individuos tomados al azar de cada población. Los valores obtenidos fueron: HV (6.9), B (6.5), HVC (5.8) y H (5.6) y al igual que para el NPA, el HV mostró ser el grupo mas diverso. El Contenido de información polimórfica (PIC) varió entre 0.58 para INRA35 y 0.85 para INRA23, con un promedio de 0.79. Los microsatélites con PIC mas altos, también presentaron un mayor número de alelos.

En la raza HV prevalecieron los alelos: BM1818*264, BM1824*186, INRA63*180, ILSTS006*290, INRA5*140, INRA23*220, HAUT27*152, HEL5*152, ETH152*202, INRA 35*112, HEL13*196, ILSTS005*184, ETH225*152, MM12*132 y MM8*140. Se observó que el 40% de los alelos presentaron frecuencias menores del 5%, los

cuales se consideran raros. En el HV se hallaron nueve alelos privados (BM1818*278, BM1824*192, INRA063*192, ILSTS006*304, ILSTS006*nulo, INRA5*148, INRA23*198, HAUTH27*142, ETH225*170). En las razas B y H no se presentaron alelos privados. El alelo BM1824*174 se encontró en un solo individuo F_1 (HV x Jersey) y el alelo ILSTS005*194 en un individuo F_1 (HV x Gyr). El alelo INRA35*112 y INRA5*140 predominaron en las tres razas puras (HV, H y B). En el locus HEL13 se encontró alta frecuencia del alelo 196 en HV y H, sin embargo, en B, el alelo 184 fue el más frecuente.

4.2 DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS RAZAS HARTÓN DEL VALLE, BRAHMAN Y HOLSTEIN

En general, para cada locus y grupo genético, la heterocigosidad esperada fue mayor que la heterocigosidad observada (Tabla 6). El locus BM1818 tuvo exceso de heterocigotos en todos los grupos genéticos, pero de acuerdo con la prueba de Hardy-Weimberg, únicamente fue altamente significativo en H y HVC. Hubo exceso de heterocigotos en BM1824 para la raza B y en los sistemas ILSTS006 y Hauth27 para HVC. Los demás loci mostraron una deficiencia de heterocigotos significativa. En HV y HVC la prueba de Hardy-Weimberg detectó desviaciones significativas entre las heterocigosidades observadas y esperadas para todos los loci. El coeficiente medio de consanguinidad por locus, mostró que las tres razas y el cruce presentan una reducción significativa de la heterocigosidad ($P < 0.001$) debido a endogamia intrapoblacional (F_{IS}). La mayor estimación de endogamia fue observada en la raza Brahman (0.22), mientras que HV y H tuvieron valores similares (0.16 y 0.17, respectivamente). Para el análisis por sistema, las nueve poblaciones muestreadas en la raza HV se unieron como si fueran una unidad. Por lo tanto, estas desviaciones pueden explicarse principalmente por efecto *Wahlund*, indicando con ello subdivisión poblacional.

Tabla 6. Estadística descriptiva de 15 loci microsatélites en los cuatro grupos genéticos estudiados: heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), Índice de fijación de Wright (F_{IS}) y Significancia de las desviaciones del equilibrio Hardy-Weimberg. *P (0.01< α < 0.05); **P (α <0.01)

	HV (n=186)			Brahman (n=18)			Holstein (n=13)			F ₁ con HV (n=32)		
	Ho	He	F _{IS}	Ho	He	F _{IS}	Ho	He	F _{IS}	Ho	He	F _{IS}
BM1818	0.81	0.75	-0.07**	0.94	0.80	-0.18	0.85	0.75	-0.14	0.85	0.75	-0.12**
BM1824	0.70	0.75	0.06**	0.89	0.65	-0.36*	0.54	0.69	0.22	0.72	0.76	0.06**
INRA063	0.69	0.82	0.15**	0.28	0.68	0.59**	0.38	0.63	0.39	0.53	0.66	0.19**
ILSTS006	0.75	0.83	0.09**	0.61	0.84	0.27*	0.83	0.77	-0.08	0.87	0.78	-0.13**
INRA 5	0.68	0.71	0.04**	0.50	0.75	0.34**	0.54	0.54	0.01	0.55	0.72	0.24**
INRA 23	0.71	0.86	0.18**	0.61	0.83	0.26*	0.85	0.89	0.05	0.66	0.86	0.24**
HAUTH27	0.66	0.82	0.20**	0.72	0.83	0.13**	0.85	0.85	0.01	0.84	0.82	-0.03**
HEL 5	0.84	0.87	0.04**	0.39	0.87	0.55**	0.69	0.89	0.23	0.69	0.88	0.22**
ETH152	0.67	0.86	0.22**	0.50	0.65	0.23	0.46	0.82	0.44	0.75	0.84	0.11**
INRA35	0.43	0.61	0.30**	0.28	0.82	0.66**	0.61	0.49	-0.25*	0.41	0.58	0.3**
HEL13	0.63	0.81	0.22**	0.50	0.86	0.42**	0.54	0.74	0.27	0.72	0.74	0.03**
ILSTS005	0.44	0.71	0.38**	0.56	0.64	0.12	0.15	0.63	0.75**	0.25	0.67	0.63**
ETH225	0.75	0.84	0.12**	0.82	0.75	-0.09**	0.85	0.86	0.02	0.81	0.83	0.02**
MM12	0.65	0.85	0.24**	0.67	0.85	0.21	0.46	0.69	0.33	0.75	0.78	0.04**
MM8	0.55	0.80	0.32**	0.65	0.67	0.03	0.61	0.80	0.23	0.53	0.82	0.35**
Promedio	0.66	0.79	0.16**	0.59	0.76	0.22**	0.61	0.74	0.17**	0.66	0.77	0.14**
Desviación	0.11	0.07		0.19	0.08		0.20	0.12		0.17	0.08	

Se estimó la contribución de cada marcador microsatélite a la diferenciación interracial por el estadístico F_{ST} (Tabla 7) y la significancia mediante la construcción de intervalos de confianza al 95% de la metodología Jackknife (Efron, 1982). El 67% de los sistemas contribuyeron para la diferenciación racial, siendo los sistemas INRA063 y ETH152, los de mayor poder de discriminación. La diferenciación global de las razas fue estimada en $F_{ST}=0.029$ ($P<0.001$), la mayor parte de la cual, probablemente se deba a las diferencias existentes entre las dos especies (*Bos taurus* y *Bos indicus*). Los valores estimados de diferenciación racial debido a deriva genética mediante el modelo “*Step-wise mutation*” (R_{ST}) fueron en general superiores que los estimativos de F_{ST} (Tabla 7). El valor medio encontrado para R_{ST} fue ligeramente superior al hallado mediante F_{ST} , lo cual sugiere que las diferencias entre razas están afectadas por las diferencias en las frecuencias alélicas y el tamaño de los alelos.

La correlación hallada entre el tamaño de muestra y el número promedio de alelos fue alta ($r=0.90$, $P<0.001$). El HV presentó un número promedio de alelos (9.46) mayor que HVC (8.06), B (7.13) y H (5.73), posiblemente, debido al mayor tamaño de muestra. Sin embargo, la estimación de riqueza alélica con una muestra mínima de 12 individuos (Tabla 5), mostró al HV con mayor promedio (6.87) y al H con el menor (5.80). La heterocigosidad esperada promedio para HV, B, H y HVC fue de 0.79 ± 0.07 , 0.76 ± 0.08 , 0.73 ± 0.12 y 0.76 ± 0.12 , respectivamente. El déficit global de heterocigotos (F_{IT}) en la muestra total fue de 0.186 ($p<0.001$).

Tabla 7. Diferenciación racial para cada locus microsatélite, estimado mediante F_{ST} con el software TFPGA y R_{ST} , con FSTAT. Intervalo de confianza al 95% (IC).

Locus	F_{ST}	R_{ST}
BM1818	0.026	0.012
BM1824	0.034	0.028
INRA063	0.086	0.224
ILSTS006	0.017 ^{ns}	-0.013
INRA 5	0.011 ^{ns}	0.077
INRA 23	0.015 ^{ns}	0.010
HAUTH27	0.010 ^{ns}	0.022
HEL 5	0.022	0.022
ETH152	0.049	0.059
INRA35	0.028	0.085
HEL13	0.028	0.210
ILSTS005	0.022	-0.015
ETH225	0.035	0.069
MM12	0.041	0.001
MM8	0.005 ^{ns}	-0.020
Promedio	0.029**	0.048
F_{IT}	0.186**	
F_{IS}	0.161**	

F_{ST} : IC (95%): 0.0205-.00403; ** ($P < 0.001$)

4.3 RELACIONES ENTRE LAS RAZAS HARTÓN DEL VALLE, BRAHMAN Y HOLSTEIN

Para conocer la magnitud de la variación genética debida a diferencias entre las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*, entre los grupos raciales o dentro de estos, se analizó la estructura poblacional con diferentes niveles jerárquicos (Tabla 8). Para las comparaciones entre especies, se excluyó el grupo HVC por estar conformado por híbridos intra e interespecíficos. Tal como se esperaba, la mayor proporción de la variación se encontró en las comparaciones entre ambas subespecies, con las mayores diferencias entre H y B (9.3%) y entre HV y B (6.84%). Entre individuos *Bos taurus* (HV y H) el porcentaje de variación fue bajo, al igual que cuando los cuatro grupos fueron analizados conjuntamente (0.029%).

Tabla 8. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con diferentes niveles de estructura jerárquica entre *Bos taurus* (HV, H), *Bos indicus* (B) y el grupo HVC: Grados de libertad (GI).

Estructura	Fuente de Variación	GI	Variación (%)	F _{ST}
Entre subespecies: (H y B)	Entre subespecies	1	9.31	0.093**
	Entre individuos dentro de subespecies	29	18.36	
	Dentro de individuos	31	72.33	
	Total	61		
Entre subespecies: (HV y B)	Entre subespecies	1	6.84	0.068**
	Entre individuos dentro de subespecies	202	15.38	
	Dentro de individuos	204	77.78	
	Total	407		
Entre grupos genéticos (HV, B, H y HVC)	Entre poblaciones	3	2.98	0.029**
	Entre individuos dentro de poblaciones	245	15.64	
	Dentro de individuos	249	81.38	
	Total	497		
Dentro de <i>Bos taurus</i> (HV y H)	Entre poblaciones	1	1.36	0.013**
	Entre individuos dentro de poblaciones	197	15.81	
	Dentro de individuos	199	82.4	
	Total	397		
Dentro HV (HV, HVC)	Entre poblaciones	1	0.63	0.006ns
	Entre individuos dentro de poblaciones	216	15.46	
	Dentro de individuos	218	83.9	
	Total	435		

** (P<0.001), ns: no significativo

Las distancias genéticas confirman la separación entre subespecies *Bos indicus* y *Bos taurus*, (Tabla 9) puesto que presentaron distancias superiores a 0.32. Las distancias dentro de *Bos taurus* fueron menores que 0.05, siendo los grupos más próximos H y HVC. Con excepción de H y HVC, todas las estimaciones de diferenciación entre pares de poblaciones (F_{ST}) fueron significativas y mostraron la misma tendencia que las distancias genéticas.

El dendrograma construido mediante el método UPGMA, diferenció claramente las dos subespecies (Figura 1). Aunque las distancias entre taurinos fueron muy pequeñas, se distinguieron dos grupos: el primer grupo que incluye al H y HVC y el segundo con los individuos de la raza HV. La alta similaridad de H con HVC puede deberse a que el 65% de los animales HVC, eran F₁ (H x HV).

Tabla 9. Estimaciones de diferenciación genética y distancia entre las razas Brahman, HV, Holstein y HVC. La distancia insesgada de Nei (1978) se indica por encima de la diagonal y las estimaciones de F_{ST} por pares de poblaciones, debajo de la diagonal.

Población	B	HV	H	HVC
B		0.320	0.407	0.403
HV	0.070*		0.057	0.027
H	0.099*	0.016*		0.013
HVC	0.092*	0.007*	0.004	

*P (0.01 < α < 0.05)

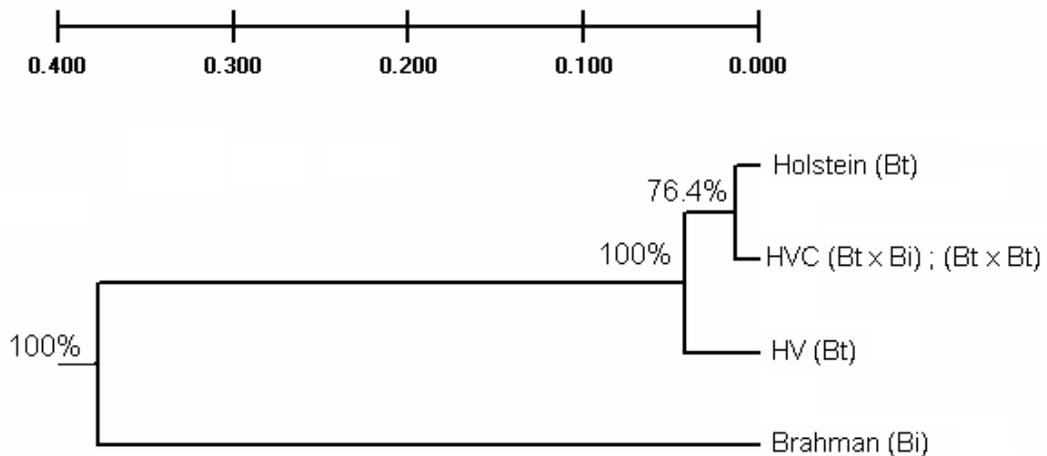


Figura 1. Relación Genética entre las razas Brahman, HV, Holstein y HV cruzado mediante el método de UPGMA. Los números entre los nodos representan los valores obtenidos de “bootstrap” con 1000 permutaciones. *Bos taurus* (Bt); *Bos indicus* (Bi)

4.4 VARIABILIDAD GENÉTICA DENTRO DE LA RAZA HARTÓN DEL VALLE

El número promedio de alelos por locus fue de 9.46 ± 1.7 , con variaciones desde 7 alelos (INRA5, INRA35, ILSTS005) hasta 12 alelos (INRA23, ETH152 y MM12). El número de alelos promedio por población fue de 6.6 (Tabla 10) y las poblaciones

con mayor número de alelos fueron PR (7.46), LO y EC (7.2), mientras CR presentó el menor número de alelos (5.3). En los 15 *loci* estudiados el 41.5% de los alelos, presentaron frecuencias menores al 5% (alelos raros). Los valores de riqueza alélica (RA) sobre un promedio mínimo de nueve individuos, mantuvieron la misma tendencia que el NPA. Se encontraron nueve alelos privados, cuatro de ellos en P (BM1818*278, ILSTS006*304, INRA5*148 e INRA23*198), dos en ZH (INRA063*192, ILSTS006*nulo), dos en LO (BM1824*192 y ETH225*170) y uno en EC (HAUTH27*142). En todas las poblaciones los valores de heterocigosidad esperada fueron mayores que los de la heterocigosidad observada. El rango de heterocigosidad esperada (H_e) entre poblaciones fue de 0.73 y 0.77 con un valor promedio de 0.75 ± 0.01 . Este valor fue significativamente menor ($P < 0.05$) que el estimado para HV cuando se analizó en conjunto con H, B y HVC ($H_e = 0.79$), indicando que la mayor proporción de genotipos heterocigotos se redujo al tener en cuenta la estructura conformada por las diferentes fincas (Efecto *Walhund*). Se encontró la mayor diversidad genética (H_e) en las poblaciones LO (0.77), EC y UNAL (0.76) y las menores en SR (0.73), CR y ZH (0.74).

Tabla 10 Estadística descriptiva para 15 loci microsatélites en nueve poblaciones de HV: Número de muestras (N), Número promedio de alelos (NPA), Riqueza alélica (RA), Heterocigosidad observada (H_o), Heterocigosidad esperada (H_e) y F_{IS} .

Población	N	NPA	RA	H_o	H_e	F_{IS}
EC	28	7.40 ± 2.4	5.91	0.66 ± 0.1	0.76 ± 0.1	0.12**
CR	11	5.33 ± 1.0	5.11	0.64 ± 0.2	0.74 ± 0.0	0.14**
UNAL	21	7.20 ± 2.2	5.90	0.64 ± 0.1	0.76 ± 0.1	0.16**
GC	11	5.86 ± 1.5	5.57	0.64 ± 0.1	0.75 ± 0.1	0.13**
JA	10	5.66 ± 1.1	5.52	0.66 ± 0.2	0.75 ± 0.0	0.10**
LO	35	7.40 ± 1.8	5.78	0.68 ± 0.1	0.77 ± 0.1	0.11**
PR	28	7.46 ± 1.6	5.84	0.66 ± 0.1	0.75 ± 0.0	0.12**
SR	20	6.40 ± 1.6	5.32	0.70 ± 0.1	0.73 ± 0.1	0.03
ZH	22	6.66 ± 1.4	5.37	0.60 ± 0.2	0.74 ± 0.1	0.18**
Promedio		6.60 ± 1.6	5.59	0.66 ± 0.1	0.75 ± 0.1	0.12 ± 0.02
Total	186	9.46 ± 1.7				

** ($P < 0.001$)

El valor del coeficiente de endogamia (F_{IS}) para la raza HV fue de 0.12 ± 0.01 (Tabla 10). Con excepción de SR (0.029), todas las fincas presentaron niveles significativos de endogamia intrapoblacional. Los F_{IS} más altos se encontraron en ZH (0.18) y UNAL (0.159). El valor promedio del F_{IS} se redujo de 0.16 (Tabla 6) a 0.12 (Tabla 10), cuando se consideró la estructura de fincas en la población HV.

El análisis de equilibrio Hardy-Weimberg para las nueve fincas de HV (Tabla 11) mostró que 61 de las 135 combinaciones marcador/población fueron significativas. En todas las fincas, al menos cuatro marcadores se desviaron significativamente de los valores esperados en el equilibrio. Las poblaciones PR y ZH exhibieron el mayor número de loci en desequilibrio y CR y J el menor número.

Tabla 11. Desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weimberg de 15 loci en nueve poblaciones de Hartón del Valle, estimadas con la metodología de Guo & Thompson (1992)

Locus	EC	CR	UNAL	GC	JA	LO	PR	SR	ZH	Total
BM1818										0
BM1824	**	*					*	*		4
INRA063	**		*				**	*	*	5
ILSTS006					*		*		**	3
INRA 5				**						1
INRA 23	**		**				*	*	**	5
HAUTH27						**	*	*	**	4
HEL 5				*					*	2
ETH152	**		*	*			*	*	**	6
INRA35	*	**			*	**	*	**		6
HEL13	**	*	**			*			**	5
ILSTS005	*	**			**	**	*		**	6
ETH225				*		*		**	**	4
MM12	**		**	**		**	**	**		6
MM8			**	**	**	**				4
Total	8	4	6	6	4	7	9	8	9	61

** (P<0.01) * (P<0.05)

De acuerdo con el AMOVA, solamente el 4.9% de la variación total encontrada se explica por las diferencias entre fincas, el resto se debe a las diferencias entre individuos dentro de las fincas. El $F_{ST}=0.049$ ($P<0.0001$) fue significativo indicando con ello, estructura poblacional. Mediante la prueba exacta de diferenciación de poblaciones (Tabla 12), todas las fincas de HV, resultaron ser entidades diferentes ($P<0.01$); esto puede ser ocasionado por las diferencias en la orientación de los sistemas de producción y manejo de los apareamientos en cada una de las fincas.

Tabla 12 Diferenciación genética y distancia entre nueve poblaciones de Hartón del Valle. Las estimaciones de F_{ST} por pares de poblaciones se encuentran por encima de la diagonal y la distancia insesgada de Nei (1978) por debajo. Todas las estimaciones de F_{ST} fueron significativas $P(\alpha) \leq 0.01$.

Poblaciones	EC	CR	UNAL	ZH	GC	JA	LO	PR	SR
EC	**	0.045	0.041	0.054	0.042	0.051	0.036	0.038	0.058
CR	0.155	**	0.063	0.059	0.072	0.056	0.050	0.045	0.091
UNAL	0.148	0.232	**	0.054	0.046	0.068	0.033	0.053	0.062
ZH	0.197	0.200	0.197	**	0.084	0.067	0.044	0.052	0.079
GC	0.150	0.254	0.168	0.325	**	0.075	0.030	0.049	0.084
JA	0.189	0.196	0.263	0.243	0.278	**	0.053	0.058	0.090
LO	0.133	0.184	0.125	0.161	0.112	0.206	**	0.040	0.050
PR	0.135	0.154	0.196	0.182	0.176	0.214	0.148	**	0.063
SR	0.202	0.334	0.219	0.281	0.307	0.332	0.179	0.225	**

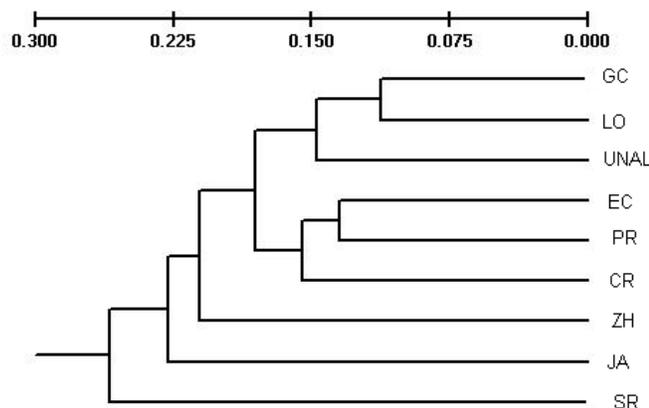


Figura 2. Relación genética entre nueve poblaciones de Hartón del Valle estimada mediante el método de UPGMA basado en las distancias de Nei (1978).

5. DISCUSION

El objetivo principal de este estudio fue la cuantificación de diversidad genética de la raza HV y la fortaleza del trabajo se sustenta en el número de loci utilizados (15) y el alto número de animales muestreados, que incluyó 186 individuos provenientes de nueve poblaciones del Valle del Cauca, lo cual garantiza estimaciones de los parámetros poblacionales más precisas. El HV fue comparado con Holstein y Brahman, porque estas dos razas han tenido influencia en la población colombiana a partir del siglo XIX (Pinzón, 1991).

5.1 DIVERSIDAD ENTRE RAZAS

La heterocigosidad esperada y la riqueza alélica revelan altos niveles de variabilidad en el HV ($He=0.75$; $RA=5.59$). Los altos niveles de variabilidad observados en el HV pueden ser explicados por las siguientes razones: en los orígenes de la raza en el siglo XV participaron varias introducciones de ganado provenientes de La Española (Pinzón, 1991); por otra parte, a lo largo de la historia de la raza se ha ejercido baja presión de selección (Valderrama, datos sin publicar) y además se ha reportado la introducción de genes de razas foráneas (Pinzón, 1991).

En otras razas criollas de América del Sur, también se ha detectado altos niveles de variabilidad, atribuida a varias causas: no han sufrido procesos de selección, tales como aislamiento genético y manipulación biológica (Barrera *et al.*, 2006.), baja presión de selección y patrones de manejo tradicionales (Egito *et al.*, 2007), introgresión con otras razas comerciales tales como Cebú (Giovambattista *et al.*, 2001; Lirón *et al.*, 2006); bajos niveles de selección artificial, a factores demográficos porque el germoplasma criollo incluye genes europeos y africanos y por último, a la multiplicidad de orígenes geográficos (Lirón *et al.*, 2006).

El HV con un número promedio de alelos (NPA) de 9.46 fue mayor que B (7.13) y H (5.73). Esta tendencia se mantuvo cuando se unificó el tamaño de muestra a un número mínimo de 12 individuos por raza, escogidos aleatoriamente. El valor encontrado fue superior a lo reportado para esta raza (NPA=5) por Carvajal-Carmona *et al*, (2001) con cinco microsatélites y por Barrera *et al*, (2006) quienes estimaron un NPA de 5.6 con 12 microsatélites. Esta diferencia puede deberse principalmente al tamaño de la muestra y al número de microsatélites usados. En este trabajo se utilizaron 186 individuos y los autores antes mencionados utilizaron solamente 8 y 10 muestras, respectivamente. El amplio tamaño de muestra permitió la observación de un 40% de alelos raros en el HV.

La heterocigosidad esperada promedio, estimada para HV con las nueve poblaciones como un conjunto, fue de 0.79 ± 0.07 , 0.76 ± 0.08 para B, 0.73 ± 0.12 para H y 0.76 ± 0.12 para HVC. De acuerdo con las desviaciones estándar obtenidas, la diversidad genética fue similar entre los cuatro grupos. Para la raza Holstein, los valores de heterocigosidad encontrados en este estudio fueron superiores a los reportados para poblaciones de Canadá y Europa por Hanslik *et al*. (2000), similares a los encontrados en Brasil por Egito *et al*. (2007), e inferiores a los de Holstein argentino (Lirón *et al*. 2006). En ganado Brahman, se han estimado menores valores en Bolivia, $H_e=0.66$ (Lirón, *et al.*, 2006) y en Colombia $H_o=0.73$ (Bedoya *et al.*, 2001), $H_e=0.64$ (Barrera *et al.*, 2006).

La heterocigosidad observada para el HV muestra altos niveles de diversidad, que también había sido reportada por Bedoya *et al.*, (2001), Moreno *et al*, (2001) y Barrera *et al*, (2006) quienes estudiaron la diversidad y las relaciones filogenéticas entre razas criollas colombianas. En los tres trabajos, el HV tuvo heterocigosidades superiores al promedio (Tabla 1). Por otra parte, Piedrahita *et al*. (2008), con microsatélites RAMs (*Randon Amplified microsatellites*) hallaron un valor de H_e de 0.26, significativamente menor que el encontrado en este estudio. Igualmente, la diversidad para la raza HV fue muy superior a lo reportado para

razas británicas (MacHugh *et al*, 1997), francesas (Moazami-Goudarzi *et al*, 1997; Maudet *et al*, 2002), del norte de Europa (Kantanen *et al*, 2000), cebuinas africanas y asiáticas (Mac Hugh *et al*, 1998), Indias (Mukesh *et al*, 2004), razas bovinas del noreste asiático (Kim *et al*, 2002), españolas (Arranz *et al.*, 1996; Martín-Burriel *et al*, 1999, Cañón *et al.* 2001, Beja-Pereira *et al*, 2003) y portuguesas (Mateus *et al*, 2004; Cañón, *et al* 2001). En conclusión, los niveles de diversidad genética hallados en la raza HV son altos, indicando que a pesar de haberse formado con un pequeño grupo de fundadores y soportado la reducción drástica de su población a partir del siglo XIX, ha conservado una cantidad sustancial de variabilidad genética.

Los altos niveles de diversidad hallados en el HV son consistentes con los de otras razas de América Latina (Tabla 1) tales como el Criollo argentino (Martínez *et al*, 2005; Lirón *et al*, 2006), el Criollo brasileño (Steigleder *et al*, 2004, Egito *et al*, 2007), el Criollo boliviano (Lirón *et al*, 2006) y el Criollo uruguayo (Amstrong *et al*, 2006). Los niveles altos de diversidad observados en bovinos criollos han sido atribuidos a la historia de la introducción de bovinos en América, la poca presión de selección ejercida a lo largo de los años y la mezcla con otras razas (Lirón *et al*, 2006; Egito *et al*, 2007). Esto permitiría sugerir que el HV, al igual que las razas criollas de América del Sur, constituye un importante y diverso reservorio de diversidad genética para su mejoramiento y conservación.

Es posible que la alta diversidad del HV se haya originado desde la época de la conquista, con una población fundadora formada con animales de diversos orígenes. Se reporta que los vacunos llegaron al Valle del Cauca, por los cuatro puntos cardinales. De acuerdo con Pinzón (1991), los que entraron por el norte y el oriente eran derivados del tronco ancestral desarrollado en la costa del Caribe, los del sur provenían del Ecuador y en 1540 llegaron a Cali ejemplares traídos por el camino de Dagua (Occidente) procedentes de La Española y de Nicaragua, por la vía Panamá-Buenaventura.

Aunque no hay datos de inventarios en el pasado, Pinzón, (1991) resalta que en 1745, en la jurisdicción de Buga, existían más de 64.000 cabezas de HV y una hacienda llegó a tener 25.000 individuos. La disminución del inventario de la raza se ha atribuido a la absorción con razas foráneas y a la sustitución de la ganadería por cultivos de caña de azúcar.

Se estimó el cuello de botella con el programa Bottleneck (Cornuet & Luikart, 1997) asumiendo equilibrio mutación-deriva mutacional y bajo los modelos Infinite Allele Model (IAM) y Step-wise Mutation Model (SMM); en ambos casos resultó significativo ($P < 0.05$), indicando que la reducción del tamaño poblacional ha afectado la distribución de la heterocigosidad esperada, originando un cuello de botella reciente. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que a pesar de la reducción drástica en el tamaño poblacional, la diversidad genética se ha mantenido en altos niveles. Por otra parte, la alta diversidad del HV también puede haberse originado mediante el mestizaje con otras razas. Según Pinzón (1991), a finales de siglo XIX se importaron de Inglaterra reproductores de las razas Devon y Durhan, que fueron cruzados con el HV para mejorar la producción de leche y algunos caracteres externos. En 1910, se importó al Valle del Cauca el ganado Cebú, con el fin de cruzarlo con el HV para obtener ejemplares vigorosos para el transporte de la caña de azúcar. A éste hecho se le atribuye hoy en día que la mayoría del ganado colombiano sea predominantemente Cebú. Hacia 1930, el Valle del Cauca fue el segundo productor de leche en Colombia, después de Cundinamarca, lo cual motivó a los ganaderos a importar razas lecheras reconocidas en Europa, como Holstein, Jersey, Ayrshire y Pardo Suizo. En años recientes, se han utilizado cruzamientos con razas europeas y americanas, como el Angler Alemán y Simmental (Valderrama, datos sin publicar). En el censo más reciente de ganado Criollo Colombiano realizado en 1999, la población total de HV fue de 9360 cabezas de las cuales el 45% fueron animales cruzados con diversas razas (Martínez, 1999).

Las tecnologías reproductivas como inseminación artificial y la transferencia embrionaria incrementan la presión de selección y reducen la diversidad genética, mediante el uso intensivo de unos pocos animales superiores. El impacto de la inseminación artificial en la diversidad genética del HV se puede considerar muy bajo, puesto que, de acuerdo con Martínez (1999), se ha utilizado únicamente en el 3.7% de los hatos.

En general, para cada locus y grupo genético, la heterocigosidad esperada fue mayor que la heterocigosidad observada. El locus BM1818 mostró exceso de heterocigotos en todos los grupos genéticos, pero fue significativo ($P < 0.0001$) en HV y HVC. La prueba de Hardy-Weimberg detectó desviaciones entre las heterocigosidades observadas y esperadas para todos los loci en los grupos HV y HVC. Las desviaciones en el equilibrio pueden deberse a una variedad de factores que incluyen apareamiento preferencial, diferencias entre las frecuencias de los genes entre machos y hembras, a subdivisión poblacional, a selección y flujo genético, entre otros.

Para el análisis por sistema (Numeral 4.1), las nueve poblaciones muestreadas en la raza HV se unieron en una unidad. Por lo tanto, las desviaciones pueden explicarse principalmente por efecto *Wahlund*, indicando con ello subdivisión poblacional significativa. En el grupo HVC las desviaciones se originan en la ausencia de *panmixia*, debido a que los animales son F_1 . En la raza B, hubo desviaciones significativas en 10 loci, debidas probablemente al sistema de apareamiento, en cual un macho reproductor se aparea con 25-30 hembras. En la raza H, dos loci se desviaron significativamente del equilibrio, posiblemente por el sistema de manejo de la reproducción mediante inseminación artificial, en el cual la divergencia entre las frecuencias génicas entre sexos puede llegar a ser muy grande.

El déficit global de heterocigotos (F_{IT}) en la muestra total de 0.186 ($p < 0.001$) (Tabla 7) fue superior a las estimaciones observadas en otros estudios con razas locales de origen taurino o cebuino (Jordana *et al.*, 2003; Ibeagha–Awemu & Erhardt, 2005; Lirón *et al.*, 2006) y similar al encontrado por Egito *et al.* (2007) con razas criollas, europeas y cebuinas en Brasil. Esta reducción global de heterocigotos es debida en mayor proporción a endogamia dentro de las poblaciones ($F_{IS} = 0.16$) que a diferenciación racial ($F_{ST} = 0.02$) (Tabla 7).

En HV, valor promedio del F_{IS} se redujo de 0.16 a 0.12 (Tablas 7 y 10), cuando se consideró la estructura de fincas. Este valor fue similar al estimado para esta raza por Bedoya *et al.* (2001) y por Barrera *et al.* (2006).

Varios marcadores exhibieron un déficit significativo de heterocigotos debido a la endogamia dentro de poblaciones; la ocurrencia de alelos nulos pudo haber aumentado la deficiencia de heterocigotos.

El coeficiente medio de consanguinidad por locus, mostró que las tres razas presentaron una reducción significativa de la heterocigosidad debido a la endogamia intrapoblacional (F_{IS}). La mayor estimación de endogamia observada fue en la raza Brahman (0.22), mientras que HV y Holstein presentaron valores similares (0.16). Es conveniente anotar que para HV el F_{IS} se redujo a 0.12 cuando la población fue analizada con subdivisión en 9 poblaciones (Efecto *Wahlund*) (Tablas 7 y 10).

5.2 DISTANCIAS GENÉTICAS Y RELACIONES ENTRE RAZAS

El análisis de varianza molecular reveló que la mayor parte de la variación genética observada en las poblaciones analizadas, fue ocasionada por las diferencias existentes entre individuos dentro de las razas (97%) (Tabla 8). Este comportamiento ha sido advertido en numerosos estudios, donde más del 90% la

variación se ha encontrado dentro de las razas. Los valores máximos de diferenciación se observaron al comparar el *Bos indicus* con las dos razas *Bos taurus*, con las diferencias mas altas entre H y B (9.3%) y entre HV y B (6.84%). Entre los *Bos taurus* (HV y H) el porcentaje de variación fue bajo (1.3%) y la diferenciación global (F_{ST}) considerando los cuatro grupos genéticos fue estimada en 0.029 ($P < 0.001$) (Tabla 7).

Las distancias genéticas y la diferenciación entre pares de F_{ST} , mostraron la misma tendencia, con las mayores divergencias entre B (*Bos taurus*) con H y HV (*Bos indicus*). El dendrograma (Figura 1) confirma las anteriores observaciones puesto que separa las especies con un *bootstrap* del 100%. Aunque las distancias entre taurinos son muy pequeñas, se distinguen dos grupos distintos con *bootstrap* del 100%: el primero incluye Holstein y HVC (76%) y el segundo agrupa los individuos de la raza HV. La alta similaridad entre H y HVC puede deberse a que el 65% de los animales HVC eran F_1 (H x HV).

Varios estudios realizados con diferentes marcadores moleculares (ADN mitocondrial, isoenzimas y microsatélites) han demostrado que la principal subdivisión del ganado en *Bos taurus* (sin giba) y *Bos indicus* (con giba), corresponde a una profunda bifurcación ocurrida hace 200.000-1.000.000 años, antes de la domesticación del ganado (~ 12.000 años) (Manwell & Baker, 1980; Lotfus *et al*, 1994; Bradley *et al*, 1996; Machugh *et al*, 1997; Troy *et al*, 2001). En contraste, las razas modernas fueron formadas mas recientemente (~ 200 años).

5.3 DIVERSIDAD GENÉTICA DENTRO DE LA RAZA HARTÓN DEL VALLE

En el análisis intrapoblacional de la raza HV, considerando nueve poblaciones del Valle del Cauca se encontró altos niveles de diversidad genética promedio, evaluados por los estadísticos NPA, RA y H_e . El rango de heterocigosidad esperada (H_e) entre poblaciones fue de 0.73 ± 0.1 y 0.77 ± 0.1 con un valor promedio

de 0.75 ± 0.01 . Las poblaciones LO, EC y PR mostraron los mas altos índices de diversidad genética (H_e).

Para interpretar estos resultados hay que remontarse a la historia de las ganaderías. LO es la hacienda con la más antigua tradición de cría de ganado de la raza HV; se inició hace más de 60 años, con animales descendientes de antiguas ganaderías de Roldadillo (Valle del Cauca), formadas en 1890. A lo largo de los años, siempre ha utilizado toros puros HV de diferente procedencia, con excepción de un toro criollo de origen costarricense y un toro de raza Pardo Suizo introducido en 1956, cuyos descendientes murieron en épocas de sequía o por anaplasmosis (Valderrama, comunicación personal). Con base en lo anterior, la alta diversidad genética, se puede explicar porque en sus orígenes se incluyó una base genética amplia de ganados puros y se ha fomentado el uso de sementales procedentes de otras ganaderías.

EC es una de seis haciendas que conforman el conglomerado ganadero Atogan Ltda., dedicado a la producción de leche y sus derivados. Se inició en 1955, con 40 vacas y dos toros HV, dos toretes HV con mestizaje de razas europeas y 40 vacas mestizas (Pardo Suizo, Cebú y Jersey). Mediante la eliminación de los mestizos y la utilización de toros HV, se llegó a un ganado puro por absorción. En 1991 se introdujo ganado Angler Alemán, con el fin de mejorar la producción de leche y algunas características del tipo. Por otro lado, la técnica de inseminación artificial utilizada en esta población, ha podido favorecer el muestreo de un mayor número de sementales, que con monta natural. Por lo tanto, la alta diversidad de esta población se puede atribuir a una población fundadora multirracial, a eventos de cruzamiento y a la utilización amplia de toros.

En cuanto a UNAL se inicia con una vacada mestiza con Holstein a la cual se introducen a partir de 1968 animales de tres ganaderías diferentes, hoy desaparecidas (Hacienda La Burrera, El Llano, Fondo Ganadero del Valle). En 2004

recibió en comodato animales de la Secretaría de Agricultura y Fomento del Valle del Cauca, que habían permanecido en endogamia durante 20 años. Posteriormente, llegaron animales de otras cuatro ganaderías.

De acuerdo con lo anterior, la alta diversidad observada al interior de las poblaciones LO, EC, UNAL y PR, se originó en la amplia base genética utilizada en las poblaciones fundadoras, moderada presión de selección, selección natural en condiciones adversas, eventos de cruzamiento e intercambio de reproductores entre las ganaderías.

Las poblaciones con menor variabilidad fueron SR, CR y ZH. La hacienda SR se formó en 1985, a partir de 25 vacas y un toro provenientes de EC y GC; es probable que la menor variabilidad observada haya sido ocasionada por deriva genética; sin embargo el F_{IS} no fue significativo. CR y ZH son poblaciones con más de 50 años, en las cuales no ha habido introducción de toros de otras fincas, lo cual se ve reflejado en los altos F_{IS} de 0.14 y 0.18, respectivamente.

El valor promedio de endogamia encontrado para HV ($F_{IS}=0.12$), es similar al reportado ($F_{IS}=0.13$) por Bedoya *et al.* (2001) en siete razas criollas colombianas y cebú. Moreno *et al.* (2001), en las mismas razas, encontró un coeficiente de endogamia de 0.28, con un $F_{IS}=0.60$ para la raza HV, valor muy superior al estimado en este trabajo. Sin embargo, Barrera *et al.* (2006) halló un F_{IS} promedio para ganado criollo colombiano y Cebú de 0.095 y de 0.06 para HV.

Solamente el 4.9% de la variación encontrada puede ser explicada por las diferencias entre fincas, el resto se debe a las diferencias entre individuos dentro de las fincas. El F_{ST} de 0.049 fue significativo ($P>0.0001$) indicando con ello, estructura poblacional. Piedrahita *et al.* (2008) con marcadores RAMS (*Random Amplified Microsatellites*) en ganado HV, encontró una mayor diferenciación genética entre seis hatos estudiados ($F_{ST} = 0.39 \pm 0.03$).

Mediante la prueba exacta de diferenciación entre poblaciones (Tabla 11), todas las fincas de HV, resultaron ser entidades diferentes ($P < 0.001$), lo que confirma la existencia de estructura poblacional, lo cual puede atribuirse a las diferencias en la orientación de los sistemas de producción y manejo de los apareamientos en cada una de las fincas. GC y C están orientadas a la producción de leche mientras que LO, SR y J son de doble propósito, puesto que las vacas se ordeñan y los terneros se engordan para carne y CR, ZH y UNAL están orientadas a la producción de carne; estas diferencias en los sistemas de producción repercuten en la selección de los reproductores.

6. CONCLUSIONES

- En el Hartón del Valle existe una cantidad significativa de variación genética.
- La diversidad genética del Hartón del Valle es similar a la encontrada en razas criollas de América del Sur.
- Cuatro de las nueve poblaciones exhibieron una riqueza alélica notoriamente más alta que las demás, debido probablemente a selección natural en condiciones ambientales adversas, moderada presión de selección y cruzamiento con otras razas.
- Las nueve poblaciones de Hartón del Valle pueden ser consideradas entidades genéticas distintas.
- Se encontraron niveles significativos de endogamia intrapoblacional en la raza Hartón del Valle.

BIBLIOGRAFÍA

- ARMSTRONG E., POSTIGLIONI A., MARTÍNEZ A., RINCÓN G., VEGA-PLA JL. (2006) Microsatellite analysis of a sample of Uruguayan Creole bulls (*Bos taurus*). *Genetics and Molecular Biology*, 29, (2), 267-272
- ARRANZ, J.J.; BAYON, Y.; SAN PRIMITIVO, F. (1996). Genetic variation at five microsatellite loci in four breeds of cattle. *Journal of Agriculture Science* 127: 533-538.
- BARRERA, G .P., R. MARTINEZ, J. E. PEREZ, N. POLANCO y ARIZA F. (2006). Evaluación de la variabilidad genética en ganado Criollo Colombiano mediante 12 marcadores microsatélites. *AGRI*. 38: 35-45.
- BARENDSE, W.; ARMITAGE, S. M.; KOSSAREK, L. M.; SHALOM, A.; KIRKPATRICK, B. W.; RYAN, A. M.; CLAYTON, D.; LI, L.; NEIBERGS, H. L.; ZHANG, N. (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat. Genet.*, 6 (3):227-235.
- BAUMUNG R., SIMIANER H. & HOFFMANN I. (2004) Genetic diversity studies in farm animals – a survey. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 121: 361.
- BEDOYA, G., CARVAJAL, L.G. BERMUDEZ, N. R. MORENO F.L. (2001). Estructura Molecular y Poblacional del Ganado Criollo Colombiano (GCC). *Rev. Col. Cienc. Pec.* 14: 107-118.
- BEJA-PEREIRA A., ALEXANDRINO P.; BESSA I.; CARRETERO Y.; DUNNER S.; LALOE D.; MOAZAMI-GOUDARZI K.; SANCHEZ A. Y CAÑON J. (2003) Genetic Characterization of southwestern European Bovine Breeds: A Historical and Biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites. *Journal of Heredity* 94(3): 243-250.
- BISHOP, M. D.; KAPPES, S. M.; KEELE, J. W.; STONE, R. T.; SUNDEN, S. L.; HAWKINS, G. A.; TOLDO, S.; FRIES, R.; GROSZ, M. D.; YOO, J. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136 (2):619-639.
- BRADLEY DG, MACHUGH E, CUNNINGHAM P, LOFTUS RT. 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 93:5131–5135.
- BREZINSKY, L.S.; KEMP, J. AND TEALE, A.J. (1993). ILSTS006: a polymorphic bovine microsatellite. *Animal Genetics* 24: 73.

BRUFFORD, M. W., BRADLEY, D. G. LUIKART, G. (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat. Rev. Genet.* .4(11), 900-910.

CAÑÓN J.; ALEXANDRINE P.; BESSA I.; CARLEOS C., CARRETERO Y., DUNNER S., FERRAN N., GARCIA D., JORDANA J.; LALOE D., PEREIRA A., SANCHEZ A., MOAZAMI-GOUDARZI K. (2001) Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genetic Sel. Evol.* 33: 311-332.

CARVAJAL-CARMONA LG, BERMUDEZ N, OLIVERA-ANGEL M, ESTRADA L, OSSA J, BEDOYA G, RUIZ-LINARES A. 2003. Abundant mtDNA diversity and ancestral admixture in Colombian criollo cattle (*Bos taurus*). *Genetics* 165: 1457–1463.

CASELLAS J., JIMÉNEZ N., FINA M., TARRÉS J., SÁNCHEZ A., PIEDRAHITA J. (2004). Genetic diversity measures of the bovine Alberes breed using microsatellites: variability among herds and types of coat colour *J. Anim. Breed. Genet.* 121: 101–110.

CASKEY, T.A.; PIZZUTI, F. U.; FENWICK, R. G.; NELSON, D. L. (1992). Triplet repeat mutations in human disease. *Science* 256:784–789.

CIAMPOLINI, R.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; VAIMAN, D.; DILLMAN, C.; MAZZANTI, E.; FOULLEY, J. L.; LEVEZIEL, H. AND CIANCI, D. (1995). Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. *Journal of Animal Science* 73: 3259–3268.

CORNUET J.M. AND LUIKART G., (1997) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.

CORREIA DE ALMEIDA L., LEHMANN L., (2001) *Biología Molecular aplicada a Produção Animal*. EMBRAPA Informação Tecnológica Brasília, DF. 215p

CRAWFORD M, CUTHBERTSON R. (1996) Mutations in sheep microsatellites *Genome Research* 6: 876-879.

EFRON, B. (1982) *The Jackknife, the Bootstrap and other Resampling Plans*. Regional Conference Series in Applied Mathematics, Philadelphia.

EDWARDS, C.J.; DOLF, G.; LOOFT, C.; LOFTUS, R.T. BRADLEY, D.G. (2000 b). Relationships between the endangered Pustertaler-Sprinzen and three related

European cattle breeds as analyzed with 20 microsatellite loci. *Animal Genetics* 31: 329-332.

EGITO A; PAIVA S; ALBUQUERQUE M.S; MARIANTE A; ALMEIDA L.D.; CASTRO S.; GRATTAPAGLIA D. (2007) Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. *BMC Genetics* 8:83

EXCOFFIER L. (2007) Arlequin ver 3.11 Computational and molecular population genetic lab. CMPL. University of Berne <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>

FAO (2004). Measurement of domestic animal diversity - a review of recent diversity studies. CGRFA/WG-AnGR-3/04/Inf. 3. 38 pgs

----- Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans. Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD). Recommended Microsatellite Markers. <http://dad.fao.org/en/refer/library/guidelin/marker.pdf>

FREEMAN, A. R.; MEGHEN, C. M.; MACHUGH, D. E.; LOFTUS, R. T.; ACHUKWI, M. D.; BADO, A.; SAUVEROCHE, B.; BRADLEY, D. G. (2004) Admixture and diversity in West African cattle populations. *Mol. Ecol.*, v.13, n.11, p. 3477-3487.

GARCIA -MORENO, J.; MATOCQ, M. D.; ROY, M. S.; GEFFEN, E. AND WAYNE, R. K. (1996). Relationships and genetic purity of the endangered Mexican wolf based on analysis of microsatellite loci. *Conserv.Biol.* 10: 376–389.

GEORGES, M.; MASSEY, J. M. (1992). Polymorphic DNA markers in Bovidae. Patent WO 92/13102.

GLOWATZKI-MULLIS, M. L.; GAILLARD, C.; WIGGER, G. AND FRIES, R. (1995). Microsatellite based parentage control in cattle. *Animal Genetics* 26: 7–12.

GOLDSTEIN, B.D., SCHLÖTTERER C. (1999). Microsatellites: evolution and applications. Oxford University Press, New York; p 352

GOUDET, J. (2002) FSTAT: A program to estimate a test gene diversities and fixation indexes (Version 2.9.3.2.).

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, v.48, n.2, p. 361-372.

HANOTTE O., BRADLEY D.G., OCHIENG J.W., VERJEE Y., HILL E.W. & REGE J.E. (2002) African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations. *Science* 296: 336–339.

HANSLIK S., HARR B., BREM G. & SCHLÖTTERER C. (2000) Microsatellite analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary new world and old world Holstein Friesian populations. *Animal Genetics* 31:31–38.

IBEAGHA-AWEMU E., JANN O., WEIMANN C., ERHART G. (2004) Genetic diversity, introgression and relationships among West/Central African cattle breeds. *Genet. Sel. Evol.* 36:673–690

JORDANA J.; ALEXANDRINE P.; BEJA-PEREIRA A.; BESSA I.; CANON J.; CARRETERO Y., DUNNER S., LALOE D.; MOAZAMI-GOUDARZI K.; SANCHEZ A. Y FERRAND N. (2003) Genetic structure of eighteen local south European beef cattle breeds by comparative statistics analysis. *J. Animal Breed Genet.* 120:73-87.

KANTANEN J., OLZAKER I., HOLM L., LIEN S., VILKKI J., BRUSGAARD K., EYTHORSDDOTTIR E., DANELL B., ADALSTEINSSON S. (2000) Genetic Diversity and population structure of 20 North European Cattle Breeds. *Journal of heredity* 91 (6):446-456.

KAPPES, S. M.; KEELE, J. W.; STONE, R. T.; MCGRAW, R. A.; ONSTEGARD, T. S.; SMITH, T. P.; LOPEZ-CORRALES, N. L.; BEATTIE, C. W. (1997). A second generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.*, 7, (3): 235-249.

KAUKINEN, J.; VARVIO, S. L (1993). Eight polymorphic bovine microsatellites. *Anim. Genet.*, 24, (2): 148.

KIM, K. S.; YEO, J. S. CHOI, C. B. (2002). Genetic diversity of north-east Asian cattle based on microsatellite data. *Animal Genetics* 33:201-204.

LI M.H., ZHAO S.H., BIAN C. ET AL. (2002) Genetic relationships among twelve Chinese indigenous goat populations based on microsatellite analysis. *Genetics, Selection, Evolution* 34: 729–744.

LIRÓN J P.; PERAL-GARCÍA P, GIOVAMBATTISTA G. (2006) Genetic characterization of argentine and bolivian creole cattle breeds assessed through microsatellites *Journal of Heredity* 97(4):331–339

LITT, M.; LUTY, J. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in Vitro amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum.*, v.44, n.3, p397-401.

LOFTUS RT, MACHUGH DE, BRADLEY DG, SHARP PM, CUNNINGHAM EP. (1994). Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2757–2761.

LOFTUS R.T., ERTUGRUL O., HARBA A.H., EL-BARODY M.A., MACHUGH D.E., PARK S.D. & BRADLEY D.G. (1999) A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East. *Molecular Ecology* 8: 2015–2022.

MACHUGH, D. E.; LOFTUS, R.T.; BRADLEY, D.G.; SHARP, P. M. CUNNINGHAM, E. P. (1994). Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proc. R. Soc. Lond.* 294: 25-31.

MACHUGH DE, SHRIVER MD, LOFTUS RT, CUNNINGHAM P, BRADLEY DG. (1997). Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* 146:1071–86.

MACHUGH, D. E. E.; LOFTUS, R. T.; CUNNINGHAM, P. BRADLEY, D. G. (1998). Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics* 29: 333–340.

MAGEE DA, MEGHEN C, HARRISON S, TROY CS, CYMBRON T, GAILLARD C, MORROW A, MAILLARD JC, BRADLEY DG. (2002). A partial African ancestry for Creole cattle populations of the Caribbean. *J Hered* 93:429–432.

MANWELL C, BAKER MA. 1980. Chemical classification of cattle. 2. Phylogenetic tree and specific status of the zebu. *Anim Blood Groups BiochemnGenet* 11:151–162.

MARTIN-BURRIEL, I.; GARCIA-MURO, E.; ZARAGOZA, P. (1999) Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites. *Animal Genetics* 30: 177-182.

MARTÍN-BURRIEL I., RODELLAR C., LENSTRA J., SANZ A, CONS C., OSTA R., RETA M, DE ARGÜELLO S., SANZ A., ZARAGOZA P. (2007) Genetic Diversity and Relationships of Endangered Spanish Cattle Breeds. *Journal of Heredity* 98(7):687-691; doi:10.1093/jhered/esm096

MARTÍNEZ R D, FERNÁNDEZ E N; BRÓCOLI A M, MARTÍNEZ A, DELGADO J V. (2005) Variabilidad genética en el ganado bovino criollo argentino de origen patagónico. *Arch. Zootec.* 54: 415-421.

MATEUS, J. C.; PENEDO, M. C.; ALVES, V. C.; RAMOS, M.; RANGEL-FIGUEIREDO, T. (2004) Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle breeds using microsatellites. *Anim. Genet.*, v.35, n.2, p. 106-113.

- MAUDET, C.; LUIKART, G.; TABERLET, P. (2002) Genetic diversity and assignment tests among seven french cattle breeds based on microsatellite dna analysis. *Journal of Animal Sciences* 80: 942-950.
- MILLER, M. (1997) Tools for population genetics analices (TFPGA) 1.3: A Windows program for analyse of allozyme and molecular population genetic data.
- MILLER, S. A.; Dikes, D.D. Polesky, H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.*, 16 (3):1215.
- MIRETTI MM, DUNNER S, NAVES M, CONTEL EP, FERRO JA. (2004). Predominant African-derived mtDNA in Caribbean and Brazilian Creole cattle is also found in Spanish cattle (*Bos taurus*). *J Hered* 95:450–453.
- MIROL PM, GIOVAMBATTISTA G, LIRON JP, DULOUT FN. (2003). African and European mitochondrial haplotypes in South American Creole cattle. *Heredity* 91:248–254.
- MARTÍNEZ, G. (1999). Censo y caracterización de los sistemas de producción de ganado criollo colombiano, Fondo Nacional Del Ganado, ICA, Pronatta, Asobón. 158 p.
- MOAZAMI-GOUDARZI, K.; LALOE, D.; FURET, J.P. AND GROSCLAUDE, F. (1997). Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Animal Genetics* 28: 338–345.
- MOMMENS G.W., COPPIETERS A. (1994). Dinucleotide repeat polymorphism at the bovine MM12E6 and MM8D3 loci. *Animal Genetics* 25: 368
- MOORE, S. S.; BYRNE, K.; BERGER, K. T.; BARENDSE, W.; MCCARTHY, F.; WOMACK, J. E.; HETZEL, D. J. (1994). Characterization of 65 bovine microsatellites. *Mamm. Genome*, 5, (2): 84-90.
- MORENO, F; BEDOYA, G; DER., J; CARVAJAL, L; BERMÚDEZ, N; ZULUAGA, F; OSSA, J; VERDUGO, J; ESTRADA, L; BARRERA, J; SCOTH, D; TOBON, C; RUIZ, L. (2001). Diversidad y relaciones filogenéticas del Ganado Criollo Colombiano. *Revista Corpoica* 3 (2):17-23.
- MUKESH M.; SODHI M.; BHATIA S.; MISHA P. (2004) Genetic diversity of indian native cattle breeds as analysed with 20 microsatellites loci. *J. Animal Breed. Genet.* 121: 416-424.
- NEI, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

PEELMAN, L. J.; MORTIAUX, F.; VAN ZEVEREN.; A. DANSERCOER, A.; MOMMENS, G.; COOPMAN, F.; BOUQUET, Y.; BURNY, A.; RENAVILLE, R. AND PORTETELLE, D. (1998). Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Animal Genetics* 29: 161-167.

PIEDRAHITA, A. M.; POSSO A. MUÑOZ J. E.; ALVAREZ L. A.; (2008) Variabilidad Genética de Hartón del Valle mediante RAM. *Acta Agronómica (Palmira)*. 57 (1):71-76.

PIMENTEL DE MELLO L., VASCONCELLOS K., TAMBASCO-TALHARI D., POZZI PEREIRA A., LEHMANN L., CORREIA DE ALMEIDA L. (2003) Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. *Genetics and Molecular Biology*, 26 (2): 133-137.

PINZON E. 1991 Historia de la Ganadería Bovina en Colombia Banco Ganadero Suplemento Ganadero (Banco Ganadero) Vol. 8 Número 1

PRIMO A. T. (1992) El ganado bovino ibérico en las Américas: 500 años después. *Archivos de Zootecnia*, 41(154) (extra): 421.

RITZ, L R.; GLOWATZKI-MULLIS, M. L.; MACHUGH, D. E. AND GAILLARD, C. (2000). Phylogenetic analysis of the tribe Bovini using microsatellites. *Animal Genetics* 31: 178-185.

SIMONS D. L. (1984) Conservation of animal genetic resources. A review. *Livestock Production Sciences*. 11: 23-36.

STEFFEN, P.; EGGEN, A.; DIETZ, A. B.; WOMACK, J. E.; STRANZINGER, G.; FRIES, R. (1993) Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Anim. Genet.*, 24(2): 121-124.

STEIGLEDER, C.S., E.A. ALMEIDA AND T.A. WEIMER (2004) Genetic diversity of a brazilian creole cattle basedon fourteen microsatellite *loci*. *Arch. Zootec.* 53: 3-11.

THIEVEN U., SOLINOS-TOLDO S. (1997). Polymorphic CA-microsatellites for the integration of the bovine genetic and physical map. *Mammalian Genome* 8 52-55.

TOLDO, S. S.; FRIES, R.; STEFFEN, P.; NEIBERGS, H. L.; BARENDSE, W.; WOMACK, J. E.; HETZEL, D. J.; STRANZINGER, G. (1993). Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes. *Mamm. Genome*, 4(12): 720-727.

TROY C, MACHUGH DE, BAILEY JF, MAGEE DA, LOFTUS RT, CUNNINGHAM P, CHAMBERLAIN AT, SYKES BC, BRADLEY DG. (2001). Genetic evidence of Near- Eastern origins of European cattle. *Nature* 410:1088-1091.

VAIMAN, D.; OSTA, R.; MERCIER, D.; GROHS, C.; LEVEZIEL, H. (1992) Characterization of five new bovine dinucleotide repeats. *Anim. Genet.*,23 (6): 537-541.

VAIMAN D.; MERCIER, D.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; EGGEN, A.; CIAMPOLINI, R.; LEPINGLE, A.; VELMALA, R.; KAUKINEN, J.; VARVIO, S. L. AND MARTIN, P. (1994). A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mamm. Genome* 5: 288-297.

VAIMAN D. (1999). The molecular genetics of cattle. *The Genetics of Cattle*. CAB International. 123-162 p.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. 1984 Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, vol. 38, no. 6, p. 1358-1370.

ZAMORANO, M.J., J. RUITER, A. RODERO Y J.L. VEGA-PLA (1998). Análisis genético de marcadores microsatélites en dos poblaciones de la raza bovina Berrenda en Negro. En: *Arch. Zootec.* 47: 195-200.

ZAMORANO, M; GENERO, E; RODERO, A; VEGA – PLATA, J; RUMIANO, F. (1998). Caracterización genética de ganado bovino criollo argentino utilizando microsatélites. En: *Arch. Zootec.* 47: 273 - 277.

CAPITULO II – VARIABILIDAD DE LOS GENES DE LAS PROTEINAS DE LA LECHE κ -CASEINA, β -LACTOGLOBULINA Y α -LACTOALBUMINA EN EL GANADO CRIOLLO HARTON DEL VALLE

1. INTRODUCCION

La leche bovina consiste de una mezcla compleja de agua (87%), lactosa (4.8%), grasa (3.7%), proteína (3.5%) y otros componentes menores (Ghashghaei, 2003). El 80% de la fracción proteica está formada por un tipo de fosfoproteínas acídicas ricas en prolina, denominadas caseínas, mientras que la otra porción la representan proteínas no fosforiladas o proteínas del suero (Graselli *et al* 1997; OEA/GTZ, 2003). Aproximadamente, el 95% de las proteínas de la leche son sintetizadas en la glándula mamaria, el resto se origina en la sangre (Bawden & Nicholas, 1999). Las proteínas del suero incluyen la β -lactoglobulina (β -LG), la α -lactoalbúmina (α -LA), la lactoferrina y varias enzimas constitutivas de la fracción remanente.

De acuerdo a su movilidad electroforética, las caseínas pueden dividirse en: α s1-, α s2-, β - y κ -caseína (k-CN). La k-CN representa el 15% de las caseínas lácteas (Grasselli, *et al.*, 1997). El contenido y las propiedades de las caseínas determinan la producción de queso, porque forman la matriz de su masa (Braunschweig *et al.*, 2000; Swaisgood, 1993; Plowman & Creamer, 1995).

El estudio del polimorfismo de las proteínas de la leche ha tenido gran aplicación en las ciencias zootécnicas y en la industria láctea (Formaggioni *et al.*, 1999). Desde el último tercio del siglo pasado, muchos estudios se han concentrado en la relación entre los loci de las proteínas de la leche y las características de composición y producción de la leche (Aleandri *et al.*, 1990; Ballou *et al.*, 1995).

Algunos genes simples son responsables de una gran fracción de la variación genética y pueden estar ligados a marcadores genéticos y segregarse conjuntamente. El uso del polimorfismo genético de las proteínas de la leche posibilita la selección de animales que mejoren la producción y provean proteínas más adecuadas para la manufactura (Aleandri *et al.*, 1990).

Las caseínas denominadas sensibles al calcio son: α_{S1-} , α_{S2-} y β -CN, contienen varios grupos de residuos fosfoeril y cuando están en bajas concentraciones de calcio, se precipitan fuera de la solución. La κ -CN contiene solo uno o dos residuos fosfoeril y puede mantenerse en solución en un amplio rango de concentraciones de calcio. Las caseínas α_{S1-} , α_{S2-} y β -CN están agregadas en una larga estructura micelar, en una suspensión coloidal con el calcio, que es mantenida por interacción con la κ -CN, la cual parece que estabiliza dicha estructura (Stewart *et al.*, 1984, 1987; citado por Vaiman, 1999). La precipitación de las caseínas tiene lugar a pH 4,6, a 20°C, seguido de una ruptura química provocada por quimosina o pepsina en la porción hidrofílica de la κ -CN (Swaisgood, 1993; Plowman and Creamer, 1995). La formación del queso es principalmente gobernada por β -CN y κ -CN, mientras las otras dos caseínas probablemente determinan la habilidad de las micelas para transportar CaPO_4 coloidal (Vaiman, 1999).

1.1 EL GEN DE K-CASEÍNA

La estructura primaria de la κ -CN posee 169 aminoácidos. Las variantes κ -CN A y κ -CN B son las más comunes y están presentes en todas las razas con frecuencias variables pero se han reportado otras nueve variantes (Tabla 1) (Formaggioni *et al.*, 1999; Prinzenberg *et al.* 1996, Prinzenberg *et al.* 1999, Farrell *et al.*, 2004). Prinzenberg *et al.*, (1999), reporta la existencia de dos variantes que no son identificadas con enzimas; esas variantes son: la H e I. También se han

reportado otras variantes como F¹ y J (Sulimova et al., 1992; Mahé et al., 1999; citados por Farrell et al., 2004).

La κ-CN A y κ-CN B difieren en los aminoácidos de las posiciones 136 (Thr por Ile) y 148 (Asp por Ala), respectivamente (Ordas, 1992). Se ha descrito una variación silente de κ-CN A denominada A₁, la cual presenta una mutación en la tercera posición del codón Pro₁₅₀ (CCA/CCG) (Prinzenberg *et al.* 1999).

El genotipo homocigoto de κ-CN BB ha mostrado ser superior para el porcentaje de grasa y proteína, mientras que el genotipo heterocigoto κ-CN AB es superior para características de producción, lo cual sugiere un efecto de heterosis (Freyer *et al.*; 1999). Se ha encontrado alta correlación entre el contenido de proteína y el alelo κ-CN B, por lo cual se ha inferido que el gen de la κ-CN es un QTL o un gen mayor para contenidos de caseína (Brawnshweig, 2000). La leche de la vaca con el alelo B, posee mejores características con respecto a la leche de vacas con el alelo A, tales como: contenido proteico más alto, mejor estabilidad a la congelación y mayor rendimiento (5 al 10 %) en la elaboración de quesos, así como menor tiempo de coagulación y cuajo más consistente (Ordás, 1992; Lyn y McAllister, 1986; Van Eenennaam y Medrano, 1991).

Tabla 1. Posiciones y diferencias de aminoácidos de las variantes de la κ-CN de acuerdo con Farrel, (2004).

Variante		Posición y aminoácido diferente en la proteína						
		10	97	104	135	136	148	155
κ-CN (169)	A	Arg	Arg	Ser	Thr	Thr	Asp	Ser
	B					Ile	Ala	
	C		His					Gly
	E						Val	
	F ¹						Ala	
	F ²	His				Ile	Ala	
	G ¹		Cys			Ile	Ala	
	G ²						Ala	
	H					Ile		
	I			Ala				
J					Ile	Ala	Arg	

La frecuencia del alelo κ -CN B, en razas bovinas fluctúa entre 0.15 a 0.81 (Ordas, 1992). El gen de κ -CN ha sido extensivamente estudiado en bovinos por la importancia de esta proteína en la estabilización de las caseínas y su influencia en la manufactura de la leche (Barroso, 1998). La relación entre las otras variantes de κ -CN y las características de producción, ha sido pobremente investigada; la leche con κ -CN C y κ -CN G¹ presenta una baja coagulación, mientras que κ -CN E no difiere significativamente de κ -CN A (Prinzenberg *et al.*, 1999).

1.2 LAS PROTEÍNAS DEL SUERO

Las proteínas del suero quedan solubles en el suero de la leche, después de la precipitación de las caseínas, a pH de 4.6 y 20°C (Farrell *et al.*, 2004). Las caseínas y las proteínas del suero difieren no solo en su estructura física, sino también en su organización genómica y en su origen evolutivo. A diferencia de las caseínas, los genes de las proteínas del suero están dispersos a lo largo del genoma (Bawden y Nicholas, 1999).

1.2.1 β -Lactoglobulina. La β -Lactoglobulina (β -LG) es la mayor proteína del suero de la leche de los rumiantes y está presente en la leche bovina a concentraciones de 3.1 mg/ml (Bawden y Nicholas, 1999). Debido a su gran valor nutritivo, solubilidad y estabilidad puede ser usada para la fortificación de bebidas y jugos de fruta, (Grasselli *et al.*, 1997). En términos de masa, constituye cerca del 50% de las proteínas lactoséricas (OEA/GTZ, 2003).

Se han reportado cuatro variantes A, B, C y D (Lyn & McAllister, 1986). El genotipo BB está asociado con un alto porcentaje de caseínas en la leche, mayor contenido de grasa y alta producción de queso (Aleandri *et al.*, 1990) y el genotipo AA con alta producción de leche total y un incremento de las proteínas del suero (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1984).

1.2.2 α -Lactoalbúmina. La α -Lactoalbumina (α -LA) es una calcio metaloproteína que forma un complejo con la β -1,4 galactosiltransferasa necesario para originar la enzima lactosa sintasa, útil en la síntesis de lactosa, en el interior de la vesícula secretora del aparato de Golgi, en las células del epitelio mamario (Bawden y Nicholas, 1999; Bleck y Bremel, 1994; Voelker *et al.*, 1997; Wheeler *et al.*, 2003).

El gen ha sido mapeado en el cromosoma 5 (Bleck & Bremel, 1994; Mao, 1994). En ganado Holstein, la sustitución de una sola base (adenina por guanina), en la región 5' de α -LA, ha mostrado estar asociada con el aumento en la producción de leche. Las vacas con el alelo A tuvieron una habilidad de transmisión predicha más alta para el rendimiento de leche, proteína y grasa mientras que el alelo B se asoció con una habilidad de transmisión predicha más alta para el porcentaje de proteína y la grasa (Voelker *et al.*, 1997) y baja producción de leche (Barreras *et al.*, 2001).

1.3 ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

Para la identificación de las variantes genéticas de las proteínas de la leche se han aplicado métodos avanzados de electroforesis y recientemente la tecnología del ADN. Hasta ahora, 30 variantes genéticas diferentes se han identificado claramente entre α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β -CN, k-CN, β -LG y α -LA (Ragavan, 1999). La influencia de las variantes genéticas de las lactoproteínas en la composición de leche y propiedades tecnológicas como coagulación y rendimiento quesero han sido estudiadas extensamente (Dovc, 2000; Ragavan, 1999). Los alelos son codominantes (Lin y McAllister, 1986).

Es posible identificar las variantes A, B, C y E de k-CN mediante el análisis RFLP, haciendo uso de las enzimas de restricción *Hinfl*, *HaeIII* y *MaeIII* (Barroso *et al.*, 1998). Además, pueden identificarse las variantes F², G¹ (F y G según Prinzenberg *et al.*, 1999; Farrell *et al.* 2004) y A₁ con seis enzimas de restricción,

pero las mutaciones ubicadas fuera de los sitios de reconocimiento de las enzimas, no pueden ser detectadas (Prinzenberg *et al.*, 1996; Prinzenberg & Erhardt, 1999; Prinzenberg *et al.*, 1999). En cambio, la SSCP es considerada una herramienta poderosa para la detección de mutaciones no reconocidas por las enzimas de restricción (Prinzenberg *et al.*, 1999) y es una técnica fácil y económica (Barroso *et al.*, 1998; Sunnucks *et al.*, 2000).

Algunas variantes son universales mientras que otras son exclusivas de una raza (Lin y McAllister 1986; Benavides, 2003). La variante A de k-CN predomina en la mayoría de las razas (Tabla 2), mientras que la variante B presenta alta frecuencia en la raza Jersey. Las frecuencias de las variantes A y B de β -LG son similares en la raza Holstein, sin embargo en Jersey, Guernsey y Shorthorn lechero predomina la variante B (Benavides, 2003).

Voelker *et al.*, (1997), encontraron fijada la variante A de α -LA en ganado Jersey, mientras que en ganado Holstein la frecuencia fue de 0.63 y para Guernsey, Red Angus, Ayrshire, Simmental y Gelbvieh fue superior a 0.9. En razas criollas de Argentina y Bolivia la variante B de β -LG presentó una frecuencia génica mayor que la variante A; por otro lado, la variante A de k-CN tuvo una alta frecuencia en cuatro de las seis razas analizadas. En general, las frecuencias génicas fueron similares a las razas Ibéricas y otras de Suramérica históricamente relacionadas y se encontró subdivisión entre las poblaciones bolivianas y argentinas (Lirón *et al.*, 2002).

Tabla 2 - Frecuencias génicas para las proteínas de la leche en diferentes razas

Raza	Frecuencia génica					
	k-Caseína		β -Lactoglobulina		α -Lactalbúmina	
	A	B	A	B	A	B
Holstein (EEUU)	0.82 ¹	0.18 ¹	0.43 ¹	0.57 ¹	0.63 ⁶	0.37 ⁶
Holstein (Australia) ²	-	-	0.51	0.49	-	-
Holstein (Portugal) ³	0.67	0.28	0.46	0.54	-	-
Holstein (Colombia) ⁸	0.76	0.24	-	-	-	-
Holstein (Mexico)	0.94	0.09	0.47	0.53	0.33	0.66
Guernsey (EEUU) ¹	0.73	0.27	0.21	0.79	0.96 ⁶	0.04 ⁶
Jersey (EEUU) ¹	0.14	0.86	0.37	0.63	1.0 ⁶	0 ⁶
Shorton Lechero ¹	0.89	0.11	0.31	0.69	-	-
Alentejana (Portugal) ³	0.55	0.45	0.43	0.57	-	-
Barrosa (Portugal) ³	0.57	0.43	0.31	0.68	-	-
Maronesa (Portugal) ³	0.61	0.39	0.60	0.40	-	-
Bovinos criollos (Uruguay) ⁴	0.51	0.49	0.49	0.51	0.28	0.72
Bovinos criollos (Argentina) ⁵	0.69	0.30	0.36	0.64	-	-
Bovinos criollos (Argentina) ⁷	0.61	0.39	0.35	0.65	-	-
Criollo de la Patagonia (Argentina) ⁷	0.61	0.39	0.85	0.16	-	-
Saavedreño (Argentina) ⁷	0.56	0.44	0.18	0.83	-	-
Chaqueño Boliviano ⁷	0.36	0.64	0.40	0.60	-	-
Yacumeño (Argentina) ⁷	0.43	0.57	0.48	0.52	-	-
Chusco (Argentina) ⁷	0.70	0.30	0.40	0.60	-	-

Fuente: ¹Eenennaam y Medrano, 1991; ²Gonzales de Llano, 1990; citado por Benavides, 2003; ³Pereira *et al.*, 2002; ⁴Postiglioni *et al.*, 2002; ⁵Poli *et al.*, 2002; ⁶Voelker *et al.*, 1997; ⁷Liron *et al.*, 2002; ⁸López *et al.*, 1999; ⁹Barreras *et al.*, 2001

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la variabilidad genética del ganado Hartón del Valle, mediante genes relacionados con la composición de la leche.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Implementar las técnicas moleculares SSCP y RFLP en el análisis de la variabilidad de los genes de las proteínas de la leche: κ -Caseína, β -Lactoglobulina y α -Lactoalbúmina.
2. Estimar la variabilidad genética de κ -Caseína, β -Lactoglobulina y α -Lactoalbúmina en once poblaciones del ganado Hartón del Valle.
3. Determinar la estructura poblacional en ganado Hartón del Valle usando los genes κ -Caseína, β -Lactoglobulina y α -Lactoalbúmina.
4. Comparar las frecuencias de los genes de κ -Caseína, β -Lactoglobulina y α -Lactoalbúmina de ganado Hartón del Valle con los del ganado Cebú (*Bos indicus*) y Holstein (*Bos taurus*).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 ANIMALES

Los animales de la raza criolla Hartón del Valle fueron muestreados en 11 fincas del Valle del Cauca; el número de muestras total fue de 276 (Tabla 3), se incluyó animales de las razas Holstein y Cebú como grupos control. Los animales de UNAL utilizados en el capítulo anterior, fueron separados en GMGA y CEUNP, debido a que ambas fincas se encuentran en municipios diferentes. Se incluyó una finca (AR) en la cual se realizan cruces entre HV y H. Las muestras se tomaron en tubos *vacutainers* de 5 ml con anticoagulante EDTA, mediante punción en la vena coccígea. Para la extracción del ADN se utilizó la metodología de desalamiento (Miller *et al.*, 1998).

Tabla 3. Número de muestras por población y localización. Hartón del Valle (HV), Holstein (H), Brahman (B).

Poblaciones	Raza	Siglas	N	Municipio
Granja Mario González Aranda	HV	GMGA	16	Palmira
Centro Experimental CEUNP	HV	CEUNP	15	Candelaria
Hacienda San Rafael	HV	SR	27	Bugalagrande
Hacienda El Capricho	HV	EC	52	Jamundi
Hacienda La Ondina	HV	LO	35	Roldadillo
Hacienda El Gran Capricho	HV	GC	31	Candelaria
Hacienda Zanjón Hondo	HV	ZH	26	Buga
Procampo	HV	PR	30	Buga
Hacienda Jamaica	HV	JA	15	Roldanillo
Casa Rincón	HV	CR	10	Roldadillo
Arenales	HV	AR	19	Roldadillo
Subtotal	HV		245	
Holstein	H	H	12	Roldadillo
Cebú Brahman	B	B	19	Jamundí
TOTAL			276	

3.2 AMPLIFICACIÓN Y DE LOS FRAGMENTOS

3.2.1 κ -caseína. Para la amplificación de las variantes de κ -caseína (κ -CN) se utilizaron dos protocolos: el primero se adaptó de la metodología descrita por Barroso *et al*, (1998) en el cual se amplificó un fragmento de 453 pb, localizado en el cromosoma 6. La secuencia de los *primers* fue: 5' -TGT GCT GAG TAG GTA TCC TAG TTA TGG-3' y 5'-GCG TTG TCT TCT TTG ATG TCT CCT TAG-3'. Las condiciones de PCR se presentan en la Tabla 4. Las muestras fueron sometidas a un ciclo de desnaturalización por 5 minutos a 94°C y luego a 35 ciclos a 94°C por un minuto, a 65°C por un minuto y a 72°C por dos minutos con una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Tabla 4. Condiciones de PCR para el fragmento de 453 pb (Barroso *et al*. 1998)

Reactivos	Concentración Inicial	Volumen	Concentración Final
Buffer Taq	10X	5 μ l	1 X
DNTPs	1,25 mM	8 μ l	200 μ M
Primer F	100 pmol/ μ l	0,2 μ l	20 pmol
Primer R	100 pmol/ μ l	0,2 μ l	20 pmol
MgCl ₂	25 mM	4 μ l	2 mM
Taq	5 U	0,4 μ l	2 U
DNA	50-300ng/ μ l	2 μ l	120 ng/ μ l
Agua		30,2 μ l	
Total		50 μ l	

Con el segundo protocolo (Prinzenberg *et al*. 1999) se amplificó un fragmento de 551 pb, correspondiente al 90% de la secuencia codificante de la proteína κ -CN. Se utilizaron 50-200 ng/ μ l, de ADN con los *primers*: ExIV#1 5'- AGA AAT AAT ACC ATT CTG CAT-3' y 551#2 5'-GTT GAA TTC TTT GAT GTC TCC TTA GAG T-3'. Las condiciones de PCR se presentan en la Tabla 5. Las muestras se desnaturalizaron a 93°C por 60 segundos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a

93°C, 30 segundos a 54°C, 30 segundos a 70°C y una extensión final de 180 segundos a 70°C.

Tabla 5. Condiciones de PCR para el fragmento de 551 pb de k-CN (Prizenberg *et al*, 1999).

Reactivos	Concentración Inicial	Volumen	Concentración Final
Buffer Taq	10X	5 µl	1 X
DNTPs	1,25 mM	4 µl	100 µM
Primer ExIV	20 pmol/ µl	1 µl	20 pmol
Primer 551	20 pmol/ µl	1 µl	20 pmol
MgCl ₂	25 mM	3 µl	1,5 mM
Taq	5 U	0,2 µl	1 U
DNA	50-200 ng/ µl	2 µl	
Agua		33,8 µl	
Total		50 µl	

La técnica SSCP permite que las secuencias variables de las cadenas simples del ADN, muestren diferencias en movilidad en un gel; estas diferencias son inducidas por mutaciones que cambian la estructura terciaria de la cadena simple del ADN (Hayashi, 1992). Para ambos fragmentos, 3 µl de los productos de la reacción de PCR, se mezclaron con 8 µl de buffer desnaturante (0.05% de Xilene-Cianoli, 0.05% de azul bromofenol, 5.5mM de EDTA pH 8.0), se sometieron a 95°C por 5 minutos y se enfriaron en hielo; se cargaron 5 µl de amplificado en geles de poliacrilamida al 12%, (proporción Acrilamida:N,N'-metilene-bis-acrilamida de 100:1) en una cámara Biometra[®] de 12x8 cm², con un volumen de 9 ml y TBE 0,5X. En el fragmento de 453 pb, la concentración del glicerol fue de 5% y se corrieron a 160 voltios durante 12 horas a 12°C, mientras que para el fragmento de 551 pb el glicerol se incrementó a 6.67% y el tiempo de corrida a 16 horas.

Para verificar que la lectura de los alelos con SSCP fuera correcta, ambos fragmentos fueron digeridos con enzimas de restricción utilizando 5 µl del producto de PCR con 3 a 5 U de cada enzima. En la Tabla 6 se presentan los patrones de

corte de las enzimas para el fragmento de 453 pb y en la Tabla 7 para el fragmento de 551pb. Los productos de la digestión se visualizaron en geles de agarosa al 1,8%.

Tabla 6. Cortes resultantes de la digestión con enzimas de restricción del fragmento 453 de κ -CN. (Fuente: Barroso et al., 1998).

Alelo	<i>Hinfl</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MaeII</i>
A	326+100+27	230+223	254+199
B	426+27	230+223	254+199
C	426+27	230+223	453
E	326+100+27	230+145+78	254+199

Tabla 7. Cortes resultantes de la digestión con enzimas de restricción del fragmento 551 de κ -CN. (Fuente: Prinzenberg et al., 1996).

Alelo	<i>HindIII</i>	<i>Hinfl</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>MaeII</i>	<i>MspI</i>
AA	551	58+69+98+326	221+330	40+511	299+252	551
BB	100 + 451	58+69+424	221+330	40+511	299+252	551
AC	100+451+551	58+69+98+326+42	221+330	40+511	299+252+55	551
AE	551	58+69+98+326	75+146+221+330	40+511	299+252	551
AF	551	58+69+98+326	221+330	40+511+551	299+252	551
EF	551	58+69+98+326	75+146+221+330	40+511+551	299+252	551
AG	551	58+69+98+326	221+330	40+511	299+252+551	551
BG	100+451+551	58+69+98+326+424	221+330	40+511	299+252	551
A ₁	551	58+69+98+326	221+330	40+511	299+252	551+460+91

3.2.2 β -Lactoglobulina. Se amplificó un fragmento de 262 pb, localizado en el cromosoma 11 (Ron *et al.*; 1994). Las condiciones de PCR (Tabla 8) se adaptaron de Ron *et al.*, (1994) con los *primers* BLGP3: 5'-GTC CTT GTG CTG GAC ACC GAC TAC A-3' y BLGP4: 5'-CAG GAC ACC GGC TCC CGG TAT ATG A-3' (Ron *et al.*; 1994). Las muestras fueron desnaturalizadas a 97°C por 3 minutos y luego se sometieron a 36 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, con extensión final de 72°C por 5 minutos. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 14% (Proporción Acrilamida: N,N'-metilene-bisacrilamida 100:1), con dimensiones de 12x8 cm², TBE 0,25X y 3,75% de glicerol, sometidos a 200 voltios durante siete horas. Los genotipos identificados mediante SSCP fueron

verificados mediante RFLP con la enzima *HaeIII*, en una muestra de 20 individuos en geles de poliacrilamida al 8% (proporción Acrilamida: N,N'-metilene-bis-acrilamida de 37:1).

3.2.3 β -Lactoalbúmina. Se amplificó un fragmento de 167 pb (Mao, 1994) entre los nucleótidos 657 a 822 inclusive, ubicado en el cromosoma 5 (Bleck & Bremen, 1994). Las secuencias de los *primers* fueron: 5' -CTC TTC CTG GAT GTA AGG CTT-3' y 5'-AGC CTG GGT GGC ATG GAA TA-3'. Las condiciones de PCR se consignan en la Tabla 8. Las muestras fueron denaturadas a 95°C por 2 minutos y luego sometidas a 36 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, posteriormente, una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Tabla 8. Condiciones de PCR para β -LA y α -LA.

Reactivos	β -LG		α -LA	
	Concentración Inicial	Volumen (μ l)	Concentración Inicial	Volumen (μ l)
Buffer Taq	10X	2.5	10X	2.5
DNTPs	1,25 mM	2	1,25 mM	2
Primer F	10 pmol/ μ l	0.75	10 pmol/ μ l	0.25
Primer R	10 pmol/ μ l	0.75	10 pmol/ μ l	0.25
MgCl ₂	25 mM	1.5	25 mM	1.5
Taq	5 U	0.2	5 U	0.2
DNA	100ng/ μ l	2	50ng/ μ l	2
Agua		15.3		16.3
Total		25 μ l		25 μ l

Una muestra de 20 individuos fue genotipada mediante RFLP, con el protocolo adaptado de Mao (1994), con la enzima *MnlI*. Debido al alto costo de esta enzima se desarrolló un protocolo con SSCP; la discriminación de ambas variantes se obtuvo con las siguientes condiciones: un gel con dimensiones 12x8 cm² con un volumen de 9 ml de solución gelificante, al 16% de poliacrilamida (Proporción

Acrilamida: N,N'-metilene-bis-acrilamida de 100:1), 0,25X de TBE y 3,75% de glicerol, sometido a 180 voltios durante cuatro horas.

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la diversidad genética se estimaron las frecuencias alélicas, la heterocigosidad esperada insesgada (H_e), la heterocigosidad observada (H_o) para cada locus y la diversidad génica promedio insesgada de Nei, (1987) (H_e), mediante los programas estadístico Arlequín 3.11 (Schneider et al., 2000) y TFGA® (Tools for Population Genetic Analyses, versión 1.3; Miller, 1997) y Popgen Versión 1,32 (Universidad de Alberta, 1997). Las diferencias estadísticas entre valores de diversidad génica se estimaron mediante la prueba de t-Student (Nei y Kumar, 2000) en la cual primero se calculó la diferencia de diversidad génica para el i-ésimo locus entre las poblaciones X y Y por $d_i = \hat{h}_{Xi} - \hat{h}_{Yi}$ para todos los loci polimórficos. Posteriormente, se calculó los valores de distancia media y su varianza mediante las siguientes ecuaciones:

$$\bar{d} = \sum_{i=1}^{L'} d_i / L' \quad ; \quad V(\bar{d}) = \sum_{i=1}^{L'} (d_i - \bar{d})^2 / [L'(L' - 1)]$$

Donde L' es el número de loci polimórficos. Luego, la diferencia entre la diversidad génica promedio entre las dos poblaciones se probó por:

$$t_{L'-1} = \bar{d} / \sqrt{V(\bar{d})} \quad \text{con } L' - 1 \text{ grados de libertad.}$$

Las desviaciones respecto a las proporciones de Hardy y Weinberg (EHW) fueron evaluadas como: la igualdad entre heterocigosidad esperada y heterocigosidad observada utilizando la prueba exacta de Raymond and Rousset (1995) usando el paquete estadístico Popgen 1.32 (1997), el método de la cadena Marcoviana

descrito por Guo y Tompson, (1992) utilizando el software estadístico Arlequín 2.0 (Schneider et al., 2000) y también a través del estimador F_{IS} (Weir and Cockerham, 1984).

La estructura genética fue inferida del análisis de varianza molecular (AMOVA; Excoffier et al., 1992) basado en las frecuencias génicas de las poblaciones o fincas como un grupo en dos niveles jerárquicos (entre y dentro) obtenida en el software estadístico Arlequín 2.0 (Schneider et al., 2000). Los valores de distancia genética entre fincas se estimaron mediante el índice de coancestría (Reynolds et al., 1983) con los cuales se construyeron los dendrogramas usando el método UPGMA mediante el software estadístico TFPGA® (Tools for population genetic analyses, versión 1.3; Miller, 1997). El análisis de componentes principales se hizo utilizando las frecuencias de todos los alelos, por población, que se resumieron en tres variables sintéticas informativas (CP) o ejes coordenados, graficados en un diagrama tridimensional, mediante el paquete estadístico SAS versión 8,2 (1990).

4. RESULTADOS

4.1 POLIMORFISMOS DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE

4.1.1 κ -Caseína (k-CN). Mediante la SSCP, se encontraron seis patrones de movilidad, iguales con los dos protocolos utilizados. Los patrones de las variantes A, B y E, fueron identificados claramente, tanto con SSCP como con RFLP y se descartó la presencia del alelo C. Las tres variantes no identificadas, se trataron con los enzimas de restricción *HindIII*, *Hinfl*, *HaeIII*, *HhaI*, *MaeII* y *MspI* y se encontró que una de ellas correspondía a κ -CN A₁. Las otras dos presentaron cortes de igual tamaño, a de la variante κ -CN A y como no fue posible identificarlas visualmente, se secuenciaron ambas cadenas de individuos homocigotos, de cada una de ellas y controles con los genotipos BB y AA. Las muestras secuenciadas fueron comparadas con todas las secuencias disponibles en el GenBank para *Bos taurus* (22 secuencias), correspondientes a los alelos A, B, E, A₁, G, H e I, y dos secuencias de *Bos indicus* (alelos K y L). Se encontró que los alelos no identificados correspondieron a las variantes G e I. En la Tabla 9 se encuentran los resultados de la secuenciación de las muestras comparadas, con la secuencia patrón X14908 (Alexander *et al.* 1988). En la Figura 1 y 2 se presentan los patrones de corrida de κ -CN obtenidos mediante los fragmentos de 455pb y 551 pb, respectivamente.

Tabla 9. Patrones de Variación en las secuencias de muestras de k-CN en HV, comparadas con la secuencia patrón X14908 y los alelos reportados en el GenBank.

Patrones	926	2850	3350	4363	4931	5176	5212	5306	5309	5345	5352	5365	5394	5397	5398	5399	5406	5414	6644	Accesión
	C	C	G	A	G	C	T	C	C	A	A	A	T	T	T	C	A	A	G	X14908
Alelo A	A	G	A	G	C.	AY380228
Alelo B	A	G	A	A	.	.	.	T	C	G	T	.	AY380229
Alelo E	?	?	G	AF123250
Alelo A ₁	G	AF092513
Alelo G	T	AF123251
Alelo H	T	T	AF105260
Alelo I	G	AF121023
Alelo F	A	AF123250
Alelo K	T	G	A	EU36583
Alelo L	T	G	.	.	.	EU365834
M98	?	.	G	Alelo I
M194	?	.	G	Alelo I
M195	G	Alelo I
M73?	.	.	T	Alelo G
M266	?	.	.	T	Alelo G
M193	?	.	.	T	Alelo G
M54	?	.	.	T	Alelo G
M100	?	.	.	.	T	C	G	T.	.	Alelo B

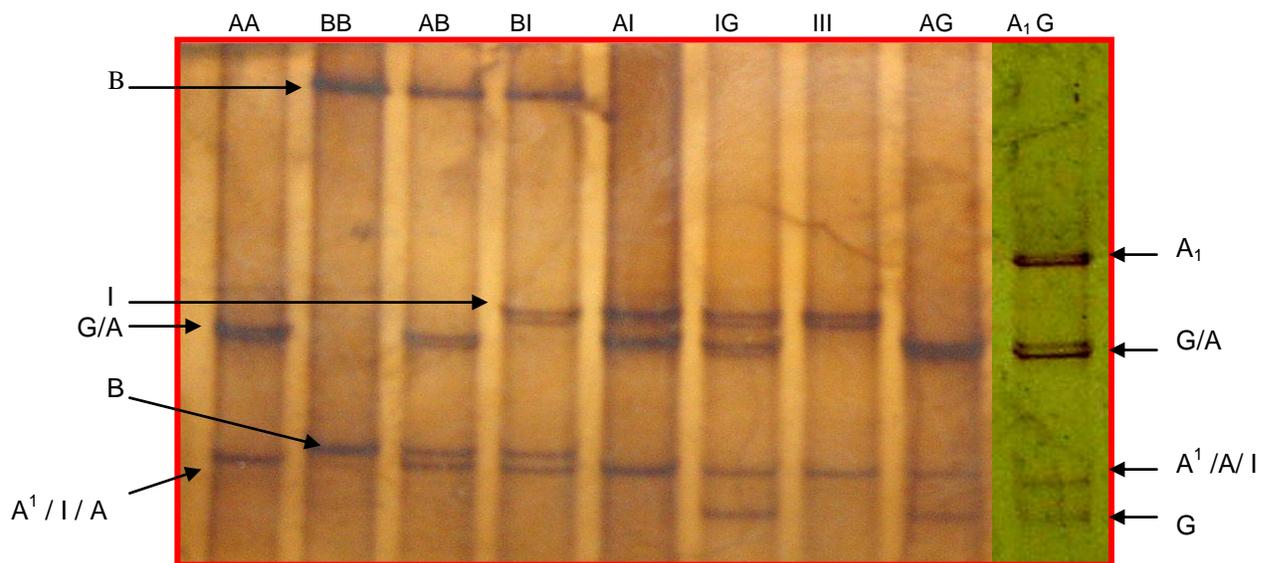


Figura 1. Patrones de corrida de las variantes alélicas de κ -CN obtenidas en el fragmento de 453 pb. Arriba: se indica el genotipo correspondiente a cada patrón. A los lados las ubicaciones de las bandas de cada variante; nótese que una banda puede corresponder a diferentes variantes.

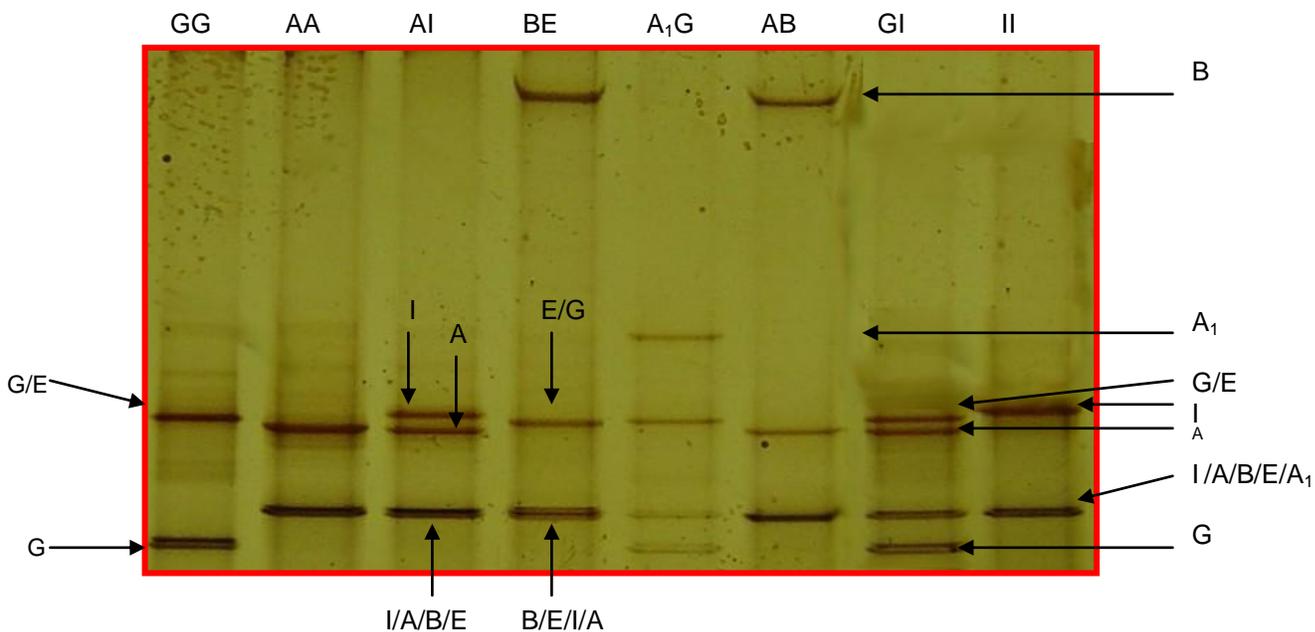


Figura 2. Patrones de corrida de las seis variantes alélicas de κ -CN obtenidas en el fragmento de 551 pb. Arriba: se indica el genotipo correspondiente a cada patrón. A los lados, las ubicaciones de las bandas de cada variante; nótese que una banda puede corresponder a diferentes variantes.

4.1.2 Proteínas del suero. No se encontró literatura sobre la utilización de la SSCP para la genotipificación de los genes de las proteínas del suero. Por lo tanto, que los protocolos para β -lactoglobulina y α -lactalbúmina fueron desarrollados en el marco de este trabajo y se describen en la sección de Materiales y Métodos.

El desarrollo de los protocolos de SSCP, para ambas proteínas, fue dispendioso, aun a concentraciones altas de poliacrilamida, debido a que ambos fragmentos son pequeños (262 pb y 167 pb para β -LG y α -LA, respectivamente), y presentan migración rápida, sin que las cadenas se separen. Los alelos se pudieron identificar con TBE 025X y reduciendo la concentración de glicerol del 5% (óptima para k-CN) a 3.75% (Figura 3). El glicerol reduce el pH mediante la formación de complejos de glicerol y iones borato contenidos en el buffer de TBE; un pH bajo suprime la carga del grupo fosfato de los ácidos nucleicos, lo cual que provoca la formación de la estructura terciaria de la cadena simple del ADN (Hayashi, 1992).

4.1.2.1 β -Lactoglobulina. Las variantes A y B de β -lactoglobulina se presentan mediante el uso de RFLP en la Figura 4 y con SSCP en la Figura 5. Aunque se estandarizó el protocolo para SSCP, resultó más conveniente utilizar RFLP, porque requiere menos tiempo de corrida. Sin embargo, la SSCP se utilizó en muestras que al ser digeridas con *HaeIII*, no mostraban bandas muy definidas.

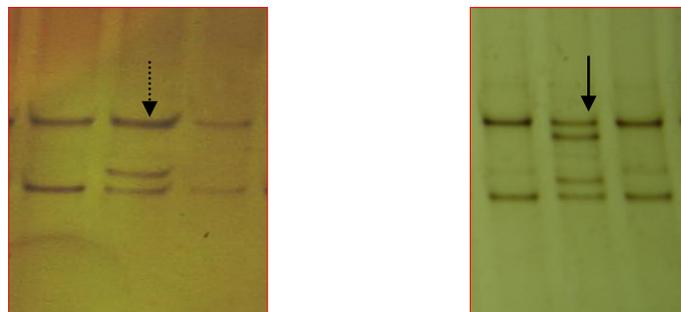


Figura 3. Movilidad de las cadenas simples de α -LA a concentraciones de glicerol del 5,0% (Derecha) y 3,75% (Izquierda).

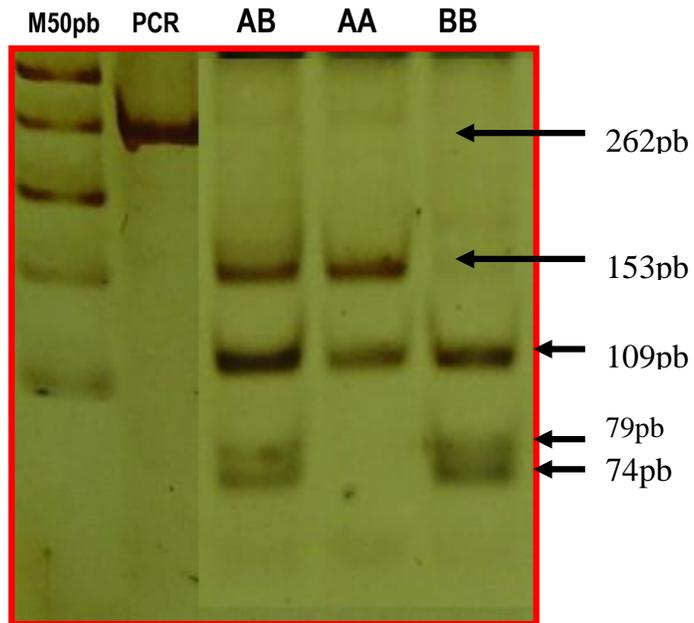


Figura 4. Patrón de bandas obtenido con la enzima de restricción *HaeIII* para las variantes A y B de β -Lactoglobulina. M: marcador de 50pb. PCR: producto no digerido.

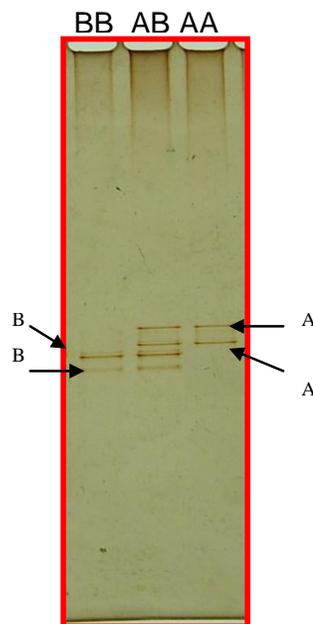


Figura 5. Patrón de bandas obtenido mediante SSCP, para las variantes A y B de β -Lactoglobulina.

4.1.2.2 α -Lactoalbúmina. Las variantes A y B de α -Lactoalbúmina fueron identificadas mediante la técnica SSCP (Figura 6), desarrollada en este trabajo ya que no se encontró ningún reporte en la literatura. En la Figura 7 se presenta el patrón de bandas obtenido mediante RFLP.

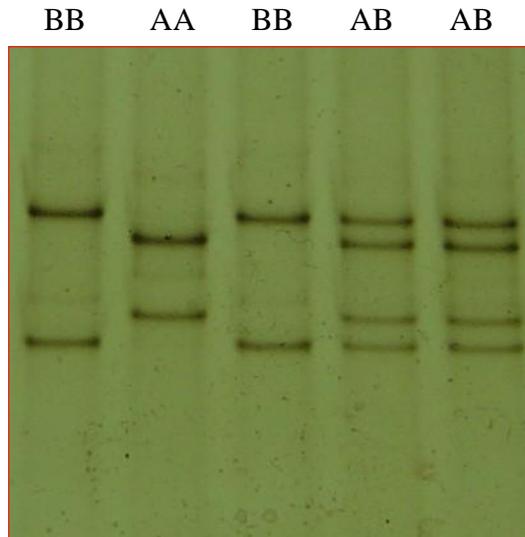


Figura 6. Patrón de bandas obtenido mediante SSCP para las variantes A y B de α -Lactoalbumina.

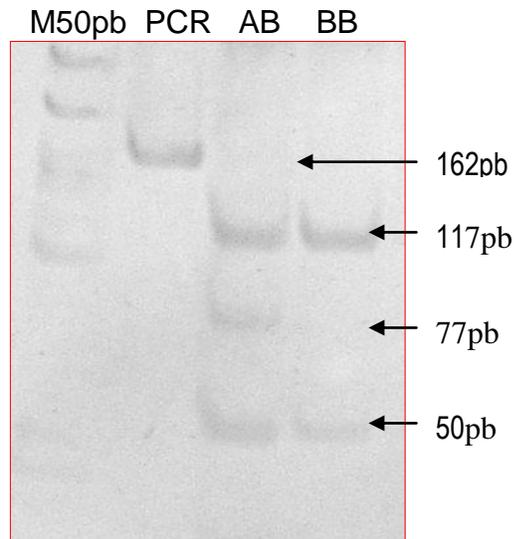


Figura 7. Patrón de bandas obtenido con la enzima de restricción *MNII* para las variantes A y B de α -Lactoalbúmina en gel de poliacrilamida al 8%.

4.2 VARIABILIDAD GENÉTICA

4.2.1 Frecuencias Génicas. Se encontraron diez alelos en los tres loci evaluados: seis para κ -CN (A, B, A₁, E, I y G), dos para β -LG (A y B) y dos para α -LA (A y B). Diez alelos se encontraron en HV y siete en H y B. Con excepción de A¹ y E, los demás alelos estuvieron representados en todas las poblaciones HV (Tabla 10).

Para κ -CN se encontraron 6, 4 y 3 alelos para HV, B y H, respectivamente. La frecuencia más alta para κ -CN A se observó en H (0.60 ± 0.11), mientras para HV fue de 0.45 ± 0.02 y para B de 0.25 ± 0.00 . La frecuencia de κ -CN B fue de 0.35 ± 0.10 , 0.29 ± 0.01 y 0.068 ± 0.00 para H, HV y B, respectivamente. El alelo κ -CN A₁ presentó una mayor proporción en la raza B (0.13 ± 0.05), pero estuvo ausente en H y con baja frecuencia en HV (0.009 ± 0.00). Las variantes κ -CN E y κ -CN I solo se encontraron en HV. El alelo G fue el alelo predominante en B (0.54 ± 0.00).

El rango entre poblaciones de HV para κ -CN B fue de 0.18 a 0.53 siendo GMGA, CEUNP y AR las que alcanzaron las mayores frecuencias. El alelo κ -CN A₁ se halló en muy baja proporción en EC, ZH y PR, mientras que κ -CN E solo se encontró en EC y ZH. El alelo I ausente en H y B, presentó altas frecuencias en LO y CR, fincas ancestrales que se encuentran en condiciones agroecológicas muy adversas. La variante G predominante en B, también lo fue en SR (0.28). En las raza HV y H de β -LG fue notoriamente mayor la frecuencia del alelo β -LG B. En HV, se encontró una frecuencia para la variante A de 0.38 ± 0.02 y de 0.62 ± 0.02 para β -LG B. Entre fincas de HV ésta última osciló entre 0.18 ± 0.084 y 0.56 ± 0.07 .

Para α -LA, H y HV fueron similares en la distribución de sus frecuencias, la variante α -LA A tuvo una frecuencia baja en HV (0.14 ± 0.01) que osciló entre 0.031 ± 0.03 y 0.26 ± 0.07 . La variante α -LA B no se halló en B.

Tabla 10. Frecuencias génicas y desviaciones estándar de las variantes alélicas de κ -CN, β -LG y α -LA en once poblaciones de Hartón del Valle (HV), Brahman (B) y Holstein (H), Número de individuos (N).

Locus	Alelos	Poblaciones Hartón Del Valle											Hartón del Valle	Brahman	Holstein
		GMGA	CEUNP	SR	EC	LO	GC	ZH	Pr	CR	JA	AR			
K-CN	A	0,34±0,08	0,53±0,09	0,46±0,07	0,33±0,04	0,44±0,05	0,55±0,06	0,64±0,06	0,48±0,06	0,13±0,07	0,53±0,09	0,50±0,09	0,45±0,02	0,25±0,06	0,60±0,11
	B	0,53±0,09	0,40±0,09	0,21±0,05	0,33±0,04	0,18±0,04	0,26±0,05	0,25±0,06	0,32±0,05	0,18±0,08	0,23±0,07	0,40±0,08	0,29±0,01	0,06±0,03	0,35±0,10
	A ₁	0,00	0,00	0,00	0,02±0,01	0,00	0,00	0,02±0,01	0,01±0,01	0,00	0,00	0,00	0,009±0,00	0,13±0,05	0,00
	E	0,00	0,00	0,00	0,02±0,01	0,00	0,00	0,02±0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,009±0,00	0,00	0,00
	G	0,09±0,05	0,06±0,04	0,28±0,06	0,13±0,03	0,05±0,02	0,13±0,04	0,04±0,02	0,10±0,03	0,09±0,06	0,13±0,06	0,06±0,04	0,11±0,01	0,54±0,07	0,05±0,0
	I	0,03±0,03	0,00	0,03±0,02	0,13±0,03	0,31±0,05	0,05±0,02	0,02±0,02	0,06±0,03	0,59±0,10	0,10±0,00	0,03±0,03	0,11±0,01	0,00	0,00
	N	16	15	26	52	36	30	26	31	11	15	16	274	22	12
β -LG	A	0,46±0,09	0,40±0,09	0,28±0,061	0,35±0,04	0,21±0,04	0,41±0,06	0,55±0,07	0,37±0,06	0,18±0,08	0,56±0,09	0,52±0,08	0,38±0,021	0,29±0,07	0,54±0,10
	B	0,53±0,09	0,60±0,09	0,71±0,06	0,64±0,04	0,78±0,04	0,58±0,06	0,44±0,07	0,62±0,07	0,81±0,08	0,43±0,09	0,47±0,08	0,62±0,021	0,70±0,07	0,45±0,10
	N	16	15	23	51	35	29	26	32	11	15	18	271	22	12
α -LA	A	0,03±0,03	0,06±0,04	0,11±0,043	0,18±0,03	0,14±0,04	0,22±0,05	0,22±0,05	0,15±0,04	0,00	0,13±0,06	0,26±0,07	0,14±0,016	0,00	0,16±0,07
	B	0,96±0,03	0,93±0,04	0,88±0,04	0,81±0,03	0,85±0,04	0,77±0,05	0,77±0,05	0,85±0,04	1,00±0,00	0,86±0,06	0,73±0,072	0,85±0,016	1,00±0,00	0,83±0,07
	N	16	15	27	52	35	31	27	30	10	15	19	277	23	12

4.2.2 Número promedio de alelos (NPA). El número promedio de alelos observados para los tres loci, en las 11 fincas de HV y los grupos control H y B se describen en la Tabla 11. El NPA fue de $3.33\pm 2,3$, 2.33 ± 0.057 y 2.33 ± 0.057 para HV, B y H, respectivamente. El locus k-CN fue el más polimórfico con 4.61 alelos para HV, 3 para B y 4 para H.

El promedio entre poblaciones HV fue de 2.7 ± 0.0 . La finca con mayor NPA fue EC (3,3), mientras que CEUNP y CR presentaron el menor valor (2,3). El número promedio de alelos observado se considera un indicador razonable de variación genética, siempre y cuando las poblaciones estén en equilibrio de mutación y deriva genética y que el tamaño de muestra sea similar para cada población (Nei, 1987; MacHug *et al.*, 1997), por lo cual, los índices de diversidad se estimaron con el tamaño de muestra original y además, con una muestra ajustada de 16 individuos por población, con excepción de CR (10 datos) y CEUNP y AR (15 datos).

Tabla 11. Estadística descriptiva de κ -Caseína, β -Lactoglobulina y α -Lactoalbúmina para las razas HV (once poblaciones), B y H: Número de muestras (N), Número promedio de alelos (NPA), Número de alelos (NA), Heterocigosidad esperada (He), Heterocigosidad ajustada por tamaño de muestra (He_a).

Raza	Población	N	NPA	NA k-CN	He	He _a	
HV	GMGA	16	$2,67\pm 1,15$	4,0	$0,39\pm 0,02$	$0,39\pm 0,02$	16
	CEUNP	15	$2,33\pm 0,57$	3,0	$0,40\pm 0,01$	$0,39\pm 0,01$	15
	SR	27	$2,67\pm 1,15$	4,0	$0,43\pm 0,01$	$0,41\pm 0,01$	16
	EC	52	$3,33\pm 2,31$	6,0	$0,50\pm 0,01$	$0,52\pm 0,01$	16
	LO	35	$2,67\pm 1,15$	4,0	$0,42\pm 0,01$	$0,44\pm 0,01$	16
	GC	31	$2,67\pm 1,15$	4,0	$0,49\pm 0,00$	$0,48\pm 0,00$	16
	ZH	26	$3,00\pm 1,73$	6,0	$0,46\pm 0,00$	$0,47\pm 0,00$	16
	PR	30	$2,67\pm 1,15$	5,0	$0,46\pm 0,01$	$0,45\pm 0,01$	16
	CR	10	$2,33\pm 0,57$	4,0	$0,31\pm 0,03$	$0,31\pm 0,03$	10
	JA	15	$2,67\pm 1,15$	4,0	$0,47\pm 0,01$	$0,46\pm 0,01$	15
	AR	19	$2,67\pm 1,15$	4,0	$0,50\pm 0,00$	$0,50\pm 0,00$	16
	Promedio	25	$2,71\pm 0,07$	4.61	$0,45\pm 0,00$	$0,44\pm 0,00$	
	Total	276	$3,33\pm 2,31$	6.0	$0,47\pm 0,01$		
B		23	$2,33\pm 0,57$	3,0	$0,35\pm 0,03$	$0,35\pm 0,03$	16
H		12	$2,33\pm 0,57$	4,0	$0,40\pm 0,00$	$0,40\pm 0,00$	12

4.2.3 Diversidad Genética. La variación en la diversidad genética estimada para los tres genes de las proteínas de la leche (Tabla 10) refleja diferencias que posiblemente se deban al origen y al manejo de cada población muestreada. El valor de H_e para los tres loci en HV fue de $0,47 \pm 0,01$, fue diferente ($t = 6,32$; $P < 0,05$) al valor obtenido en H ($0,40 \pm 0,00$). Por el contrario, el valor hallado para B no fue significativamente diferente de HV.

Los valores de diversidad génica promedio (H_e) por población mostraron una correlación positiva ($r=0,56$; $P<0,05$) con respecto al tamaño de la muestra. Sin embargo, los valores de H_e reales y ajustados fueron similares. Las poblaciones con mayores valores de H_e fueron EC y AR. Se encontraron diferencias estadísticas significativas ($t>4,30$; $P< 0,05$) entre algunos de los hatos HV. Las mayores diferencias se encontraron entre SR con EC, ZH, CR, AR y H y entre EC con GC, PR, CR y JA.

En la κ -CN, el índice de diversidad fue superior en la raza HV (0.68), que B (0.63) y H (0.54). Con excepción de la población JA, todas las poblaciones HV se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg. (Tabla 12). Los valores de H_e entre fincas oscilaron entre 0.53 (ZH) y 0,74 (EC).

Para β -LG, el H tuvo mayor H_e (0.51) que HV y H. Entre las poblaciones de HV mostraron alta diversidad GMGA, CEUNP, GC, ZH y AR; cinco poblaciones mostraron deficiencia significativa de heterocigotos.

En HV, el gen α -LA presentó la diversidad más baja entre los tres loci ($0,26 \pm 0,02$). Todas las razas y las poblaciones HV se encontraron en equilibrio HW. La endogamia intrapoblacional estimada mediante el F_{IS} solo resultó significativamente diferente de cero, para la población JA.

Tabla 12. Valores estimados de Heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho) y significancia de las desviaciones al equilibrio Hardy-Weimberg para κ -CN, β -LG, α -LA, en once poblaciones de Hartón del Valle y los grupos control Holstein y Brahman.

Población y/o raza	F _{IS}	K-CN		β -LG		α -LA	
		He	Ho	He	Ho	He	Ho
GMGA	0.164	0,60±0,05	0,62±0,00	0,51±0,02	0,31±0,089	0,06±0,05	0,06±0,03
CEUNP	-0.003	0,57±0,04	0,80±0,02	0,49±0,04	0,26±0,067	0,12±0,07	0,13±0,04
SR	0.028	0,67±0,03	0,88±0,00	0,41±0,05	0,07±0,047**	0,20±0,06	0,22±0,04
EC	-0.001	0,74±0,02	0,86±0,00	0,46±0,02	0,23±0,049**	0,30±0,04	0,36±0,03
LO	0.076	0,67±0,02	0,72±0,00	0,34±0,05	0,14±0,065**	0,24±0,06	0,28±0,04
GC	0.056	0,69±0,04	0,73±0,00	0,49±0,02	0,06±0,06**	0,38±0,05	0,45±0,05
ZH	-0.048	0,53±0,06	0,60±0,00	0,50±0,02	0,34±0,06	0,35±0,06	0,44±0,05
P	-0.047	0,65±0,03	0,71±0,00	0,47±0,03	0,43±0,08	0,25±0,06	0,23±0,04
CR	0.024	0,61±0,09	0,72±0,00	0,31±0,10	0,18±0,09	0,00±0,00	0,00±0,00
J	0.294*	0,65±0,07	0,53±0,00*	0,50±0,03	0,20±0,08**	0,23±0,09	0,26±0,06
A	0.24	0,59±0,04	0,56±0,00	0,51±0,02	0,27±0,08	0,39±0,06	0,31±0,07
HV Total		0,68±0,01	0,73±0,00*	0,47±0,01	0,22±0,02**	0,26±0,02	0,29±0,01
H	0.14	0,54±0,07	0,80±0,10	0,51±0,10	0,08±0,10**	0,29±0,10	0,33±0,07
B	0.27	0,63±0,07	0,63±0,00	0,42±0,05	0,13±0,06**	0,00±0,00	0,00±0,00

* (P<0,05) ** (P<0,01)

4.3 DIFERENCIACIÓN Y ESTRUCTURA GENÉTICA

En la prueba global de los tres loci evaluados el HV mostró alta diferenciación genética (P<0,01) con la raza B pero no con la raza H ($p=0,4738$). La prueba exacta de diferenciación de poblaciones indicó que la distribución génica de los tres loci de las proteínas de la leche es significativamente diferente entre los hatos HV. Los hatos LO y CR mostraron diferenciación genética con todas las

poblaciones de HV, excepto entre sí mismas. El análisis de varianza molecular (AMOVA) reveló que el 96% de la varianza genética en los genes de las proteínas de la leche (κ -CN, β -LG y α -LA) de ganado HV, se debe a variaciones dentro de fincas, mientras que el 4,04% restante se debe a diferencias entre fincas (Tabla 13).

Tabla 13. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) entre 11 poblaciones HV, en los loci κ -CN, β -LG y α -LA.

Fuente de variación	GL	CM	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación	P
Entre Fincas entre individuos	10	2,007	0.02 Va	4.04	0,001
Entre loci dentro de individuos	559	0,639	0.63 Vb	95.96	
Total	569		0.63		

El valor de F_{ST} global fue 0.04 ($P < 0.01$), indica que existe baja pero altamente significativa diferenciación genética entre poblaciones HV.

Los valores de distancia genética fueron estimados con base en el coeficiente de coancestría (Reynolds et al. 1983). La finca más distante fue CR con valores de distancia desde 0.10 a 0.30 con las demás fincas, mientras que las fincas más cercanas fueron CEUNP y GMGA, (0,004) y ZH con AR (0,007).

El dendrograma construido mediante UPGMA, asocia las fincas de HV (Figura 8) para los genes de las proteínas de la leche con base en sus distancias obtenidas a partir del coeficiente de coancestría, y permite establecer dos grupos bien diferenciados: el primer grupo formado por LO y CR y el segundo grupo lo forman CEUNP, GMGA, SR, EC, GC, ZH, PR, JA y AR. El dendrograma en el que se incluyeron los grupos control (Figura 9) mantuvo la misma tendencia de agrupamiento de las fincas HV pero la raza H se ubicó dentro de un subgrupo (AR,

ZH y JA) del grupo 2 descrito anteriormente, mientras que B se ubicó en un “cluster” aparte, confirmando las diferencias entre subespecies para los genes en estudio.

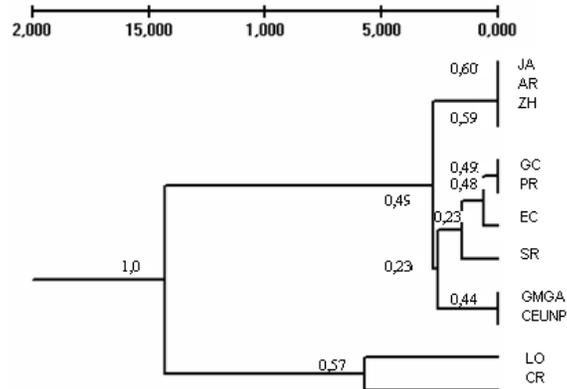


Figura 8. Árbol construido por el método UPGMA a partir de la distancia o coeficiente de coancestría (Reynolds *et al.*, 1983) para 11 fincas de ganado criollo Hartón del Valle. El número decimal en cada nudo representa el valor de “bootstrapping”.

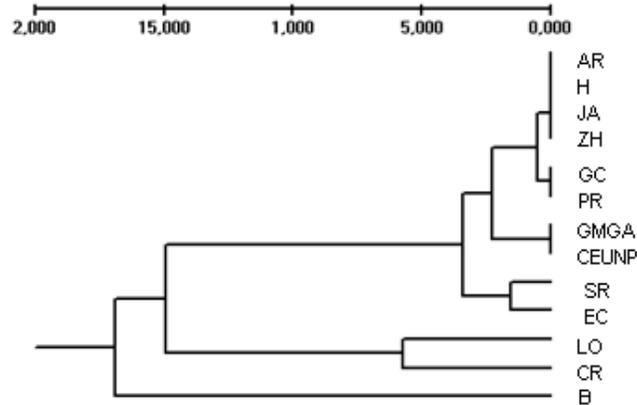


Figura 9. Dendrograma construido por el método UPGMA a partir de la distancia o coeficiente de Coancestría (Reynolds *et al.*, 1983) para 11 fincas de ganado criollo Hartón del Valle, Brahman y Holstein.

El análisis de componentes principales (ACP) obtenido a partir de los valores de las frecuencias alélicas reveló que el 83% de la varianza total puede ser explicada por tres variables sintéticas. El primer componente (CP₁) explicó la mayor variabilidad (49,2%), mientras que el segundo componente (CP₂) explicó la máxima variabilidad residual (19,7%) (Tabla 14). Las variantes alélicas mas comunes en el ganado bovino fueron las de mayor aporte al CP1: A y B de κ-CN, β-LG y α-LA. Las variantes κ-CN A₁, κ-CN I y κ-CN G contribuyeron en mayor proporción al CP₂.

Tabla 14. Variación de las frecuencias alélicas explicada por tres Componentes Principales.

Componentes Principales	Valor propio	Variación Absoluta (%)	Variación acumulada (%)
1	4,920	49,20	49,20
2	1,965	19,65	68,84
3	1,395	13,95	82,79

La correlación entre la mayoría de las variantes alélicas y factores (CP) mostró comunalidades (R^2) entre el 76,2% y el 92%. Únicamente κ-CN E y κ-CN B mostraron valores de 48,45% y 68,25%, respectivamente. En general, la alta comunalidad observada entre variantes y factores, indica que la clasificación de las fincas de HV en base a los tres componentes suministra suficiente información para considerar la tipología observada en la Figura 10. El ACP estuvo acorde con la tipología obtenida en las Figuras 8 y 9. La poblaciones CR y LO se ubican bastante distantes del grupo formado por los demás hatos evaluados, además se observa la separación entre HV y B y la similaridad entre HV y H. El hato Holstein muestreado probablemente se formó por absorción de individuos criollos.

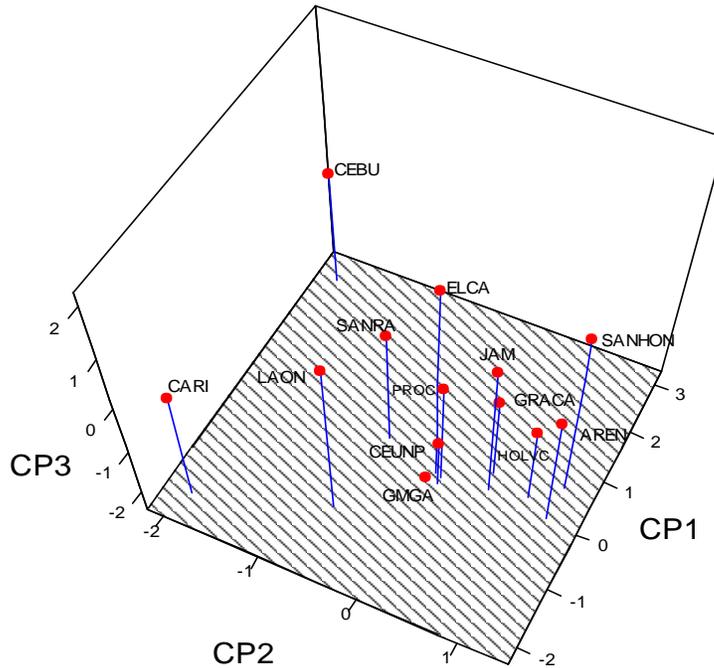


Figura 10. Diagrama de los primeros tres componentes del Análisis de Componentes Principales a partir de las frecuencias alélicas de tres loci de para proteínas de leche en fincas de ganado criollo Hartón del Valle.

La tipología expuesta en los dendrogramas y el ACP, describe la separación del *Bos taurus* (HV y H) del *Bos indicus* (B) y la posible relación entre las fincas de HV.

4.4 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

En la Tabla 15 se observan los resultados de la prueba de desequilibrio de ligamiento. Se encontró que HV existe un desequilibrio de ligamiento entre los tres de genes muestreados. La probabilidad de desequilibrio en HV fue bastante alta al parear κ -CN con cada una de las otras proteínas y la probabilidad fue más baja entre β -LG/ α -LA. Sin embargo cuando se excluye una finca en la cual se ha practicado cruzamientos, el desequilibrio entre las proteínas del suero desaparece. A diferencia de HV, los grupos de B y H no presentaron desequilibrio.

Tabla15. Resultados de desequilibrio de ligamiento entre genes pareados en HV, y excluyendo la población cruzada (AR) y los controles B y H.

Raza	HV		Sin AR		B		H	
Gen	β -LG	α -LA	B-LG	α -LA	β -LG	α -LA	β -LG	α -LA
κ -CN	0,00 **	0,00 **	0.00**	0.00**	0.86	----	0.23	0.23
β -LG		0.05*		0.06				0.59

Probabilidades del equilibrio de ligamiento entre pares de genes obtenidos mediante la prueba exacta usando la cadena Markoviana (Slatkin *et al*, 1996) en 1000,172 pasos.
 * (P<0,05) ; ** (P<0,01)

5. DISCUSION

5.1 POLIMORFISMO DE LOS GENES EN LA RAZA HARTÓN DEL VALLE

El contenido proteico de la leche es el principal factor que influye en la producción del queso. El polimorfismo de las proteínas de la leche afecta la composición de la leche y la calidad del queso. Las caseínas en particular han sido propuestas como marcadores polimórficos para la selección del ganado bovino para mejorar la producción y la calidad de la leche. El análisis de SSCP de los genes de las proteínas de la leche es una alternativa valiosa para la identificación de las variantes alélicas y como ayuda de selección.

El tamaño de la muestra utilizado (276 individuos) y la metodología SSCP permitieron el muestreo de seis variantes alélicas para κ -CN: A, B, E, A₁, I y HV, cuando la mayoría de los reportes presentan los dos alelos más frecuentes A y B. Los patrones de movilidad fueron diferentes a los obtenidos por Naranjo *et al.* (2007), en la raza HV mediante SSCP, quienes detectaron dos variantes alélicas. Con la técnica SSCP, Ceriotti *et al.* (2004) identificaron cinco variantes en 358 animales: A, A₁, B y H en *Bos indicus* y A, B y E en *Bos taurus*. De acuerdo con Prinzenberg *et al.* (1999), las pruebas moleculares para κ -CN se han concentrado en la diferenciación de κ -CN A y κ -CN B y algunas han dado lugar a la mala identificación de la variante C como B y también confundir a la E, F, G, H, A₁ como la variante A lo cual puede dar lugar a sobreestimación en la frecuencia de A. Por lo tanto, la metodología y el número de animales muestreados permitieron estimar con precisión las frecuencias de los alelos de k-CN en la raza HV.

La variante k-CN A en HV, presentó una frecuencia de 0.45 ± 0.02 que está por debajo del rango reportado para razas Ibéricas y algunas razas criollas de Sur América (0.470-0.762) (Arranz *et al.*, 1996; Postiglioni *et al.*, 2002) y para razas

africanas tanto *Bos indicus* como *Bos taurus* (Ceriotti *et al.*, 2004). Sin embargo, estuvo dentro del rango de razas criollas de Argentina y Bolivia (0.355-0.70) (Lirón *et al.*, 2002).

El alelo B está asociado con el contenido alto de proteína en la leche y la calidad de la leche (Boettcher *et al.* 2004; Caroli *et al.* 2004). El genotipo BB incrementa el contenido de proteína y grasa (Kuserova *et al.* 2006). Las frecuencias de κ -CN B en HV fueron superiores a las de Holstein en EEUU (Van Eennennan a & Medrano, 1991) y en Colombia (Trujillo *et al.* 1999; López *et al.*, 1999) y similares al Criollo Argentino (Poli *et al.* 2002). La mayoría de los reportes muestran frecuencias más altas para κ -CN B respecto a las observadas en este estudio (Golijow *et al.* 1999; Pereira *et al.* 2002) pero solo identifican las variantes A y B. Con SSCP, la ocurrencia de κ -CN B en razas africanas, fue superior en taurinos (0.35-.079) que en cebuinos (0.12-0.2) (Ceriotti *et al.* 2004).

La variante κ -CN A₁ se identificó en 5 individuos de HV y la mayor frecuencia se observó en B (0,136±0,052); este alelo parece ser específico de Cebú. (Prinzenberg & Erhardt, 1999; Ceriotti *et al.*, 2004). La variante κ -CN E solo se observó en 4 individuos HV; ha sido descrita en Simmental suizo y en Ayrshire escocés (Alais, 1985).

La frecuencia de κ -CN A₁ y κ -CN E obtenidas en HV fueron 0,009 y 0,007 respectivamente; bajo el criterio de Cavalli-Sforza y Bodner (1981), los alelos pueden considerarse raros o poco comunes cuando sus frecuencias son menores a 0.005.

Generalmente, la frecuencia de la variante β -LG B es mayor que β -LG A. En HV, se encontró una frecuencia para la variante A de 0.38±0.02 y de 0.62±0.02 para β -LG B. Los valores hallados en HV para β -LG B estuvieron dentro de los rangos reportados para ganado Ibérico y criollo (0.516-0.825) (Van Eenennaam y

Medrano, 1991; Pereira *et al.*, 2002; Postiglioni *et al.*, 2002; Poli *et al.*, 2002; Voelker *et al.*, 1997; Lirón *et al.*, 2002, Uffo *et al.*, 2006)).

En la raza HV la frecuencia de α -LA B fue de 0.86; esta variante es común en todas las razas de occidente (Formaggioni *et al.* 1999). El valor hallado fue superior a lo reportado en criollo cubano y uruguayo (Postiglioni *et al.*, 2002; Uffo *et al.*, 2006). En razas especializadas para producción de leche, Poli *et al.*, (2002) encontraron altas frecuencias para α -LA A (0,67 a 1.0). Tanto α -LA A como α -LA B, han sido encontradas en ganado *Bos indicus* (Farell *et al.*, 2004), sin embargo, esta última no fue observada en la raza B en este trabajo.

5.2 DIVERSIDAD GENÉTICA

El valor de \hat{H}_e para los tres loci en HV de $0,47\pm 0,01$ fue similar a la diversidad hallada en razas taurinas y cebuínas de África (Ceriotti *et al.*, 2004) pero notoriamente superior a la encontrada en criollo cubano (Uffo *et al.*, 2006).

Para la κ -CN, la H_e en HV ($0,68\pm 0,01$) está por encima del rango descrito en diferentes razas criollas en sur América (0,33 a 0,50) (Golijow *et al.*, 1999; Giovambattista, *et al.*, 2001; Lirón *et al.*, 2002); esos estudios se basan en identificación de las dos variantes más comunes de κ -CN. El valor de H_e para β -LG ($0,473\pm 0,011$) de HV está en el rango descrito para esas razas (0,267 a 0,508; Lirón *et al.*, 2002). En HV, el gen de α -LA presentó la diversidad más baja entre los tres loci ($0,26\pm 0,02$).

Los programas selectivos aplicados a razas tienden a reducir los niveles de variación genética. En HV no han existido procesos sistemáticos de selección artificial, lo cual ha permitido mantener altos niveles de diversidad genética en los genes de las proteínas de la leche. El ganado ha estado expuesto a selección natural en diferentes condiciones agroecológicas del Valle del Cauca, lo cual

puede haber moldeado el patrón de diversidad genética favoreciendo alelos particulares o combinaciones de alelos en los diferentes ambientes. Por ejemplo, la variante I de la κ -caseína es más frecuente en LO y CR, ambos hatos localizados en una zona muy seca.

Los niveles altos de diversidad observados en bovinos criollos han sido atribuidos a la historia de la introducción de bovinos en América, la poca presión de selección ejercida a lo largo de los años y la mezcla con otras razas (Lirón *et al*, 2006; Egito *et al*, 2007; Giovambattista, *et al*, 2001).

5.3 ESTRUCTURA GENÉTICA Y DIFERENCIACIÓN

Al igual que con los microsatélites, el HV mostró alta diferenciación genética con la raza B pero no con la raza H, lo cual comprueba que las diferencias inter-específicas se reflejan también en los loci de las proteínas de la leche. Estas diferencias son corroboradas por las distancias genéticas y el ACP, en los cuales la raza B (*Bos indicus*) resultó siempre más lejana de las *Bos taurus* (HV y H).

El F_{ST} (0,05) encontrado para k-CN en ganado en HV fue menor que el reportado para ganado criollo Argentino en el cual la conexión entre las poblaciones es restringida y mayor que en Holstein (Giovambattista *et al.*, 2002) raza que representa un ejemplo extremo de uniformidad genética. La prueba exacta para diferenciación de poblaciones indicó que la distribución génica de los tres loci de las proteínas de la leche fue significativamente diferente entre los hatos de HV.

La gran variación observada dentro de los hatos (96%), puede deberse a las diferencias genéticas propias de los individuos y a la presencia de estructuras familiares de hermanos medios, formadas por el bajo número de toros utilizados como padres en cada generación, lo cual representa un factor adicional que incrementa la varianza dentro de cada finca.

El dendrograma obtenido asoció las fincas LO y CR con una clara divergencia entre las demás. La finca CR se formó en 1960 a partir de animales de LO y desde entonces no se han introducido animales de otros hatos; ambas tienen sistema de producción doble propósito. Es posible que el patrón genético de estas proteínas este asociado a las condiciones agroecológicas donde están ubicadas ambas fincas, en una de las zonas más secas del Dpto. del Valle del Cauca.

Por otro lado, en el segundo grupo se destaca un subgrupo con las poblaciones GMGA Y CEUNP; estas fincas están situadas en diferentes municipios y conforman un hato de conservación perteneciente a la Universidad Nacional de Colombia. En el estudio con microsatélites (Capítulo 1) las dos poblaciones se analizaron como una unidad, debido al conocimiento previo sobre el manejo de los animales y teniendo en cuenta que los marcadores utilizados eran neutros, pero para el análisis con polimorfismos proteicos se estimó más conveniente el análisis independiente de cada una de ellas. Las distancias genéticas entre ambas fueron muy pequeñas y reflejan su similitud, a pesar de que se encuentran en condiciones ambientales diferentes. Esta estructura ya había sido detectada por Piedrahita (2008) con marcadores RAM's. El "cluster" SR, EC, PR y GC comprende fincas con sistemas de producción de leche y entre ellas ha habido intercambio entre reproductores. La población AR tiene alto mestizaje con H y recientemente en JA se han introducido genes H, lo cual puede explicar su similitud. La finca ZH es un sistema de producción de carne que se ha mantenido por 50 años en endogamia. A pesar de que sus frecuencias alélicas son muy diferentes a las que muestran la mayoría de los hatos (alta frecuencia de κ -CN A, β -LG A y α -LA) esta finca no diverge de las otras.

El primer componente del ACP explicó la mitad de la variación observada y diferenció la raza B (*Bos indicus*) de las HV y H (*Bos taurus*), mientras que el segundo componente con el 19% de la variación, separó los hatos de ganado HV. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con los microsatélites para la

divergencia entre especies en este estudio y con los obtenidos por Cerioti *et al.*, (2004), con las frecuencias haplotípicas de las caseínas encontraron congruencia con la topología del árbol filogenético y alta analogía con los análisis llevados a cabo con microsatélites. Lo anterior muestra que es importante incluir los genes de proteínas de la leche en estudios de diversidad y programas de conservación, debido a su notable variabilidad y eficiencia en discriminar poblaciones de ganado, y además, por su implicación en las características productivas.

Se encontró que en HV existe un desequilibrio de ligamiento entre los tres genes muestreados que pudo haber sido provocado por dos posibles razones: en primer lugar, el HV, tuvo grandes poblaciones como la de la jurisdicción de Buga que en 1745 poseía 64,000 animales (Pinzón, 1984), pero años después esas poblaciones se vieron reducidas por absorción con otras razas (Casas & Valderrama, 1998), situación que pudo causar un cuello de botella que provocó un desequilibrio a nivel genético. En segundo lugar según Hart y Clark (1997) puede también surgir como un “artefacto” por el apareamiento entre subpoblaciones que difieren en frecuencias alélicas o que presentan estructura genética. La existencia de estructura genética en el HV fue demostrada anteriormente y hay fincas o subpoblaciones en las cuales se presentan cruzamientos interraciales, efecto que se observa cuando se excluyó del análisis la población AR con alto mestizaje H.

En general, Hartón del Valle después de muchos años de vida en la región del Valle del Cauca fue producto de la selección natural (Casas & Valderrama, 1998). Los valores de diferenciación genética y las Figuras 9, 10 y 11 sugieren que ha existido alguna conexión entre hatos o fincas que ha permitido mantener una baja diferenciación genética.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al conocimiento genético de la raza criolla Hartón del Valle. Es claro que esta raza constituye un reservorio de diversidad genética en proteínas de la leche y una estructura genética que puede

garantizar la preservación de la diversidad genética. Su heterogeneidad genética parece ser una característica que según algunos investigadores (Giovambattista *et al.*, 2001; Lirón *et al.*, 2002) es propia de las poblaciones de ganado criollo americano posiblemente como consecuencia de la subdivisión del ganado criollo en la región, en pequeños rebaños aislados o con un bajo grado de flujo de genes entre ellos y adaptados a un amplio rango de ambientes en la región.

El efecto positivo de las variantes más comunes de las proteínas de la leche es bien conocido en otras razas de ganado. El HV mostró otras variantes las cuales podrían ser económicamente importantes. La búsqueda de correlaciones entre las variantes alélicas de las proteínas y las características de producción o adaptación, puede tener como limitante la falta de registros en los hatos; estos aspectos refuerzan la importancia de conservar la diversidad de HV para oportunidades de investigación futuras.

La conservación y manejo de la diversidad genética de las proteínas de la leche en el HV pueden ser direccionadas a diferentes aspectos de la variación genética, de acuerdo a la estructura que mostró la raza entre las diferentes fincas. Así, los programas de mejoramiento o conservación pueden tener como objetivo incrementar los genotipos o haplotipos de interés económico más que la diversidad alélica, en aquellas fincas con altas frecuencias de esas variantes de interés, o que se encuentran en condiciones favorables, ya que se ha mencionado que la composición de la leche no solo es el producto del efecto de sus variantes genéticas, si no que otros factores como el ambiente y manejo también están involucrados, por tanto la selección direccional, en ambientes desfavorables puede llevar a una pérdida de diversidad en lugar de la obtención de un beneficio económico. Por otro lado se debe propiciar el mantenimiento de la diversidad en aquellas fincas que además de poseer variantes de interés económico también poseen otras variantes específicas cuyo valor puede ser dilucidado en investigaciones futuras.

Los programas de conservación y manejo de la diversidad deben implementar técnicas moleculares apropiadas para el buen diagnóstico de las facultades genéticas del HV y de las razas Colombianas. El SSCP resultó ser una técnica apropiada fácil de implementar y con un alto poder de detección de variantes no comunes por lo que se recomienda su uso en futuros estudios de diversidad genética en ganado.

6. CONCLUSIONES

Los análisis moleculares utilizados basados la técnica SSCP permitieron obtener niveles de diversidad acorde a lo esperado para las razas criollas; además de identificar las variantes comunes que se reportan en la mayoría de trabajos sobre diversidad de ganado en base a proteínas de la leche, también fue posible detectar otras variantes importantes para la valoración genética del la raza HV.

Se identificaron diez variantes alélicas mediante SSCP y RFLP distribuidas en tres loci de las proteínas de la leche: seis variantes corresponden a κ -caseína, dos a β -LG y dos a α -LA

Los protocolos de SSCP para la identificación de las variantes alélicas de las proteínas del suero fueron elaborados en este trabajo con buenos resultados. El protocolo de SSCP desarrollado para α -Lactoalbumina resultó más apropiado que RFLP en la identificación de las variantes alélicas

Los valores de diversidad génica y el número de alelos observados indican que el ganado criollo Hartón del Valle constituye un valioso reservorio de diversidad genética en cuanto a proteínas de la leche.

Se encontró una baja pero significativa diferenciación genética entre las poblaciones de HV que puede ser un factor importante a considerar para preservar la diversidad genética o implementar programas de mejoramiento.

El HV difiere en los genes de las proteínas de la leche del ganado B y con H, aunque con este último las diferencias encontradas son menores.

BIBLIOGRAFIA

ALAIS C (1985) Ciencia de la Leche Principios de Técnica Lechera, 2nd edn. Barcelona: Reverté.

ALEANDRI, R; BUTTAZZONI, L. G; SCHNEIDER, J.C. (1990) The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. En: J Dairy Sci. Vol. 73; p.241-255.

ALEXANDER, L.J., STEWART, A.F., MACKINLAY, A.G., KAPELINSKAYA, T.V., TKACH, T.M. AND GORODETSKY, S.I. (1988) Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene Eur. J. Biochem. 178 (2), 395-401.

ARRANZ, J.J.; BAYON, Y. SAN PRIMITIVO, F. (1996). Genetic variation at five microsatellite loci in four breeds of cattle. *Journal of Agriculture Science* 127: 533-538.

BALLOU, L. U., M. PASQUINI, R. D. BREMEL, T. EVERSON, AND D. SOMMER. (1995) Factors affecting herd milk composition and milk plasmin at four levels of somatic cell counts. En: J. Dairy Sci. Vol. 78; p.2186–2195.

BARRERAS, A; ROBINSON, O; MONGE, F. J; VIZCARRA, O. NAVARRO L. H. (2001). Effects of genotypes of casein and serum proteins on milk production in Holsteins. En: Proceeding, Western Section, American Society of Animal Science Vol. 52.

BARROSO, A; DUNNER, S. and CAÑÓN J. (1998) Technical note: detection of bovine kappa-casein variants A, B, C and E by means of polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism (SSCP). En: J. Anim. Sci. Vol. 76; p.1535-1538.

BAWDEN, W. S. y NICHOLAS, K. R. (1999) The genetics of cattle. Ed R. Ries and A. Ruvinsky CAB International

BENAVIDES, T. A. (2003). Efecto de las variantes genéticas A y B de k-Caseína y β -lactoglobulina sobre las propiedades de coagulación de la leche. Tesis de grado en Lic. en Ingeniería de alimentos. Universidad Austral de Chile.

BLECK G.; BREMEL R. (1993) Correlation of the α -lactalbumin polymorphism to milk production and milk Composition of Holstein. En: J. Dairy Sci. Vol. 76: 2292-2298.

BLECK G.; BREMEL R. (1994) Variation in expression of a bovine α -lactalbumin transgene in milk of transgenic mice. En: J. Dairy Sci. Vol. 77:897-1904.

BOETTCHER P. J.; CAROLI A.; STELLA A.; CHESSA S.; BUDELLI E. CANAVESI F.; GHIROLDI S.; PAGNACCO G. (2004): Effects of casein haplotypes on milk production traits in Italian Holstein and Brown Swiss cattle. J. Dairy Sci., 87: 4311–4317.

BRAUNSCHWEIG M.; HAGGER C.; STRANZINGER G.; PUHAN Z. (2000) Associations between Casein haplotypes and Milk production traits of Swiss Brown cattle. En: J. Dairy Sci. 76:1387-1395.

CASAS I.; VALDERRAMA M. (1998). El Bovino Criollo HV. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira – Asociación Nacional de Criadores de Ganado Hartón del Valle. ASOHARTON. Palmira, Diciembre. 55pp

CAROLI A.; CHESSA S.; BOLLA P.; BUDELLI E.; GANDINI G. (2004) Genetic structure of milk protein polymorphism and effects on milk production traits in local dairy cattle. En: J. Anim. Breed. Genet. 121:141 - 142.

CERIOTTI G. MARLETTA , D. CAROLI A.AND ERHARDT G. (2004). Milk protein loci polymorphism in taurine (*Bos taurus*) and zebu (*Bos indicus*) populations bred in hot climate. J. Anim. Breed. Genet. 121: 404–415

DOVC P. (2000) Genetic polymorphisms in milk protein genes and their impact on milk composition. En: Adv Exp Med Biol. 480:..225-230.

EGITO A; PAIVA S; ALBUQUERQUE M.S; MARIANTE A; ALMEIDA L.D.; CASTRO S.; GRATTAPAGLIA D. (2007) Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. *BMC Genetics* 8:83

ESCOBAR, M. (1999) Estimación de valores genéticos para características de importancia económica en bovinos en cinco fincas del Valle del Cauca. Trabajo Dirigido de Grado Carrera de Zootecnia Universidad Nacional de Colombia Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 171 p.

EXCOFIER, L; SMOUSE P. E. and QUATTRO J. M. (1992) Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*. Vol. 131; p.479-491

FARRELL, H. M; JIMENEZ-FLORES, R; BLECK, G. T; BROWN, E. M; BUTLER, J. E; CREAMER, L. K; HICKS, C. L; HOLLAR, C. M; NG-KWAI-HANG, K. F. SWAISGOOD, H. E. N (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision En: J Dairy Sci. Vol. 87; p.1641-1674.

FREYER, G; ERHERDT, G. PANICKE, L. (1999) Casein polymorphism and relation between milk production traits. En: J. Anim. Breed. Genet. 116:87-97.

FORMAGGIONI P.; SUMMER M.; MARACARNE; MARIANI P. (1999) Milk protein polymorphism: Detection and diffusion of the genetic variants in Bos genus. Annal. della Fac. di Med. Vet. XIX: 127-165.
<http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/formaggioni/formaggioni.htm>

GHASHGHAEI, K. (2003) Effect of cow phenotype and milk protein structure on biofouling rates in heat exchangers. Thesis. Master of Science. California Polytechnic State University. Saint Louis Obispo.

GIOVAMBATTISTA G.; RIPOLI M. V. P.; PERAL-GARCIA M. V.; BOUZAT J. L. (2001) Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: the Argentinean Creole cattle. En: Anim. Genet. 32:240-247.

GOLIJOW C.; GIOVAMBATTISTA G.; RÍPOLI M. V.; DULOUT F. N; LOJO M. M. (1999) Genetic variability and population structure in loci related to milk production traits in native argentine creole and commercial argentine holstein cattle. En: Genetics and Molecular Biology. 22 (3): 395-398.

GRASSELLI M.; DEL CAÑIZO A.; FERNANDEZ H.; MIRANDA M.; CAMPERI S. CASCONO O. (1997) ¿Qué hacer con el suero del queso? En: Ciencia Hoy. 8 (43).

GUO S.; THOMPSON E. (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 48:361-372.

HARTL, D.; CLARK, A. (1997) Principles of population genetics. Third edition. Sinauer associates Inc. p 541.

HAYASHI K. (1992) PCR SSCP Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR products. Chapter 4. En: Searching for the presence of unknown mutations. 14-22 p.

KUČEROVÁ J, MATĚJÍČEK A., JANDUROVÁ O.M., SØRENSEN P., NĚMCOVÁ E., ŠTÍPKOVÁ M, KOTT T, BOUŠKA J, FRELICH J. (2006) Milk protein genes *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LGB* and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. Czech J. Anim. Sci., 51, (6): 241–247

LIN C. Y.; MCALLISTER A. J. (1986) Effects of milk protein loci on first lactation production in dairy cattle. En: J. Dairy Sci. 69:704-712.

LIRON J. P.; RIPOLI M. V; De LUCA J. C.; PERAL-GARCIA P.; GIOVAMBATTISTA, G. (2002) Analysis of genetic diversity and population

structure in Argentine and Bolivian Creole cattle using five loci related to milk production. En: Genetics and Molecular Biology. Sao Paulo. 24 (4):413-419.

LIRÓN J P.; PERAL-GARCÍA P.; GIOVAMBATTISTA G. (2006) Genetic characterization of argentine and bolivian creole cattle breeds assessed through microsatellites Journal of Heredity 97(4):331–339

LOPEZ M.; HERNANDEZ V.; ESTRADA L. (1999) Correlación entre haplotipos para la K-caseína y características de producción láctea en Bovinos Holstein. En: Revista colombiana de biotecnología. Santa Fe de Bogota. II (2):16-20

MACHUGH D.E.; SHRIVER M.D.; LOFTUS R.T.; CUNNINGHAM P.; BRADLEY D.G. (1997) Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). Genetics 146: 1071–1086.

MAO F.C. (1994) Rapid communication: a bovine α -lactalbumin gene *MnII* restriction fragment length polymorphism. En: J Anim. Sci. 72:529.

MILLER S. A.; Dikes, D. D.; Polesky H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Res., 16 (3):1215.

MLLER M. P. (1997). Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.

MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY CENTRE OF UNIVERSITY OF ALBERTA, CENTER INTERNATIONAL FOR INTERNATIONAL FORESTRY RESEARCH. (1997). Population genetic analysis. POPGEN versión 1.32 (32-bit).

NARANJO, J.; POSSO, A.; MUÑOZ J. (2007) Detección de las variantes alélicas de kappa-caseína en bovinos Hartón del Valle. Acta Agronómica. (Colombia) Vol. 53 (1): 53-57

NEI M.; ROYCHOUDHURY A. K (1974) Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. Genetics 76: 379-390.

NEI M. (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York. P. 512.

NEI M.; KUMAR S. (2000) Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University press. p. 333.

NG-KWAI-HANG K. F.; MOXLEY J. F.; MONARDES H. G. (1984) Association of genetic variants of Casein and milk serum proteins with milk, and protein production by dairy cattle. En: J. Dairy Sci. 67:835-840.

OEA/GTZ PUBLICACIONES. (2003) Optimización del rendimiento y Aseguramiento de Inocuidad en la Industria de Quesería. En: Oficina de ciencia y tecnología. Washington D C. USA.

http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/QUESO/queso.htm. (Acceso: 10 de junio, 2004).

ORDAS J. G. (1992) Selección de caseínas k bovinas mediante polimorfismos de ADN y PCR. En: A. Y. M. A. 32 (1):21-23.

PEREIRA A.; ERHARDT G.; MATOS C.; GAMA L.; FERRAND N. (2002) Evidence for a geographical cline of casein haplotypes in portuguese cattle breeds. En: Animal Genetics, 33:295-300.

PIEDRAHITA, A. M.; POSSO A.; MUÑOZ J. E.; ALVAREZ L. A.; (2008) Variabilidad Genética de Hartón del Valle mediante RAM. Acta Agronómica (Palmira). 57 (1):71-76.

PINZON, M. E. (1984); Historia de la ganadería bovina en Colombia. En: Suplemento Ganadero. Banco ganadero Vol. 4, no.1 p.208

POLI M. A.; HOLGADO F.; RABASA A. E. (2002) Frecuencias genotípicas y alélicas de los genes de caseína k y la lactoglobulina B en un rodeo de bovinos criollos en Argentina. En: III Simposio Iberoamericano sobre la conservación de los recursos zoogenéticos locales y el desarrollo rural. (25-27 nov. 2002: Montevideo, Uruguay) Programa y resúmenes. Area de mejoramiento genético animal, Facultad de veterinaria- UDELAR. p.12.

POSTIGLIONI A.; RINCÓN G.; KELLY L.; LLAMBÍ S.; FERNÁNDEZ G.; ANGELO M.; GAGLIARDI J.; TRUJILLO M.; DE BETHENCOURT K.; GUEVARA CASTELLANO A.; ARRUGA M. V. (2002) Biodiversidad genética en bovinos criollos del Uruguay. Análisis con marcadores moleculares. En: Arch. Zootec. 51:195-202.

PLOWMAN J. E.; CREAMER L. K. (1995) Restrained molecular dynamics study of the interaction between bovine casein peptide 98-111 and bovine chymosin and porcine pepsin. En: J. Dairy Res. 62: 451-467.

PRINZENBERG E. M.; KRAUSE I.; ERHARDT G. (1999) SSCP analysis at the bovine CSN3 *locus* discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, A(1)). En: Animal Biotechnology. 10:49-62

PRINZENBERG E.M.; ERHARDT G. (1999) A new *CSN3* allele in *Bos indicus* cattle is characterised by *MspI* RFLP. En: *Animal Genetics*. 30:164.

PRINZENBERG E. M.; HIENDLEDER S.; IKONEN T.; ERHARDT G. (1996) Molecular genetic characterization of new bovine kappa-casein alleles *CSN3F* and *CSN3G* and genotyping by RFLP. En: *Animal Genetics*. 27:347-349.

RAGAVAN T. J. (1999) Effect of genetic variants of b-casein on hydrolysis by different enzymes. En: *Animal Science Graduate Seminar (MSc. Research Proposal)*.

RAYMOND M.; ROUSSET F. (1995) GENEPOP (version 1.2): A population genetics software for exact test and ecumenicism. En: *Journal of Heredity* 86:248-249.

REYNOLDS J.; WEIR B. S.; COCKERHAM C. C. (1983) Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. En: *Genetics* 105:767-779.

RON M.; YOFFE E.; EZRA J. F.; MEDRANO J. I.; WELLER (1994) Determination of milk protein genotype effects on production traits of Israeli Holsteins. En: *J. Dairy Sci.* 77:1106-1113.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT (1990) User's guide. Proc Primcomp. Volumen 2. version 6. Fourth edition. 893-950 p.

SCHNEIDER S.; ROESSLI D.; EXCOFIER L. (2000) Arlequin ver. 2.000. A software for populations genetic data analysis. University of Genova. Switzerland. p.111.

SUNNUCKS P.; WILSON A. C.; BEHEREGARAY L. B.; ZENGER K.; FRENCH J.; TAYLOR, A. C. (2000) SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. En: *Molecular Ecology* 9:1699-1710.

SWAISGOOD, H. E. (1993). Review and update of casein chemistry. En: *J. Dairy Sci.* 76:3054–3061.

TRUJILLO E.; NORIEGA D.; CAMARGO M. (1999) Identificación de individuos portadores de las variantes alélicas A y B de kappa-caseína bovina para su utilización en mejoramiento animal. En: *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 12:254.

UFFO O.; MARTÍN-BURRIEL 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: 15-24

VAIMAN D. (1999) *The genetics of cattle*. Ed. R. Ries and A. Ruvinsky CAB International.

VAN EENENNAAN A.; MEDRANO J. F. (1991). Differences in alelic protein expression in the milk of heterozygous k-casein cows. *En: J. Dairy Sci.* 74:1491-1496.

VAN EENENNAAN A.; MEDRANO J.F. (1991). Milk Protein Polymorphisms in California Dairy Cattle. *En: J Dairy Sci.* 74:1730-1742.

VOELKER G. R.; BLECK G. T.; WHEELER M. B. (1997) Single-base Polymorphisms within the flanking region of the bovine α -lactalbumin gene. *En: J Dairy Sci.* 80:194-197.

WEIR B. S.; COCKERHAM C. C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of populations structure. *In. Evolution*, 38:1358-1370.

WHEELER M. B. (2003) Production of transgenic livestock: promise fulfilled. *En: J. Anim. Sci.* 81(3):32-37.

WRIGHT S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 295-420.

YEH F. C.; BOYLE T. J. (1997) Popgene Version 1.32. Microsoft Windows based Software for population genetic analysis. pp. 135

CAPITULO III - DIVERSIDAD GENETICA Y ANCESTRALIDAD DEL GANADO HARTON DEL VALLE MEDIANTE ADN MITOCONDRIAL E INTROGRESION MEDIANTE MICRO-SATELITES DEL CROMOSOMA Y

1. INTRODUCCIÓN

El genoma mitocondrial de los mamíferos es una molécula circular de aproximadamente 16 kb que contiene 37 genes y una región control no codificante (Anderson, 1982). La región control del ADN mitocondrial (ADNmt) contiene las principales secuencias regulatorias para la transcripción e iniciación de la replicación e incluye una estructura conocida como D-loop. Al igual que en los humanos, en el ADNmt de los bovinos se han encontrado dos regiones mayores hipervariables: la primera, de 375 pb, situada entre el extremo 5' y la región central y contiene el 58% del número promedio de sustituciones; la segunda está ubicada en el extremo 3' (Loftus *et al.*, 1994).

El ADNmt puede aislarse fácilmente porque está presente en un alto número de copias en la mayoría de las células somáticas, evoluciona entre cinco y diez veces más rápido que el ADN nuclear y la región D-loop muestra una tasa de evolución aún mayor, no presenta ninguna forma de recombinación puesto que se transmite exclusivamente a través de linajes maternos, razón por la cual es útil para la reconstrucción de filogenias. Usualmente, son referenciados como haplotipos con múltiples alelos y las relaciones evolutivas son interpretadas como estimaciones de filogenia matriarcal (Vaiman, 1999).

El análisis de la diversidad genética existente en las secuencias de ADN mitocondrial es una herramienta para el conocimiento del origen y naturaleza de

los procesos de domesticación y diversificación de los bovinos. La principal subdivisión fenotípica del ganado en *Bos taurus* y *Bos indicus* está altamente correlacionada con una marcada diferenciación en las secuencias de ADNmt (Loftus, *et al*, 1994). Las secuencias mitocondriales de seis razas representativas de Europa (taurinas), tres razas de la India (indicinas) y cuatro africanas (tres indicinas y una taurina) mostraron dos linajes geográficos que no correspondieron con la dicotomía taurino-indicino: las razas europeas y africanas presentaron un linaje y las indias otro. Esta divergencia fue interpretada como la evidencia de que ocurrieron dos eventos independientes de domesticación para *Bos taurus* y *Bos indicus* y la agrupación de los cebú africanos en el linaje taurino se atribuyó a cruces ancestrales con *Bos taurus* (Loftus, *et al*, 1994). La divergencia entre ambos parece haber ocurrido en los orígenes de la domesticación del ganado hace 12.000 años (Bradley *et al.*, 1996).

Los linajes de ADNmt en el ganado *Bos taurus* europeo son un subgrupo de aquellos encontrados en el Cercano Oriente lo que concuerda con el origen del ganado europeo (Troy *et al.*, 2001). El ganado africano *Bos taurus* tiene linajes de ADNmt que se diferencian filogenéticamente de otras poblaciones taurinas y se encuentran con baja frecuencia en el Cercano Oriente (Bradley, *et al.*, 1996; Troy *et al.*, 2001).

Estudios comparativos de la región control de ADNmt han revelado la sorprendente complejidad en la historia evolutiva del viejo y nuevo mundo (Bruford *et al.* 2003). En el mediterráneo, los haplotipos del ganado moderno *Bos taurus* pertenecen a uno de cuatro grupos de secuencias T, T1, T2 y T3: el 94% de las poblaciones africanas portan el haplotipo T1, que raramente se encuentra fuera de éste continente (6% en el Cercano Oriente), en contraste, las poblaciones modernas de ganado europeo portan dos haplotipos similares T y T3 (94%), que decrecen en el Medio Oriente (65-74%) y casi desaparecen en África (6%). El haplogrupo T2 está presente en un 6% en Europa, 21-27% en el Cercano Oriente

y ausente en África. La distribución de los haplogrupos ha sido interpretada como indicador de que el origen del ganado europeo fue en el Medio Oriente y que hubo una domesticación independiente para el ganado africano (Bradley *et al.* 1996, Troy *et al.* 2001, Hanotte *et al.* 2002).

En ganado portugués se estudió la variación de secuencias de la región D-loop y el análisis filogenético y la comparación de secuencias mostraron dos haplotipos predominantes: E₁ correspondiente a la ancestría europea y A₁ que refleja el mestizaje con ganado africano en los orígenes de las razas ibéricas, explicado por la ocupación árabe a la península (Cymbron *et al.*, 1999).

Meireles *et al.*, (1999), utilizaron los polimorfismos de ADNmt para estudiar los niveles de introgresión *Bos taurus* en cebú brasilero y encontraron una mayor participación de matrilineas de origen taurino en el cebú americano puro: 79, 73 y 100% para Nellore, Gyr y Brahman, respectivamente, indicándolo una influencia significativa de razas taurinas en la formación de las razas de cebú americano.

Carvajal-Carmona *et al.*, (2003) examinaron la ancestría genética y la diversidad en 110 muestras de siete razas ganado criollo colombiano (GCC), mediante el estudio de la región control del ADNmt. La diversidad fue mayor en el GCC que en el ganado europeo y africano y el 26% de los linajes mitocondriales correspondieron a ancestría africana (T1), explicado por eventos de intercambio entre la península ibérica y el Norte de África, antes de la introducción del ganado a América. En 21 muestras de ganado Hartón del Valle encontraron T1 (38%), T2 (29%) y T3 (33%), mientras que en las demás razas T3 fue el más común. El análisis de la estructura genética reveló que el Hartón, el Blanco Orejinegro y el Sanmartinero se diferenciaron de las otras razas, lo cual supone una ancestría diferenciada. En razas criollas de ganado del Caribe y Brasil también se han encontrado haplotipos europeos y africanos (Magee *et al.*, 2002; Miretti *et al.*, 2004, Egipto, 2007).

El ganado doméstico presenta diferencias relacionadas con el sexo en poblaciones mezcladas y pueden revelar los patrones de migración (MacHugh, 1997); los linajes masculinos pueden reflejar historias evolutivas diferentes a las proporcionadas por los linajes maternos (Edwards *et al.*, 2000). Los microsatélites del cromosoma Y son de especial interés porque son haploides y de herencia paterna. La morfología del cromosoma para las razas cebuínas de Asia y África es acrocéntrica mientras que para las razas taurinas es submetacéntrica (Bradley *et al.*, 1994). Hanotte *et al.*, (1997) encontraron el microsatélite INRA 124 específico de Y, en el cual se hallaron el alelo 132 pb específico para ganado *Bos taurus* y el alelo 130 específico para ganado *Bos indicus*.

Edwards *et al.*, (2000) evaluó un panel de cuatro microsatélites (INRA124, INRA126, INRA189 y BM861) que amplificaron y mostraron polimorfismo en bovinos (*Bos taurus* y *Bos indicus*) y las especies relacionadas Bisonte (*Bos bisón*), Mithan (*Bos bibos*) Búfalos (*Bubalus arnee*) y Yak (*Bos grunniens*). Los microsatélites mostraron alelos cebú-específico y taurino-específico, útiles en la descripción del flujo genético en poblaciones híbridas.

En un estudio realizado en el África sub-Sahariana se reportó la frecuencia de alelos específicos *Bos taurus* y *Bos indicus* en razas de ganado africano, mediante el microsatélite INRA 124; se analizaron 984 machos de 69 poblaciones indígenas en 22 países. El alelo *Bos taurus* se presentó en 291 machos (30%) y el *Bos indicus* en 693 machos (70%), pero, particularmente, el alelo *Bos indicus* se presentó en el 96% de los machos cebú y en el 50% de los machos taurinos (Hanotte, *et al.*, 2002). Giovambattista *et al.* (2000) estudió la frecuencia de los haplotipos del cromosoma Y (*Bos taurus* y *Bos indicus*) en las razas de ganado criollo Argentino y Boliviano mediante el marcador microsatélite INRA 124; el haplotipo indicus se presentó en un 14.4% y el taurino en un 85.6% de los machos estudiados. Así mismo, logró constatar que estos polimorfismos sugieren una introgresión cebuína en Suramérica.

Este trabajo aborda el estudio de la diversidad, la estructura genética y la ancestralidad de la raza Hartón del Valle, mediante el análisis del ADN mitocondrial. También evalúa el grado de introgresión con ganado Cebú Brahman con el microsatélite INRA124, situado en el cromosoma Y.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la diversidad del Ganado Hartón del Valle y las relaciones con razas taurinas y cebuínas.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar la diversidad haplotípica y nucleotídica de la región control del ADNmt, en Hartón del Valle.
- Determinar por vía materna, si la población está estructurada en linajes.
- Realizar la reconstrucción de posibles conexiones con razas colombianas y de todo el mundo, mediante la comparación con secuencias depositadas en el GenBank.
- Cuantificar la magnitud de la Introgresión de ganado *Bos indicus* en el Hartón del Valle, mediante microsatélites del cromosoma Y.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MUESTRAS, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN

El ADNmt de 97 individuos se obtuvo de muestras de sangre, procesadas mediante la metodología de desalamiento (Miller *et al.*, 1998). Se secuenció la región control de 72 animales HV, provenientes de 9 poblaciones y de controles de las razas Brahman (N=6) y Holstein (N=9) y F₁ con Hartón del Valle (N=10). Se amplificó un fragmento de 350 pb ubicado en la región más variable del D-loop con los *primers* AN4 (5'-GGTAATGTACATAACATTAATG-3') y AN3 (5'-CGAGATGTCTTATTTAAGAGG-3'), descritos por Cymbron *et al* (1998). La secuencia, fue seleccionada por haber sido utilizada ampliamente en diferentes trabajos con razas ibéricas y criollas de América, con el fin de establecer comparaciones (Bradley *et al.*, 1996; Cymbron *et al.*, 1999; Magee *et al.*, 2002; Miretti *et al.*, 2002; Carvajal-Carmona *et al.*, 2003; Mirol *et al.*, 2003; Beja-Pereira *et al.*, 2006; Lirón *et al.*, 2006; Egito, 2007).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando un volumen total de 50 µl con 50 ng de ADNmt, 0.6 unidades de Taq polimerasa, 10X de buffer de PCR, 3.5 mM de MgCl₂, DNTPs con concentraciones de 1.25 mM y primers 20µM forward y revers. El protocolo de termorregulación fue: 3 minutos de denaturación inicial, seguidos de 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 40 segundos a 55 °C, 40 segundos a 72°C y extensión final de 72°C por 4 minutos. En el alineamiento del segundo ciclo de amplificación, se hizo una pausa por 3 minutos a 55°C. El amplificado se visualizó en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y corridos a 70 voltios por 30 minutos. El tamaño del fragmento se comparó con un marcador de peso de 100 pb. Se enviaron a secuenciar ambos lados de la cadena de ADN. La edición y alineación de secuencias se realizó mediante el

programa Sequencer versión 6.1.0 (Gene Code Corporation, Ann Arbor U.S, Michigan).

Las secuencias de este trabajo fueron comparadas con 559 secuencias de la región control del ADNmt depositadas en el GenBank, que representan 50 razas originarias de África, España, Portugal, India, Argentina, Bolivia, Colombia y el Caribe (Tabla 1); estas secuencias también fueron utilizadas para investigar las relaciones filogenéticas con el HV.

Para el análisis de microsatélites con cromosoma Y se tomaron muestras de sangre de 49 machos provenientes de 10 fincas, de los cuales 38 eran HV, dos H, un cebú B (utilizado como control) y 8 HVC. Se extrajo el DNA mediante protocolo Salting Out (Miller *et al.*, 1998). La amplificación consistió en un paso de denaturación inicial a 93°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 40 s a 93 °C, 40 s a 56 °C y 40 s a 72 °C, y una extensión final de 5 min a 72°C. Para distinguir los alelos específico de los taurinos (132 bp) o cebuíno (130 bp) se utilizó electroforesis de geles denaturantes de poliacrilamida al 6% y se visualizó por tinción con plata en Cámaras de Secuenciación Fisher de 35 x 45 cm. La estimación de las frecuencias de los alelos se realizó por conteo directo.

Tabla 1. Razas estudiadas de acuerdo con sus regiones de origen, número de animales muestreados, referencia y número de acceso en GenBank (Fecha de acceso Marzo 2008).

RAZA	Sigla	País	N	Referencia	Accesos
Kenana	KEN	África	9	Bradley <i>et al.</i> 1996; Troy <i>et al.</i> , 2001; Loftus <i>et al.</i> , 1994b	L27728, L27729, U51835, U21836; AF336729 a AF336733
Kuri	KUR	África	10	Troy <i>et al.</i> 2001	AF336677 a AF336686
Butana	BUT	África	14	Bradley <i>et al.</i> , 1996; Troy <i>et al.</i> 2001; Xuebin <i>et al.</i> , unpublished	U51831 a U51834; AF336711 a AF336717; AY378138 a AY378140
White Fulani	FUL	África	9	Bradley <i>et al.</i> , 1996; Troy <i>et al.</i> 2001; Loftus <i>et al.</i> , 1994b	U51840 a U51842; L27720, L27721: AF336677 a AF336686
Egiption	EGT	África	11	Troy <i>et al.</i> , 2001	AF336718 a AF336728
Nanchi	NAN	África	10	Troy <i>et al.</i> , 2001	AF336701 a AF336710
Somba	SOM	África	10	Troy <i>et al.</i> , 2001	AF336666 a AF336675
Kurdi	KUD	África	10	Troy <i>et al.</i> , 2001	AF336646 a AF336655
N'Dama	NDA	África	8	Troy <i>et al.</i> , 2001	AF336656 A 336663
Kapsiki	KAP	África	10	Troy <i>et al.</i> , 2002	
Criollo Argentino	ARC	Argentina	17	Miretti <i>et al.</i> 2002 ; Mirol <i>et al.</i> , 2003	AF517789 a AF217798, AF531381, AF531384, AF531392, AF531394, AF531402, AF531404, AF531406
Criollo Boliviano	BOC	Bolivia	8	Mirol <i>et al.</i> , 2003	AF531382, AF531385, AF531391, AF531393, AF531405, AF531407, AF531408, AF531409
Santa Lucia Criollo	SLC	Caribe	10	Magee <i>et al.</i> , 2003	AY235780 a AY235790
Guadalupe Criollo	GDC	Caribe	13	Miretti <i>et al.</i> , 2004; Magee <i>et al.</i> , 2003	AY426319 a AY426321; AY235767 a AY235773
Antigua Criollo	ATC	Caribe	10	Magee <i>et al.</i> , 2003	AY235742 a AY235751
Alistana	ALI	ESPAÑA	5	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515547 a DQ515551
Retinta	RET	ESPAÑA	4	Miretti <i>et al.</i> , 2004; Mirol <i>et al.</i> ,	AY426323, AY426324, AF531410, AF531411
Tudanca	TUD	ESPAÑA	6	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515601 a DQ515606
Rubia Gallega	RUB	ESPAÑA	4	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515597 a DQ515600
Pajuna	PAJ	ESPAÑA	9	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515583 a DQ515591
Negra Serrana	NSE	ESPAÑA	5	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515578 a DQ515582
Monchina	MOC	ESPAÑA	5	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515573 a DQ515577
Murciana	MUR	ESPAÑA	3	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515560 a DQ515562
Mostrenca	MOS	ESPAÑA	5	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515555 a DQ515559
Morucha	MOR	ESPAÑA	5	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515550 a DQ515554
Cárdena Andaluza	CRA	ESPAÑA	7	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515594 a DQ515500
Berrenda	VER	ESPAÑA	18	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515584 a DQ515591; AF3362492 a AF3365501
Asturiana Montaña	ASM	ESPAÑA	3	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515559 a DQ515561

Continuación Tabla 1. Razas estudiadas de acuerdo con sus regiones de origen, número de animales muestreados, referencia y número de acceso en GenBank (Fecha de acceso Marzo 2008).

RAZA	Sigla	País	N	Referencia	Accesos
Lidia	LID	ESPAÑA	5	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515508 a DQ515512
Albera	ALB	ESPAÑA	6	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515541 a DQ515546
Preta	PRE	Portugal	4	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515592 a DQ515595
Maronesa	MAR	Portugal	9	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515563 a DQ515572
Mertolenga	MER	Portugal	10	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515537 a DQ515547
Garvonesa	GAR	Portugal	7	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515501 a DQ515507
Barrosa	BAR	Portugal	9	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515562 a DQ515571
Alentejana	ALE	Portugal	10	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515531 a DQ515540
Lidia	LIDp	Portugal	5	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2006	DQ515522 a DQ515526
Costeño con Cuernos	CCC	Colombia	10	Carvajal-Carmona <i>et al.</i> , 2003	AY444483 a AY444492
San Martinero	SMT	Colombia	10	Carvajal-Carmona <i>et al.</i> , 2003	AY444464 a AY444473
Romosinuano	ROM	Colombia	10	Carvajal-Carmona <i>et al.</i> , 2003	AY444445 a AY444454
Harton del Valle	HV	Colombia	10	Carvajal-Carmona <i>et al.</i> , 2003	AY444425 a AY444434
Chino Santandereano	CHI	Colombia	8	Carvajal-Carmona <i>et al.</i> , 2003	AY444406 a AY444413
Casanareño	CAS	Colombia	4	Carvajal-Carmona <i>et al.</i> , 2003	AY444402 a AY444405
Blancorejinegro	BON	Colombia	12	Carvajal-Carmona <i>et al.</i> , 2003	AY444390 a AY444401

3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de clados anidados a partir del programa TCS version 1.1.3 el cual representa el menor número de pasos posibles (método parsimonioso) para acomodar toda una red de haplotipos (Clement *et al*, 2000). Esta red puede interpretarse como una medida de distancias para inferencia de la distribución espacial de haplotipos. La distribución de los haplotipos en HV y las relaciones con razas criollas colombianas, suramericanas, europeas y africanas se realizó mediante la construcción de redes haplotípicas (networks) por el método de median joining (MJN) (Bandelt *et al.*, et 1999), con el programa NETWORK 4.1.0.8 (www.fluxusengineering.com).

Las secuencias fueron comparadas con 559 secuencias depositadas en el GenBank, que representan 50 razas bovinas originarias de África, España, Portugal, India, Argentina, Bolivia, Colombia y el Caribe. Los polimorfismos se identificaron por comparación con la secuencia de referencia NC_001567 (Anderson *et al.* 1982), que es el haplotipo central (*Eucons*) del cluster taurino europeo (T3) (Troy *et al.* 2001). Las variaciones con respecto a la secuencia consenso u otra raíz de haplotipos (*Afcons*) se registraron de la siguiente manera: el haplotipo *Afcons* es considerado la raíz del cluster taurino africano (T1) y se diferencia de *Eucons* por las transiciones C→T, T→C, y T→C en las posiciones 16050, 16113, y 16255, respectivamente (*Afcons* (*Eucons* 050T-113C-255C)).

Las matrices de distancia se basaron en el modelo de Kimura 2-parámetros. A partir de las matrices de distancia se construyeron dendrogramas utilizando el agrupamiento Neighbor-Joining (Consensus Network), con el programa SplitTree4 (<http://www-ab.informatik.unituebingen.de/software/splitstree4/welcome.html>).

4. RESULTADOS

4.1 DIVERSIDAD DE LA REGIÓN CONTROL DEL ADN DEL HARTÓN DEL VALLE

4.1.1 Haplotipos y linajes. El análisis de la región hipervariable del ADNmt de 97 secuencias de ganado HV y los grupos control se basó en un fragmento de 350 pb (Figura 1).

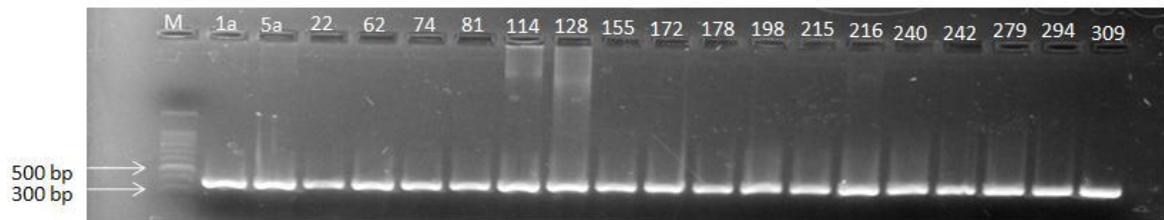


Figura 1. Fragmento de 350 pb de la región control del ADNmt de bovinos Hartón del Valle. Celda 1: Marcador de peso molecular de 100 bp.

La alineación y comparación entre las secuencias en la población total, revelaron 16 tipos mitocondriales, definidos por el polimorfismo de 26 sitios (Tabla 2, Figura 2). Se encontraron 14 haplotipos en HV, 4 en H y 3 en B y HVC. La mayoría de los individuos muestreados en los diferentes grupos genéticos, se clasificaron en el haplotipo I (59%), que es idéntico a la secuencia consenso europea, III (12.3%) y IV (10.3%). El haplotipo XV fue único en la raza B y el IX solo se presentó en H y HVC. Alrededor del haplotipo I se observan varios haplotipos circundantes.

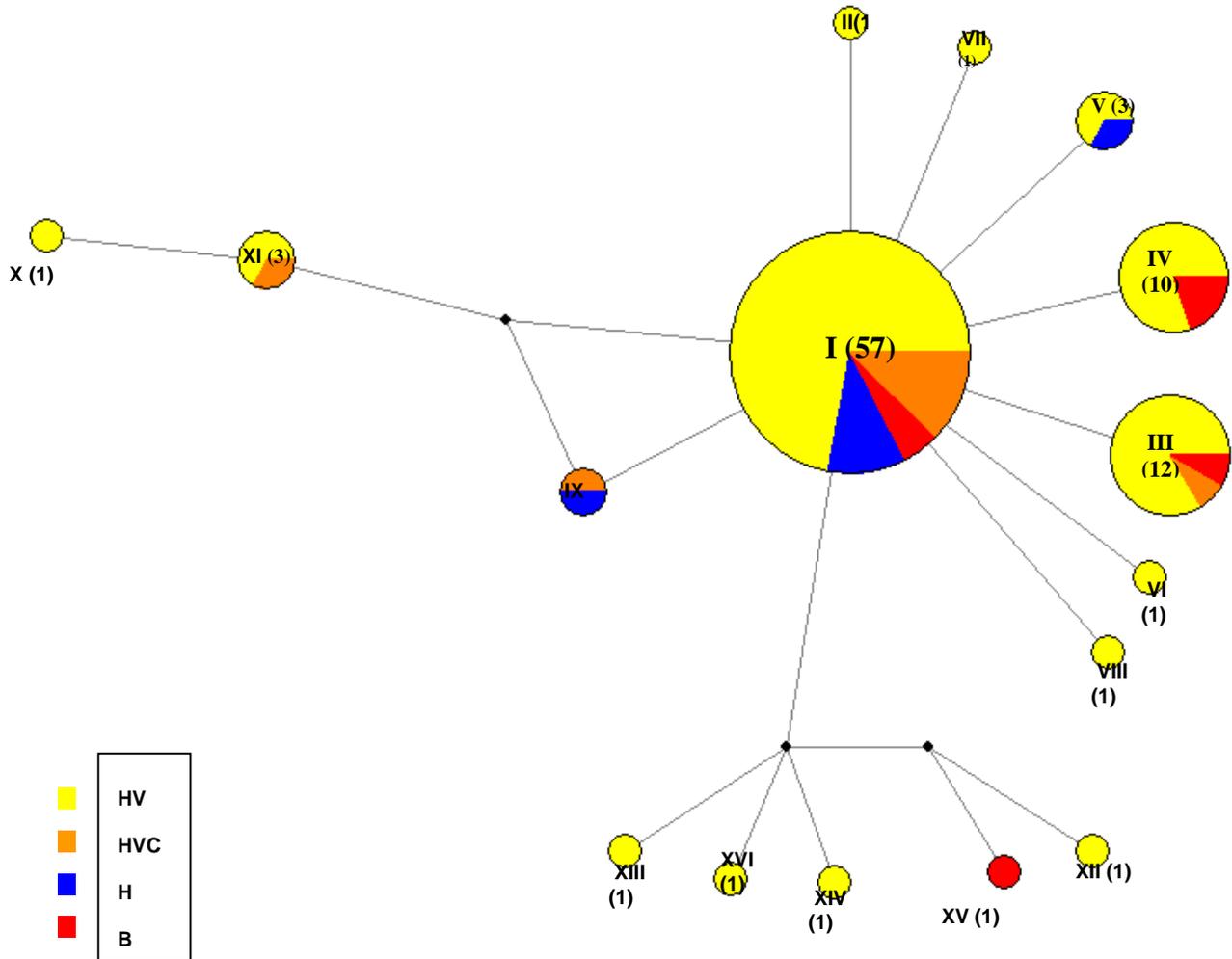


Figura 2. Red de Haplotipos de ADNmt en HV, B, H y HVC. Los círculos representan las secuencias haplotípicas, el área es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Los puntos negros representan haplotipos no muestreados o extintos. En números romanos el haplotipo y el número de individuos entre paréntesis.

En las 72 secuencias de HV, se encontraron 14 haplotipos definidos por el polimorfismo de 24 sitios, de los cuales 18 fueron transiciones y 6 transversiones. Los haplotipos más frecuentes fueron: el I (57% de las secuencias), idéntico a la secuencia europea; el III (14%) y el IV (11%), respectivamente. Los demás

haplotipos ocurrieron en 1 o 2 individuos. No se encontraron los haplotipos IX y XV.

Con base en la presencia de nucleótidos en determinadas posiciones, se clasificaron las secuencias en linajes predefinidos por otros autores (Tabla 2) (Troy *et al.*, 2001; Miretti *et al.*, 2002). Los haplotipos I al X correspondieron al linaje T3, que es el haplotipo central (*Eucons*) de la secuencia europea de referencia para taurinos (*Eucons*) (Anderson *et al.*, 1982). Se encontró un haplotipo (XI) perteneciente al linaje T2, (definido por las posiciones 16054, 16185 y 16255), que es común en razas del Medio Oriente, en dos individuos HV y en uno HVC. Se halló el linaje T1, (definido por las posiciones 16050, 16113 y 16255) que considerado la raíz del “cluster” taurino africano (*Afcons*), representado en los haplotipos XII al XVI.

Todos los individuos H correspondieron al linaje T3 (Tabla 3). No se hallaron haplotipos cebuinos en la raza B; en esta raza se encontró un haplotipo ((XV) reportado como derivado del *Afcons* y solo se ha encontrado en razas criollas de América latina; éste haplotipo no se halló en HV.

En los animales HVC predominó el linaje T3, pero un individuo (HV x H) mostró un haplotipo único (XI) del linaje T2. Como era de esperarse, debido a su ancestralidad europea el linaje más común en HV fue el T3 (91.7%), representado por nueve haplotipos (Figura 3). Se encontraron cuatro haplotipos T1 (5.6%), lo cual sugiere la participación de razas africanas y un haplotipo T2 (2.7%) originario del Oriente Medio. La distribución de los haplotipos en HV, muestra tres niveles de agrupación: el primero con nueve haplotipos del linaje predominante T3, el segundo que incluye el haplotipo X de T3 y el linaje T2 y el tercero con los cuatro haplotipos que conforman el linaje africano T1.

Tabla 3. Número y Frecuencia relativa (% , entre paréntesis) de Linajes T1 (haplotipo taurino de origen africano), T2 (haplotipo taurino originado en Oriente Medio) y T3 (haplotipo taurino de origen europeo) en ganado HV, B, H y HVC

Raza y/o Cruce	N	T1	T2	T3
HV	72	4 (5.50)	2 (2.8)	66 (91.7)
B	6	1 (16.7)	0	5 (83.3)
H	9	0	0	9 (100)
HVC	10	0	1 (10)	9 (90)
Total	97	5.1	3.1	91.8

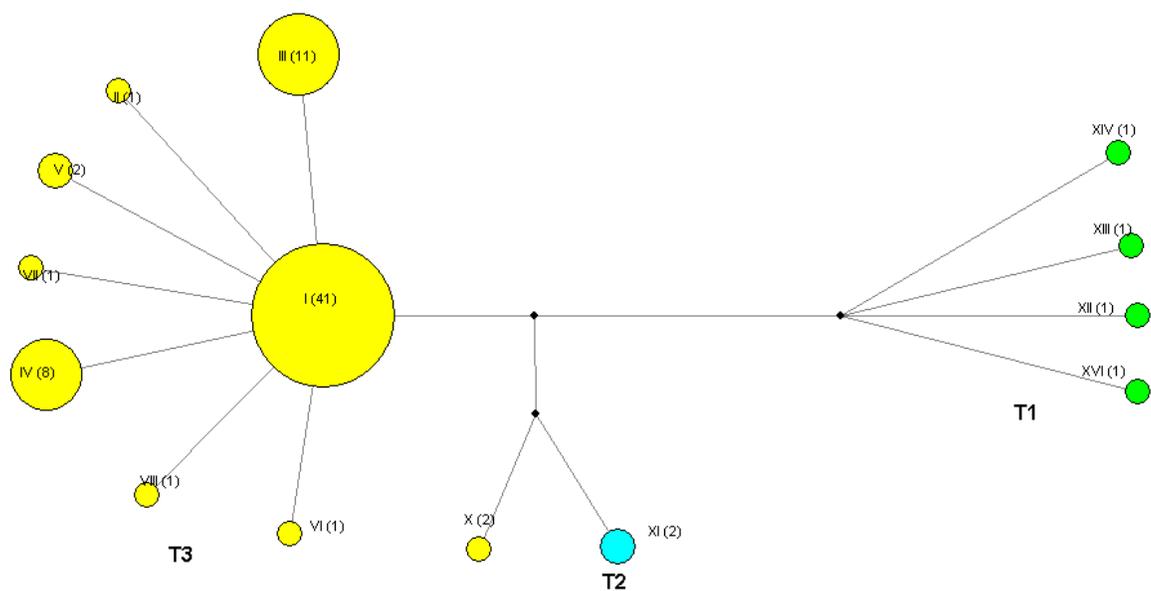


Figura 3. Red de Haplotipos de ADNmt de 72 individuos Hartón del Valle construida mediante el método “Median joining” (Bandelt *et al.*, 1999). Los círculos representan las frecuencias haplotípicas y el área es proporcional a la frecuencia del haplotipo. En números romanos el haplotipo y entre paréntesis el número de individuos. Los linajes se representan con colores: T1 (verde), T2 (azul) y T3 (amarillo). Las líneas representan el número de eventos mutacionales que separan los haplotipos. Los puntos negros son haplotipos extintos o no muestreados.

El haplotipo I, estuvo presente en las nueve poblaciones HV (Tabla 4); en JA todos los individuos pertenecieron a este grupo. Los haplotipos III (14%) y IV (11%) se hallaron en cinco y cuatro poblaciones, respectivamente. Los haplotipos II, VI y VII fueron únicos en CR, EC y ZH, respectivamente. LO se destacó porque fue la única que presentó los tres linajes y UN y PR mostraron dos linajes.

Tabla 4. Frecuencias relativas de haplotipos agrupados de acuerdo con el linaje y el hato en la raza Hartón del Valle.

Linaje	Haplotipo	Poblaciones								
		EC	CR	UN	GC	JA	LO	PR	SR	ZH
T3	I	0.42	0.20	0.84	0.33	1.00	0.47	0.70	0.63	0.33
	II	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	III	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.10	0.13	0.33
	IV	0.08	0.60	0.07	0.00	0.00	0.06	0.00	0.25	0.00
	V	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00
	VI	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	VII	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33
	VIII	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	X	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	T2	XI	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00
T1	XII	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.1	0.00	0.00
	XIII	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00
	XIV	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00
	XVI	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00
Haplotipos/ población		5	3	3	3	1	7	4	3	3

La diversidad haplotípica promedio estimada mediante el método de Nei (1987), en nueve hatos de la raza HV fue de 0.65 ± 0.05 (Tabla 5), valor inferior encontrado en la raza B pero superior al de H y HVC. Los hatos GC y LO se destacaron por tener la mayor diversidad haplotípica y nucleotídica, UN por la baja diversidad (0.26) y JA por ser uniforme a nivel de su ADNmt.

Tabla 5. Número de haplotipos, diversidad haplotípica y nucleotídica en nueve poblaciones de ganado HV y en las razas B, H y el cruce HVC, estimados mediante el método de Nei (1987) con el programa Arlequín. Numero de datos: N

Raza y/o cruce	Población	N	No Haplotipos	Diversidad Haplotípica	Diversidad Nucleotídica
HV	EC	12	5	0.75 ± 0.09	0.04 ± 0.03
	CR	5	3	0.70 ± 0.21	0.03 ± 0.03
	UN	13	3	0.29 ± 0.15	0.04 ± 0.03
	GC	3	3	1.00 ± 0.27	0.18 ± 0.15
	JA	3	1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	LO	15	7	0.77 ± 0.10	0.11 ± 0.06
	PR	10	4	0.53 ± 0.18	0.07 ± 0.04
	SR	8	3	0.60 ± 0.16	0.03 ± 0.03
	ZH	3	3	1.00 ± 0.27	0.05 ± 0.05
Subtotal		72	14	0.65 ± 0.05	0.06 ± 0.04
B		6	3	0.73 ± 0.15	0.11 ± 0.08
H		9	4	0.58 ± 0.18	0.02 ± 0.02
HVC		10	4	0.53 ± 0.18	0.05 ± 0.04

El análisis molecular de varianza (Tabla 6) no detectó diferencias significativas entre los grupos genéticos (HV, H, B y HVC) y el índice de fijación (F_{ST}) no fue significativo, porque heterogeneidad de varianzas no permitió detectar la diferenciación. Tampoco hubo diferencias entre las nueve poblaciones HV y no se detecto estructura genética entre ellas.

Tabla 6. Análisis de varianza molecular entre grupos genéticos (HV, H, B y HVC) y entre nueve poblaciones de Hartón del Valle.

Fuente de Variación	Gl.	Suma Cuadrados	Componentes de varianza	%	F_{ST}
Entre grupos genéticos	3	2.195	-0.003 Va	-0.49	-0.004 ^{ns}
Dentro de grupos genéticos	93	72.908	0.783 Vb	100.49	
Total	96	75.103	0.780		
Entre poblaciones de HV	8	7.962	0.028 Va	3.53	0.03 ^{ns}
Dentro de poblaciones	63	48.913	0.776 Vb	96.47	
Total	71	56.875	0.805		

4.2 RELACIONES DEL HARTÓN DEL VALLE CON EL GANADO CRIOLLO COLOMBIANO

Las 72 secuencias de HV fueron alineadas con 73 secuencias de Ganado Criollo Colombiano (GCC) publicadas en el GenBank (Carvajal-Carmona *et al.*, 2001) y la comparación entre ellas reveló 19 haplotipos representativos del linaje T3, 12 haplotipos para el linaje T1 y un haplotipo único del linaje T2 (Figura 4). La mitad de los haplotipos hallados en HV (7/14) no han sido reportados en GCC; dichos haplotipos son V, VI, VII, VIII, X, XII y XIII. De acuerdo con su ancestría europea la mayoría de las secuencias de HV y de GCC se ubicaron en el linaje T3. De los 12 haplotipos T1, cinco se hallaron en el HV. En el linaje T2 (haplotipo XI) se encontraron dos individuos HV y seis de GCC.

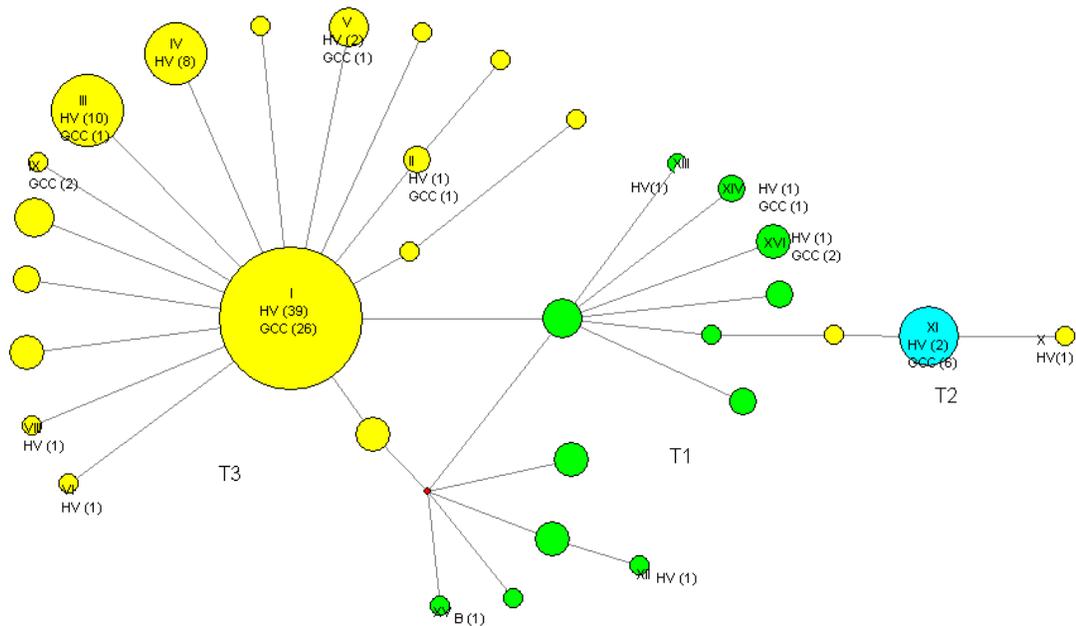


Figura 4. Red de haplotipos de 72 secuencias HV comparadas con 74 secuencias de Ganado Criollo Colombiano (GCC). Entre paréntesis el número de individuos. Los círculos representan las frecuencias haplotípicas y el área es proporcional a la frecuencia del haplotipo. En números romanos el haplotipo y entre paréntesis el número de individuos. Los linajes se representan con colores: T1 (verde), T2 (azul) y T3 (amarillo).

Se generaron matrices de distancia basadas en el modelo Kimura 2p, con las cuales se produjeron árboles filogenéticos mediante el agrupamiento *Neighbor-Joining*, teniendo en cuenta redes de consenso, con el programa Mega v3.0. Al relacionar las siete razas criollas colombianas con las de éste trabajo, se observó que el Blancorejinegro y el Chino Santandereano se diferenciaron notoriamente de las demás razas. El HV y sus cruces (HVC), mostraron proximidad con Romosinuano y Holstein; el Brahman se agrupó con el Casanareño y el San Martinero (Figura 5, Tabla 7).

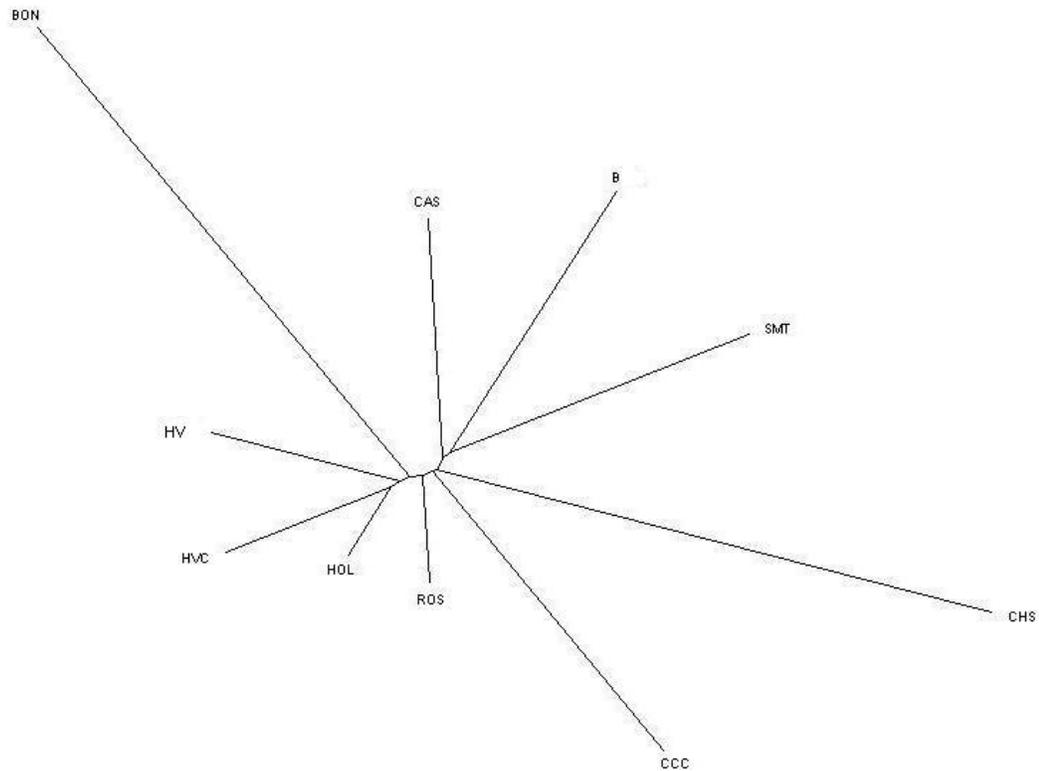


Figura 5. Árbol filogenético de ganado colombiano inferido a partir de una secuencia del D-loop basada en la distancia de Kimura 2p agrupadas por el método Neighbor joining. Hartón del Valle (HV), Hartón del Valle cruzado (HVC), Brahman (B), Holstein (HOL), Romosinuano (ROS), Sanmartinero (SMT), Blancorejinegro (BON), Casanareño (CAS), Chino Santandereano (CHS), Costeño con Cuernos (CCC).

Tabla 7. Matriz de distancia basada en el modelo Kimura 2p, entre ganado criollo colombiano, H y B, con el programa Mega v3.0. San Martinero (SMT), Romosinuano (ROS), Chino Santandereano (CHS) Blancorejinegro (BON), Casanareño (CAS) Costeño con Cuernos (CCC) Hartón del Valle (HV), Holstein (H) y Brahman (B).

	SMT	ROS	CHS	BON	CAS	CCC	HV	HVC	H	B
SMT										
ROS	0.0071									
CHS	0.0138	0.0107								
BON	0.0143	0.0108	0.0175							
CAS	0.0085	0.0055	0.0124	0.0132						
CCC	0.0107	0.0071	0.0141	0.0146	0.0093					
HVC	0.0087	0.0047	0.0120	0.0113	0.0075	0.0092				
HV	0.0087	0.0047	0.0122	0.0120	0.0073	0.0090	0.0057			
H	0.0070	0.0030	0.0108	0.0105	0.0058	0.0076	0.0039	0.0043		
B	0.0095	0.0066	0.0137	0.0142	0.0085	0.0106	0.0083	0.0083	0.0066	

4.3. RELACIONES DEL HARTÓN DEL VALLE CON RAZAS DEL MUNDO

Con el programa TCS se construyó una red de haplotipos con 559 secuencias de todo el mundo que incluyeron razas *Bos taurus* y *Bos indicus* (Tabla 1). Al depurar la red y excluir las secuencias no relacionadas con la información generada en este trabajo quedaron 353 secuencias, entre las cuales solo se hallaron secuencias de razas ibéricas, africanas y criollas de América Latina. La red

depurada reveló la presencia de 37 haplotipos diferentes, de los cuales el HV compartió nueve y siete fueron únicos (Figura 6).

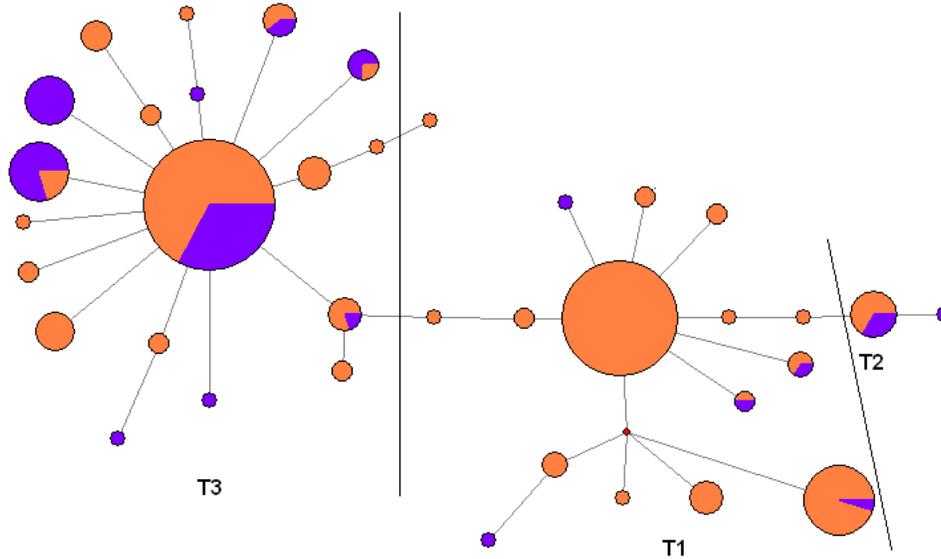


Figura 6. Red de haplotipos de 72 secuencias HV (violeta) comparadas con 353 secuencias de todo el mundo (naranja). Los círculos representan las frecuencias haplotípicas y el área es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Las líneas representan el número de eventos mutacionales que separan los haplotipos. El punto rojo es un haplotipo extinto o no muestreado.

En el haplotipo central del cluster T3 (*eucons*), se hallaron el 50% de las secuencias (175/353), que incluyeron 87 secuencias de HV (80% de éste trabajo), 29 secuencias de razas españolas (Pajuna, Lidia, Rubio Gallego, Avileña, Mostrenca, Murciana, Monchina, Morucha, Negra Serrana, Retinta, y Tudanca), 15 secuencias de razas portuguesas (Preta, Maronesa, Garvonesa y Mertolenga), 10 de Criollo Argentino, 2 de Criollo Boliviano, 6 de Criollo del Caribe y 3 de la raza Kuri de África.

El 15% de las secuencias se situaron en el haplotipo central del cluster africano (T1) (*afcons*). La mayoría de ellas (60%) correspondieron a animales de razas africanas (Egipcia, Kapsiki, N'Dama, Somba, White Fulani, Kuri y Kenana) y en

menor proporción de razas de España, Portugal, criollas del Caribe y Colombia (1 HV, 2 Romosinuano). Los cuatro individuos HV del linaje T1, encontrados en este trabajo se ubicaron en haplotipos periféricos.

En el linaje T2 se halló un haplotipo único que incluyó cinco HV, dos Blancorejinegro y un Chino Santandereano que parece haber evolucionado en Colombia, puesto que no incluye animales de otras razas.

La relación existente entre el HV con razas ibéricas y africanas se presenta en el Figura 7, donde se confirma la proximidad con las razas ibéricas principalmente las españolas Tudanca, Rubio Gallego, Negra Serrana, Murciana, Pajuna y Avileña y las portuguesas Garvonesa y Mertolenga. Así mismo, en un cluster distinto se encontraron las razas africanas, siendo la Kuri la más cercana al HV. Teniendo en cuenta las secuencias de razas Ibéricas, Africanas y Latinoamericanas, se construyó un árbol filogenético (Figura 8) que confirma la ancestralidad ibérica y la influencia africana en las razas criollas de América Latina; apenas la Criolla de Guadalupe se distancia de las demás. Con excepción del Blancorejinegro y el Chino Santandereano, las razas colombianas se agrupan en un cluster entremezcladas con razas españolas, portuguesas y con las criollas de Argentina, Bolivia y el Caribe.

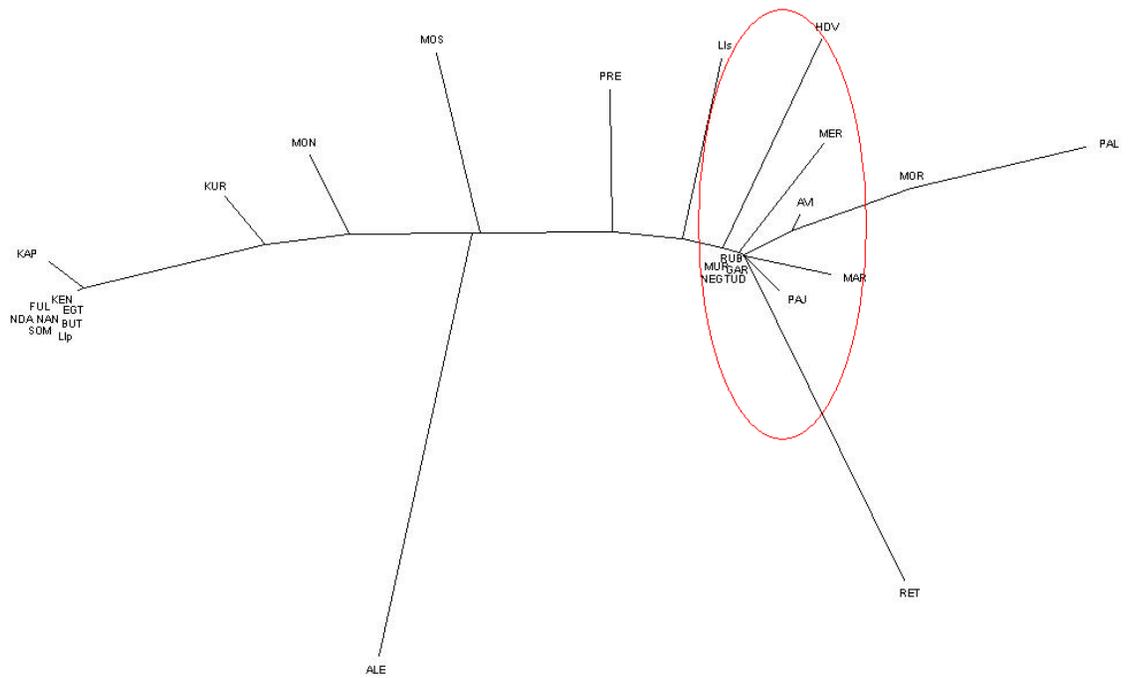


Figura 7. Árbol filogenético que relaciona el HV con razas ibéricas y africanas, inferido a partir de una secuencia del D-loop, basada en la distancia de Kimura 2p agrupadas por el método Neigborg joining con el programa Mega v.3.0

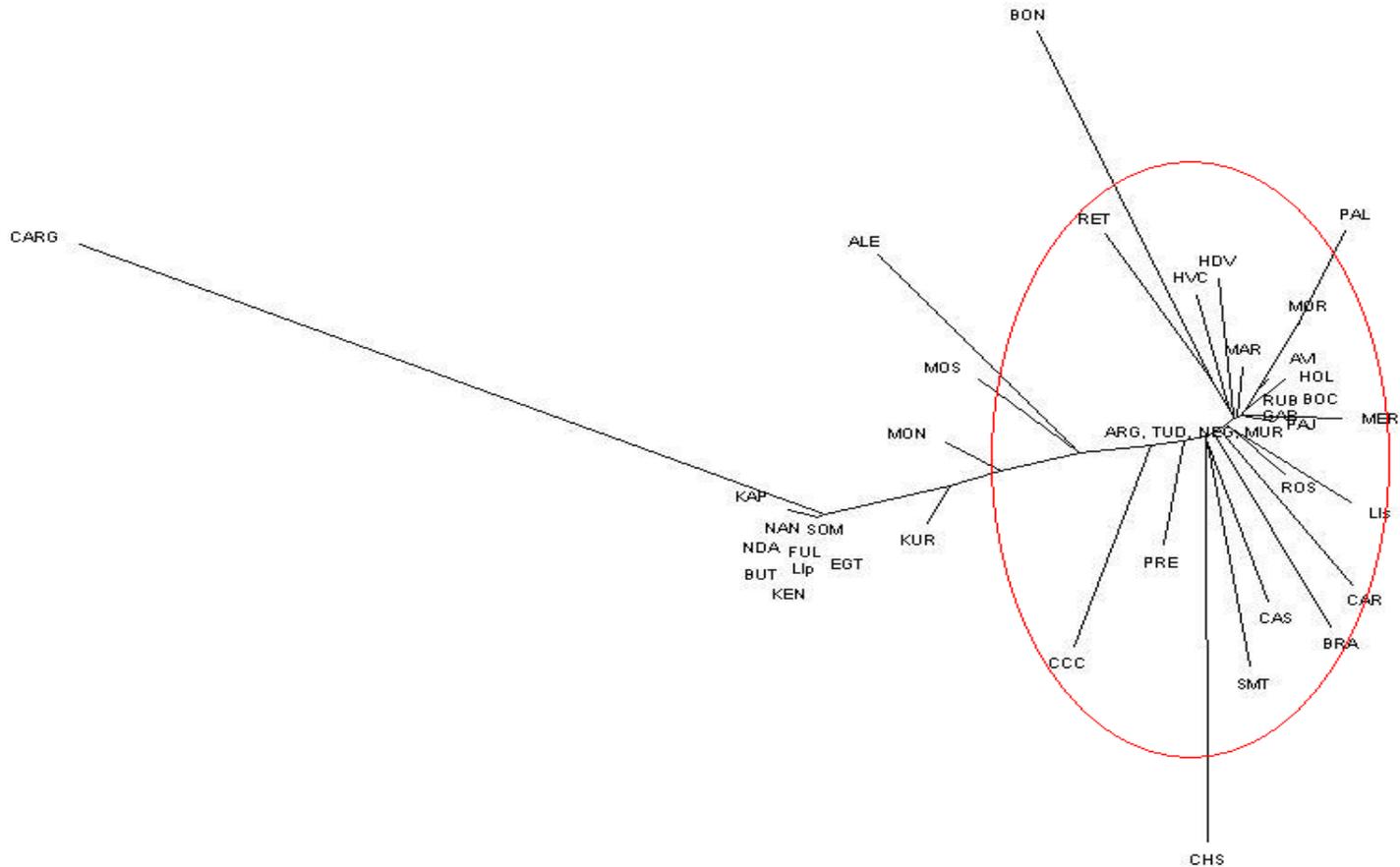


Figura 8. Árbol filogenético que relaciona el HV con razas ibéricas, Africanas y Latinoamericanas, inferido a partir de una secuencia del D-loop, basada en la distancia de Kimura 2p agrupadas por el método Neigborg joining con el programa Mega v.3.0.

4.4 INTROGRESIÓN DE *BOS INDICUS* EN GANADO HARTÓN DEL VALLE.

Aunque se probaron los microsatélites BM186, INRA126 e INRA189, los resultados fueron desechados porque estos sistemas amplificaron en hembras utilizadas como controles. La mayoría de los autores han detectado introgresión con el sistema INRA124, aunque no presentan la razón por la cual utilizan este único sistema. Con el microsatélite INRA124, se evaluaron 38 machos HV de nueve poblaciones (Tabla 8). El alelo específico de *Bos indicus* (130 pb) estuvo presente únicamente en dos machos HV, ambos provenientes de la misma finca (CR), para un porcentaje de introgresión de Cebú en HV del 5%.

Tabla 8. Número y proporción (%) de los alelos Y indicus y taurino amplificados con el microsatélite INRA124

Raza y/o cruce	N	Número de Alelos Y		Indicino	Taurino
		<i>indicus - taurus</i>		%	%
HV	38	2	36	5	95
Holstein	2	0	2	0	100
Brahman	1	1	0	100	0
HV x <i>Bos indicus</i>	1	1	0	100	0
HV x <i>Bos taurus</i>	7	0	7	0	100

5. DISCUSION

5.1 VARIACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL DEL ADNmt EN EL GANADO HARTÓN DEL VALLE

Basado en los resultados obtenidos es posible verificar la existencia de un pool altamente diverso en el ADNmt de la raza HV, puesto que se hallaron 14 haplotipos y tres linajes mitocondriales. Los diferentes haplotipos se definieron por el polimorfismo de 24 sitios, 18 de los cuales fueron transiciones y 6 transversiones, indicando el sesgo transicional, que ha sido previamente descrito en bovinos (Loftus *et al.* 1994; Bradley *et al.* 1996; Carvajal-Carmona *et al.* 2003). Este número de haplotipos fue notoriamente superior al hallado en HV (7) (Carvajal-Carmona *et al.* 2003) y en cuatro razas criollas brasileñas y una argentina (9) (Miretti *et a.*, 2002) y similar al encontrado en tres razas criollas de Caribe y la raza Nellore (17) (Maguee *et al.*, 2002).

El ganado bovino fue introducido al Caribe por los conquistadores españoles en 1943 (Wilkins, 1984) y en 1525 ya se había expandido a Centro y Suramérica; también se ha reportado embarques de ganado desde Portugal al Brasil (Primo, 1992) y que bovinos africanos fueron introducidos al continente, durante los siglos XVI y XVII, como consecuencia de las rutas de comercio de esclavos.

El HV presentó una gran influencia del ADmt europeo (T3) y una baja proporción de africano (T1), que se evidencia en la distribución de sus linajes (5.6, 2.7 y 91.7%, para T1, T2 y T3, respectivamente). Este resultado contrasta notablemente, con la proporción reportada para ésta raza (38, 29 y 33%) por Carvajal-Carmona *et al.*, (2003) quienes muestrearon 21 individuos en una sola finca. También, difiere a la hallada por los mismos autores, en siete razas de ganado criollo colombiano (26, 9 y 65%).

Se observó cierto grado de participación de razas africanas en el HV. En razas ibéricas se han detectado haplotipos de origen africano (Cymbron *et al.*, 1999; Miretti *et al.*, 2002; Beja-Pereira *et al.*, 2006) y también en ganados criollos de América (Carvajal-Carmona *et al.*, 2001, Egito, 2007, Magee *et al.*, 2002; Miretti *et al.*, 2002; Mirol *et al.*, 2003). En razas criollas de Brasil se ha encontrado una elevada participación materna de razas de origen africano (T3=44.4% y T1=40.7%), siendo el único país suramericano que formó su ganadería criolla con ganados de origen portugués (Egito, 2007).

Liron *et al.* (2006), al analizar 454 secuencias de ganado criollo (Colombia, Argentina, Brasil y Antillas), ibérico y africano encontraron que el haplogrupo T3 fue el más común en las razas criollas americanas (63.6%), seguido del africano T1 (32.4%) y por último, el haplogrupo del cercano oriente T2 (4%). Dentro del linaje africano hallaron dos subclados: el T1a, reportado en bovinos de Brasil y de las Antillas Menores, cuya distribución en África se desconoce y el T1 que se limita a la región de América colonizada por los españoles. En el Hartón del Valle predominó el haplogrupo europeo (91.7%) y el porcentaje de linajes africano fue notoriamente menor; se encontró un individuo Brahman con el haplotipo T1a, cuyo origen probable pudo ser Brasil. Dos individuos HV, pertenecientes a la misma población, mostraron el linaje T2, ubicado frecuentemente en el Cercano Oriente y solo reportado en Colombia.

La presencia de haplotipos africanos en el ganado HV ha sido explicada de diferentes maneras: i) el linaje T1 llegó a América directamente desde el oeste de África, traído desde los puertos intermedios utilizados en los viajes para el comercio de esclavos. ii) introgresión de ganados africanos a la península ibérica, durante la invasión árabe, antes de la conquista de América. iii) introgresión de ganados brasileños cuyos ancestros portugueses tienen matrilineas africanas (Magee *et al.* 20002; Mirol *et al.* 2003; Miretti *et al.* 2004; Lirón *et al.* 2006).

La diversidad nucleotídica media en HV (0.06 ± 0.04) fue inferior a la de la raza B, pero superior a las de H y HVC. El hato LO se destacó por tener la mayor diversidad haplotípica y nucleotídica y fue la única que mostró los tres linajes mitocondriales. Es la hacienda con la más antigua tradición de cría de ganado de la raza HV, que se originó con una base genética amplia de animales puros descendientes de antiguas ganaderías de Roldadillo (Valle del Cauca), y ha fomentado el uso de sementales procedentes de otras ganaderías. Este hato es de sumo interés para la conservación de la variabilidad de la raza, puesto que se halló alta diversidad en todos los niveles estudiados (microsatélites autosómicos, ADNmt y proteínas de la leche).

5.2 RELACIÓN DEL HARTÓN DEL VALLE CON OTRAS RAZAS BOVINAS CRIOLLAS Y COLOMBIANAS

Al relacionar siete razas criollas colombianas estudiadas por Carvajal-Carmona *et al*, (2003) con las de éste trabajo, se observó proximidad entre el HV y sus cruces, con la raza criolla Romosinuano y la Holstein colombiana y en menor grado con el Costeño con Cuernos, el Casanareño y el San Martinero. Esta proximidad ya había sido reportada por Pinzón (1984) quien atribuyó al CCC el origen del Romosinuano, el HV y el Chino Santandereano. Así mismo, afirmó que los vacunos llegaron al Valle del Cauca por los cuatro puntos cardinales y que los que entraron por el norte y el oriente eran derivados del tronco ancestral desarrollado en la costa del Caribe (Pinzón, 1991).

La cercanía del HV y sus cruces (HVC) con la raza Holstein, se explica porque los animales H fueron muestreados en el Valle del Cauca, donde esta raza se produjo por absorción del HV y porque la mayoría de los animales cruzados analizados eran F_1 entre ambas razas.

El Brahman, un poco más distante del HV, se incluyó en un *cluster* con el Casanareño y el San Martinero. En el Casanareño se ha encontrado con ADNmt, un 49% de introgresión con Cebú (Martínez *et al.*, 2006), mientras que estudios citogenéticos del cromosoma Y revelaron 100% de introgresión (Sánchez *et al.*, 2008) y con microsatélites autosómicos (Sastre *et al.* 2007).

Varios estudios han demostrado una profunda bifurcación en el ADNmt bovino entre los dos mayores taxa del ganado doméstico *Bos indicus* y *Bos taurus*, indicando una divergencia previa a la domesticación (Loftus *et al.* 1994; Bradley *et al.* 1996). Al igual que en otros trabajos con ganado *Bos indicus* en América, no se observaron haplotipos cebuinos en ninguna de las muestras Brahman analizadas. El Cebú americano ha mostrado haplotipos de origen taurino, lo cual indica que su formación tuvo lugar exclusivamente a partir de hembras *Bos taurus* y machos *Bos indicus* (Mirol *et al.*, 2003; Barrera *et al.*, 2006; Egito, 2007, Meirelles *et al.* 1999). El origen del ganado Brahman se remonta al siglo XIX en los Estados Unidos, con la participación de las razas Guzerá, Nelore, Krishna Valley y Gyr, importadas de la India y Brasil. En Colombia se formó por absorción en razas criollas colombianas (Pinzón, 1991) y hoy en día, constituye más del 95% del hato Cebú nacional (Asocebu, www.asocebu.com, 2008).

5.3 RELACIONES DEL HARTÓN DEL VALLE CON RAZAS DEL MUNDO

Aunque no se conoce con seguridad las razas ancestrales de los criollos americanos, algunos reportes indican que, posiblemente, eran ganados de la zona sur de España; otros autores afirman que también salieron barcos desde Galicia en el norte de España y de las Islas Canarias, ruta y escala habitual en los viajes a América (Primo, 1992). Rouse (1977) indica que las razas españolas Retinta, Berrenda, Cacereña y Andaluza negra, podrían haber participado en la formación de la ganadería americana. Casas y Valderrama (1998) sugieren que en el Hartón se encuentran combinadas la Rubio Gallega y sus modalidades Palmeña y Canaria,

la Asturiana de los Valles y la Minorquina o Mahonesa. El HV mostró alta proximidad con razas ibéricas y en una baja proporción con las africanas. Entre las ibéricas las más cercanas fueron: Tudanca, Rubio Gallego, Negra Serrana, Murciana, Pajuna y Avileña y las portuguesas Garvonesa y Mertolenga.

5.4 INTROGRESIÓN DE *BOS INDICUS* EN GANADO HARTÓN DEL VALLE

Sánchez *et al.* (2007) detectaron un grado de introgresión genética promedio estimado de 20.89%, en siete razas de GCC que fueron analizadas citogenéticamente. En el HV no detectaron introgresión cebuina, puesto que el cromosoma Y submetacéntrico, característico de los *Bos taurus*, fue observado en los 8 toros estudiados.

La presencia de 5-8% patrilinajes de origen cebuino, en bovinos criollos colombianos también había sido detectada previamente con los marcadores microsatélites del cromosoma Y (INRA124, INRA126 y BM861); para la raza HV se encontraron diferentes grados (0-27%), dependiendo del tipo de análisis utilizado (Bedoya *et al.*, 2003). Cabe anotar que en este trabajo, los resultados obtenidos con los microsatélites INRA126 y BM861 no fueron tenidos en cuenta, puesto que amplificaron en hembras utilizadas como controles.

El porcentaje de introgresión del 5% hallado en 38 toros HV en este trabajo, muestra que con excepción de un productor, los toros que se han estado utilizando no tienen influencia cebuina. El uso del microsatélite INRA124 como marcador único de introgresión con cebú ha sido utilizado en bastos estudios de introgresión en África y en razas criollas americanas (Hanotte, *et al.*, 2002; Giovambattista *et al.* 2001).

6. CONCLUSIONES

- En la raza Hartón del Valle existe un pool altamente diverso en la región control del ADNmt. La subpoblación LO se destacó por tener la mayor diversidad haplotípica y nucleotídica y fue la única que mostró los tres linajes mitocondriales.
- De acuerdo con su ancestralidad española, la raza HV tiene una marcada influencia del ADmt europeo (91.7%) y una baja participación de taurinos de origen africano (5.6%). Entre las razas españolas las más cercanas fueron Tudanca, Rubio Gallego, Negra Serrana, Murciana, Pajuna y Avileña y entre las portuguesas Garvonesa y Mertolenga.
- Se encontró alta proximidad entre el HV con la raza criolla Romosinuano y en menor grado con el Costeño con Cuernos, el Casanareño y el San Martinero. Así mismo, diferenciación del Blancorejinegro y el Chino Santandereano.
- Con el microsatélite INRA124 se encontró que el HV tiene un bajo porcentaje de introgresión de la raza Brahman (5%).

BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ L. A., VERA V., CARDENAS H., BARRETO G. MUÑOZ J. E., Evaluación de la diversidad genética del ganado Hartón Del Valle y del grado de introgresión con *Bos Taurus* y *Bos indicus*. Proyecto De Tesis. Doctorado en Ciencias–Biología. Universidad del Valle. Cali 43 pg

ANDERSON, S., DE BRUIJN M.H.L., COULSON, A.R., EPERON, C., SANGER, F. & YOUNG I.G. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA: conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Cambridge. J. Mol. Biol.*, 156: 683-717.

BANDET H. J.; Forster, P.; Rohl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, v.16, n.1, p. 37-48.

BARRERA G.; MARTINEZ R.; PEREZ J. E.; HERAZO T. (2006) Identificación de ADN mitocondrial *Bos taurus* en poblaciones de ganado Cebu Brahman colombiano. *Revista Corpoica*. Vol 7 No 2:5-11

BEDOYA G.; HERNANDEZ E.; BERMUDEZ N.; CARDONA H.; DUQUE C.; ARIAS W. (2003) Una aproximación al origen genético y grado de mezcla reciente en BON y otras razas de ganado Criollo colombiano. Contribución a la preservación y propagación del ganado criollo colombiano. Editado por Ossa J. E. y Segura J A. Universidad de Antioquia Medellín Colombia.

BEJA-PEREIRA, A.; CARAMELLI, D.; LALUEZA-FOX, C.; VERNESI, C.; FERRAND, N.; CASOLI, A.; GOYACHE, F.; ROYO, L. J.; CONTI, S.; LARI, M.; MARTINI, A.; OURAGH, L.; MAGID, A.; ATASH, A.; ZSOLNAI, A.; BOSCATO, P.; TRIANTAPHYLIDIS, C.; PLOUMI, K.; SINEO, L.; MALLEGNI, F.; TABERLET, P.; ERHARDT, G.; SAMPIETRO, L.; BERTRANPETIT, J.; BARBUJANI, G.; LUIKART, G.; BERTORELLE, G. (2006) The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.103, n.21, p. 8113-8118.

BRADLEY DG, MACHUGH DE, CUNNINGHAM P, LOFTUS RT (1996) Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5131–5135.

BRADLEY DG, MACHUGH DE, LOFTUS RT, SOWRS, HOSTE CH, CUNNINGHAM EP (1994) Zebutaurine variation in Y chromosomal DNA: A sensitive assay for genetic introgresión in West African trypanotolerant cattle populations. *Anim Genet* 25:7–12

BRADLEY D. LOTUS R., CUNNINGHAM P., MACHUGH D. (1998) Genetics And Domestic Cattle Origins. Evolutionary Anthropology Vol 79 pp 79-86

BRADLEY D. (1998) Genetic characterization of cattle in West and Central Africa. Summary report of European commission. CTA (1992-1995) pp186-190

BRUFORD, M. W.; BRADLEY, D. G.; LUIKART, G. (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nat. Rev. Genet., v.4, n.11, p. 900-910.

CASAS, I; VALDERRAMA, M. 1998. El Bovino Criollo Hartón del Valle. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira – Asociación Nacional de Criadores de Ganado Hartón del Valle ASOHARTON. Palmira.

CARVAJAL-CARMONA L, BERMÚDEZ N, OLIVERA-ANGEL M, ESTRADA L, OSSA J, BEDOYA G, RUIZ-LINARESA. (2003) Abundant mtDNA Diversity and Ancestral Admixture in Colombian *criollo* Cattle (*Bos taurus*) Genetics, Vol. 165, 1457-1463

CLEMENT, M., POSADA, D., Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology 9 (10): 1657-1660.

CYMBRON T.; RONAN T.; LOFTUS, MALHIERO M.; BRADLEY D. (1999) Mitochondrial sequence variation suggests an African influence in Portuguese cattle Proc. R. Soc. Lond. Proc. R. Soc. Lond. B (1999) 266, 597-603

DURÁN, C. V, ALVAREZ I. a., CAMPOS R. 1995 Conservación, Mejoramiento y Utilización del ganado Criollo Hartón del Valle. Programa de Investigación Universidad Nacional de Colombia. Universidad Nacional de Colombia Palmira.

EDWARDS, C. J.; GAILLARD, C.; BRADLEY, D. G.; MACHUGH, D. E. (2000) Y-specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species. Anim. Genet., v.31, n.2, p. 127-130.

EGITO A. (2007). Diversidade Genetica, Ancestralidade Individual E Miscigenacao Nas Racas Bovinas No Brasil Com Base Em Microsatelits E Haplotipos De Dna Mitocondrial: Subsídios Para A Conservacao. Tese de Doutorado. Universidade de Brasilia. 232 p.

GIOVAMBATTISTA, G., M. V. RIPOLI, P. PERAL-GARCIA, and J. L. BOUZAT, (2001) Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: the Argentinean Creole cattle. Anim. Genet. 32:240-247

HANOTTE O. (1997) A polymorphic Y chromosomal microsatellite locus in cattle. Animal Genetics 28,322

- HANOTTE, O.; BRADLEY, D. G.; OCHIENG, J. W.; VERJEE, Y.; HILL, E. W.; REGE, J. E. (2002) African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations. *Science*, v.296, n.5566, p. 336-339.
- HANOTTE, O.; JIANLIN, H. (2005) Genetic characterization of livestock populations and its use in conservation decision-making. *The Role of Biotechnology for the Characterization of Crop, Forestry Animal and Fishery Genetic Resources*. Turim, p. 131-136.
- HIENDLEDER S., WOLF E., (2003) The mitochondrial genome in embryo Technologies. *Reprod Dom Anim*. 38,290- 304
- LOFTUS, R.T., MACHUGH, D.E., BRADLEY, D.G., SHARP, P.M. CUNNINGHAM, E.P. (1992) Mitochondrial DNA and inferred relationships between European, African and Asian cattle. *Anim. Genet.*, 23 (supple. 1): 65.
- LOFTUS R.T., O. ERTUGRUL, A. H. HARBA, M. A. A. EL-BARODY D. E. MACHUGH, S. D. E. PARK and D. G. BRADLEY. (1999) A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East. *Molecular Ecology* 8, 2015–2022
- LOFTUS RT, MACHUGH DE, BRADLEY DG, SHARP PM, CUNNINGHAM EP (1994) Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2757–2761.
- LOFTUS RT, MACHUGH DE, NGERE LO, BALAIN DS, BADI AM, BRADLEY DG, CUNNINGHAM EP (1994) Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. *Anim Genet* 25:265–271.
- MAGEE D. A.; MEGHEN C., HARRISON S., TRÍO C., CYMBRON T., GAILLARD C., MORROW A., MAILLARD J., BRADLEY D. (2002) A Partial Africa Ancestry for the creole cattle populations of the Caribbean. *The Journal of Heredity* 93(6) 429-432
- MACHUGH, D. E.; SHRIVER, M. D.; LOFTUS, R. T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D. G. (1997) Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics*, v.146, n.3, p. 1071-1086.
- MARTINEZ R.; BARRERA G.; SASTRE H. (2006) Variabilidad y Estado Genético de siete subpoblaciones de la raza criolla colombiana Casanareño. *Revista Corpoica*. Vol 7 No 2:5-11
- MEGHEN, C.; MACHUGH, D E.; BRADLEY, D. G. (1994) Genetic Characterisation and West African Cattle *World Animal Review*, FAO, Rome. 78:59-66

- MEIRELLE F., ROSA A., LOBO R., SMITH J., DUARTE F., (1999) Is the American zebu really *Bos indicus*? Genet Mol Biol 22(4) 543-546
- MILLER, S. A.; Dikes, D.D. Polesky, H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Res., 16 (3):1215.
- MIRETTI, M. M., J. A. FERRO, M. A. LARA, and E. P. B. CONTEL, (2001) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) in exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in South American cattle. Biochem. Genet. 39:311-324.
- MIRETTI, M. M.; PEREIRA, H. A., JR.; POLI, M. A.; CONTEL, E. P.; FERRO, J. A. (2002) African-derived mitochondria in South American native cattle breeds (*Bos taurus*): evidence of a new taurine mitochondrial lineage. J. Hered., v.93, n.5, p. 323-330.
- MIRETTI, M. M.; DUNNER, S.; NAVES, M.; CONTEL, E. P.; FERRO, J. A. (2004) Predominant African-derived mtDNA in Caribbean and Brazilian Creole cattle is also found in Spanish cattle (*Bos taurus*). J Hered, v.95, n.5, p. 450-453.
- MIROL, P. M.; GIOVAMBATTISTA, G.; LIRON, J. P.; DULOUT, F. N. (2003) African and European mitochondrial haplotypes in South American Creole cattle. Heredity, v.91, n.3, p. 248-254.
- PINZÓN MARTÍNEZ, E., 1984 *Historia de la Ganadería Bovina en Colombia*, Ed. 1. Banco Ganadero, Bogota, Colombia.
- PINZON E. 1991 Historia de la Ganadería Bovina en Colombia Banco Ganadero Suplemento Ganadero (Banco Ganadero) Vol. 8 Número 1
- PRIMO, A., 1992 El ganado bovino Ibérico en las Américas: 500 años después. Arch. Zootec. 41:421-432.
- ROUSE, J. E. (1977) The Criollo: Spanish cattle in the Americas. Oklahoma: University of Oklahoma Press. p. 303
- SANCHEZ C. A.; JIMENEZ L. BUENO M. (2008) Introgresión genética de *Bos indicus* (bovidae) en bovinos criollos colombianos de origen *Bos taurus*. Acta biol. Colomb., Vol 13 No. 1: 131-142
- SASTRE H.; RODERO E.; RODERO A.; AZOR P.; SEPÚLVEDA N.; HERRERA M.; MOLINA A. (2007) Estudio genético de la raza bovina criolla Casanare de Colombia y su relación con otras razas Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XVII, N° 5, 490 - 498

SEQUENCER versión 6.1.0. (Gene Code Corporation, Ann Arbor U.S, Michigan).

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFIER, L. (2000) Arlequin ver. 2.000. Software for populations genetic data analysis. University of Genova. Switzerland. p.111.

TROY, C. S.; MACHUGH, D. E.; BAILEY, J. F.; MAGEE, D. A.; LOFTUS, R. T.; CUNNINGHAM, P.; CHAMBERLAIN, A. T.; SYKES, B. C.; BRADLEY, D. G. (2001). Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. Nature, v.410, n.6832, p. 1088-1091.

VAIMAN D. (1999) The genetics of cattle. Ed. R. Ries and A. Ruvinsky CAB International.

WILKINGS J V., MARTINEZ I., ROJAS F. (1982). El ganado vacuno criollo. Documento 31. Santa Cruz, Bolivia: CIAT

ANEXO

Anexo 1. Frecuencias Génicas para Hartón del Valle (HV), Holstein (H), Brahman (B) y HVC de acuerdo con el microsatélite. El alelo N corresponde a alelo nulo.

Locus	Alelo	HV	B	H	HVC
BM1818	256	0.035	0.028	0.000	0.016
	258	0.132	0.139	0.000	0.063
	260	0.227	0.111	0.231	0.281
	262	0.124	0.389	0.192	0.078
	264	0.397	0.167	0.423	0.391
	266	0.054	0.083	0.115	0.125
	268	0.016	0.028	0.038	0.031
	270	0.011	0.000	0.000	0.016
	278	0.003	0.056	0.000	0.000
BM1824	174	0.000	0.000	0.000	0.016
	176	0.132	0.083	0.231	0.094
	178	0.137	0.361	0.077	0.203
	180	0.309	0.472	0.154	0.281
	182	0.011	0.000	0.000	0.031
	186	0.352	0.056	0.500	0.344
	190	0.024	0.000	0.038	0.031
	192	0.003	0.028	0.000	0.000
	N	0.032	0.000	0.000	0.000
INRA63	178	0.051	0.000	0.115	0.000
	180	0.268	0.000	0.192	0.266
	182	0.249	0.167	0.577	0.516
	184	0.092	0.000	0.038	0.078
	185	0.049	0.056	0.000	0.016
	186	0.124	0.444	0.000	0.078
	190	0.124	0.000	0.000	0.016
	192	0.005	0.000	0.000	0.000
	N	0.038	0.333	0.077	0.031
ILSTS006	278	0.013	0.000	0.000	0.000
	288	0.038	0.083	0.000	0.016
	290	0.247	0.083	0.125	0.172
	292	0.142	0.333	0.167	0.156
	294	0.188	0.139	0.167	0.266
	296	0.191	0.167	0.417	0.328
	298	0.102	0.111	0.125	0.047
	300	0.054	0.000	0.000	0.016
	304	0.008	0.028	0.000	0.000
	N	0.016	0.056	0.000	0.000

Anexo 1 Continuación Frecuencias Génicas para Hartón del Valle (HV), Holstein (H), Brahman (B) y HVC de acuerdo con el microsatélite. El alelo N corresponde a alelo nulo.

Locus	Alelo	HV	B	H	HVC
INRA5	136	0.054	0.111	0.000	0.000
	138	0.202	0.222	0.038	0.081
	140	0.446	0.417	0.615	0.435
	142	0.210	0.111	0.308	0.258
	144	0.059	0.139	0.038	0.129
	148	0.003	0.000	0.000	0.000
	N	0.027	0.000	0.000	0.097
INRA23	198	0.005	0.028	0.000	0.000
	200	0.022	0.111	0.000	0.000
	204	0.059	0.194	0.038	0.031
	206	0.049	0.083	0.154	0.047
	210	0.062	0.000	0.154	0.141
	212	0.103	0.000	0.115	0.250
	214	0.108	0.000	0.038	0.125
	216	0.116	0.056	0.077	0.063
	218	0.081	0.083	0.192	0.063
	220	0.281	0.333	0.192	0.188
	222	0.016	0.000	0.038	0.000
	N	0.097	0.111	0.000	0.094
HAUTH27	142	0.003	0.028	0.000	0.016
	145	0.030	0.028	0.115	0.094
	147	0.140	0.083	0.269	0.156
	149	0.105	0.167	0.077	0.094
	152	0.288	0.306	0.192	0.344
	154	0.228	0.083	0.077	0.141
	158	0.065	0.083	0.077	0.094
	160	0.094	0.000	0.192	0.063
	N	0.048	0.222	0.000	0.000
	HEL5	150	0.043	0.250	0.115
152		0.200	0.139	0.077	0.094
156		0.181	0.000	0.038	0.094
158		0.114	0.167	0.077	0.047
160		0.051	0.056	0.077	0.156
162		0.084	0.139	0.231	0.203
164		0.095	0.028	0.154	0.156
166		0.151	0.111	0.154	0.125
168		0.054	0.056	0.077	0.031
N		0.027	0.056	0.000	0.063

Anexo 1 Continuación Frecuencias Génicas para Hartón del Valle (HV), Holstein (H), Brahman (B) y HVC de acuerdo con el microsatélite. El alelo N corresponde a alelo nulo.

Locus	Alelo	HV	B	H	HVC
ETH152	190	0.011	0.056	0.000	0.016
	192	0.016	0.000	0.000	0.000
	196	0.091	0.583	0.154	0.047
	198	0.134	0.028	0.115	0.203
	200	0.177	0.056	0.154	0.156
	202	0.218	0.139	0.269	0.297
	204	0.129	0.028	0.269	0.063
	206	0.105	0.028	0.000	0.063
	210	0.054	0.000	0.038	0.063
	212	0.027	0.000	0.000	0.016
	214	0.016	0.028	0.000	0.016
	N	0.022	0.056	0.000	0.063
	INRA35	108	0.257	0.056	0.385
110		0.078	0.139	0.000	0.094
111		0.027	0.056	0.000	0.000
112		0.565	0.333	0.615	0.609
120		0.030	0.056	0.000	0.031
130		0.016	0.194	0.000	0.016
N		0.027	0.167	0.000	0.031
HEL13	174	0.011	0.056	0.038	0.000
	180	0.011	0.056	0.000	0.016
	184	0.019	0.306	0.038	0.031
	186	0.055	0.056	0.000	0.000
	188	0.038	0.111	0.000	0.016
	190	0.158	0.167	0.231	0.203
	192	0.210	0.139	0.231	0.281
	196	0.322	0.056	0.423	0.375
	198	0.077	0.056	0.038	0.016
	N	0.098	0.000	0.000	0.063
ILSTS005	180	0.019	0.083	0.000	0.000
	182	0.274	0.056	0.231	0.328
	184	0.444	0.528	0.538	0.469
	186	0.075	0.000	0.000	0.063
	188	0.046	0.306	0.000	0.031
	190	0.024	0.028	0.000	0.031
	194	0.000	0.000	0.000	0.016
	400	0.118	0.000	0.231	0.063
	170	0.003	0.000	0.000	0.000
	N	0.032	0.059	0.000	0.065

Anexo 1 Continuación Frecuencias Génicas para Hartón del Valle (HV), Holstein (H), Brahman (B) y HVC de acuerdo con el microsatélite. El alelo N corresponde a alelo nulo.

Locus	Alelo	HV	B	H	HVC
ETH225	142	0.178	0.147	0.115	0.177
	144	0.005	0.000	0.038	0.032
	146	0.089	0.059	0.038	0.129
	148	0.065	0.000	0.077	0.016
	150	0.189	0.059	0.192	0.177
	152	0.249	0.029	0.154	0.306
	154	0.078	0.059	0.115	0.016
	156	0.019	0.118	0.000	0.000
	160	0.092	0.471	0.269	0.081
	170	0.003	0.000	0.000	0.000
	N	0.032	0.059	0.000	0.065
MM12	105	0.022	0.250	0.000	0.016
	116	0.038	0.056	0.000	0.031
	118	0.086	0.000	0.231	0.063
	120	0.242	0.139	0.154	0.234
	121	0.070	0.028	0.000	0.078
	122	0.089	0.111	0.000	0.109
	124	0.035	0.167	0.038	0.031
	126	0.035	0.000	0.000	0.031
	130	0.022	0.028	0.000	0.016
	132	0.250	0.000	0.500	0.391
	138	0.011	0.000	0.000	0.000
N	0.102	0.222	0.077	0.000	
MM8	136	0.168	0.029	0.192	0.183
	138	0.098	0.294	0.038	0.100
	140	0.366	0.500	0.385	0.350
	142	0.098	0.000	0.038	0.083
	144	0.073	0.088	0.154	0.050
	146	0.073	0.000	0.115	0.050
	148	0.042	0.000	0.000	0.083
	150	0.017	0.029	0.077	0.067
	N	0.067	0.059	0.000	0.033