

Diversidad genética y estructura poblacional en bovinos colombianos casanareño a través de marcadores moleculares microsatélites

Genetic diversity and population structure in casanareño colombian cattle through microsatellite molecular markers

Ricardo Jose Ocampo-Gallego^{1*},
Juan Felipe Martínez-Rocha¹,
Rodrigo Alfredo Martínez-Sarmiento¹

¹Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA. Centro de Investigación el Nus, CP. 250047, Corregimiento San José del Nus, municipio de San Roque, Antioquia, Colombia.

*Autor de correspondencia:
rocampo@agrosavia.co

Artículo científico

Recibido: 21 de agosto 2019

Aceptado: 22 de octubre 2020

Como citar: Ocampo-Gallego RJ, Martínez-Rocha JF, Martínez-Sarmiento RA (2020) Diversidad genética y estructura poblacional en bovinos colombianos casanareño a través de marcadores moleculares microsatélites. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 7(3): e2396. DOI: 10.19136/era.a7n3.2396

RESUMEN. El conocimiento de la estructura poblacional, la variabilidad genética y la introgresión de razas foráneas es crucial para enfocar esfuerzos para la conservación de los recursos genéticos autóctonos. Este estudio tuvo por objetivo analizar la diversidad genética de una población de bovinos Casanareño de seis sitios en Colombia usando 11 marcadores microsatélites. Se obtuvieron muestras de sangre de 212 individuos no emparentados las cuales fueron amplificadas por PCR y analizadas. Se observaron 156 alelos con contenido de información polimórfica promedio de 0.742, lo que demuestra que el panel utilizado fue informativo. Las estimaciones de la heterocigosidad observada variaron de 0.788 en MF a 0.690 en CY. Se presentó un déficit de individuos heterocigotos en la población general ($F_{IS} = 0.059$) causado por la alta consanguinidad y la proporción de la varianza genética debida a diferencias entre las distintas subpoblaciones fue del 4%. Tanto el análisis de agrupamiento bayesiano como el árbol filogenético mostraron un patrón de agrupamiento similar, que reveló dos clústeres principales en los bovinos Casanareño el cual puede ser resultado del aislamiento geográfico, prácticas reproductivas y la absorción hacia razas cebuinas. Cuatro de seis subpoblaciones presentaron tamaños efectivos poblacionales inferiores al nivel crítico definido por la FAO de 50 individuos por lo que se recomienda conformar un núcleo de conservación de la raza Casanareño con un esquema de apareamiento bien definido para minimizar la consanguinidad y el uso intensivo de pocos machos para mantener la diversidad genética y evitar que la raza se extinga.

Palabras clave: ADN, conservación, ganado criollo, recursos genéticos animales, STR.

ABSTRACT. Knowledge of population structure, genetic variability and introgression of foreign breeds is crucial to focus efforts for the conservation of indigenous genetic resources. This study aimed to analyze the genetic diversity of six Casanareño populations cattle using 11 microsatellite markers. Blood samples were obtained from 212 unrelated individuals which were amplified by PCR and analyzed. We observed a total of 156 alleles with a polymorphic information content average of 0.742, which shows that the panel used was very informative. The observed heterozygosity estimates varied from 0.788 in MF to 0.690 in CY. There was a deficit of heterozygous individuals in the general population ($F_{IS} = 0.059$) caused by high consanguinity and the proportion of the genetic variance due to the differences between the different subpopulations was 4%. Both the Bayesian grouping analysis and the phylogenetic tree showed a reliable clustering pattern, which revealed two main clusters in Casanareño cattle which can be the result of geographical isolation, reproductive practices and absorption to zebu breeds. Four out of six subpopulations presented effective population sizes below the critical level defined by the FAO of 50 individuals, so it is recommended to form a conservation nucleus of the Casanareño breed with a well-defined mating scheme to minimize consanguinity and the intensive use of few males to maintain genetic diversity and prevent the breed from becoming extinct.

Key words: Animal genetic resources, conservation, Creole cattle, DNA, STR.

INTRODUCCIÓN

Dada su ubicación geográfica privilegiada Colombia posee diferentes pisos térmicos que van desde las montañas con nieves perpetuas hasta el nivel del mar, lo que hace posible la explotación de diferentes especies animales de interés económico para la producción de leche y carne. El país cuenta con 26 413 227 semovientes aproximadamente, los cuales están distribuidos en 600 578 predios, que en su mayoría pertenecen a razas cebuinas y en menor proporción a razas autóctonas de Colombia (ICA 2018). Actualmente, se tienen siete razas de bovinos criollos descendientes de los bovinos ibéricos traídos al nuevo mundo por los colonizadores españoles durante la conquista (Ocampo *et al.* 2017). Gran parte de las razas criollas colombianas están en riesgo de desaparecer por los cruces absorbentes hacia el cebú y el uso preferente de razas exóticas mejoradas (Martínez *et al.* 2012).

La raza bovina Casanareño se desarrolló en las sabanas inundables y el piedemonte llanero del oriente colombiano que se caracteriza por presentar pasturas de mala calidad, temperatura promedio superior a los 30 °C, y lluvias entre 2 000 y 4 000 mm anuales. Condiciones ambientales poco favorables que dieron lugar a un bovino de pequeño tamaño, capaz de sobrevivir y reproducirse en dicho medio (Sastre 2005). Pero por la gran capacidad de adaptación a estas condiciones poco favorables, la raza Casanareño se encuentran en riesgo de desaparecer; ya que se estima en menos de 500 semovientes el número de ejemplares puros con poblaciones que presentan alto parentesco y consanguinidad, lo que sitúa a la raza en situación de riesgo (FAO 2013). Un factor que ha influido en la reducción de ejemplares puros, se debe a que en muchos lugares de la región donde se originó la raza, los productores prefieren animales híbridos F1 Brahman (*Bos indicus*) x Casanareño (*Bos Taurus*), ya que esta cruce es de mayor tamaño y presenta mejores rendimientos en parámetros productivos y reproductivos (Salamanca 2006). Por otro lado, en otras zonas del departamento de Casanare varios productores prefieren mantener animales criollos puros en

sus fincas, ya que las condiciones ambientales hacen casi imposible la supervivencia de animales cebuinos. Pero en la mayoría de las fincas no se llevan registros productivos ni reproductivos de los animales, por lo que es frecuente el apareamiento entre individuos emparentados, ya que los toros permanecen hasta ocho años, lo que se traduce en incremento en la consanguinidad de las poblaciones (Salamanca 2006).

En los últimos años, las razas criollas han ganado importancia en Colombia debido a la adaptabilidad, fertilidad y consumo de forrajes de baja calidad, en comparación con las razas introducidas que requirieron mayor inversión. Por lo que se ha creado conciencia en la conservación y documentación de los recursos zoogenéticos, lo que ha llevado a realizar estudios enfocados en caracterizar y documentar la diversidad genética y el componente productivo de las diferentes especies domésticas de interés económico (Ocampo *et al.* 2017). Varios estudios han utilizado los marcadores microsatélites para caracterizar la diversidad genética de diferentes especies y razas de ganado (Dixit *et al.* 2012, Souza *et al.* 2012, Pham *et al.* 2013, Ocampo *et al.* 2016, Gororo *et al.* 2018). Debido a que son altamente polimórficos, codominantes, distribuidos en todo el genoma, de neutra selección y altamente reproductibles (FAO 2011). Para conservar una especie o raza en riesgo de desaparecer debe considerarse la idea de conformar y mantener un núcleo de animales puros con el fin de preservar la diversidad de genes existentes, por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar y evaluar la diversidad genética de seis poblaciones de la raza Casanareño usando 11 marcadores microsatélite para utilizar la información en programas de conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo sanguíneo y genotipificación

Se seleccionaron 212 individuos no emparentados de la raza Casanareño de seis ganaderías (subpoblaciones): BB: el Bubuy (n = 62), CR: Canaguaro (n = 74), CY: Canaguay (n = 17), GA: El Garcero (n = 15), GU: Guadualito (n = 17) y MF: Mata Fresca (n = 27), correspondientes a seis

localidades del departamento de Casanare, Colombia. A cada individuo se le extrajo una muestra de sangre de la vena coccígea en tubo vacutainer con EDTA como anticoagulante, utilizando el protocolo descrito por la ISAG (FAO 2011). Adicionalmente, y como elemento de comparación, se incluyeron 24 individuos de la raza Brahman (CB) previamente genotipados y no emparentados. A cada muestra de sangre se le realizó la extracción de ADN a través de un kit comercial (MOBIO, Catalogo 12000-100), una vez extraído se determinó la pureza y concentración por espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington).

Un panel de 11 marcadores microsatélites recomendados por la ISAG-FAO (2011) para estudios de diversidad genética en bovinos fue amplificado por PCR (Tabla 1). Cada cebador en su secuencia reverse fue marcado con fluorocromos (Applied Biosystems) en su extremo 5'. La mezcla de reacción de PCR se ajustó a un volumen de 10 μ l que contenía: Buffer PCR 1X, 0.2 μ M de cada cebador, 0.2 mM de cada DNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 1.85 U de Taq polimerasa Hot Start (ABM), 1 μ l de ADN (~120 ng) y agua desionizada para ajustar el volumen final.

Se utilizó un termociclador PTC 100 (MJ Research Inc., Waltham) para amplificar los microsatélites a través de PCR. El perfil térmico usado fue el siguiente: 95°C durante 5 minutos para desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos a 95°C por 1.15 minutos, 55°C a 45 segundos y 72°C durante 1 minuto. La extensión final fue a 72°C durante 10 minutos.

Se analizaron por electroforesis capilar los productos de amplificación generados de la PCR a través de un secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems). El marcador interno LIZ 500 (Applied Biosystems) se utilizó para realizar los análisis y el software GENEMAPPER 4.1 (Applied Biosystems) para estimar el tamaño de los alelos en las 212 muestras analizadas.

Análisis estadístico

A cada loci le fueron estimadas las frecuencias alélicas, el número observado (A_n) y efectivo (A_e) de alelos, las heterocigocidades observadas (H_o) y es-

peradas (H_e) para cada microsatélite con el programa GenAIEx 6.5 (Peakall y Smouse 2012). Se estimó con el software Excel Microsatellite Toolkit V 3.1.1 (Park 2008) el Contenido de Información Polimórfica (PIC) a cada microsatélite analizado. A las subpoblaciones de Casanareño se le estimaron las pruebas de equilibrio de Hardy Weinberg (HW) y de déficit de heterocigotos con simulaciones de Montecarlo vía cadenas de Markov con el software Genepop 4.2 (Rousset 2008).

La estructura de las poblaciones se analizaron con los estadísticos F de Wright (F_{IS} , F_{ST} y F_{IT}) utilizando la metodología propuesta por Weir y Cockerham (1984) con el programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet 2002) y el análisis molecular de varianza AMOVA con el programa Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer 2015). El tamaño efectivo poblacional (N_e) para cada una de las subpoblaciones se calculó con el desequilibrio de ligamiento con el programa Ne-estimator (Peel *et al.* 2004).

Para determinar el grado de diferenciación genética entre las subpoblaciones y la introgresión de razas cebuinas en cada una de ellas se utilizaron dos metodologías. Primero, la matriz de coeficientes de diferenciación F_{ST} y la distancia genética de Nei con el programa genAIEx 6.5 para determinar las diferencias genéticas en las seis subpoblaciones analizadas. A partir de los coeficientes de diferenciación F_{ST} determinados con el software MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013) se construyó un árbol filogenético utilizando el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages). Con la segunda metodología se estimó la estructura poblacional y la introgresión de ganado cebú con el modelo de agrupación Bayesiano del programa STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000), que utiliza genotipos de múltiples loci para asignar a los individuos de las poblaciones proporciones de mezcla individual, además de deducir el número de poblaciones parentales (K) para una muestra dada. También se realizó un análisis de mezcla con frecuencias alélicas correlacionadas (Pritchard *et al.* 2000, Ciani *et al.* 2013, Zuccaro *et al.* 2008).

Se realizaron siete corridas independientes para cada K ($1 \leq K \leq 7$) con el fin de obtener un

Tabla 1. Panel de microsatélites utilizados.

Microsatélite	Cromosoma	Secuencia del Primer (5'-3')	Rango
BM 2113	2	F: GCTGCCTTCTACCAAATACCC R: CTTCTGAGAGAAGCAACACC	122-156
TGLA 53	16	F: GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA R: ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	143- 191
ETH 10	5	F: GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA R: CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	207-231
SPS 115	15	F: AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG R: AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG	234-258
ETH 3	19	F: GAACCTGCCTCTCTGCATTGG R: GTGAGTCCCATAGAGCATAAGCTC	103-133
INRA 023	3	F: GATCTTTGTTTCAATCTATTCCAATTC R: ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	195-225
TGLA 126	20	F: CTAATTTAGAATGAGAGAGCTTCT R: TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC	114-130
TGLA 122	21	F: CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC R: AATCACATGGCAAATAAGTACATAC	135-183
BM 1818	23	F: AGCTGGGAATATAACCAAAGG R: AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	248-278
ETH 225	9	F: GATCACCTTGCCACTATTTCCT R: ACATGACAGCCAGCTGCTACT	130-158
BM 1824	1	F: GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC R: CATTCTCCAACCTGCTTCCTTG	176-212

valor de K representativo. Se adoptó un periodo de burn-in de 200 000 generaciones seguido por 1 000 000 de interacciones MCMC (Markov Chain Monte Carlo). El número más probable de agrupaciones o K (poblaciones o razas) presentes en los datos se calculó de acuerdo al algoritmo ΔK propuesto por Evanno *et al.* (2005).

RESULTADOS

Variabilidad genética en la población general

Para los 212 bovinos Casanareños genotipados se encontraron 156 alelos en total para los 11 loci microsatélite. El número observado de alelos osciló entre 10 (loci ETH 10 y SPS 115) a 23 (locus TGLA 122). El número promedio de alelos/locus encontrado fue de 14.2, lo cual indica que la población de bovinos Casanareños en Colombia presenta alta variabilidad genética. El resumen de las medidas de variabilidad genética calculadas para cada marcador analizado en la población de bovinos Casanareños se presenta en la Tabla 2.

La H_e varió entre 0.714 y 0.827 (locus SPS 115 y BM 2113, respectivamente) con promedio de 0.784 para la población de bovinos en general, en tanto la H_o varió entre 0.900 y 0.578 (locus BM 2113

y TGLA 53), con promedio de 0.739 para los 11 microsatélites analizados en la población. El contenido de información polimórfica (PIC) promedio para los 11 loci microsatélite analizados fue de 0.742. Todos los loci presentaron PIC superior a 0.5 lo que indica que fueron altamente polimórficos. La estructura de la población evaluada por los estadísticos de Wright mostró que el valor FIS promedio fue de 0.059. Varios marcadores como TGLA 53, SPS 115 y TGLA 126 presentaron valores de FIS superiores a 0.1 lo que indica exceso de individuos homocigotos para dichos marcadores en la población.

El estadístico de Wright F_{IT} , que mide la pérdida de heterocigocidad del individuo con respecto al total de la población presentó un valor de 0.108, lo que indica un déficit de individuos heterocigotos del 10.8% en la población de bovinos Casanareños colombianos.

Variabilidad genética entre las subpoblaciones

Para las subpoblaciones de bovinos casanareños se encontró un promedio de 8.94 alelos/locus, siendo BB la subpoblación donde se encontró el mayor número de alelos/locus (10.727) y CY la subpoblación donde se encontró el menor (7.0 alelos/locus). En la Tabla 3 se presenta un resumen de

Tabla 2. Número de alelos (An), Número efectivo de alelos (Ea), Heterocigocidad observada (Ho), Heterocigocidad esperada (He), Contenido de Información Polimórfica (PIC) y estadísticos F (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) por locus.

LOCUS	An	Ea	Ho	He	PIC	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
BM 2113	12	6.182	0.900	0.827	0.807	-0.089	-0.038	0.047
TGLA 53	18	4.923	0.578	0.789	0.769	0.268	0.302	0.046
ETH 10	10	5.462	0.782	0.810	0.787	0.035	0.072	0.039
SPS 115	10	3.753	0.640	0.714	0.682	0.104	0.134	0.033
ETH 3	12	4.328	0.710	0.761	0.731	0.067	0.098	0.033
INRA 023	15	4.952	0.752	0.791	0.770	0.049	0.076	0.028
TGLA 126	13	5.144	0.710	0.792	0.766	0.103	0.145	0.047
TGLA 122	23	5.363	0.804	0.800	0.774	-0.005	0.035	0.040
BM 1818	11	4.036	0.716	0.738	0.709	0.030	0.093	0.065
ETH 225	14	5.470	0.750	0.808	0.783	0.071	0.152	0.087
BM 1824	18	5.236	0.789	0.798	0.770	0.011	0.120	0.110
Promedio	14.2	4.986	0.739	0.784	0.742	0.059	0.108	0.052

Tabla 3. Población (Pob), número de individuos (N), número promedio de alelos (An), número efectivo de alelos (Ea), Heterocigocidad observa (Ho) y esperada (He), estadístico F_{IS} y tamaño efectivo poblacional (N_e) para cada una de las poblaciones. BB: el Bubuy. CR: Canaguaro. CY: Canaguayo. GA: El Garcero. GU: Guadualito. MF: Mata Fresca.

Pob	N	An	Ea	Ho	He	F_{IS}	N_e^*
BB	62	10.727	5.639	0.722	0.811	0.118	36.7 (30.1-45.5)
CR	74	10.455	5.285	0.760	0.802	0.059	60.1 (47.8-78.1)
CY	17	7.000	4.602	0.690	0.771	0.136	12.7 (9.0-19.1)
GA	15	8.091	4.741	0.734	0.777	0.094	41.9 (37.1-46.6)
GU	17	7.091	4.189	0.742	0.753	0.046	118.4 (112.2-125.1)
MF	27	10.273	5.461	0.788	0.793	0.027	20.7 (15.4-29.1)

* Los números entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza al 95%.

varias medidas de variabilidad genética analizadas en cada una de las subpoblaciones.

La menor Ho se observó en la población de CY (0.690) y la mayor en MF (0.788). Mientras que la He más baja la presentó la población de GU (0.753) y la más alta en el BB (0.811). La Ho y la He no presentaron amplias diferencias entre las poblaciones, siendo la población del BB la que presentó la mayor diferencia y MF la menor. En términos generales, todas las subpoblaciones presentaron alta diversidad genética para cada uno de los loci analizados. Se realizaron un total de 66 pruebas de equilibrio de HW en todas las subpoblaciones para cada uno de los 11 microsatélites analizados (Tabla 4), de las cuales 20 presentaron desvíos significativos ($p < 0.05$), lo cual se podría atribuir al déficit de individuos heterocigotos encontrado en las subpoblaciones de BB, CN, CY y GA ($p < 0.05$).

El N_e estimado para cada una de las subpoblaciones de Casanareño varió de 118.4 individuos para GU a 12.7 individuos para CY. Es de resaltar

que las subpoblaciones de BB, CY, GA y MF presentaron tamaños efectivos poblaciones inferiores a 50 individuos. Por otro lado, el análisis molecular de varianza (AMOVA) reveló que la mayor parte de la varianza genética en la población de bovinos casanareños podría explicarse por la variabilidad dentro del individuo (84%) y la menor parte (4%) a diferencias entre las distintas subpoblaciones (Tabla 5).

Para determinar y analizar la diferenciación genética entre las seis subpoblaciones de bovinos criollos Casanareño y la raza CB, se calculó la matriz de coeficientes de diferenciación genética F_{ST} y la distancia genética de Nei (Tabla 6), además del árbol filogenético elaborado con los coeficientes de diferenciación genética F_{ST} (Figura 1). Se observa que las subpoblaciones del BB, MF, GA y CY se encuentran agrupadas en el mismo nodo y además están separadas del grupo conformado por las subpoblaciones de CR, GU y la raza CB, lo cual podría indicar que estas últimas poblaciones comparten ale-

Tabla 4. Test de Equilibrio de Hardy Weinberg por población. Población (Pob). BB: el Bubuy. CR: Canaguaro. CY: Canaguay. GA: El Garcero. GU: Guadualito. MF: Mata Fresca.

Pob	BM 2113	TGLA 53	ETH 10	SPS 115	ETH 3	INRA 023	TGLA 126	TGLA 122	BM 1818	ETH 225	BM 1824
BB	0.289	0.002*	0.774	0.002*	0.001*	0.196	0.000*	0.000*	0.494	0.000*	0.000*
CR	0.676	0.004*	0.336	0.000*	0.425	0.775	0.031*	0.966	0.000*	0.000*	0.397
CY	0.883	0.002*	0.706	0.092	0.203	0.751	0.002*	0.706	0.000*	0.295	0.178
GA	0.340	0.260	0.147	0.133	0.846	0.164	0.799	0.155	0.955	0.330	0.650
GU	0.648	0.003*	0.230	0.856	0.410	0.598	0.816	0.861	0.102	0.848	0.754
MF	0.972	0.002*	0.000*	0.073	0.001*	0.950	0.056	0.001*	0.265	0.269	0.068

* Desvió significativo del equilibrio de Hardy Weinberg ($p < 0.05$).

Tabla 5. Análisis molecular de varianza (AMOVA) en seis subpoblaciones de bovinos casanareños.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Variación estándar	%
Entre poblaciones	5	83.454	16.691	0.180	4%
Entre Individuos	206	1047.138	5.083	0.578	12%
Dentro individuos	212	832.500	3.927	3.927	84%
Total	423	1963.092		4.685	100%

Tabla 6. Matriz de coeficientes de diferenciación genética F_{ST} (debajo de la diagonal) y distancia genética de Nei (encima de la diagonal) en seis subpoblaciones de bovinos Casanareño y la raza Brahman.

	BB	CR	CY	GA	GU	MF	CB
BB	-	0.257	0.296	0.208	0.359	0.140	0.398
CR	0.025	-	0.396	0.332	0.090	0.217	0.229
CY	0.033	0.042	-	0.317	0.394	0.278	0.334
GA	0.024	0.035	0.038	-	0.377	0.254	0.438
GU	0.040	0.013	0.047	0.044	-	0.281	0.250
MF	0.016	0.024	0.033	0.030	0.034	-	0.311
CB	0.043	0.028	0.041	0.050	0.033	0.037	-

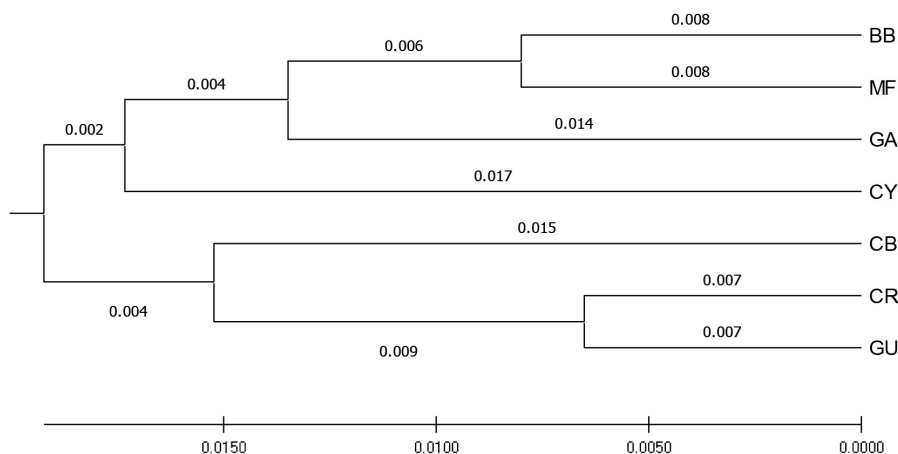


Figura 1. Árbol filogenético (UPGMA) que representan los coeficientes de diferenciación genética F_{ST} entre las seis poblaciones de bovinos Casanareños y la raza Brahman. BB: El Bubuy. CR: Canaguaro. CY: Canaguay. GA: El Garcero. GU: Guadualito. MF: Mata Fresca. CB: Brahman.

los con Cebú, debido posiblemente al mestizaje.

El análisis de la estructura poblacional con el programa STRUCTURE y el número de clúster esperados (K) osciló entre uno y siete. Como se

muestra en la Figura 2 para un valor de $K = 2$, se observa una clara diferenciación de dos clústeres homogéneos en los cuales se puede observar un clúster compuesto por varios animales de las poblaciones de

CR y GU que presentaron introgresión genética cebuina en su genoma y la proximidad de estas dos subpoblaciones con la raza CB. De acuerdo con el algoritmo propuesto por Evanno y colaboradores K = 2 fue el número más probable de poblaciones ancestrales que explican la variabilidad genética observada en la raza criolla Casanareño (Figura 3).

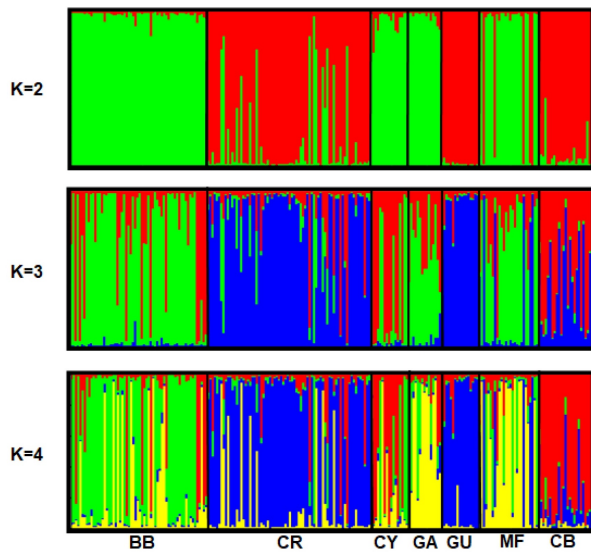


Figura 2: Estructura poblacional estimada con STRUCTURE de seis poblaciones de bovinos criollos Casanareño y cebú para valores de K = 2. BB: el Bubby. CR: Canaguaro. CY: Canaguay. GA: El Garcero. GU: Guadualito. MF: Mata Fresca. CB: Cebú.

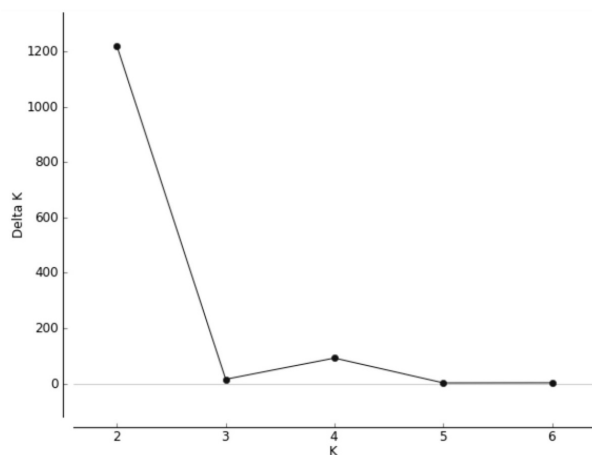


Figura 3: ΔK calculado de acuerdo con el algoritmo propuesto por Evanno et al. (2005) de K = 2 a K = 6.

DISCUSIÓN

Todos los loci determinados presentaron alto polimorfismo de acuerdo con las recomendaciones dadas por la ISAG/FAO (2011) sobre el número mínimo de alelos para estudios de diversidad genética con este panel de marcadores. El número promedio de alelos/locus encontrados de 14.2 alelos/locus para la población de bovinos, valor que es superior a los 12.5 alelos/locus reportados por Pham et al. (2013) para una población de 410 individuos (siete poblaciones) en Vietnam utilizando 27 marcadores microsatélites y similar a los 14.2 alelos/locus reportados por Martínez et al. (2012) en 137 individuos de la raza criolla Blanco Orejinegro de poblaciones comerciales con 12 microsatélites, lo que sugiere que el panel utilizado es polimórfico e informativo para el estudio de la variabilidad y diversidad en la población de bovinos Casanareños estudiados en el presente trabajo.

Se observó que la H_o fue menor que la H_e , con excepción de los loci BM 2113 y TGLA 122 donde fue mayor. Resultados similares fueron reportados por Martínez et al. (2012), Pham et al. (2013) y Gororo et al. (2018) en bovinos criollos de Colombia, Vietnam y Zimbabwe, respectivamente. Por otro lado, los altos valores de PIC y número promedio de alelos/locus demuestran que el panel de 11 microsatélites utilizados es apropiado para realizar estudios de diversidad y mapeo genético en bovinos colombianos (Kayang et al. 2002). Cada una de las subpoblaciones evaluadas presentó un alto número de alelos/marcador en promedio. En la subpoblación BB se encontró el mayor número de alelos (10.727 alelos/locus), valor superior a los 7.52 alelos/locus encontrados por Acosta et al. (2013) en bovinos criollos, a los 6.47 alelos/locus encontrados por Sanarana et al. (2016) en bovinos criollos Nguni Surafricanos y a los 5.167 alelos/locus encontrados por Gororo et al. (2018) en bovinos criollos de Zimbabwe. Lo que confirma la alta variabilidad genética encontrada en la raza Casanareño.

El análisis molecular de varianza (AMOVA) reveló que de la variabilidad genética total observada en la raza criolla Casanareño el 4% corresponde

a diferencias genéticas entre las distintas subpoblaciones analizadas. Resultados similares fueron reportados por Villalobos *et al.* (2010), Martínez *et al.* (2012), Pham *et al.* (2013), Sanarana *et al.* (2016) y Gororo *et al.* (2018) quienes reportaron en sus estudios proporciones de varianza molecular explicada por diferencias entre poblaciones entre el 3 y 9%. Con respecto a los desvíos significativos en las pruebas de equilibrio de HW, los altos valores de promedio de F_{IS} y el déficit de heterocigotos encontrado en las subpoblaciones BB, CR, CY y GU pueden ser el resultado de varios factores como la endogamia y la selección (Álvarez *et al.* 2012). No obstante, la causa principal podría atribuirse a la alta consanguinidad, lo que se debe a que en la mayoría de las ganaderías colombianas no se llevan registros ni controles en el cruzamiento de los animales, por lo que es frecuente el cruce de animales emparentados lo que conlleva a la disminución de individuos heterocigotos en las poblaciones (Bernardes *et al.* 2016). Por otro lado, es frecuente que en gran parte de las ganaderías del país se utilicen uno o dos sementales durante muchos años para aparear con todas las hembras del ható lo que contribuye a la reducción del número de individuos heterocigotos de la población, lo cual se pudo evidenciar con los altos valores de FIS encontrados (Tolone *et al.* 2012).

El grado de diferenciación genética evaluado por el coeficiente F_{ST} agrupó bajo el mismo clúster en el árbol filogenético las subpoblaciones BB, MF, GA y CY lo que podría reflejar el origen común de dichas poblaciones. Mientras que las subpoblaciones CR, GU están agrupadas en el mismo clúster junto con la raza CB, lo que podría indicar introgresión genética cebuina en estas subpoblaciones de Casanareño. En el análisis bayesiano con el programa STRUCTURE se asumió que $K = 2$ es el número más probable de poblaciones ancestrales que explican la diversidad y estructura genética de las poblaciones (Evanno *et al.* 2005). Como se observa en la Figura 2 se aprecia una clara separación de las poblaciones de Casanareño evaluadas lo que demuestra la introgresión y mezcla con cebú en algunas de ellas.

La primera población ancestral estaría conformada por los bovinos introducidos a Colombia hace

500 años aproximadamente durante la conquista y colonización del continente americano, de los cuales derivan las actuales poblaciones de Casanareño. Por otro lado, la segunda población ancestral podría estar conformada por las razas cebuinas que fueron introducidas al país con el propósito de ser la base de la producción ganadera nacional, para realizar cruzamientos y absorción de los bovinos criollos colombianos. Lo que podría explicar el alto mestizaje observado en gran parte de los individuos en las poblaciones de CR y GU, lo cual concuerda con los datos históricos recopilados en los lugares donde se tomaron muestras de estos animales, con presencia de machos Brahman o sus híbridos en las ganaderías. Con la introducción de *Bos indicus* o ganado Cebú en la región de Casanare hacia el año 1950, se comenzaron a cruzar las dos razas y los animales F1 presentaron mejores rendimientos productivos y reproductivos al de sus progenitores por efecto del vigor híbrido (Salamanca 2006). A pesar de la gran capacidad de adaptación y rusticidad de la raza criolla Casanare el cruce de machos Brahman con hembras criollas fueron mal interpretados de tal forma que se le atribuyó todo el valor al *Bos indicus* desconociendo el aporte genético del Casanareño. Es por ello que se generalizó la práctica de utilizar toros Cebú permanentemente en varias ganaderías de tal forma que en la actualidad la raza Casanare y otras razas criollas colombianas están a punto de desaparecer como consecuencia de los cruces absorbentes sucesivos hacia el cebú (Ocampo *et al.* 2020). Para las subpoblaciones del BB, CY, GA y MF la introgresión de la raza CB fue menos perceptible y casi nula para los animales del BB y GA, lo cual es consistente con la historia de un manejo de cría más sistemático y segregado como una raza taurina.

Respecto al tamaño efectivo poblacional estimado para cada una de las subpoblaciones la mayoría fueron inferiores a 50 individuos con excepción de las subpoblaciones de GU y CR. Pero hay que tener en cuenta la historia de manejo cerrado entre las subpoblaciones estudiadas, a pesar de la introgresión de ganado cebú, lo que pudo haber favorecido la reducción del tamaño efectivo en estos

hatos. Teniendo en cuenta que el tamaño efectivo poblacional sugerido por la FAO (2013) es de 50 individuos y a lo reportado por Meuwissen (1999) quien concluyo que debido a la mutación y la deriva genética el N_e crítico debería estar entre 50 y 100 animales. Por lo que el tamaño efectivo poblacional encontrado en el presente estudio para las poblaciones del BB, CY, MF y GA es bajo, lo que representa una situación desfavorable para la población de bovinos Casanareño, ya que la heterocigosidad o diversidad genética presente en cada generación decrece a una tasa acelerada en poblaciones con N_e menor que 100 y que el incremento en homocigosis como consecuencia de un N_e reducido resulta en la pérdida de habilidad adaptativa, depresión endogámica y por último la extinción (Henson 1992).

Con el fin de preservar la raza para el futuro se debe crear un núcleo de conservación tanto *in vivo* como *in vitro* de la raza Casanareño por medio del sistema de bancos de germoplasma de la nación Colombia, como se hizo para las razas criollas colombianas Blanco Orejinegro, Romosinuano, Costeño con Cuernos, San Martinero y Hartón del Valle. Para conservar y multiplicar individuos puros de la raza Casanareño representantes de las subpoblaciones de BB, CY, GA y MF con esquemas de apareamiento definidos, evitando la introgresión de razas bovinas foráneas en dichos núcleo de conservación.

CONCLUSIONES

Las seis subpoblaciones de Casanareño analizadas presentaron alta variabilidad genética en los 11 marcadores microsatélites evaluados dado que ninguno fue monomórfico, presentaron elevado número de alelos y alto contenido de información

polimórfico. Cuatro de las seis subpoblaciones de bovinos Casanareños evaluados presentaron un déficit generalizado de individuos heterocigotos y reducidos tamaños efectivos poblacionales, lo cual puede atribuirse a la alta consanguinidad debida a la falta de controles y registro en el apareamiento de los animales. Para proteger de forma eficaz a la raza criolla colombiana Casanareño, la diversidad genética de las poblaciones del Bubuy, Canaguay, El Garcero y Mata Fresca deben ser tenidas en cuenta en planes de conservación de los recursos genéticos por la escasa o nula introgresión de razas foráneas en sus animales. Se recomienda continuar con el monitoreo de parámetros relacionados con la diversidad genética de la raza bovina Casanareño utilizando marcadores genéticos más informativos como los array de SNPs de media y alta densidad.

AGRADECIMIENTOS

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) y al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) por la financiación del proyecto de investigación "Seis razas de bovinos criollos caracterizados a nivel molecular, mediante información de 24 marcadores microsatélites y nuevas variantes tipo snp" a través del Sistema de Bancos de Germoplasma de la Nación para la Alimentación y la Agricultura (SBGNAA) mediante fondos públicos del cual deriva la presente publicación. También agradecemos a todos los investigadores del grupo de investigación Recursos Genéticos y Biotecnología Animal de AGROSAVIA que participaron del proyecto de investigación a través de la colecta de muestras e información en campo.

LITERATURA CITADA

- Acosta A, Uffo O, Sanz A, Ronda R, Osta R, Rodellar C, Martin-Burriel I, Zaragoza P (2013) Genetic diversity and differentiation of five Cuban cattle breeds using 30 microsatellite loci. *Journal of Animal Breeding Genetics* 130: 79-86.
- Álvarez I, Capote J, Traoré A, Fonseca N, Perez K, Cuervo M, Fernández I, Goyache F (2012) Genetic relationships of the Cuban hair sheep inferred from microsatellite polymorphism. *Small Ruminant Research* 104: 89-93.

- Bernardes DA, Grossi RP, Savegnago ME, Buzanskas SB, Ramos EP, Romanzini DG, Guidolin DGF, Bezerra LAF, Lobo RB, Munari DP (2016) Population structure of Tabapuã beef cattle using pedigree analysis. *Livestock Science* 187: 96-101.
- ICA (2018) Censo bovino nacional. <https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos-2016/censo-2018>. Fecha de consulta: 13 de Julio de 2019.
- Ciani E, Ciampolini R, D'Andrea MS, Castellana E, Cecchi F, Incoronato C, D'Angelo F, Albenzio M, Pilla F, Matassino D, Cianci D (2013) Analysis of genetic variability within and among Italian sheep breeds reveals population stratification and suggests the presence of a phylogeographic gradient. *Small Ruminant Research* 112: 21-27.
- Dixit SP, Verma NK, Aggarwal RAK, Vyas MK, Rana J, Sharma A (2012) Genetic diversity and relationship among Indian goat breeds based on microsatellite markers. *Small Ruminant Research* 105: 38-45.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Excoffier L, Lischer H (2015) Arlequin ver 3.5.2 An integrated software package for population genetics data analysis. Switzerland: Swiss Institute of Bioinformatics.
- FAO (2011) Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines. Rome, Italy. 100p.
- FAO (2013) In vivo conservation of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines, No. 14. Rome, Italy. 270p.
- Gororo E, Makuza SM, Chatiza FP, Chidzondo F, Sanyika TW (2018) Genetic diversity in Zimbabwean Sanga cattle breeds using microsatellite markers. *South African Journal of Animal Science* 48: 128-141.
- Goudet J (2002) FSTAT (version 2.9.3.2): a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- Henson EL (1992) In-situ conservation of livestock and poultry. FAO Animal Production and Health Paper, Rome, Italy. 99p.
- Kayang BB, Inoue-Murayama M, Hoshi T (2002) Microsatellite loci in Japanese quail and cross-species amplification in chicken and guinea fowl. *Genetic Selection Evolution* 34: 233-253.
- Martínez R, Vásquez RE, Gallego JL (2012) Eficiencia productiva de la raza Bon en el trópico colombiano. Corpoica. Bogotá, Colombia. 215p.
- Meuwissen TI, Luo Z (1992) Computing inbreeding coefficients in large populations. *Genetic Selection Evolution* 24: 305-313.
- Ocampo R, Martínez R, Cardona H (2016) Genetic diversity of Colombian sheep by microsatellite markers. *Chilean Journal of Agricultural Research* 76: 40-47.
- Ocampo RJ, Martínez RA, Rocha JF, Cardona H (2017) Genetic characterization of Colombian indigenous sheep. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 30: 116-125.
- Ocampo R, Ramirez J, Lopera J, Restrepo G, Gallego J (2020) Genetic diversity assessed by pedigree analysis in the blanco orejinegro (Bon) cattle breed population from the colombian germplasm bank. *Chilean journal of agricultural & animal sciences* 36: 69-77.
- Park SDE (2008) Excel Microsatellite Toolkit. Computer program and documentation distributed by the author. <http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit>. Fecha de consulta: 01 de Julio de 2019.

- Pham LD, Do DN, Binh NT, Nam LQ, Ba NV, Thuy TTT, Hoan TX, Cuong VCh, Kadarmideen HN (2013) Assessment of genetic diversity and population structure of Vietnamese indigenous cattle populations by microsatellites. *Livestock Science* 155: 17-22.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Peel D, Ovenden JR, Peel SL (2004) Neestimator: software for estimating effective population size. Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries. Brisbane. Versión 12. <http://www.molecularfisherieslaboratory.com.au/scientific-papers/>. Fecha de consulta: 01 de Julio de 2019.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
- Salamanca CA (2006) El ganado criollo Casanareño y su entorno productivo. Censo y caracterización de los sistemas producción del ganado criollo y colombiano. Santafé de Bogotá, Colombia. <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/ganado-criollo-casanare-entorno-t26527.htm>. Fecha de consulta: 18 de Julio de 2020.
- Sanarana Y, Visser C, Bosman L, Nephawe K, Maiwashe A, Van Marle-Köster E (2016) Genetic diversity in South African Nguni cattle ecotypes based on microsatellite markers. *Tropical Animal Health Production* 48: 379-85.
- Santana I, Abeledo CM, Sánchez N (2017) Estimación de los niveles de endogamia en el centro genético núcleo del cerdo criollo cubano. *AICA* 9: 129-134.
- Sastre HJ, Rodero E, Rodero A, Azor PJ, Sepúlveda NG, Herrera M, Molina A (2005) Caracterización faneróptica, morfológica, morfométrica y genética de la raza colombiana criolla Casanare, Villavicencio, Colombia. <https://sites.google.com/a/ganadocriollocolombiano.com/ganadocriollocolombiano/razas-2/casanare-cas>. Fecha de consulta: 18 de Julio de 2020
- Souza CA, Paiva SR, McManus CM, Azevedo HC, Mariante AS, Drattapaglia D (2012) Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Ines hair sheep in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 8: 1217-29.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tolone M, Mastrangelo S, Rosa AJM (2012) Genetic diversity and population structure of Sicilian sheep breeds using microsatellite markers. *Small Ruminant Research* 102: 18-25.
- Villalobos Cortés AI, Martínez AM, Escobar C, Vega-Pla JL, Delgado JV (2010) Study of genetic diversity of the Guaymi and Guabala bovine populations by means of microsatellites. *Livestock Science* 131: 45-51.
- Weir BS, Cockerham C (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Zuccaro A, Bordonaro S, Criscione A, Guastella M, Perrotta G, Blasi M, D'Urso G, Marletta D (2008) Genetic diversity and admixture analysis of Sanfratellano and three other Italian horse breeds assessed by microsatellite markers. *Animal* 2: 991-998.