

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GANADO HARTÓN DEL VALLE USANDO MARCADORES MOLECULARES RAMS

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF "HARTON DEL VALLE CATTLE" USING MOLECULAR MARKERS RAMS

ANA MARÍA PIEDRAHITA¹, JAIME EDUARDO MUÑOZ²,
ÁNGELA ALVAREZ³, ANDRÉS MAURICIO POSSO⁴

PALABRAS CLAVE:

Hartón del Valle, diversidad genética, marcadores moleculares, RAMS.

KEY WORDS:

Harton del Valle, genetic diversity, molecular markers RAMS.

RESUMEN

El Hartón del Valle hace parte de las siete razas de ganado bovino criollo colombiano. Para estudiar su diversidad genética fueron muestreados 33 individuos de la raza Hartón del Valle y 3 individuos de la raza Holstein, como control externo. Las muestras fueron analizadas mediante la técnica molecular RAMS (Random Amplified Microsatellites). Usando los primers CGA, CCA, TG y CT, se obtuvieron patrones de amplificación que mostraron variación entre y dentro de la raza Hartón del Valle y se lograron distinguir tres grupos entre los individuos. Un primer grupo lo conformaron individuos de la Granja Mario González Aranda (GMGA) y el Centro Experimental (Ceunp); el segundo grupo, la Hacienda San Rafael (SR) y Hacienda El Capricho (HC) y el tercer grupo, la Hacienda La Ondina (HLO), Hacienda El Gran Capricho (HGC) y Hacienda Samanes (HS). Se obtuvo un valor de heterocigosidad $H = 0.2336$, oscilando entre 0.0718 y 0.2542, resultados similares a otros estudios en ganado criollo colombiano. La GMGA y Ceunp, obtuvieron los mayores valores (0.2542 y 0.2521, respectivamente), en el análisis de distancia y similitud, estos formaron un grupo independiente del resto de hatos, indicando que son un núcleo que ha expresado valiosa información acerca de su variabilidad genética. Se calculó el estadístico F_{st} de diferenciación poblacional y se obtuvo un valor de $F = 0.4112$ indicando que existe gran diferenciación genética entre los hatos evaluados. En el análisis de varianza molecular se obtuvo un porcentaje de variación entre hatos del 39.5% y dentro de hatos del 60.5%.

Recibido para evaluación: Noviembre 30 de 2004. Aprobado para publicación: Febrero 8 de 2005.

- 1 Trabajo de Grado Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 2003. Zootecnista.
- 2 Ing. Agrónomo. Esp. En Matemáticas. Profesor Asociado Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira.
- 3 Zootecnista. M. Sc. Profesora Asistente Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira.
- 4 Laboratorio de Biología Molecular. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

Correspondencia: biotecnofaca@unicauca.edu.co

ABSTRACT

The Hartón of Valle makes part of the seven bovine criollo Colombian cattle. In order to study the genetic diversity, 33 Hartón of Valle individuals and 3 Holstein individual as external control were sampled. The samples were analyzed through the molecular technique RAMS (Random Amplified Microsatellites). Using the primers CGA, CCA, TG y CT, amplification patterns were obtained, which showed a variation within and inside the Hartón of Valle race distinguishing three groups among the individuals. The first group was integrated by individuals of the Mario Gonzalez Aranda farm (GMGA) and the experimental center (Ceunp); the second one, the San Rafael (SR) and Capricho (HC) haciendas and the third group, la Ondina (HLO), gran Capricho (HGC) and Samanes (HS) haciendas. A heterocigosity value $H = 0.2336$ was obtained, oscillating between 0.0718 and 0.2542, similar results to other studies in criollo Colombian cattle. La GMGA y Ceunp, obtained the highest values (0.2542 and 0.2521, respectively) in the similitude and distance analysis, these integrated an independent group from the rest of the herds, which indicated they are a nucleus expressing valuable information about its genetic variability. The F_{st} demographic differentiation statistic was calculated, a value of $F = 0.4112$ was obtained, indicating that there is a great genetic differentiations between the evaluated herds. In the molecular variance analysis a variation percentage between herds of 39.5% and inside herds of 60.5% was obtained.

INTRODUCCIÓN

Por diversidad biológica se entiende la variabilidad total de estirpes genéticas, especies y ecosistemas. Los recursos genéticos se cuentan entre los bienes más valiosos y estratégicamente más importantes que posee un país, contribuyen al bienestar de la sociedad al establecer un equilibrio en los ecosistemas y constituyen un componente primordial de los sistemas de producción pecuarios. (1).

Los animales domésticos satisfacen al menos el 30% de las necesidades humanas de alimentación y agricultura en forma de carne, leche, productos lácteos, huevos, fibra, fertilizante para los cultivos y potencia de tracción, contribución realizada aproximadamente por unas 4500 razas obtenidas a partir de 40 o más especies de animales domésticos. Estas razas han sido desarrolladas a lo largo de los últimos 12.000 años y representan el patrimonio restante de diversidad genética a partir del cual deberán satisfacerse las demandas futuras, las cuales se están extinguiendo a una velocidad de seis razas por mes. (2). Colombia se encuentra ubicado en la zona tropical y es quizá el país latinoamericano que posee el mayor número de razas criollas de la especie bovina: Blanco Orejinegro, Casanareño, Chino Santandereano, Costeño con Cuernos, Hartón del Valle, Romosinuano y San Martinero, son el resultado del apareamiento realizado en el continente americano de los varios tipos de ganado comunes en España en la época del descubrimiento y conquista, los cuales se aparearon entre sí en forma casi indiscriminada, hasta comienzos del siglo pasado.

El ganado criollo *Bos taurus*, ha sido reemplazado por razas de ganado *Bos indicus*, el cual sufre el desplazamiento de razas europeas mejoradas o por las cruza con estas. La importación o el cruzamiento con razas mejoradas puede resultar en la pérdida de material genético criollo antes que su potencial real sea conocido (6).

El Hartón del Valle al igual que todas las razas criollas de ganado bovino, desde poco menos de 100 años, ha sido sometido constantemente a cruzamientos graduales de absorción hacia ganado cebuino o taurino, ocasionando una disminución en la población pura. El origen del Hartón del Valle se deriva directamente de la raza criolla Costeño con cuernos con una mezcla con ganados del sur de Perú y Ecuador (5).

Los marcadores moleculares han sido utilizados para la identificación genealógica, para la caracterización de distancias genéticas entre razas y para una investigación más eficaz y eficiente que ayude a comprender la función animal tanto por lo que se refiere a sus características de producción como de adaptación (Delgado, et al, 2001). Los marcadores son caracteres que se pueden detectar a nivel morfológico, bioquímico o a nivel de ADN; permiten diferenciar entre genotipos y se pueden usar para obtener información acerca de las características genéticas de un organismo (3).

En la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, se adelantan proyectos de investigación en diversidad genética animal y vegetal. En este estudio se pretende obtener información sobre la diversidad genética del

ganado criollo Hartón del Valle, utilizando marcadores genéticos RAMS (Random Amplified Microsatellites), se plantaron los siguientes objetivos: Caracterizar la diversidad genética de la raza criolla Hartón del Valle mediante el uso de marcadores moleculares RAMS y conocer la diversidad genética de las seis fincas más representativas de la raza mediante el uso de técnicas estadísticas multivariadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

UBICACIÓN Y SELECCIÓN DE HATOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Valle del Cauca. Se ubicaron seis fincas del Valle del Cauca, con individuos de la raza Hartón del Valle y como control externo, se seleccionó una finca con individuos de la raza Holstein; se procesaron de cinco a ocho muestras de sangre por finca y se extrajo el ADN, para un total de 36 muestras (Tabla 1).

EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN fue extraído a partir de 5 ml de sangre, utilizando el protocolo de extracción de "Salting Out". La sangre se tomó usando tubos vacutainer con EDTA, y se centrifugaron 5 ml de sangre con anticoagulante EDTA a 2000 r. p. m x 10 minutos. Los glóbulos blancos se resuspendieron en un 1 ml de solución de lisis I. Se adicionó 400 µl de solución de lisis II y 20 µl de proteinasa K (PK: 10 ug / µl). La mezcla se incubó en baño maría a 56° C durante 1 hora. A cada muestra se le agregó 200 µl de NaCl 5 M y fueron centrifugadas a 13000 r. P. m x 10 minutos. El sobrenadante (200 – 500 µl) fue transferido a tubos nuevos con etanol absoluto

"frío" (99.98% - 900 µl) para precipitar el ADN. Para obtener una precipitación total, los tubos se almacenaron a –20° C hasta el día siguiente. Previa centrifugación, se agregó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó por 5 minutos a 13000 r. p. m y se dejaron secar los tubos totalmente. Se adicionaron 100 µl de TE 1X y al día siguiente se adicionó 1 µl de RNAsa.

CUANTIFICACIÓN DE ADN

La concentración de ADN se determinó utilizando ADN del bacteriófago lambda (DNAλ), utilizando 20 ng / µl, 0.5 µl de azul de bromofenol y diferentes cantidades de TE 1X, visualizándose a través de un gel de agarosa al 0.8 %. Las muestras de ADN fueron diluidas a un volumen total de 100 µl a 5 ng de concentración.

AMPLIFICACIÓN DE ADN VÍA PCR

Se utilizaron siete primers para el método Microsatélites RAMS (Tabla 2). La técnica de Microsatélites RAMS se realizó en un volumen total de 25 µl, conteniendo tampón de PCR 1X, 0.2mM de cada DNTP's, 4 µM de primer, 1 unidad de la enzima Taq polimerasa, 20 ng de ADN y diferentes niveles de buffer de taq y MgCl₂, según cada cóctel. Se completó con agua bidestilada filtrada estéril. Como controles negativos se usó la mezcla de reactivos y se reemplazó el ADN por agua bidestilada, filtrada y estéril. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC 100 Programmable Thermal Controller de MJ. Research, Inc. (Tabla 2 , 3 y 4).

El programa de amplificación varió al momento de la hibridación de los primers de acuerdo al cebador utilizado (Tabla 5 y 6). Los productos de amplificación se almacenaron a –20 ° C.

TABLA 1: Ubicación y selección de hatos

FINCA	UBICACIÓN	N	ALTURA (msnm)	T (° C)	HR (%)	PRECIPITACIÓN (mm)
GMGA	Palmira	8	1001	24	72	1000
CEUNP	Candelaria	5	1010	23.8	75	1002
SAN RAFAEL	Bugalagrande	5	956	28	76	1000
CAPRICH0	Cali	5	995	27	80	1100
GRAN CAPRICH0	Candelaria	3	1000	27	70	1200
ONDINA	Roldanillo	7	960	28	65	750
SAMANES	Roldanillo	3	1000	26	65	800

TABLA 2: Primers usados en Microsatélites RAMS

PRIMER	SECUENCIA (5' a 3')
AG	HBH (AG) ₇ A
CT	DVD (CT) ₇ C
CA	DBD A (CA) ₇
CCA	DDB (CCA) ₅
CGA	DHB (CGA) ₅
GT	VHV (GT) ₅ G
TG	HVH (TG) ₇ T

Las siguientes designaciones son usadas para los sitios degenerados: H (A, T o C); B (G, T o C); V (G, A o C) Y D (G, A o T).

TABLA 3: Datos para la preparación del cóctel para una muestra

	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen
1. Buffer de Taq	10x	1x	-
2. dNTP'S	1.25 mM	0.2 Mm	4 μ l
3. Primer	50 μ M	4 μ M	2 μ l
4. MgCl ₂	25 mM	-	-
5. ADN	10 ng/ μ l	20 ng	2 μ l
6. Taq Polimerasa	5 u/ μ l	1 unidad	0.2 μ l
7. H ₂ O HPLC	-	-	-
Total			25 μ l

TABLA 4: Datos para la preparación de cócteles de RAMS

	COCTELES (Volumen / μ l)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Buffer	2.5	2.5	2.5	2.5	1.6	2	2	3
dNTP's	4	4	4	4	4	4	4	4
Primer	2	2	2	2	2	2	2	2
MgCl ₂	1.5	2	2.5	3	1.5	1.5	2.5	1.5
ADN	2	2	2	2	2	2	2	2
Taq	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O	12.8	12.3	11.8	11.3	13.7	13.3	12.3	12.3
Total	25	25	25	25	25	25	25	25

TABLA 5: Perfil térmico para RAMs

PASOS	TEMPERATURA (° C)	TIEMPO (min.)	ETAPAS
1	95	5:00	Desnaturalización inicial
2	95	5:00	Desnaturalización
3	50-58	0:45	Hibridación
4	72	2:00	Extensión
5	37 veces desde 2		
6	72	7:00	Extensión final

TABLA 6: Temperatura de hibridación utilizada para cada primer

Temperatura (° C)	Primer
50	AG – CA
55	CCA – TG – CT
58	GT - CGA

ELECTROFORESIS

El ADN total se visualizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % y los productos amplificados en geles al 1.2 %, preparados con TBE 0.5 X (trisma borato EDTA) y con bromuro de etidio (10 mg/ml). A cada una de las muestras de ADN se le agregó Blue Juice 10 X y fueron servidas en los pozos. La electroforesis se corrió a 90 voltios durante tres horas. Los geles se observaron en un transiluminador FBTIV-88, FisherBiotech® y fueron fotografiados con una cámara digital Kodak.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Similitud genética

La lectura de las bandas se realizó con base en el criterio de Berg y Hamrick (1997), los cuales consideran como locus polimórfico aquel en el cual el alelo más común tiene una frecuencia menor al 99%. Se creó una matriz de variables binarias, en la que los individuos representan el lugar de las filas y las bandas evaluadas el lugar de las columnas; posteriormente se creó la matriz de similitud con el paquete estadístico TFGA® (Tools for population genetic analyses, versión 1.3, febrero de 2000) y a partir de ella se construyó el dendrograma utilizando el método gráfico de agrupamiento UPGMA (Unweighted pair group arithmetic mean) y por medio del paquete estadístico NTSYS (Numerical Taxonomy System for personal Computer, versión 2.02 PC), se construyó el dendrograma por haplotipos*.

La similitud genética entre los individuos fue calculada utilizando el coeficiente de similitud de Nei – Li, (4), también conocido como similaridad de DICE (1945) (7)

o de Sorense, la cual permite estudiar conjuntos de individuos:

$$S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$$

Donde,

S_{ij} = Similaridad entre el individuo i y el j
a = N° de bandas presentes simultáneamente en los individuos i y j
b = N° de bandas presentes en i y ausentes en j
c = N° de bandas presentes en j y ausentes en i

DIVERSIDAD GENÉTICA

Se calculó el índice de heterocigosidad o diversidad genética, que indica la probabilidad de muestrear dos genes que sean diferentes dentro de una o mas poblaciones, usualmente denominada H_e , o simplemente H. Es la medida más generalizada de diversidad genética. Se estima mediante la fórmula:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^q x_i^2$$

Donde,

X_i = Frecuencia en la población del alelo i y q es el número de alelos.

H = Probabilidad de que dos individuos tomados al azar tengan diferente patrón; es el valor o dato con el que se presenta la diversidad de la población.

* Grupos de individuos con estructura genética idéntica, difiere de otros por la presencia o ausencia de una banda.

Estadístico Fst

Se calculó el estadístico F_{ST} , o coeficiente de diferenciación genética, para estimar la mayor diversidad posible en cada subgrupo:

$$F_{ST} = H_{ST} / H_T$$

Se tuvo en cuenta la clasificación de Wright (1978), para evaluar el índice de Fst, donde,

- 0 – 0.05 = Poca diferenciación genética
- 0.05 – 0.15 = Moderada diferenciación genética
- > 0.25 = Gran diferenciación genética

Usando el paquete estadístico TFPGA®, se analizó la variación en la frecuencia alélica entre grupos, se determinó el estadístico Fst insesgado con un intervalo de confianza del 95%, obtenido mediante 1000 permutaciones sobre los 52 loci obtenidos con cuatro primers polimórficos en las siete fincas estudiadas, con un total de 36 individuos.

Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

Se construyó una matriz de distancias para todas las fincas a partir de la matriz binaria de los datos. Se utilizó el paquete estadístico AMOVA®, por medio del programa AMOVA PREP y se llevó a cabo el análisis de varianza molecular. Por medio de este análisis se logra estimar y comparar la variación dentro de cada finca y entre las fincas, aportando una medida del porcentaje de variación a cada una de las fuentes de variación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Descriptivo

Se probaron siete primers RAMS y se seleccionaron los cuatro más polimórficos (CCA, CT, TG y CGA), los cuales generaron un total de 52 patrones de bandas, siendo los primers CGA y TG los más polimórficos (Tabla 7).

Los patrones de amplificación obtenidos con los cuatro cebadores mostraron variación entre y dentro de la raza criolla Hartón del Valle. En la Figura 1 se presenta el patrón de amplificación generado por el primer TG.

En la Figura 1, la columna 13 representa el marcador de peso molecular de 100 pares de bases (MPM); la columna 1 representa un individuo de la raza Holstein, como testigo externo, perteneciente a la Hacienda Samanes, ubicada en Roldanillo, Valle del Cauca.

Las columnas 2,3,4,5 y 6 corresponden a individuos Hartón del Valle, pertenecientes a la Granja Mario González Aranda, ubicada en Palmira y las columnas 7,8,9,10,11 y 12 corresponden a individuos del Centro Experimental, Ceunp, ubicado en Candelaria.

Los individuos de Ceunp (columnas 7,8,9,10,11 y 12), presentan una banda única en 300 pb, que se encuentran ausentes en la Granja Mario González Aranda (columnas 2,3,4,5 y 6) y en Holstein (columna 1). Se observa polimorfismo y diferencias entre individuos de la raza Hartón del Valle y la raza Holstein. En la Figura 2 se observan patrones de bandas generados por el primer CT; la columna 1 representa el marcador de peso molecular (100 pb) y el resto de las columnas representan individuos de la raza Hartón del Valle, pertenecientes a la Hacienda "La Ondina", ubicada en Roldanillo, Valle del Cauca; se observa polimorfismo dentro de la población. Los individuos de las columnas 2 y 6, presentan entre ellos patrones distintos y se diferencian del patrón que presentan los individuos de las columnas 3, 4 y 5.

DIVERSIDAD GENÉTICA

Presencias y ausencias de bandas

Se obtuvieron un total de 604 presencias y 1268 ausencias para toda la población. El patrón de bandas permitió identificar aquellos individuos con presencias y ausencias únicas, tal es el caso del locus 1 para el marcador CGA, que se encuentra ausente únicamente en cuatro de ocho individuos de la Granja Mario González Aranda y en tres de cinco del Centro Experimental Ceunp; estas ausencias únicas en estos dos núcleos permite identificarlos como los más cercanos genéticamente; Estos dos grupos pertenecen a la Universidad Nacional, Sede Palmira, son un núcleo que han expresado valiosa información acerca de su variabilidad genética, lo que justifica establecer programas de cruzamientos o descarte de animales, evitar consanguinidad de los rebaños como alternativa de conservación de la raza como un recurso genético animal.

Tabla 7: Número de loci y rangos encontrados en los primers evaluados

PRIMER	Nº LOCI POLIMÓRFICO	Rango (pb)
CGA	14	100-1200
TG	16	80-950
CCA	11	100-800
CT	11	100-700

FIGURA 1: Patrones de bandas generadas por los microsatélites RAMS (TG) en individuos de ganado criollo Hartón del Valle y una población testigo.

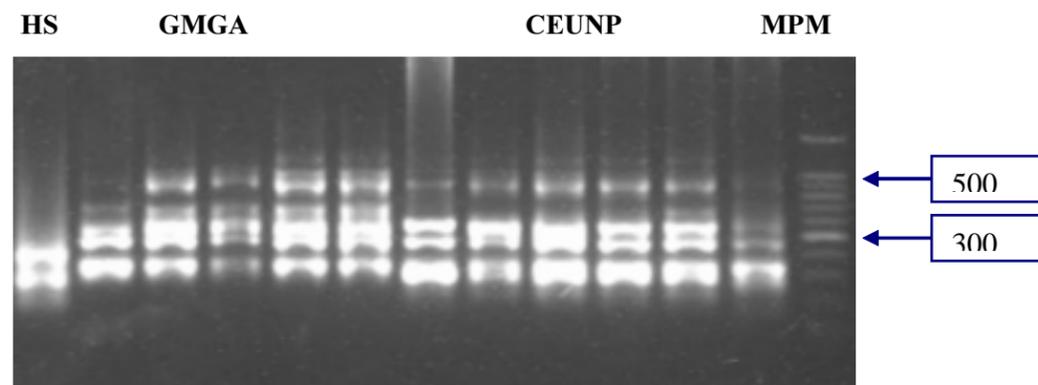
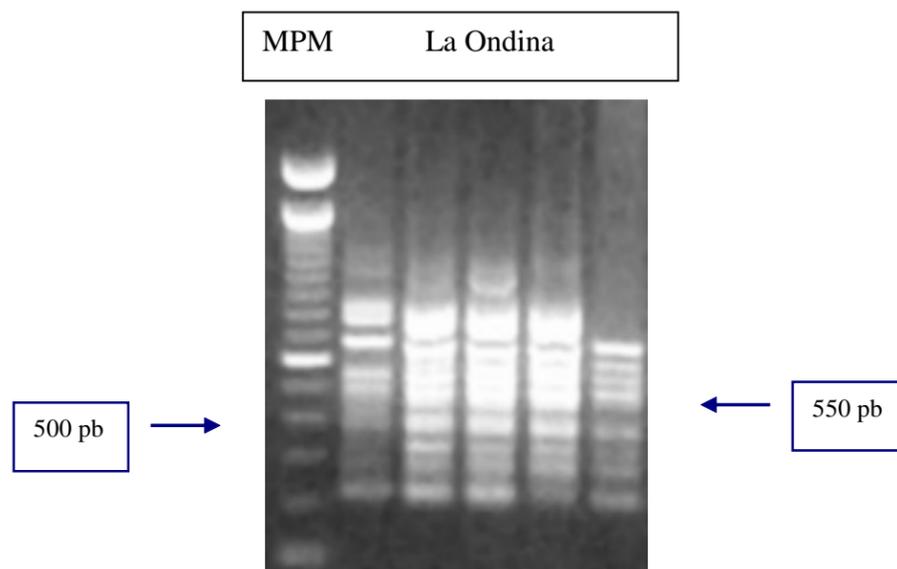


FIGURA 2: Patrones de bandas generadas por los microsatélites RAMS (CT) en individuos de ganado criollo Hartón del Valle.



El número de bandas presentes en Hartón del Valle y ausentes en Holstein, permite que en el futuro, se pueda utilizar esta información para localizar genes de interés dentro de la raza Hartón del Valle. Una vez determinado el marcador RAMS, la banda que produce el polimorfismo, puede ser extraída del gel, clonada en un plásmido y secuenciada, de tal manera, que luego, podrían sintetizarse primers específicos para amplificar vía PCR dicho fragmento.

Heterocigosidad y porcentaje de loci polimórfico

Se compararon los valores de heterocigosidad para cada una de las fincas evaluadas y se encontró un valor de $H = 0.2636$ para todos los individuos, los valores oscilaron entre 0.0718 y 0.2542; la Granja Mario González Aranda, obtuvo el mayor valor ($H = 0.2542$), seguida por Centro Experimental, Ceunp ($H = 0.2521$), indicando que son los hatos con mayor variabilidad en los loci estudiados; y el menor valor observado para la Hacienda Samanes de ganado Holstein (0.0718) y El Gran Capricho (0.0974).

El porcentaje de loci polimórfico es uno de los indicadores del potencial de un marcador para evaluar diversidad. De igual forma que los valores de heterocigosidad, el grupo que obtuvo el mayor valor de loci polimórfico fue el de la Granja "Mario González Aranda" con 63.3%, seguido por Ceunp (57.6%). (Tabla 8).

Similitud genética

En el dendrograma obtenidos por RAMS (Figura 3), con base en el índice de similitud de Nei – Li, se observa que los individuos se separan en 3 grupos a un nivel de similitud de 0.45. El primer grupo está formado por los individuos de la Granja Mario González Aranda y el Centro Experimental, Ceunp; el segundo grupo está conformado por individuos de la Hacienda "San Rafael" y "El Capricho", y el tercer grupo lo conforman los individuos Holstein de la Hacienda Samanes e individuos Hartón del Valle de "La Ondina" y "El Gran Capricho".

TABLA 8. Heterocigosidad y porcentaje de loci polimórficos para hatos de ganado criollo Hartón del Valle y el grupo testigo.

POBLACIÓN	TAMAÑO DE MUESTRA (n)	Heterocigosidad (H)	% loci polimórficos (99%)
1.Granja MGA	8	0.2542	63.3077
2.Ceunp	5	0.2521	57.6923
3.San Rafael	5	0.1705	42.3077
4.El Capricho	5	0.1248	30.7692
5.La Ondina	7	0.1748	53.8462
6.Gran Capricho	3	0.0974	23.0769
7.Samanes	3	0.0718	15.3846
TOTAL	36	0.2636	100

De acuerdo a los datos obtenidos para los primers RAMS, se encontró que los valores de heterocigosidad oscilaron entre 0.2021 y 0.3092, siendo los primers CT y CCA, los más adecuados para estimar diversidad en la población evaluada ($H = 0.3522$ y 0.3092 , respectivamente) con 11 loci polimórficos. Los valores de F_{st} oscilaron entre 0.2589 - 0.4740, siendo el primer CGA, el de mayor aporte para estimar diferenciación genética (Tabla 9).

TABLA 9: Valores de Heterocigosidad y F_{st} para los primer RAMS

PRIMER	HETEROCIGOSIDAD	% loci poli.	F_{st}	S.D
CCA	0.3092	100	0.2589	0.0428
CGA	0.2283	100	0.4740	0.0877
CT	0.3522	100	0.4619	0.0610
TG	0.2021	100	0.4441	0.0507

El grupo de La Granja Mario González Aranda y El Centro Experimental Ceunp, a pesar de ser núcleos de pequeño tamaño, se distinguen de los otros y se presentan diferencias al interior de ellos. Estos dos grupos son los que más se diferencian de los individuos de la raza Holstein, (Figura 3), lo que sugiere que tienen menos relaciones genéticas con esta raza y deben ser conservado, por tanto los animales superiores de estos núcleos pueden ser usados para aumentar la pureza de la raza Hartón del Valle. La concordancia de los datos obtenidos con los marcadores RAMS y la manera como se constituyeron los hatos permite que se sugieran estos marcadores para estudios de relaciones genéticas entre individuos y para estudios de diversidad genética en razas criollas, como una alternativa a los microsatélites clásicos.

Distancia Genética

En el dendrograma de distancia obtenido mediante el análisis UPGMA (Figura 4), se observa la similitud de los hatos Hartón del Valle y el grupo testigo con animales Holstein.

Se observa que los individuos se separan en 4 grupos a un nivel de similitud de 0.15; un primer grupo está conformado por individuos de la “La Ondina” y “El Gran Capricho”, el segundo grupo está conformado por “San Rafael” y “El Capricho”, el tercer grupo por Granja “MGA” y “Ceunp”, y por último se encuentran los individuos de ganado Holstein, de la Hacienda “Samanes”, aislados del resto de la población. Los hatos La Ondina y El Gran Capricho, son los que comparten más genes, con un

Figura 3: Dendrograma de similitud de 36 individuos de ganado Hartón del Valle y el grupo testigo.

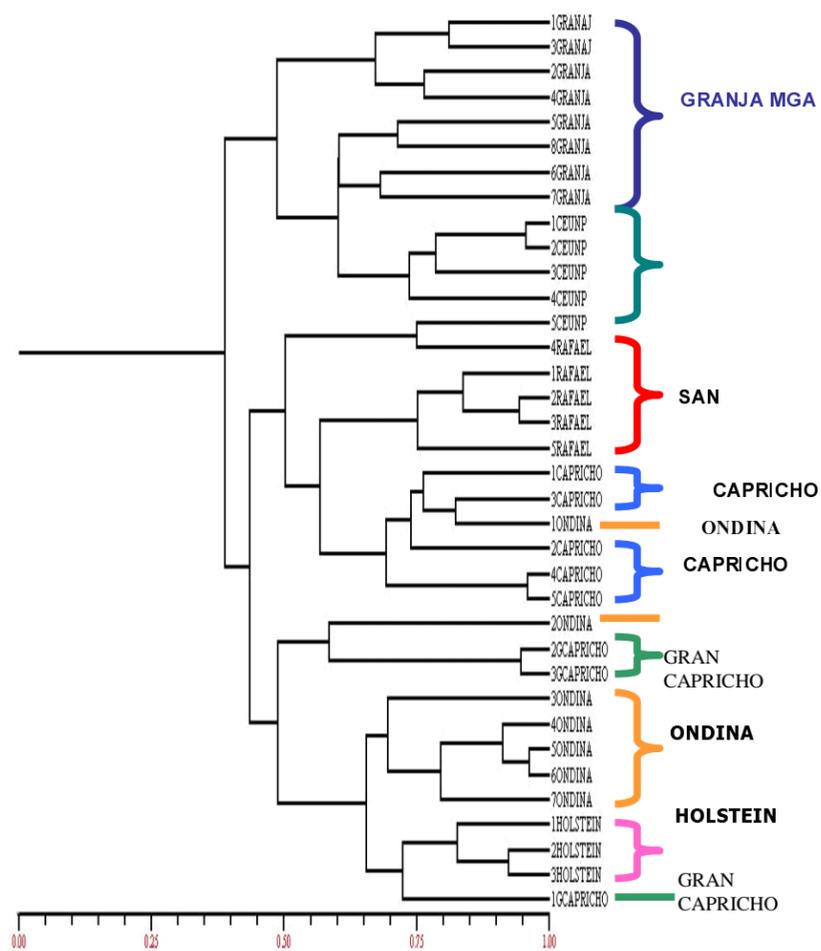
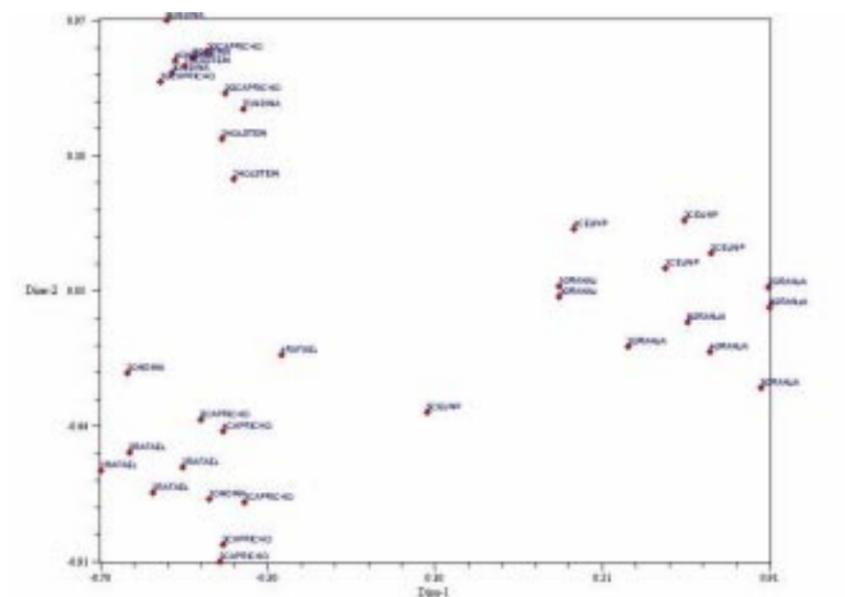


FIGURA 4: Análisis de correspondencia múltiple de 33 individuos de raza Hartón del Valle y 3 individuos Holstein, basado en patrones de microsatélites.



índice de distancia de 0.0680 (Figura 13), lo que se confirma con el dendrograma con individuos, ya que se relacionan en el mismo grupo (Figura 3).

Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM)

Se realizó el análisis de correspondencia múltiple (ACM), utilizando el análisis multivariado NTSYS, que permite representar de forma tridimensional el grupo de individuos, de acuerdo con sus características descriptivas en un plano, donde la asociación se basa en variables específicas.

El gráfico en tercera dimensión generado por Análisis de Correspondencia Múltiple, muestra la distribución de los individuos en 3 grupos (Figura 4).

Se conforman tres grupos: el primero conformado por los núcleos de la Granja MGA y Ceunp, el segundo por individuos de San Rafael y El Capricho, y el tercero por individuos de El Gran Capricho, La Ondina y Samanes. Estos resultados sugieren:

- Que el núcleo de la Universidad Nacional tiene una composición que lo diferencia del resto.

- El núcleo de San Rafael y El Capricho se diferencian de la raza Holstein y por lo tanto pueden constituirse en un grupo importante por su tamaño, en la conservación de la raza.
- Gran Capricho tiene alta similitud con Holstein, y de acuerdo a los resultados obtenidos presenta características que se alejan de los individuos representantes de la raza Hartón del Valle.
- En la Ondina se presentaron algunos individuos cercanos a Hartón del Valle y otros a Holstein. Con esta técnica RAMS, se pueden identificar individuos cercanos a Holstein en caso de que se desee conservar un núcleo de Hartón del Valle más puro.

Los valores de identidad concuerdan con los valores de distancia, siendo los hatos El Gran Capricho y La Ondina (7-5), los más cercanos, obteniendo el mayor valor de identidad (0.9343), y los hatos Hacienda Samanes (Holstein) y Centro Experimental, Ceunp (6-2), las más distantes, el menor valor de identidad (0.7386) (Tabla 10).

El polimorfismo encontrado sugiere que la técnica puede ser útil en programas de mejoramiento o manejo, (por ejemplo, permitir adoptar estrategias óptimas de

cruzamientos para identificar individuos lejanos), así como encontrar el grado de mezcla racial existente entre los individuos.

La técnica RAMS ofrece ventajas al ser comparada con otros tipos de técnicas moleculares: permite detectar el polimorfismo por visualización de los fragmentos directamente en geles de agarosa, requiere poca cantidad de ADN, no requiere hibridación con sondas ni transferencia a membranas eliminando la necesidad de isótopos radioactivos. Además es una técnica que reúne la reproducibilidad de microsatélites y la sencillez de RAPD, y se logró discriminar entre y dentro de grupos de acuerdo a cada uno de los hatos evaluados.

Estadístico Fst

Se calculó el estadístico Fst, sobre las siete localidades de muestreo, en un total de 36 individuos, asumiendo equilibrio Hardy – Weinberg, por tratarse de un marcador dominante, con un intervalo de confianza del 95 %, sobre los 52 loci obtenidos con los 4 cebadores evaluados. El valor de Fst fue de 0.4112, con una desviación

estándar de 0.037. De acuerdo con la clasificación de Wright (1978), el valor de Fst encontrado indica que existe gran diferenciación genética entre los hatos evaluados, lo que justifica su conservación como un recurso genético animal. La diferenciación se debe básicamente a la conformación de los grupos, dos de los cuales pueden ser considerados importantes para la conservación de la raza Hartón del Valle

Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

De acuerdo con los resultados obtenidos por el análisis de varianza molecular, se obtuvo un porcentaje de variación entre grupos del 39.5 % y dentro de grupos del 60.5 %, lo cual indica que existe mayor variación dentro de grupos que entre grupos (Tabla 11). Esta variación se debe a la gran diversidad de los grupos evaluados, que se aprecia tanto dentro como entre los grupos. Hay alta variación entre grupos, dos asociados a Hartón del Valle y uno mezclado con Holstein. Esta información se puede utilizar para programas de cruzamientos entre individuos de los dos grupos, aprovechar las distancias genéticas y probablemente obtener mayor vigor híbrido.

TABLA 10: Distancia genética no sesgada de Nei (1978) en la parte inferior de la diagonal, e identidad genética no sesgada de Nei (1978) en la parte superior de la diagonal, entre los grupos de ganado criollo Hartón del Valle y el grupo testigo.

GRUPO	1	2	3	4	5	6	7
1.Granja MGA	****	0.9028	0.8108	0.7995	0.8575	0.7420	0.8575
2.Ceunp	0.1022	****	0.8277	0.8434	0.8875	0.7386	0.8107
3.San Rafael	0.2097	0.1891	****	0.8951	0.8852	0.7649	0.8046
4.El Capricho	0.2238	0.1704	0.1108	****	0.9132	0.7567	0.8193
5.La Ondina	0.1537	0.1193	0.1219	0.0908	****	0.8470	0.9343
6.Saman (Holstein)	0.2984	0.3030	0.2680	0.2788	0.1661	****	0.8136
7.Gran Capricho	0.1538	0.2099	0.2175	0.1993	0.0680	0.2063	****

TABLA 11: Análisis de Varianza Molecular para siete hatos de Hartón del Valle y el grupo testigo.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	% de variación
Entre grupos	6	146.09464	3.7231	39.50
Dentro de grupos	29	165.3869	5.7029	60.50
Total	36	312.3333		

La alta variación al interior de los grupos de Hartón del Valle, permite también identificar los animales más distantes dentro de cada grupo para mejorar el rendimiento productivo.

CONCLUSIONES

1. El uso de marcadores moleculares RAMS, permitió caracterizar la diversidad genética de la raza criolla Hartón del Valle.
2. Se evaluaron siete primers, seleccionándose los cuatro más polimórficos (CCA, CGA, CT y TG), los cuales generaron un patrón de bandas distinguible entre 80 Y 1200 pares de bases. El número de loci polimórfico fue de 11 para los primers CCA y CT, 14 para el primer CGA y 16 para el primer TG. cebadores mostraron variación dentro de la raza criolla Hartón del Valle.
3. Se obtuvo un valor de heterocigosidad $H = 0.2636$ para todos los individuos; los valores oscilaron entre 0.0718 y 0.2542; la Granja Mario González Aranda, obtuvo el mayor valor ($H = 0.2542$), seguida, Ceunp ($H = 0.2521$), indicando que son los hatos con mayor variabilidad en los loci estudiados; y el menor valor observado para la Hacienda Samanes de ganado Holstein (0.0974). de igual manera la Granja "Mario González Aranda" obtuvo el mayor valor de % de loci polimórfico (63.3%), seguido por Ceunp (57.6%).
4. Los grupos de la Granja Mario González Aranda y Ceunp, son núcleos que han expresado valiosa información acerca de su variabilidad genética, lo que justifica establecer programas de cruzamientos o descarte de animales, evitar consanguinidad de los rebaños como alternativa de conservación de la raza como un recurso genético animal.
5. Los valores de heterocigosidad para los primers evaluados, oscilaron entre 0.2021 y 0.3092; siendo los primers CT y CGA, los de mayor aporte para estimar diversidad en la población evaluada ($H = 0.3522$ y 0.3092, respectivamente) con 11 loci polimórficos.
6. El análisis de polimorfismos (UPGMA), obtenidos por RAMS, con base en el índice de similitud de Nei – Li, permitió separar los individuos en 3 grupos a un nivel de similitud de 0.45. El primer grupo conformado por los individuos de la Granja Mario González Aranda y Ceunp; el segundo grupo por individuos de la Hacienda "San Rafael", "El Capricho", "La Ondina" y "El Gran Capricho" y el tercer grupo por individuos de raza Holstein de la Hacienda Samanes.
7. Los valores de identidad se correlacionan con los valores de distancia, siendo los hatos El Gran Capricho y La Ondina (7-5), los más cercanos, obteniendo el mayor valor de identidad (0.9343), y los hatos Hacienda Samanes (Holstein) y Centro Experimental, Ceunp (6-2), las más distantes, el menor valor de identidad (0.7386). Esta técnica permite dar información sobre la variabilidad genética existente entre los núcleos más representativos de la raza Hartón del Valle, en el Valle del Cauca, estimado a partir de la técnica molecular RAMS.
8. El valor de F_{st} fue de 0.4112, con una desviación estándar de 0.037; de acuerdo con la clasificación de Wright (1978), el valor de F_{st} encontrado indica que existe gran diferenciación genética entre los hatos evaluados, lo que justifica su conservación como un recurso genético animal.

REFERENCIAS

- (1) MORALES R, A. 1998. Relevancia de los recursos genéticos animales en proyectos genómicos. EN: IV Congreso Iberoamericano de Razas Criollas y Autóctonas. México, Noviembre 1998.
- (2) FAO. 1981. Recursos Genéticos Animales en América Latina. Roma. 168 p. En: <<http://www.fao.org/dad-is/>>
- (3) FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. EMBRAPA – Cenargen. Brasília, D. F.
- (4) LEUNG, H; NELSON, R. H; LEACH, J. E. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. Advances in plant pathology 10: 157-205. 1993.
- (5) PINZON, M. E. 1996. Historia de la ganadería en Colombia; Revista Costa Ganadera 8 (28): 6-8. 43. 1996.

-
- (6) SEGURA- CORREA, J. C; MONTES- PEREZ, R. C.2001. Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales (RGA). En: Rev. Biomed 2001. 12: 196-206. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. Disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb011237.pdf>.
- (7) SNEATH, P.H; SOKAL, R. 1983. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman; Co; San Francisco. 573p.