**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 ge-

nética, 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 indivi-*

*duos 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 Fst*

*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

20

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Vol 3 No.1 Marzo 2005

**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 inviduals 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 Cenup, 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 Fst 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 varianza 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 recur-

sos 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 compo-

nente primordial de los sistemas de producción pecua-

rios. (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 Cuer-

nos, Hartón del Valle, Romosinuano y San Martinero,

son el resultado del apareamiento realizado en el conti-

nente 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 desplaza-

miento de razas europeas mejoradas o por las cruzas 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 gra-

duales 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 investiga-

ción más eficaz y eficiente que ayude a comprender la

función animal tanto por lo que se refiere a sus caracte-

rísticas de producción como de adaptación (Delgado,

et al, 2001). Los marcadores son caracteres que se pue-

den detectar a nivel morfológico, bioquímico o a nivel

de ADN; permiten diferenciar entre genotipos y se pue-

den usar para obtener información acerca de las carac-

terísticas 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

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **),1&$** | **8%,&$&,Ð1** | **1** | **$/785$****PVQP** | **7   &** | **+5** | **35(&,3,7$&,Ð1****PP** |
| \*0\*$ | 3DOPLUD |   |      |    |    |      |
| &(813 | &DQGHODULD |   |      |      |    |      |
| 6$1 5$)$(/ | %XJDODJUDQGH |   |     |    |    |      |
| &$35,&+2 | &DOL |   |     |    |    |      |
| \*5$1&$35,&+2 | &DQGHODULD |   |      |    |    |      |
| 21',1$ | 5ROGDQLOOR |   |     |    |    |     |
| 6$0$1(6 | 5ROGDQLOOR |   |      |    |    |     |

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Vol 3 No.1 Marzo 2005

ganado criollo Hartón del Valle, utilizando marcadores

genéticos RAMS (Random Amplified Microsatellites),

se plantaron los siguientes objetivos: Caracterizar la di-

versidad genética de la raza criolla Hartón del Valle me-

diante el uso de marcadores moleculares RAMS y co-

nocer la diversidad genética de las seis fincas más re-

presentativas de la raza mediante el uso de técnicas es-

tadísticas 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 Co-

lombia, 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 proce-

saron 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 56º 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

**TABLA 1:** Ubicación y selección de hatos

21

frío (99.98% - 900 µl) para precipitar el ADN. Para

obtener una precipitación total, los tubos se almacena-

ron a 20º C hasta el día siguiente. Previa centrifugación,

se agregó 1 ml de etanol al 70% y centrífugo por 5 mi-

nutos a 13000 r. p. m y se dejaron secar los tubos total-

mente. 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 volu-

men 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 com-

pletó con agua bidestilada filtrada estéril. Como con-

troles negativos se usó la mezcla de reactivos y se

reemplazó el ADN por agua bidestilada, filtrada y es-

téril. La amplificación se llevó a cabo en un

termociclador PTC 100 Programmable Termal

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 utili-

zado (Tabla 5 y 6). Los productos de amplificación se

almacenaron a 20 º C.

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **35,0(5** | **6(&8(1&,$   · D  ·** |
| $\* | +%+  $\*  $ |
| &7 | '9'  &7  & |
| &$ | '%' $  &$  |
| &&$ | ''%  &&$  |
| &\*$ | '+%  &\*$  |
| \*7 | 9+9  \*7  \* |
| 7\* | +9+  7\*  7 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **3$626** | **7(03(5$785$   &** | **7,(032  PLQ** | **(7$3$6** |
|   |    |      | 'HVQDWXUDOL]DFLyQ LQLFLDO |
|   |    |      | 'HVQDWXUDOL]DFLyQ |
|   |       |      | +LEULGDFLyQ |
|   |    |      | ([WHQVLyQ |
|   |    YHFHV GHVGH   |  |  |
|   |    |      | ([WHQVLyQ ILQDO |

22

Facultad de Ciencias Agropecuarias

**TABLA 2:** Primers usados en Microsatélites RAMS

Vol 3 No.1 Marzo 2005

A o T).

**,QLFLDO**       **&RQFHQWUDFLyQ )LQDO**

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,

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

**&RQFHQWUDFLyQ** **9ROXPHQ**

   %XIIHU GH 7DT   [  [

   G173·6  P0  0P   O

   3ULPHU  0   0   O

   0J&/  P0

   $'1  QJ O  QJ   O

   7DT 3ROLPHUDVD   X O   XQLGDG  O

  + 2 +3/&

**7RWDO**  O

**TABLA 5:** Perfil térmico para RAMs

**TABLA 4:** Datos para la preparación de cócteles de RAMS

|  |  |
| --- | --- |
| **7HPSHUDWXUD   &** | **3ULPHU** |
|    | $\* ² &$ |
|    | &&$ ² 7\* ² &7 |
|    | \*7   &\*$ |

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Vol 3 No.1 Marzo 2005

23

**TABLA 6:** Temperatura de hibridación utilizada para cada primer

**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 represen-

tan 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 TFPGA® (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 in-

dividuos:

**SIJ = 2 a /(2 a + b + c)**

Donde,

SIJ = Similaridad entre el individuo i y el j

a = Nº de bandas presentes simultáneamente en los

individuos i y j

b = Nº de bandas presentes en i y ausentes en j

c = Nº 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 pobla-

ciones, usualmente denominada He, o simplemente H.

Es la medida más generalizada de diversidad genética.

Se estima mediante la fórmula:

*T*

*K* = 1 − ∑*[* 2

*L*

*L* =1

Donde,

X i = Frecuencia en la población del alelo i y q es el núme-

ro 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.

**Gracias por evaluar Wondershare PDF Converter Pro 4.0.5.**

**Sólo puedes convertir 5 páginas en la versión de prueba.**

**Para conseguir la versión completa, pide el programa desde:**

[*http://cbs.wondershare.com/go.php?pid=1032&m=db*](http://cbs.wondershare.com/go.php?pid=1032&m=db)