

Caracterización genética del ganado Criollo Lechero Dominicano utilizando microsatélites

Helmut Bethancourt¹ y Bolívar Toribio²

En el ganado bovino criollo lechero se conocen pocos animales denominados puros. La biología molecular es una herramienta utilizada para la caracterización genética de razas de animales como un prerrequisito para la toma de decisión en los programas de mejoramiento y conservación. El objetivo de este estudio es caracterizar la población bovina Criollo Lechero Dominicano con un panel de 11 microsatélites seleccionados a partir de las recomendaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) para el estudio de biodiversidad genética bovina. Se analizaron muestras de ADN obtenidas de la población bovina criollas del Centro de Investigación para el Mejoramiento de la Producción Animal (CIMPA), donde se dispone de ejemplares puros. La amplificación se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La electroforesis se llevó a cabo mediante un secuenciador automático ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer. La tipificación alélica se realizó con los paquetes informáticos Genemapper 4.0. Para cada microsatélite se calculó el contenido de información polimórfica (PIC), el número medio de alelos (N_a), la heterocigosis observada (H_o), la heterocigosis esperada (H_e), el estadístico Fis y equilibrio Hardy-Weinberg (HWE). Los valores obtenidos fueron: PIC: 0.715; N_a : 8.09; H_e : 0.7577; H_o : 0.7487. Se notan valores de heterocigosis relativamente altos, pero estos son similares a encontrados en otras poblaciones bovinas criollas latinoamericanas. Se sugirió un modelo de cruzamiento rotacional basado en cálculos de distancia genética para la conservación de esta raza criolla y procurar un aumento de su población.

Palabras clave: Variabilidad genética, microsatélites.

INTRODUCCIÓN

El ganado criollo en América Latina se caracteriza por tener cualidades favorables para su desarrollo en el trópico. Tienen pelo corto y escaso, su coloración varía desde amarillo al rojo y negro pudiendo tener un poco de blanco en la parte inferior. Su piel es pigmentada usualmente tiene arrugas en la zona del cuello, cara y alrededor de los ojos. Tienen un sistema óseo delgado, y pezuñas resistentes y buena agilidad para andar Veras *et al.* (1986).

El Criollo Lechero Dominicano es el resultado de la multiplicación y adaptación al medio ambiente de los animales traídos a la República Dominicana desde el descubrimiento de América hasta el siglo XIX. Selección natural durante tres siglos ha resultado en una adaptabilidad al trópico de animales con línea de producción lechera (SEA 1978).

La selección natural ocurrida durante años, así como cruces dirigidos por ganaderos hicieron que la denominada raza Criolla se adaptara a las condiciones climáticas locales. Sin embargo, a principio del siglo XX se notó una disminución en la calidad genética de la ganadería y se sugirió el uso de razas introducidas especializadas con mayor productividad. Desde el año 1910, se importaron toros puros de razas comerciales, estos se distribuyeron entre los ganaderos, disminuyendo el uso de ganado Criollo en el país (Ottenwalder 2002).

En el año 1976, inició un proyecto para rescatar el ganado criollo en el Centro de Investigación para el Mejoramiento de la Producción Animal (CIMPA) con apoyo de varias instituciones nacionales. El proyecto incluyó la adquisición de unas 130 vacas con características de ganado criollo en varias zonas del país. Se hicieron cua-

¹Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal (CEDAF). Santo Domingo, República Dominicana. Para contacto: helmutbio@yahoo.com

² Especialista en producción animal.

tro grupos, denominados familias, dependiendo del origen geográfico de los animales para evitar la consanguinidad entre ellos.

Aunque en algunos años se descuidaron los trabajos de conservación del ganado criollo, por lo que se redujo su población, actualmente, en el hato el Criollo lechero existen unos pocos animales denominados puros y otros considerados mestizos. Se consideró importante el aprovechamiento de la biología molecular para continuar con la adecuada conservación del ganado Criollo Lechero Dominicano.

Actualmente, el Criollo Lechero Dominicano tiene peso promedio de 430 kg y altura a la cruz de 130 cm y, usualmente, se distingue una coloración oscura en las pezuñas y partes de la cara (Toribio *et al.* 2011)

Para esta investigación se utilizaron marcadores moleculares microsatélites, recomendados por consultores de la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) para la caracterización genética de razas de animales como un prerrequisito para la toma de decisión en los programas de conservación. Los microsatélites son los más utilizados para caracterizar ganado bovino y son útiles para mapeo genético, determinación de paternidad, investigación médica y estudios de variación genética (Lirón *et al.* 2006). La información generada permitirá proponer un modelo de conservación para mantener la diversidad genética del ganado Lechero Criollo Dominicano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de pelos fueron tomadas de animales de ganado bovino Criollo Lechero Dominicano, en el Centro de Investigación y Mejoramiento para la Producción Animal (CIMPA), localizado en Estancia del Yaque, Santiago, República Dominicana, a un grupo de 21 vacas, 7 novillas y 6 toros para un total de 34 animales puros. Las muestras se enviaron de acuerdo a los lineamientos de la Dirección General de Ganadería y las autoridades competentes chilenas al laboratorio de marcadores moléculares doctor Hiroshi Takamine de la Universidad Austral de Chile, donde fueron procesadas.

A partir de cada muestra, en el laboratorio se seleccionaron 3 pelos que presentasen un folículo piloso visible. Dichos pelos se lavaron brevemente con agua destilada y se cortaron a 1 cm del bulbo. Estas muestras se dispusieron en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, al cual se le agregó 200µL de solución al 5% de Chelex 100 y 1,0 µL de proteinasa K (20 mg/ml). Las muestras se incubaron a 56°C por toda la noche en un baño termostático, y luego por 8 min a 95°C, para inactivar la proteasa. Antes de ser utilizada para su amplificación mediante PCR, se centrifugó la muestra por 2 min a 14.000 r.p.m., para separar las impurezas.

En el estudio se utilizaron 11 marcadores microsatélites recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG). Estos son los siguientes: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824. Estos microsatélites fueron recomendados por los consultores de la ISAG para la caracterización genética de razas bovinas. Los mismos fueron analizados siguiendo un protocolo que consideró una reacción múltiple en un termociclador GeneAmp modelo 2720 (Applied Biosystems). Cada reacción de PCR consideró un volumen de 8µ que contenía entre 20 y 100ng de ADN genómico, 100 µM de dNTP, 1,5 µM de MgCl₂, entre 0,1 y 0,3 mM de partidor, tampón de PCR 1x y 1U de ampliTa-qGold ADN polimerasa (Applied Biosystem). Las condiciones de reacción incluyeron una etapa inicial de desnaturalización del ADN por 15 min a 95°C, seguida de 31 ciclos de amplificación consistentes en: desnaturalización por 45 seg a 94°C, hibridación por 45 seg a 61°C y elongación por 1min a 72°C, para terminar con 2 etapas de extensión de 60 min a 72°C y 120 min a 25°C.

De cada muestra amplificada se obtuvo 1 µl de ADN, al que se le adicionó 0.25 µl Liz 500 Size Estándar y 10 µl de Formamida. Estos tubos, se sometieron a 95° C por 5 minutos, para posteriormente ser llevados al equipo de análisis de ADN ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, donde se realizó la electroforesis capilar automatizada.

Para el análisis de los fragmentos, se utilizó el software Genemapper 4.0, del cual se obtuvo el electroferograma. Aplicando el criterio de asig-

nación de genotipos según nomenclatura recomendada por la ISAG en Test de Comparación 2007, se determinaron los genotipos presentes en cada uno de los locus, de cada animal.

Para el análisis de datos relativos a la población estudiada, se utilizó el programa informático Genepop 4.0 (Raymond y Rousset 1995) y también el Microsatellite Tool Kit para Microsoft Excel. Para cada microsatélite se calculó el índice de contenido polimórfico (PIC), el número medio de alelos (N_a), la heterosis observada (H_o), la heterosis esperada (H_e), el estadístico Fis (Weir y Cockerham 1984) y el equilibrio genético Hardy-Weinberg. Se determinó distancia genética utilizando el coeficiente de Jaccard y se generó un dendrograma usando el método UPGMA con el programa DendroUPGMA (García-Vallvé *et al.* 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los microsatélites estudiados mostraron un alto grado de polimorfismo detectándose 89 alelos en los 11 *loci* de los 34 animales estudiados, lo que corresponde a un promedio de 8.09 alelos por

locus. El número de alelos por locus varió desde un máximo de 11 alelos para los locus TGLA227, BM2113 y TGLA122 hasta un mínimo de 5 correspondiente al locus TGLA 126 (Tabla 1). El 45% de los locus presentó más de 8 alelos (5 de 11), y debido a esto se encontró un promedio de alelos tan alto en la población, así como en los niveles de heterosis y el índice de contenido polimórfico (PIC). El número promedio de alelos es similar al 8.14 reportado para la raza Limonero de Venezuela (Villasmil *et al.* 2008) y al 8.2 de la raza Criolla de Brasil (Steigleder *et al.* 2004). Sin embargo es superior al 5.63 reportado para la raza panameña Guabalá (Villalobos *et al.* 2009) y, también, superior a 6.2 y 7.3 reportado para la raza Retinta española y la criolla argentina, y 6.6, 7.3 y 7.8, reportado para razas criollas bolivianas (Lirón *et al.* 2006), y valores entre 5.5 y 7.2 reportados para razas de la península ibérica y Francia (Beja-Pereira *et al.* 2003).

Cabe destacar que a mayor número de animales muestreados existe mayor posibilidad de detectar un mayor número de alelos, y que se encontró un número relativamente alto para una muestra reducida de animales muestreados.

Tabla 1. Frecuencia alélica y parámetros de diversidad para 11 microsatélites utilizados en el ganado criollo lechero (Alelic frequency and diversity parameters for 11 microsatellites used)

	TGLA227		BM2113		TGLA53		ETH10		SPS115		TGLA126	
	Alelo	Frec.	Alelo	Frec.	Alelo	Frec.	Alelo	Frec.	Alelo	Frec.	Alelo	Frec.
1	75	10	121	15	154	10	213	1	248	28	115	43
2	77	2	123	1	160	33	215	2	250	1	117	11
3	79	5	125	13	162	9	217	22	252	9	119	9
4	81	12	127	6	164	3	219	18	254	13	121	1
5	83	1	129	3	166	1	221	19	256	11	123	4
6	87	1	131	1	168	2	223	6	260	6		
7	89	22	135	16	170	5						
8	91	7	137	2	172	2						
9	93	3	139	7	174	1						
10	97	3	141	2	176	2						
11	103	2	143	2								
H_o	0.79		0.79		0.71		0.76		0.85		0.47	
H_e	0.83		0.85		0.73		0.75		0.75		0.56	
FIS	0.047		0.065		0.028		-0.021		-0.135		0.163	
PIC	0.80		0.82		0.69		0.69		0.71		0.51	

H_o – heterosis observada; H_e – heterosis esperada; Fis – estadístico Fis; PIC – índice de contenido polimórfico.

Los valores PIC indican cuáles de los microsatélites fueron los más informativos. Valores sobre 0.5 son muy informativos, entre 0.25 y 0.5 son medianamente informativos y por debajo de 0.25 denota baja información polimórfica (Martínez *et al.* 2005). Todos los marcadores utilizados en el estudio fueron muy informativos y por tanto son útiles para valorar la diversidad genética de la raza Criolla Lechera Dominicana, siendo el menor valor de 0.514 (TGLA126) y el más alto 0.816 (BM2113). Los valores para cada marcador se muestran en la Tabla 1.

Para medir la variabilidad genética se utilizan la heterosis observada (Ho) y la heterosis esperada no sesgada (He). Ho es el número relativo de individuos heterocigotos para cada locus encontrado en la población estudiada, mientras que He es la frecuencia relativa que se debería observar luego de apareamientos entre individuos al azar con las mismas frecuencias génicas observadas en la población (Villasmil *et al.* 2008).

Se encontró que todos los marcadores estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.05$). Los estimados de Fis se realizaron de acuerdo

Weir y Cockerham (1984) (Tabla 1). Todos tuvieron valores bajos con excepción de SPS115, TGLA126 e INRA23. Sin embargo, se continuó con el resto de los análisis ya que no hubo ningún problema de interpretación alélica. Hay que notar que la población estudiada se maneja con cruzamientos dirigidos y no un sistema de cruzamiento natural, y que hay mayor número de hembras que de machos por lo que no se asume un cumplimiento con todas las suposiciones de Hardy-Weinberg de equilibrio entre los *loci*.

El Ho fue 0.749, similar al 0.739 del criollo argentino, pero inferior al criollo Saavedreño boliviano con 0.851 (Lirón *et al.* 2006). Este valor es superior a la heterosis observada de 0.6115 en el ganado español Mostrenco (Martínez *et al.* 2005) y 0.602 observado en la raza venezolana Limonero (Villasmil *et al.* 2008). En un estudio realizado a poblaciones de razas comerciales Gyr, Nellore, Guzarat y Holstein se ha detectado un alto nivel de endogamia con un valor promedio de 0.350 de heterosis observada (Machado *et al.* 2003).

El He tuvo un valor de 0.758, similar al de la raza Morucha de España (0.709), pero superior

Tabla 1. (cont.). Frecuencia alélica y parámetros de diversidad para 11 microsatélites utilizados en el ganado criollo lechero (Allelic frequency and diversity parameters for 11 microsatellites used)

	TGLA122		INRA23		ETH3		ETH225		BM1824	
	Alelo	Frec.	Alelo	Frec.	Alelo	Frec.	Alelo	Frec.	Alelo	Frec.
1	139	2	194	5	117	13	140	9	178	17
2	141	28	198	3	119	11	142	5	180	4
3	143	1	200	1	121	13	144	7	182	29
4	145	1	204	1	125	21	148	10	188	16
5	147	1	206	13	127	8	150	28	190	1
6	149	14	208	12	129	2	158	1	192	1
7	151	6	210	2			160	8		
8	153	3	212	2						
9	161	9	214	23						
10	163	1	216	6						
11	169	2								
Ho	0.79		0.71		0.82		0.76		0.76	
He	0.77		0.81		0.80		0.77		0.71	
FIS	-0.032		0.133		-0.028		0.010		-0.083	
PIC	0.73		0.78		0.76		0.73		0.64	

Ho – heterosis observada; He – heterosis esperada; Fis – estadístico Fis; PIC – índice de contenido polimórfico.

al 0.611 reportado para la raza francesa Aubrac (Beja-Pereira *et al.* 2003) y al 0.689 y reportado para el criollo Limonero (Villasmil *et al.* 2008) y el criollo Peruano (Aquino *et al.* 2008), respectivamente. Y también superior a 0.530 reportado para razas comerciales (Machado *et al.* 2003). A pesar de contar con una población reducida de 34 animales, el ganado Criollo Lechero Dominicano mostró un valor de heterosis superior al 0.612 reportado por un estudio similar realizado con 340 animales criollos (Martínez *et al.* 2005).

De acuerdo a los resultados de las distancia genética en la población, se separaron cuatro familias y se elaboró un plan de cruzamiento rotacional para mantener la diversidad y aumentar el tamaño de la población.

CONCLUSIONES

Se ha verificado una alta variabilidad en el ganado Criollo Lechero Dominicano. Esto sugiere que este hato es una rica reserva de diversidad genética y su notable adaptación al medio local refuerza la importancia de preservarlo como una raza pura.

Se puede confirmar que el grupo de marcadores microsatélites utilizado es adecuado y contribuye al conocimiento genético del ganado Criollo Lechero Dominicano. Esta ventaja permite hacer planes de conservación adecuados.

El modelo de conservación sugerido puede ayudar a conservar la diversidad genética en el hato, así como ser la base para un mejoramiento genético del mismo para su uso en ganaderías comerciales que procuran obtener cruces más resistentes y productivos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su más sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF) por financiar esta investigación, al doctor Manuel Ortiz por el valioso apoyo otorgado en su laboratorio y al CIMPA por suministrar el material genético de la población estudiada.

LITERATURA CITADA

- Aquino, Y.; Veli, E.; Rivas, E.; Rivas, V.; Estrada, R. 2008. Variabilidad genética de bovinos criollos de Perú utilizando marcadores microsatélites. *Arch. Zootec.* 57:337-340.
- Beja-Perira, A.; Alexandrino, P.; Bessa, I.; Carretero, Y.; Dunner, S.; Ferrand, N.; Jordana, J.; Laloe, D.; Moazami-Goudarzi, K.; Sanchez, A.; Cañon, J. 2003. Genetic characterization of southwestern European bovine breeds: a historical and geographical reassessment with a set of 16 microsatellites. *J Hered* 94:243-250.
- Bishop, M.; Kappes, S.; Keele, J.; Stone, R.; Sunden, S.; Hawkins, G.; Solinas, T.; Fries, R.; Grosz, M.; Yoo, J.; Beattie, J.; 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136:619-639.
- García-Vallvé, S.; Puigbo, P. 2009. DendroUPGMA: A dendrogram construction utility. Biochemistry and biotechnology Department. Universitat Rovira I Virgili (URV). Rovira, ES.
- Lirón, J.; Peral-García, P.; Giovambattista, G. 2006. Genetic Characterization of Argentine and Bolivian Creole Cattle Breeds Assessed through Microsatellites. *J Hered* 97 (4): 331-339.
- Machado, M.; Schuster, I.; Martínez, M.; Campos, A. 2003. Genetic diversity of four cattle breeds using microsatellite markers. *R. Bras. Zootec.* 32: 93-98.
- Martínez, A.; Calderón, J.; Camacho, E.; Rico, C.; Vega-Pla, J.; Delgado, J. 2005. Caracterización genética de la raza bovina mostrenca con microsatélites. *Archivos de Zootecnia* 54: 357-361
- Ottenwalder, F. 2002. La Pecuaria Dominicana. Editorial Letra Gráfica: Santo Domingo, DO. P 13.
- Raymond, M.; Rousset, F. 1995. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86:248-249.
- SEA (Secretaría de Estado de Agricultura, DO). 1978, Rescate y Desarrollo del Ganado Lechero Criollo, Centro de Investigación y Mejoramiento de la Producción Animal (CIMPA). Editado por la Unidad de Divulgación Técnica de la Secretaría de Estado de Agricultura. Santo Domingo, DO.
- Steigleder, C.; Almeida, E.; Weimer, T. 2004. Diversidad genética del bovino criollo brasileño utilizando catorce loci de microsatélites. *Arch. Zootec.* 53: 3-11.
- Toribio, B.; Moquete, A.; Lubin, G. 2011, Medidas zoométricas y peso del ganado criollo lechero de CIMPA. Documento interno. Santiago, DO.
- Veras, J.; Bonilla, B.; Guerrero, M. 1986. Comportamiento Productivo y Reproductivo de un Hato de Ganado Mestizo de Criollo en República Dominicana. Tesis de grado de ingeniero Agrónomo. Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD). Santo Domingo, DO. Pp 49-51
- Villalobos, A.; Martínez, A.; Vega-Pla, J.; Delgado, J. 2009. Caracterización genética de la población bovina Guabalá mediante microsatélites. *Archivos de Zootecnia* 58: 485-488.
- Villasmil-Ontiveros, Y.; Román, R.; Yáñez-Cuellar, L.; Contreras, G.; Jordana, J.; Aranguren-Méndez, J. 2008. Diversidad Genética de al raza Criollo Limonero utilizando marcadores de ADN microsatélites. *FCV-Luz. XVIII:* 415-423.
- Weir, B.; Cockerham, C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of populations structure. *Evolution* 38:1358-1370.

