



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**VARIACIÓN GENÉTICA DE UNA  
POBLACIÓN COLOMBIANA DE  
BÚFALO DE AGUA (*Bubalus bubalis*)  
A TRAVÉS DE UN PANEL DE  
MICROSATÉLITES RELACIONADOS  
CON LA ESPECIE**

**SONIA ROCIO QUINTANILLA QUINTERO**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento Biología.

Bogotá D.C., Colombia

2014



# VARIACIÓN GENÉTICA DE UNA POBLACIÓN COLOMBIANA DE BÚFALO DE AGUA (*Bubalus bubalis*) A TRAVÉS DE UN PANEL DE MICROSATÉLITES RELACIONADOS CON LA ESPECIE.

**SONIA ROCIO QUINTANILLA QUINTERO**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias-Biología**

Línea genética

Director:

Jimmy Jolman Vargas Duarte MSc., Ph.D (C)

Codirector:

Paul Bloor MSc, PhD

Línea de Investigación:

Genética

Grupo de Investigación:

Grupo Control Genético en Salud Animal

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento Biología.  
Bogotá D.C., Colombia

2014



*A mi hija Ana Sofia*



## **Agradecimientos**

Deseo expresar de todo corazón mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que me brindaron su colaboración, sus conocimientos, su ayuda incondicional y por sobre todo su amistad durante la realización de esta investigación. Este es el esfuerzo de un gran equipo de trabajo, a cada uno de ellos, Gracias.

A Dios, esa fuerza superior, quien me regalo a mí familia, a mi hija, quien me regala cada amanecer y quien me da fortaleza para realizar cada reto que ha puesto en mi vida.

A mí familia, quienes siempre estan pendientes de encomendarme en sus oraciones y de pedir por mí, para que cada día sea mejor, no solo en lo que hago como profesional, sino como ser humano íntegro, a ellos, por ayudarme, apoyarme en todos los aspectos y comprenderme en este anhelo de superacion personal, gracias.

Al Profesor Jimmy Vargas Duarte Ph.D (c)., director principal de ésta tesis y Profesor asistente de dedicación exclusiva del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, por brindarme una oportunidad, por sus valiosos aportes, dedicación constante, por la confianza depositada en mí y porque en muchas ocasiones el tiempo transcurre muy rápidamente, pero descubres que no solo hay conocimiento, sino también hay lazos de amistad y personas de gran calidad humana. Gracias por brindarme todos estos valiosos detalles que me llevaron a la culminación de este trabajo.

Al Profesor Paul Bloor, codirector de ésta tesis y Profesor especial del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, quien con sus valiosos conocimientos, enseñanzas y apreciables asesorias, aportó su valioso conocimiento y experiencia para la realización de esta investigación.

A la Junta directiva del Fondo Bufalero del Centro, en especial a la doctora Alba Lucia Suarez Quiceno, subgerente, quien depositó la confianza de su banco genético y la información suministrada en las bases de datos para poder realizar éste trabajo

Al Instituto de Genética del Eje Cafetero, en especial a su directora, Dra. Ana Lorenza Valencia quien apoyó la compra de los microsatélites fluoromarcados utilizados para el estudio.

En todas las etapas de vida, como proyectos de investigación, existen personas que desinteresadamente, tienen una participación efectiva para el buen desarrollo de este trabajo y son todos aquellos que de una u otra forma aportaron su granito de arena, son ellos: Miguel Adriano Novoa, Blanca Schoeder, Rita Baldrich, Wilson Sierra y así podría mencionar a muchos más que en este momento se me escapan pero a quienes les doy gracias infinitas.

A Todos de nuevo, gracias.



## Resumen

Uno de los intereses de la industria bubalina actual es el mejoramiento genético de los hatos, buscando aumentar su producción y calidad. Ésta actividad se fundamenta en la selección de individuos con las mejores características genéticas teniendo en cuenta su fenotipo y genealogía, para posteriormente realizar apareamientos entre individuos portadores de las mejores cualidades productivas.

Sin embargo, el desconocimiento de los pedigríes de los individuos sometidos al programa de mejoramiento puede llegar a generar problemas a futuro en la población como endogamia y pérdida de la diversidad genética, lo que a futuro puede llegar a tener un efecto deletéreo en los organismos, debido a que tienen menos posibilidades de respuesta frente a diversos cambios ambientales. éste inconveniente se resolverá utilizando la verificación del parentesco y/o identificación genética de los individuos (genotipificación) a través de marcadores moleculares como los microsatélites, los cuales han demostrado ser una valiosa herramienta para realizar la identificación precisa de los individuos.

En ésta investigación se estandarizó y validó un panel de dieciséis loci microsatélites dinucleótidos (CCMB211, CCMB208, CCMB168, CCMB126, CCMB005, CCMB238, CCMB078, CCMB060, CCMB006, CCMB207, CCMB001, CCMB077, CCMB045, CCMB043, CCMB159 y CCMB113), seleccionados de un grupo de 498 marcadores polimorficos aislados de una librería genómica de la especie *Bubalus Bubalis* reportados por Nagarajan *et al.*, (2009).

Inicialmente se presenta todo el proceso de estandarización y optimización de las condiciones de la PCR multiplex utilizando éstos marcadores fluoromarcados. Posteriormente, se realiza la validación del panel utilizando 282 muestras de individuos de raza Buffalypso nacidos entre 2006 y 2009 en la Hacienda bufalera “La Suiza” que pertenece al Fondo Bufalero del Centro y que tenían información genealógica parcial. Se

observó que todos los microsatélites seleccionados para el panel eran polimórficos y que tenían un número medio de alelos de  $9,51 \pm 0,49$ . 13 de los 16 marcadores tenían desviaciones significativas respecto del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) debido al exceso de homocigotos en la población evaluada. Al realizar el análisis de los individuos por sexo se observó que los machos presentaban mayor exceso de homocigotos que las hembras, siendo éstas las que aportaban más diversidad a la población.

Dado el desconocimiento de los pedigríes de los individuos seleccionados para la muestra y debido al exceso de homocigotos encontrados en los análisis iniciales, se procedió a buscar las relaciones entre hermanos y entre parientes mediante análisis de máxima verosimilitud utilizando los programas Kinalyzer y ML-relate; con una probabilidad del 95% se encontró que el 91.05% de los individuos podrían ser medios hermanos, el 8.04% hermanos completos y el 0.08% padres e hijos.

Adicionalmente se realizó el análisis de la variabilidad genética de la población mediante estadísticos F de Wright, análisis de correspondencias múltiples, análisis de coordenadas principales y análisis bayesianos de estructura. Los resultados generales de éstos análisis evidenciaron la presencia de dos acervos genéticos diferentes para el lote de individuos nacidos en el 2006 y otro completamente diferente para los nacidos en el 2007 y un manejo genético más adecuado que combinaba los dos acervos para los individuos nacidos a partir del 2008 y 2009. También se evidencia una tendencia a agrupar a los machos lejos de las hembras por el marcado exceso de homocigotos de los mismos, lo que los hace más similares entre sí.

La aplicación de los resultados de este estudio, incluyendo el panel de microsatélites validado puede permitir a los criadores de búfalo asignar paternidad y realizar apareamientos entre individuos específicos para el desarrollo de la cría y orientar estrategias de conservación racionales para los búfalos que pertenecen al Fondo Bufalero del Centro (FBC).

**Palabras clave:** Búfalos, Microsatélite, *Bubalus bubalis*, relaciones genéticas, variabilidad genética, Colombia

## Abstract

One of the interests of the current bubaline industry is the genetic improvement of the herds, looking to increase production and quality. This activity is based on the selection of individuals with the highest genetic features given their phenotype and genealogy, later to make matings between individuals carrying the best productive qualities. However, the pedigrees are unknown and the individual subject to the breeding program can generate future problems in the population as inbreeding and loss of genetic diversity, which in future can have a deleterious effect on organisms because they are less likely to respond to various environmental changes. This problema will be solve using the verifying relationship or genetic identification of individuals (genotyping) using molecular markers such microsatellites, which have proven to be a valuable tool for the accurate identification of individuals.

In this research was standardized and validated a panel of sixteen loci microsatellites dinucleotide (CCMB211, CCMB208, CCMB168, CCMB126, CCMB005, CCMB238, CCMB078, CCMB060, CCMB006, CCMB207, CCMB001, CCMB077, CCMB045, CCMB043, CCMB159 and CCMB113), selected of a group of 498 polymorphic markers isolated from a genomic library of the species *Bubalus Bubalis* reported by Nagarajan et al., (2009).

Initially the process of standardization and optimization of multiplex PCR conditions is presented using these markers labelled with four different fluorescent dyes. Subsequently, the validation panel is made using 282 samples from individuals of *Buffalypso* breed born between 2006 and 2009 in ranch "La Suiza" belonging to Fondo Bufalero Centro and they had partial genealogical information. It was observed that all microsatellite selected for the panel were polymorphic and having an average number of alleles of  $9.51 \pm 0.49$ . 13 of the 16 markers had significant deviations from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) due to excess of homozygotes in the population evaluated. When the analysis of individuals was realized by sex was observed that males had higher excess homozygous than females, these being the most contributing of the diversity to the population.

Given to ignorance of the pedigrees of the selected sample and due to the excess of homozygotes found in the initial analysis individuals, we proceeded to find the relationships between brothers and between relatives by maximum likelihood analysis using Kinalyzer and ML-relate programs; with a probability of 95% was found that 91.05% of individuals could be half-siblings, the 8.04% full-siblings, and 0.08% fathers and sons.

Further analysis of the genetic variability of the population was made by Wright F statistics, multiple correspondence analysis, principal coordinates analysis and Bayesian analysis of structure. The overall results of these analyzes revealed the presence of two different gene pools one for a lot of individuals born in 2006 and other completely different for those born in 2007 and a more appropriate genetic management that combined the two stocks for 2008 and 2009. Also it is showing a trend to agroupe the males away from females by the marked excess of homozygotes of them, making them more similar to each other.

The application of the results of this study, including validated microsatellite panel may allow breeders buffalo assign paternity and make matings between specific individuals for the development of farming and guide rational conservation strategies for buffaloes belonging to the Fondo Bufalero Centro (FBC).

**Keywords: Buffaloes, Microsatellite Repeats, genetic variability, genetic relationships, Colombia.**

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVII</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1 ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>7</b>
1.1 EI BÚFALO EN EL MUNDO .....	7
1.2 HISTORIA DEL BÚFALO EN SURAMÉRICA Y COLOMBIA .....	10
1.3 CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS DEL BÚFALO DE AGUA PRESENTE EN COLOMBIA.....	11
1.3.1 Producción de leche .....	12
1.3.2 Producción de carne.....	13
1.3.3 Producción de cuero.....	14
1.4 EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN ANIMALES DOMÉSTICOS CON MARCADORES GENÉTICOS.....	15
1.5 ESTUDIOS GENÉTICO - POBLACIONALES EN BÚFALOS EMPLEANDO MARCADORES MOLECULARES DE BOVINOS. ....	20
<b>2 METODOLOGÍA</b> .....	<b>25</b>
2.1 SELECCIÓN DE LOS INDIVIDUOS Y CASUÍSTICA DE LA INVESTIGACIÓN	25
2.2 SELECCIÓN DE LOS LOCI MICROSATÉLITES PRÓPIOS DE LA ESPECIE BUBALINA Y FLUOROMARCAJE. ....	28
2.3 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE SECA EN TARJETAS FTA	29
2.4 ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS MARCADORES MICROSATÉLITES .....	29
2.5 DESARROLLO DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR Y ANÁLISIS DE ELECTROFEROGRAMAS .....	35
2.6 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD, ESTRUCTURA GENÉTICA Y DE PARENTESCO.....	38
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
3.1. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE TARJETAS FTA. ....	41
3.2. ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES.....	41
3.3. SELECCIÓN DE LA MUESTRA Y ÉXITO DE LA AMPLIFICACIÓN.....	45
3.4. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y DE PEDIGRÍ.....	47
<b>4 DISCUSIÓN</b> .....	<b>71</b>

XIV VARIACIÓN GENÉTICA DE UNA POBLACIÓN COLOMBIANA DE BÚFALO DE  
AGUA (*Bubalus bubalis*) A TRAVÉS DE UN PANEL DE MICROSATÉLITES  
RELACIONADOS CON LA ESPECIE

---

<b>5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>79</b>
5.1 Conclusiones .....	79
5.2 Recomendaciones .....	80
<b>A. Anexo: Electroferogramas empleados para la validación de la amplificación de ADN de otras especies en loci específicos para <i>Bubalus bubalis</i> .....</b>	<b>83</b>
<b>B. Anexo: Electroferogramas resultados individuales de la validación de las reacciones monoplex y multiplex .....</b>	<b>85</b>
<b>C. Anexo: Descripción de los protocolos de extracción de ADN utilizados para la investigación .....</b>	<b>107</b>
<b>D. Anexo: Frecuencias alélicas para población muestreada por locus. ....</b>	<b>111</b>
<b>E. Anexo: Resultados del análisis de hermandad realizados con el programa KINALYZER. ....</b>	<b>117</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>121</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Muestra de sangre seca de búfalo obtenida de un ejemplar del Fondo Bufalero del Centro y goteada en tarjeta FTA® .....	31
<b>Figura 2.</b> Evaluación de diferentes concentraciones de MgCl <sub>2</sub> sobre la calidad de los amplificadores obtenidos en una PCR 16-plex con marcadores microsatélites específicos para la especie bubalina.....	43
<b>Figura 3.</b> Evaluación de diferentes temperaturas de anillamiento sobre la calidad de los amplificadores obtenidos en una PCR 16-plex con marcadores microsatélites específicos para la especie bubalina.....	44
<b>Figura 4.</b> Análisis de Correspondencias Múltiples (ACM) obtenido con los genotipos de individuos nacidos durante el periodo comprendido entre los años 2006 a 2009.....	56
<b>Figura 5.</b> Análisis de coordenadas principales (PCoA) obtenido con los genotipos de los individuos nacidos durante el periodo comprendido entre los años 2006 a 2009.....	57
<b>Figura 6.</b> Representación gráfica de los acervos genéticos encontrados en 282 individuos con genotipos completos mediante el programa STRUCTURE. Cada individuo fue representado por una barra de colores divididos en K, según los clúster encontrados.....	59
<b>Figura 7.</b> Variaciones en los valores de probabilidad de exclusión calculada de acuerdo a la combinación de un número variable de loci evaluados en los casos donde uno de los padres se identifica erróneamente. ....	67

**Figura 8.** Variación en los valores de probabilidad de exclusión calculada de acuerdo a la combinación de un número variable de loci evaluados en los casos donde el genotipo de uno de los padres no está disponible.....68

**Figura 9.** Variación en los valores de probabilidad de exclusión calculada de acuerdo a la combinación de un número variable de loci evaluados en los casos donde ambos padres están erróneamente identificados.....69



## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Características de los marcadores microsatélites propios de la especie bubalina y seleccionados para la caracterización de una población de búfalo colombiana.....	27
<b>Tabla 2.</b> Condiciones para las PCR monoplex empleadas con cada marcador microsatélite.....	32
<b>Tabla 3.</b> Condiciones finales establecidas para una PCR multiplex de 16 marcadores microsatélites específicos para la especie bubalina.....	32
<b>Tabla 4.</b> Resultados de los marcadores genéticos y concentración óptima de los primers para la PCR múltiple.....	37
<b>Tabla 5.</b> Total de muestras amplificadas por PCR 16-plex y número de marcadores en los cuales fue posible observar alelos específicos.....	46
<b>Tabla 6.</b> Estadísticos de diversidad molecular F (S. Wright) de la muestra de búfalos de la Hacienda la Suiza para cada marcador ( $F_{st}$ , $F_{is}$ y $F_{it}$ ).....	49
<b>Tabla 7.</b> Índices de diversidad estándar para la población de búfalos de la Hacienda la Suiza nacida durante los años 2006 a 2009.....	52
<b>Tabla 8.</b> Índices de diversidad estándar, discriminados por hembras y machos, de la población de búfalos de la Hacienda la Suiza.....	53
<b>Tabla 9.</b> Sub-Set77 deducido por KINALYZER mostrando los individuos que comparten al menos un alelo en cada marcador analizado.....	63
<b>Tabla 10.</b> Número de individuos con coincidencias genéticas y combinaciones mínimas de marcadores para obtener un genotipo único dentro de la población.....	66



# INTRODUCCIÓN

El búfalo de agua o búfalo de agua asiático doméstico (*Bubalus bubalis*), es una especie que ha sido empleada a lo largo de su historia, como animales de tiro o trabajo, sobre todo en plantaciones de arroz, caña de azúcar y palma africana. La especie ha cobrado una enorme importancia económica debido a la creciente demanda por su leche, carne, cuernos y piel en las últimas dos décadas (Rodríguez J.M., 1993).

El búfalo de agua a nivel mundial cuenta con una población de aproximadamente 172 millones de individuos, los cuales se encuentran principalmente distribuidos en los países del subcontinente indio y sudeste asiático donde ésta especie contribuye de manera significativa a la economía agrícola y seguridad alimentaria de ésta región (Kikkawa *et al.*, 1997).

Debido a su gran poder de adaptación biológica a diferentes biomas, resistencia a enfermedades y parásitos y principalmente debido a sus características productivas, ésta especie se ha distribuido desde éstas regiones hacia otros lugares del mundo como Australia, Brasil, Islas Caribeñas, Colombia e incluso a países europeos como Grecia e Italia donde ha tenido un gran auge por las características intrínsecas de producción en tres campos agrícolas importantes como: producción de carne, uso como animales de trabajo en cultivos de palma y arroz debido a su difícil acceso y en la industria láctea donde el búfalo ha tenido su mayor impacto dada la composición de su leche, muy apreciada por su alto contenido en grasa y proteína que la ha hecho mundialmente famosa gracias a la “*mozzarella di búfala*” (Moioli *et al.*, 2001)

El búfalo de agua asiático doméstico ó búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) se clasifica generalmente en dos sub-especies principales basadas en el tamaño del cuerpo, la apariencia externa, las características biológicas, su distribución geográfica y su cariotipo: el búfalo de río (2n=50) que se encuentran en el subcontinente indio, al oeste

de los Balcanes e Italia y por otra parte, el búfalo de pantano ( $2n=48$ ) que se localiza a partir de Assam, desde el sudeste de Asia hasta el valle de Yangtzé de China en el este (Cockrill W.R., 1981).

Del mismo modo, estudios previos realizados sobre el búfalo de agua y el búfalo de pantano utilizando herramientas moleculares como el análisis de secuencias de la región control del ADN mitocondrial "ADNmt" o región D-loop y también estudios realizados utilizando microsatélites, han buscado resolver la variabilidad y estructura genética de éstas dos subespecies, así mismo, han buscado dilucidar su filogenia. Los resultados de éstas investigaciones, mostraron diferenciación genética evidente entre el búfalo de río y el de pantano, por lo cual, se confirma que se trata de dos subespecies disímiles (Amano *et al.*, 1994, Tanaka *et al.*, 1996, Barker *et al.*, 1997, Kierstein *et al.*, 2004, Elbeltagy *et al.*, 2008, Moioli *et al.*, 2001, Kikkawa *et al.*, 1997, Aminafshar *et al.*, 2008, Navani *et al.*, 2002, Vijn *et al.*, 2008).

Todas las investigaciones que se han desarrollado a partir de microsatélites dinucleótidos utilizan marcadores desarrollados para la especie bovina, es decir, a partir de una librería genómica de *Bos taurus* y en muchas de éstas publicaciones algunos de los marcadores utilizados no han evidenciado un buen nivel de polimorfismo o resultan ser monomórficos (Elbeltagy *et al.*, 2008, Moioli *et al.*, 2001, Kikkawa *et al.*, 1997, Aminafshar *et al.*, 2008, Navani *et al.*, 2002, Vijn *et al.*, 2008).

El establecimiento de los marcadores genéticos que se deben utilizar y las especificaciones de su uso es regulada y controlada por la *International Society of Animal Genetics* (ISAG) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (*FAO por sus siglas en inglés*) quienes en grupos de trabajo con científicos expertos en el tema, han propuesto conjuntos de marcadores moleculares para realizar éste tipo de investigaciones en búfalos. Sin embargo, los marcadores propuestos no están desarrollados a partir de una librería genómica propia de la especie *Bubalus bubalis* (ISAG., 2010; FAO., 2007; FAO., 2011).

Se ha observado según los informes de la ISAG de los ejercicios de comparación interlaboratoriales o en las filiaciones biológicas (ISAG, 2010), dificultades adicionales en

el tallaje alélico de los marcadores propuestos, como: presencia de alelos nulos, errores de tallaje por adición de los primers a un ADN no plantilla o molde (longitud similar del amplificado, pero diferente secuencia del alelo), presencia de microvariantes o alelos raros, cambio en las tasas de mutación del marcador y exceso de productos “stutter” como resultado del deslizamiento de la polimerasa, entre otros problemas, que dependiendo de la técnica utilizada para realizar la electroforesis (capilar o geles de poliacrilamida) no pueden ser detectados en algunos casos (Hauge & Litt, 1993; Kimpton *et al.*, 1993; Brownstein *et al.*, 1996; Gill *et al.*, 1996; Magnuson *et al.*, 1996; Walsh *et al.*, 1996; Bacher & Schumm, 1998; Kline *et al.*, 1998; Crouse *et al.*, 1999; Butler *et al.*, 2004).

Como consecuencia de lo anterior, es posible que los bajos niveles de polimorfismo reportados en las investigaciones realizadas anteriormente sean artificiales, así como, la deficiencia de heterocigotos presentados sean el resultado de alelos nulos y por consiguiente, las conclusiones que se realizan a partir del uso de éstos marcadores puedan influir en el progreso de los programas de mejoramiento genético e incluso influir en la eficiencia biológica de la población por las decisiones que se toman a partir de los datos obtenidos con ésta herramienta (Chakraborty *et al.*, 1992). Generalmente, la selección de individuos con miras al mejoramiento de una característica productiva trae como consecuencia el aumento de la endogamia debido a la propagación de algunos individuos de material genético superior (Breda *et al.*, 2004, Reis *et al.*, 2009). La reducción en la variabilidad genética es una de las principales consecuencias de la endogamia. Por lo general, cuantificado por la varianza genética aditiva, la disminución de la variabilidad genética en la población puede reducir la capacidad de promover la selección y en consecuencia, la ganancia genética que podría lograrse en programas de mejoramiento (Carneiro *et al.*, 2007; Malhado *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2009; Jacometo *et al.*, 2010).

Recientemente, Nagarajan *et al.* (2009) aislaron un conjunto de microsatélites dinucleótidos a partir de una librería genómica de *Bubalus bubalis*. A pesar de la existencia de marcadores propios de la especie y de la importancia económica de ésta especie, es notable que no se haya validado y estandarizado un panel de dichos marcadores para la realización de estudios poblacionales y análisis de filiación en búfalos

En Colombia, las poblaciones de búfalo de agua fueron introducidas hace 45 años, siendo sometidas a condiciones ambientales distintas a las de sus parientes asiáticos, manteniéndose como hatos reducidos con un manejo genético y reproductivo poco explorado y adicional a esto, tal vez lo más preocupante, con un mal manejo de registros en bases de datos de pedigrí y falta de control de cruzamientos. Su introducción al país data exactamente del año 1967, con la importación realizada desde Trinidad y Tobago que consistía de 30 hembras, 5 machos y 5 bueyes que se ubicaron en el Magdalena medio y después una segunda importación realizada por el Fondo Bufalero del Centro en 1970, que constó de 110 animales del mismo país de origen. Actualmente, el país cuenta con individuos de las razas Buffalypso, Murrah Búlgaro Murrah y Mediterráneo (Rodríguez J.M, 1993; Mitat A., 2007; Sanint L.F., 2006; Martínez G., 2010).

Actualmente, existe una población aproximada de 100.000 animales mantenidos en numerosas unidades de manejo o “stocks” independientes . La mayor parte del hato bufalino se encuentra en el Magdalena Medio, con 35%, y Costa Atlántica, con 32%. El resto se encuentra disperso en los Llanos Orientales 11,7%; Amazonía 10,3%; el Pacífico, 6%; y la Zona Cafetera, con 3% (Mitat A., 2007; Sanint L.F., 2006; Martínez G., 2010).

Particularmente una de las poblaciones de búfalos más importantes del país es la que posee el Fondo Bufalero del Centro y es considerada una de las poblaciones referencia por ser una de las más antiguas en el país. Actualmente cuenta con aproximadamente 11.000 individuos distribuidos en 4 haciendas. La más importante y con mayor número de animales es la “Bufalera La Suiza” que cuenta con aproximadamente 4.800 individuos; en ésta hacienda se lleva a cabo todo el programa reproductor y mejoramiento del lote del Fondo y desde allí se distribuyen los individuos a las otras tres bufaleras donde únicamente se hace el proceso de ceba, ordeño y cría (Comunicación personal Fondo Bufalero del Centro).

Este proyecto busca estandarizar, evaluar y validar un panel de microsatélites en multiplex propios de la especie *Bubalus bubalis* que permita conocer la variabilidad genética de una población bubalina colombiana de la raza “Buffalypso”, a partir de una muestra seleccionada del banco genético de reproductores, hembras élite y superior del

Fondo Bufalero del Centro, que pertenezcan a un mismo intervalo generacional y que actualmente se encuentren aportando su material genético a las poblaciones existentes.

La investigación actual propone una metodología que permita al Fondo Bufalero del Centro en colaboración con el Instituto de Genética del Eje cafetero y el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia responder a los siguientes interrogantes: (1) cómo se está manejando desde el aspecto genético el hato del fondo que se encuentra ubicado en la Hacienda la Suiza que posee registros de pedigrí parciales y que lleva a cabo un programa de mejoramiento y reproducción; (2) qué herramientas permitirán identificar, hasta donde sea posible, las relaciones genéticas entre individuos; (3) es posible conocer si hay grupos genéticos importantes que se puedan conservar y en éste sentido orientar los programas de cruzamiento; (4) es posible determinar qué procesos pueden estar causando pérdida de diversidad genética generando algún grado de deterioro para las generaciones futuras.

Por lo tanto, el objetivo de ésta investigación fue evaluar genéticamente una población de búfalo doméstico, mediante el empleo de marcadores moleculares nucleares tipo microsatélite propios de la especie *Bubalus bubalis*. Los objetivos específicos fueron: (1) estandarizar una PCR multiplex utilizando un panel de microsatélites dinucleótidos propios de la especie *Bubalus bubalis*, (2) determinar los marcadores más informativos para su aplicación en estudios genéticos de filiación en las poblaciones estudiadas, (3) realizar un análisis descriptivo de la estructura genética de una poblaciones del Fondo Bufalero del Centro S.A (FBC) y finalmente (4) ofrecer recomendaciones de manejo para la población estudiada basado en los resultados obtenidos.

# 1 ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN

## 1.1 EI BÚFALO EN EL MUNDO

Existen evidencias arqueológicas de la presencia del búfalo en el mundo desde 60.000 años AC (Almaguer Y., 2007), sin embargo, la historia de su domesticación se remonta por los menos a 3000 años AC en las sociedades fluviales del Éufrates, el Tigris, el Indos y el Yangtsé (Almaguer Y., 2007; Bishop 2000; Rodríguez J.M., 1993; Arias 1983). Durante su historia los búfalos han sido los rumiantes que con mayor frecuencia se han destinado al trabajo en muchos países del mundo, pero especialmente en Asia y África se han constituido en un factor integrante en la producción agrícola (Rodríguez J.M., 1993). Adicionalmente, el uso de la leche de búfala y la carne de los machos, ha sido factor de desarrollo para la explotación de la especie, si se tiene en cuenta que en los países asiáticos y africanos, un porcentaje importante de la leche y carne de búfalo garantiza en gran medida la seguridad alimentaria de estas regiones del mundo (Rodríguez J.M., 1993; FAO, 2008).

Los búfalos constituyen un grupo característico de ganado. Son animales de complexión robusta, dotados de pezuñas y orejas grandes, cuernos de sección triangular, hocico ancho y desprovisto de pelo, lomo más o menos recto, anca de lavadero y pelo ralo (Almaguer Y., 2007; Rodríguez J.M., 1993).

Los dos géneros de búfalos reconocidos actualmente son: el *Syncerus*, al cual pertenece el búfalo Cafre, Africano o del Cabo, así como, el búfalo de bosque o búfalo enano también africano y el género *Bubalus bubalis* con las variedades: *kerebau*, búfalo asiático indio o carabao y la variedad *bubalis* o búfalo doméstico



de agua con sus dos subespecies : búfalo de río y búfalo de pantano (Almaguer Y., 2007; Rodríguez J.M., 1993). A continuación se describen las características de los diferentes géneros de búfalos:

#### **1.1.1. BÚFALO CAFRE O DEL CABO (*Syncerus caffer*)**

El búfalo salvaje es originario de África Meridional y se diferencia del búfalo asiático por su agresividad, cabeza y hombros gruesos, cuernos curvos y gruesos que se encuentran en la línea media de la frente o en algunos casos se dirigen hacia abajo y hacia atrás, su alzada oscila entre 1.20 a 1.50 metros y el peso es de casi una tonelada. Su capa es pardo negruzca con pelaje tupido en los jóvenes, mientras que, los adultos carecen de pelo en extensas áreas de su cuerpo. Se han descrito 21 razas locales de búfalos africanos y algunas variedades como el búfalo rojo del bosque de Ituri (Rodríguez J.M., 1993; Van Hooft *et al.*, 2007).

#### **1.1.2. BÚFALO ASIÁTICO (*Bubalus bubalis*)**

El búfalo asiático y en especial el búfalo doméstico de agua es el más representativo y es reconocido en el mundo por su docilidad. Mide desde 1.50 hasta 1.80 metros de alzada y pesa entre 500 kg hasta 1 Tn; en condiciones domésticas su capa es gris, negra, rojiza o blanca y puede presentar manchas en el mentón, garganta y extremidades; los cuernos son semicirculares y extendidos hacia afuera oblicuamente para luego continuar hacia atrás alineados con el lomo (Rodríguez J.M., 1993; Kikkawa *et al.*, 1997).

Existen actualmente poblaciones de búfalo de agua salvajes en Ceilán, Nepal, Assam, Indochina y Borneo. Se reconoce una variedad más pequeña de búfalo con 1 metro de alzada, entre 270-320 kg de peso, cuernos gruesos y cortos dirigidos hacia atrás denominada

"Tamarao" y que se circunscribe a la Isla de Mindoro en las Filipinas. Adicionalmente son también búfalos de agua los denominados "Anoas" que se encuentran en las Islas Célebes (Rodríguez, 1993, Kikkawa et al., 1997)

En el curso de la evolución del búfalo de agua, se han desarrollado dos subespecies que difieren entre sí morfológica, cariológica y fisiológicamente, también en su comportamiento. El primero de ellos lo constituye el "búfalo de pantano" ( $2n=48$ ) o Carabao, que puede asociarse al típico animal de tracción empleado en los cultivos de arroz o ejerciendo labores agrícolas, es de contextura robusta y tiene una extraordinaria aptitud para la producción de carne.

La segunda subespecie la constituye el "búfalo de río" ( $2n=50$ ), donde las razas Murrah, Neli, Kundhi, Jafarabadi, Nili-Ravi y Mehsana están constituidas por animales con características productivas esencialmente lecheras o de doble propósito, mientras que, las razas Surti, Tarai, Bhadawaxi, Egipcia, Kalahandi, Mediterránea y Nagpuri las constituyen animales con aptitud especialmente cárnica. Producto de los apareamientos fortuitos y sin ningún tipo de control entre las diferentes razas, se ha descrito un tercer tipo de búfalo denominado DESI o mestizo, estos animales presentan fenotipos variados y su aptitud es básicamente la producción de carne y algunos cruces que contienen mezclas raciales más tendientes a la producción de leche pueden ser utilizadas para doble propósito, es decir, producción de carne y leche como el cruce denominado "Buffalypso" (Almaguer Y., 2007; Muiolo *et al.*, 2001; Rodríguez J.M., 1993; Kikkawa *et al.*, 1997; Barker *et al.*, 1997).

Según la FAO se estima que hoy en el mundo existen 170 millones de cabezas de búfalos, de las cuales más del 80% se encuentran en el continente Asiático específicamente en la India, China y Pakistán (Vale & Ribeiro, 2005; Sanint L.F., 2006). En Europa (Grecia e Italia con una población de aproximadamente 100.000 individuos), Australia

y América (principalmente en Brasil con una población de 460.000 individuos), la población de búfalos ha crecido y su popularidad como especie productiva se debe a los altos beneficios económicos que reporta, alcanzando valores tres veces mayores que los obtenidos con la cría de bovinos (Vale & Ribeiro, 2005).

## 1.2 HISTORIA DEL BÚFALO EN SURAMÉRICA Y COLOMBIA

El búfalo doméstico de agua (*Bubalus bubalis*) es un bóvido multipropósito, capaz de adaptarse a biomas de trópico medio bajo, en tierras inundables, mal drenadas, poco fértiles y con alta estacionalidad de lluvias. Dada su rusticidad y capacidad de adaptación, el búfalo de agua doméstico se ha convertido en una alternativa económica importante en zonas tropicales, donde se requiere de una especie capaz de producir carne y leche de óptima calidad, a partir de forrajes de bajo valor nutritivo y en zonas desfavorables para la mayoría de bovinos (*Bos taurus* y *Bos indicus*) (Vale & Ribeiro, 2005; Angulo *et al.*, 2005).

El origen de los rebaños bubalinos suramericanos data de finales del siglo XIX cuando fueron introducidos al Caribe y el norte de Brasil a través de importaciones procedentes de Australia, Bulgaria, Egipto, India, Italia, Rumania y del sudoeste asiático (Almaguer Y., 2007; Sanint L.F., 2006).

La historia del búfalo en Colombia se inicia en 1946 cuando el Dr. Víctor Manuel Patiño técnico de la Secretaria de Agricultura del Valle presentó un proyecto para su importación como fuente de alimento y de trabajo. Sin embargo, solo hasta abril de 1967 el Instituto Colombiano de Reforma Agraria (INCORA) importó de Trinidad y Tobago a través de la Compañía Caroni Ltda. 40 animales *Bubalus bubalis* variedad "Buffalypso", una mezcla de Murrah, Surti, Jafarabadi, Neli y Bhadawaxi, los cuales fueron trasladados a la región del bajo Calima en el litoral pacífico para que

cumplieran su periodo de aclimatación y posteriormente, una parte fue trasladada al municipio de Guapi (Cauca) donde se destinaron a los programas dirigidos por el INCORA (Sanint L.F., 2006; Angulo *et al.*, 2006; Rodríguez, 1993).

En vista de los buenos rendimientos, en 1970 El Fondo Bufalero del Centro (FBC) realizó una segunda importación, de 110 hembras de levante de la misma Isla caribeña, una parte de este lote se llevó a Guapi y el resto se localizó en la Hacienda La Virginia (Caldas) al cuidado del fondo ganadero de Risaralda (hoy FBC). De esta forma el país contaba en 1977 con 380 animales distribuidos en Guapi, Valle del Cauca, Antioquia, Popayán, Pereira, Guainía, Dorada y Puerto Boyacá. En 1984 fueron llevados los primeros ejemplares a la Costa Atlántica, Cúcuta, y los Llanos Orientales y en 1988 se estimó que la población alcanzaba 7.356 cabezas de búfalos, es decir, solo un 12% de la población actual (Sanint L.F., 2006; Rodríguez, 1993).

Actualmente se explota el búfalo en ganaderías de los departamentos de Risaralda, Caldas, Cundinamarca, Meta, Cauca, Santander, Cesar, Guainía, Casanare, Vichada, Arauca, Valle, Tolima, Córdoba y la Costa Pacífica (Sanint L.F., 2006; Angulo *et al.*, 2006, Rodríguez, 1993).

### **1.3 CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS DEL BÚFALO DE AGUA PRESENTE EN COLOMBIA**

Los animales presentes en Colombia son medio líneas y eumétricos. La cabeza es alargada y algo estrecha en la parte anterior, de huesos esponjosos y livianos lo que les permite flotar dentro del agua y su perfil es convexilíneo especialmente a nivel frontal. Los cuernos son rugosos, de sección transversal triangular en los machos y ovalada en las hembras. El cuerpo es abarillado, con línea dorsal algo ensillada, extremidades cortas, pelo escaso y su color varía entre negro azabache, gris oscuro, castaño rojizo, bayo, marrón y aún blanquecino (RodríguezJ.M., 1993).

Los búfalos son animales con una larga vida productiva. Presentan mayor longevidad que los bovinos, dando así un mayor número de lactancias y de crías. Los animales empleados para producción de leche pueden alcanzar 18 años en producción y se han reportado búfalas en Brasil con más de 35 años de edad que 4 años atrás habían tenido su último bucerro. Con respecto a los machos su primer servicio se lleva a cabo a los 2 años y pueden ser útiles como animales de tracción a los 4 años de edad, manteniendo su vigor durante 12 a 20 años (Drost M. 2007; Rodríguez J.M., 1993)

La edad de pubertad oscila entre 1.6 - 3 años y los ciclos estrales varían de acuerdo con la raza, sin embargo oscila entre 22 - 37 días y el celo puede durar 12 - 48 horas. La edad al primer parto en Colombia está entre 36 - 40 meses y la gestación es un poco más prolongada que en los bovinos 305 - 320 días. El intervalo entre partos es de aproximadamente 400 días y rara vez presentan dificultades para el parto (Drost M. 2007; Rodríguez J.M., 1993).

Se tiene la creencia que los búfalos son agresivos, sin embargo, no es cierto, son animales dóciles, vigilantes y tranquilos. La extraordinaria fuerza de arrastre les ha merecido el nombre vernacular de "tractores con patas o tractores vivientes" ya que pueden arrastrar con facilidad carretas hasta con 1250 Kg. Son además ideales para el trabajo en bosques y plantaciones de arroz, caña y palma africana. Su capacidad de cargas es el doble de la capacidad que tendría un bovino (Rodríguez J.M., 1993).

### **1.3.1 Producción de leche**

Como ya se mencionó, los búfalos de agua domésticos subespecie búfalo de río, son mejores productores de leche

que los de pantano y su rendimiento aumenta con la edad por lo que se logran producciones satisfactorias para la especie a nivel de la tercera o cuarta lactancia. En Colombia una hembra bubalina promedio produce 7 a 8 litros diarios de leche en una lactancia de 7 meses aunque algunos ejemplares pueden alcanzar los 10 litros o más. El contenido de grasa fluctúa entre 7 a 8%, pero según el tipo de alimentación que reciba puede alcanzar hasta el 12%. La leche de búfala se emplea para la preparación de productos lácteos tipo quesos de diversas variedades, yogurt y un tipo especial de mantequilla que se conoce con el nombre de "Ghee" (Vale & Ribeiro, 2006; Seno *et al.*, 2006; Rodríguez J.M., 1993).

Los sólidos totales de la leche de búfala oscilan entre 18 y 20,5%, con 5% promedio de proteína. Los sólidos no grasos varían entre 9 y 10.5%. Por esta cantidad de sólidos, se concluye que es más económico producir un kilo de queso con leche de búfala, para el cual se requieren unos 4 a 5 litros de leche comparado con 8 a 9 litros de leche de bovino (Vale & Ribeiro, 2006; Seno *et al.*, 2006; Rodríguez, 1993).

### **1.3.2 Producción de carne**

La carne de búfalo es bastante parecida a la del bovino, aunque presenta un color más oscuro. Es blanda y altamente palatable. Contiene menos grasa intramuscular, estando presente la grasa de cobertura. Se asegura que tiene menos colesterol comparada con la del vacuno (Rodríguez J.M., 1993).

Aunque en Colombia los estudios de rentabilidad y habilidad para la producción de carne de búfalo son escasos, en

algunas regiones han sido calculados ciertos parámetros, observándose un buen nivel de ganancia de peso a diferentes edades (Angulo *et al.*, 2006; Rodríguez J.M., 1993).

El peso corporal para un macho adulto oscila entre 600 y 850 Kilos, las hembras pueden pesar entre 360 a 380 kg y los neonatos al nacer pesan entre 35 y 40 kg. En Colombia, estudios realizados en el departamento de Casanare con dietas a base de pastoreo con forrajes nativos y sal mineralizada a voluntad, han descrito valores de 410 kg de peso vivo a los 20 meses de edad. En el Magdalena Medio se han logrado pesos de hasta 520 kg a los 24 meses de edad.

El búfalo es una especie que puede producir carne, a una edad y con una cantidad de grasa, comparable con la de los ganados bovinos cruzados y puros. Las canales bubalinas son más cortas, más pequeñas que las canales de sus competidores vacunos pero sus rendimientos tanto en carne como en canal al ser contrastados con la edad en la cual se obtienen permiten afirmar que el búfalo es una especie que supera ampliamente a sus competidores vacunos en el proceso de producción de carne (Angulo *et al.*, 2006).

### **1.3.3 Producción de cuero**

La piel del búfalo constituye un 10 - 12 % del peso del animal y es más grueso y poroso que el del bovino, en el mercado común se le conoce por su apariencia como "piel de marrano o cuero de marrano". El Fondo Ganadero de Caldas en 1990 describió como peso promedio de las pieles frescas de búfalo

45 kg comparado con 30 kg de peso promedio para las pieles de bovino y un espesor de 60 - 70 mm para la piel de búfalo contra 40 - 50 mm para la piel de bovino (Rodríguez J.M., 1993).

#### **1.4 EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN ANIMALES DOMÉSTICOS CON MARCADORES GENÉTICOS**

La caracterización molecular en animales domésticos, ha desempeñado actualmente un papel importante debido a que ha permitido estimar la diversidad genética, establecer la estructura de las poblaciones, identificar genes adaptativos asociados a parámetros ambientales y condiciones socioeconómicas y suministrar información valiosa en los casos de poblaciones locales y pequeñas, donde los programas de selección y cruzamiento no son controlados de forma estricta (Kolbehdari *et al.*, 2008)

Adicionalmente, los puntos clave donde se ha centrado la investigación genética molecular y cuantitativa, son la búsqueda de genes que afectan parámetros productivos como: eficiencia y calidad de producción y también resistencia a enfermedades y parásitos. Es así como la selección genética asistida por marcadores moleculares, se ha convertido en una herramienta potencial para disminuir la brecha que existe a nivel de selección entre las explotaciones industriales y las poblaciones locales (Lappalainen *et al.*, 2010; Joost *et al.*, 2007).

La evaluación genética directa en animales, por lo general se ha realizado mediante el análisis de fenotipos para identificar influencias genéticas, mientras que, la genética molecular a menudo comienza con el análisis de alelos o secuencias de ADN conocidas y posteriormente se examina su influencia en los fenotipos. Los genomas eucariotas muestran una considerable variabilidad de la secuencia de ADN (polimorfismos), entre las especies y entre los individuos dentro de una especie. Varios tipos de polimorfismos de ADN son los que han



sido ampliamente usados en investigación básica y aplicada en animales para estudios filogenéticos, búsqueda de genes asociados a características productivas, selección asistida por marcadores moleculares, pruebas de filiación biológica y diseño de sistemas de trazabilidad, son éstos: los microsatélites autosómicos y sexuales, los polimorfismos de un solo nucleótido (*SNP*'s por sus siglas en inglés), las secuencias de ADN mitocondrial de la región control o *D-loop* y aquellos encontrados en la región que codifica para la citocromo B (ADNmt), los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*RFLP*'s por sus siglas en inglés) y los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (*AFLP*'s por sus siglas en inglés) (Amano *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1996; Barker *et al.*, 1997; Kikkawa *et al.*, 1997; Moioli *et al.*, 2001; Navani *et al.*, 2002; Luikart *et al.*, 2003; Kierstein *et al.*, 2004; Aminafshar *et al.*, 2008; Elbeltagy *et al.*, 2008; McKay *et al.*, 2008; Taberlet *et al.*, 2008; Vijh *et al.*, 2008; Maceachern *et al.*, 2009; Pariset *et al.*, 2009; Joost *et al.*, 2010; Oleksyk *et al.*, 2010; Stella *et al.*, 2010; Ajmone-Marsan *et al.*, 2012).

El uso de microsatélites se ha convertido en un método estándar para estimar la diversidad genética neutral en las especies domésticas y sus filiaciones biológicas o relaciones de parentesco. Es así como dos organizaciones internacionales fueron creadas para definir los estándares para trabajo con marcadores moleculares tipo microsatélite y *SNP*'s en animales domésticos, son ellas la *International Society of Animal Genetics* (ISAG) que fue creada como un organismo de asesoramiento a través de talleres para la práctica de ensayos con antígenos de los glóbulos rojos en animales en 1954, evolucionó hasta ser hoy uno de los organismos de control que busca a través de talleres, conferencias y ejercicios de comparación estandarizar las metodologías de trabajo entre los diferentes grupos de investigación y laboratorios de genotipificación.

En el 2007, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) creó la Comisión de Recursos Genéticos para que dictaran los lineamientos en cuanto a diversidad genética de los animales domésticos. Ésta comisión genera el "Plan de Acción Mundial sobre los Recursos Zoogenéticos (PAM)" en la Conferencia Técnica Internacional sobre los Recursos Zoogenéticos

para la Alimentación y la Agricultura” (FAO, 2007) donde se definieron las estrategias necesarias para conservar la biodiversidad de las especies domésticas de interés productivo de mayor impacto para la seguridad alimentaria mundial, adicionalmente en el 2008, ésta comisión estableció las listas de *loci* de microsatélites recomendados para cada especie (alrededor de 30 por especie) para los bovinos, búfalos, aves de corral, ovinos y cerdos que se utilizarían en los estudios de diversidad, sin embargo, muchos de éstos marcadores propuestos no son especie-específicos como ocurre en ovinos y búfalos que utilizan marcadores creados para *Bos taurus* (FAO, 2008; Hoffmann *et al.*, 2004)

Las razas de ganado se han formado a lo largo de los siglos y están relacionadas con la evolución humana, sus eventos migratorios y la selección natural. En éste sentido, las diferentes razas han sido seleccionadas para adaptarse a diversas condiciones ambientales y las necesidades humanas. La diversidad genética de las razas domésticas permite a los agricultores desarrollar nuevas características en respuesta a cambios en el medio ambiente, enfermedades o las condiciones del mercado. En éste sentido cuando una raza se deteriora o se extingue, además de perder la diversidad genética, es una pérdida de la historia de la civilización .

En relación a lo dicho anteriormente, se han realizado numerosos estudios de la distancia y variabilidad genética de diversas especies y razas de ganado durante los últimos años por los equipos de investigación de todo el mundo. Un ejemplo de esto, es el informe realizado por Baumung *et al.*, (2004) sobre 87 proyectos diferentes que se ejecutaron en 93 países diferentes. La mayoría de estos estudios, los cuales se enfocaron en analizar la distancia genética en algunos rumiantes utilizando diferentes herramientas como *loci* microsatélites, polimorfismos de proteínas, grupos sanguíneos u otros sistemas de marcadores moleculares empleados alternativamente; deducen que con cualquier marcador molecular la variabilidad genética disminuye junto con la distancia de los centros iniciales de domesticación y que coincide con lo ocurrido en las poblaciones humanas y sus migraciones. También observaron que dentro de las razas, los marcadores autosómicos tipo microsatélite permiten evaluar parámetros como la heterocigosidad esperada y calculada y la riqueza alélica, entre otros, los cuales pueden revelar los efectos del aislamiento genético, la endogamia, los cuellos de botella, la introgresión y la subdivisión de la población.

Peter *et al.*, (2007) analizaron la estructura de la población y la diversidad genética de las 57 razas ovinas europeas derivadas de 15 países europeos. Los análisis se basaron en la tipificación de microsatélites dinucleótidos diseñados de una librería genómica bovina (*Bos taurus*) seguido de un análisis de componentes principales y un modelo bayesiano basado en agrupación. Como resultado de este estudio, los distintos grupos de ovejas pudieron ser identificados: ovejas del medio oriente de cola gorda, ovino del sudeste europeo y ovejas del nor-oeste europeo. Dentro del último grupo, se encontraron dos grupos distintos compuestos por las razas tipo Merino y Alpino respectivamente.

Al igual que en las ovejas, la mayoría de los estudios de diversidad genética en el ganado bovino se llevaron a cabo por primera vez a escala nacional o regional y no incluían los recursos genéticos de otras áreas. Para una comprensión más general de la diversidad en las diferentes especies es necesario incluir muestras de referencia y un conjunto de los marcadores estandarizados y validados para lograr combinar los conjuntos de datos de distintos análisis dentro de un meta-análisis. Los marcadores tipo microsatélite y AFLP no sólo se utilizaron para evaluar la diversidad genética, sino también, para decidir sobre las prioridades de conservación de razas de ganado. Tapio *et al.*, (2006) utilizaron el enfoque Weitzmann y el conjunto básico de la diversidad medida de Eding *et al.*, (2002) para cuantificar la contribución de cada raza a la cantidad máxima de diversidad genética y de ésta manera pretendían identificar las razas que necesitaban un manejo en cuanto a conservación de la diversidad genética de las razas bovinas en el norte de Europa.

El Consorcio de Diversidad de Ganado Europeo (2006), investigó las distancias genéticas entre 69 razas de ganado europeo para indicar las prioridades de conservación. En este estudio, se utilizaron y combinaron dos métodos diferentes de evaluación: el primero de acuerdo con al enfoque Weitzman, en el cual, se evaluaron las contribuciones a la diversidad genética derivadas de las distancias genéticas entre las poblaciones. Alternativamente, se evaluó la diversidad dentro y entre las poblaciones y se optimizó mediante la reducción de parentescos estimados por marcadores moleculares. Los autores discuten las posibilidades y

limitaciones de las decisiones con ayuda de marcadores moleculares en las disposiciones sobre conservación y llegan a la conclusión de que todavía es necesario mejorar los métodos actuales.

También se han realizado estudios de diversidad a partir de marcadores no neutrales, como son los genes de interés productivo, éstos han ayudado a obtener un conocimiento más profundo acerca de la domesticación, desarrollo de las especies y las diferentes razas de ganado. Uno de éstos, fue el realizado por Jann *et al.*, (2004) donde se hizo el análisis de la distribución geográfica de los haplotipos de la caseína en diferentes razas de ganado bovino y dio información sobre el proceso de domesticación del ganado moderno, también se muestra el efecto de la selección natural o artificial geográficamente diferenciadas. Dentro de este estudio también se identificaron haplotipos de caseína específicos para *Bos indicus*. La aparición de estos haplotipos en las razas *Bos taurus* del sur de Europa, sugiere una introgresión de genes de las razas indicas en las taurinas durante su desarrollo.

Otra herramienta ampliamente utilizada en estudios filogenéticos de animales de interés productivo es el análisis del ADN mitocondrial, esta herramienta ha ayudado a elucidar el proceso de domesticación (Beja-Peirera *et al.*, 2006 y Negrini *et al.*, 2007). Algunos estudios como el que realizaron Taberlet *et al.*, 2007 lograron hacer un paralelo entre los aspectos relacionados con las amenazas y los medios de conservación de animales domésticos y animales silvestres con el análisis comparativo de su ADNmt, esto para ayudar a identificar cuáles eran los aspectos más importantes a favorecer o rechazar cuando se intentaba conservar diversidad genética en una población sometida a un proceso de domesticación y selección asistida.

Al igual que en el ganado bovino y ovino, se estableció un proyecto europeo para evaluar la diversidad genética de las razas porcinas (Pig biodiversity Project II), los resultados de la tipificación de microsatélites se utilizaron para calcular la distancia genética de Reynolds y conocer cómo se agrupaban las razas porcinas europeas. Otro estudio importante en porcinos, fue el realizado por SanCristobal *et al.*, (2006) donde se encontró agrupación significativa de variedades o líneas dentro de las principales razas.

En cuanto a la aplicación de los marcadores moleculares tipo microsatélite en el campo de la genética forense Glowatzki-Mullis *et al.*, (1995) indican que los microsatélites altamente polimórficos (es decir que presentan mayor cantidad de alelos en la población) son más potentes para realizar la discriminación de parentesco, comparado, con los marcadores bioquímicos como los grupos sanguíneos o sistemas de marcadores bioquímicos como las proteínas séricas. También hacen referencia a la aplicación de los marcadores moleculares en la aplicación de trazabilidad molecular de las cadenas productivas, especialmente aplicado a la identificación de la fuente de los animales en productos de origen animal y la determinación de sexo en embriones.

## **1.5 ESTUDIOS GENÉTICO - POBLACIONALES EN BÚFALOS EMPLEANDO MARCADORES MOLECULARES DE BOVINOS.**

Son varios los trabajos de investigación en el mundo, que han empleado marcadores de ADN nuclear como microsatélites y SNP's para comparar poblaciones de búfalos con otros miembros de la tribu Bovidae. Algunos de los más importantes son: el estudio realizado por Zhang *et al.*, (2007) quienes empleando 30 microsatélites descritos por el proyecto MoDAD (Global Project for the Maintenance of Domestic Animal Genetic Diversity) de la FAO, compararon 18 poblaciones de búfalos de pantano nativos describiendo una variación genética poco marcada entre ellas con una varianza genética de solo 2,8%, diferencias que coincidían con la distribución geográfica de cada población. También, Flamand *et al.*, (2003) empleando 10 microsatélites bovinos compararon poblaciones de búfalo asiático doméstico, salvaje e híbridos encontrando distancias genéticas mínimas entre ellos.

Mediante el uso de 20 microsatélites descritos para bovinos, Ritz *et al.*, (2000) compararon individuos *Bos indicus*, *Bos taurus*, *Poephagus grunniens*, *Bibos*,

*Bisontes*, *Syncerus cafre* y *Bubalus bubalis*, estableciendo las distancias genéticas y el tiempo de divergencia entre las especies.

Barker *et al.*, (1997) compararon 11 poblaciones de búfalos domésticos asiáticos, 3 de búfalo de río y 8 de búfalo de pantano, empleando 21 microsatélites de *Bos taurus* y 25 *loci* que codificaban proteínas, describen las diferencias entre las poblaciones de búfalo de río y búfalo de pantano y establecen que la divergencia entre las dos poblaciones de búfalos se presentó hace aproximadamente 15.000 años. Posteriormente, empleando 6 poblaciones adicionales de búfalo de pantano, el mismo grupo también confirmó las divergencias genéticas existentes entre estos dos grupos de búfalos y la relación existente desde el punto de vista geográfico.

Con respecto a los estudios llevados a cabo en búfalo doméstico de agua con el subtipo de río utilizando microsatélites de *Bos taurus* y *Ovis aries* en otros lugares del mundo donde el búfalo es importante, en Italia el grupo de investigación de producción animal del *Instituto Sperimentale per la Zootecnia* en cabeza de Moiola *et al.*, (2001) describieron la estructura genética de tres poblaciones del área mediterránea empleando 13 marcadores, encontrando una mínima diferenciación genética entre las poblaciones de búfalos griegos e italianos, pero una moderada diferenciación entre los búfalos egipcios con las dos poblaciones europeas estudiadas. Además, observaron una pérdida en la biodiversidad en las poblaciones de búfalos europeos (exceso de homocigotos), debida muy seguramente al bajo número de individuos situación que facilita la formación de poblaciones endogámicas.

En la investigación realizada por Kumar *et al.*, (2006) también con microsatélites de *Bos taurus*, se describió la estructura genética de 8 poblaciones indias de búfalo de río: Meshana, Murrah, Jafarabadi, Badawhaxi, Nagpuri, Surati, Pandapuri y Toda. Encontraron que las líneas Toda, Jafarabadi y Pandapuri son un mismo linaje y que las líneas Badawhaxi, Nagpuri, Surati, Meshana y Murrah son producto de mezclas raciales.

Con la descripción de la estructura genética de las poblaciones de búfalo presentes en el delta del Nilo, el sureste de Egipto e Italia, Elbeltagy *et al.*, (2008)

empleando 15 microsatélites de *Bos taurus*, encontraron grandes diferencias genéticas entre las poblaciones de búfalos egipcios y las italianas, lo que confirmaba lo descrito por Moioli *et al.*, (2001) quienes también encontraron un alto nivel de endogamia en las poblaciones de búfalos europeas.

El uso de marcadores moleculares asociados a cromosomas sexuales en búfalos, específicamente cromosoma Y, ha sido descrito en búfalo africano (*Syncerus caffer*) buscando establecer el comportamiento reproductivo de los machos dentro de las poblaciones salvajes y ha sido la contraparte para los estudios de divergencia genética y filogenias hechos a partir de ADN mitocondrial en ésta especie (Van Hooft *et al.*, 2007; Van Hooft *et al.*, 2010).

En el 2002, Van Hooft *et al.*, describieron el comportamiento reproductivo de los machos asociado a las condiciones climáticas y mediante el uso de 35 microsatélites ligados al cromosoma Y bovino (*Bos taurus*) encontraron que solamente 3 de ellos fueron polimórficos, estableciendo 6, 7 y 10 haplotipos, los cuales fueron agrupados en 18 haplogrupos, de los cuales solamente 2 haplogrupos fueron compartidos por las dos poblaciones estudiadas.

Fu *et al.*, (2007) empleando la secuencia de la caja HMG del gen SRY, ubicado en el cromosoma Y, desarrolló una metodología para sexar embriones de búfalo de pantano, método también empleado para sexaje de embriones de búfalo de río y de bovinos (Parma *et al.*, 2004). Otras regiones empleadas para sexar embriones son aquellas ubicadas en los genes ZFY y ZFX del cromosoma Y.

Los ensayos empleando marcadores de ADN mitocondrial han sido restringidos a trabajos que buscan resolver la filogenia, historia evolutiva y la taxonomía de las diferentes especies y subtipos de búfalos africanos y de búfalos asiáticos tanto domésticos como salvajes. Para resaltar se encuentra el estudio realizado por Kikkawa *et al.*, (1997) donde se compararon diferentes subtipos de búfalo doméstico de agua: búfalos de río, búfalos de pantano y anoas, empleando el análisis de la secuencia del gen de la citocromo B del ADN mitocondrial. Tienen elementos de prueba que permite clasificar a los búfalos domésticos asiáticos en

4 linajes: búfalo de pantano, búfalo de río, anoa de las tierras bajas y anoa de montaña.

Otro estudio importante fue el realizado por Simonsen *et al.*, (1998) donde se describió la diversidad genética del búfalo salvaje africano empleando la secuencia de la región control del ADN mitocondrial, demostrando la diversidad genética presente en las poblaciones de búfalo africano y proponiendo una posible fragmentación de la variabilidad genética de las poblaciones actuales asociada probablemente al desplazamiento y las actividades de las poblaciones humanas.

La descripción de la secuencia completa del ADN mitocondrial del búfalo fue realizada por Parma *et al.*, (2004) y se describió que está constituida por 16355 pares de bases y con una organización similar a la de otros organismos; esta información puede ser empleada en estudios evolutivos y para establecer sistemas de trazabilidad en alimentos provenientes de búfalos.

El estudio más grande en términos de número de individuos y de localidades, fue el realizado por Kumar *et al.*, (2007) donde se analizaron los eventos evolutivos asociados con la domesticación de los búfalos de agua empleando animales del norte, noroeste, centro y sur de la India y comparándolos con búfalos de la margen del Mediterráneo y Brasil a través del empleo de la región control del ADN mitocondrial y la secuencia del gen de la citocromo b, encontrando que a pesar de las diferencias citogenéticas y fenotípicas no hubo diferencias en el tiempo de divergencia de las secuencias asumiendo que estas poblaciones son subespecies y no especies distintas ya que provienen de un mismo ancestro común.

En Colombia se han realizado dos estudios poblacionales asociados a la estructura genética de la población de búfalo de agua doméstico subespecie río con algunos marcadores moleculares desarrollados para la especie bovina. El primero de ellos fue realizado con 6 marcadores (Martínez *et al.*, 2009) y se caracterizó genéticamente la raza Murrah mediante el análisis de marcadores moleculares tipo microsatélite de bovinos. Evidenciaron que 4 marcadores (BM1824, INRA37, SPS115 y BM2113) fueron polimórficos y 2 marcadores (ETH10 y ETH225) fueron monomórficos. El mayor número de alelos fue 11 para



el marcador INRA37 y el menor número de alelos fue 7 para el marcador BM2113. Los marcadores polimórficos no mostraron estar en equilibrio Hardy-Weinberg. La probabilidad de exclusión fue 96,6% para los seis marcadores y el más informativo fue el marcador INRA37 con un 84,3% de contenido de información polimórfica y como aplicación inferían su uso en pruebas de paternidad en la población colombiana de la raza Murrah, pero el muestreo de ésta población fue muy pequeño ( $n=100$ ) y se sacó de un núcleo muy cerrado porque provenían de dos hatos. Cabe resaltar que éste análisis fue realizado utilizando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida 6% y tinción con nitrato de plata, la cual, es una técnica de detección que requiere gran habilidad del personal que realiza los análisis por los artefactos y errores de genotipificación que pueden generarse cuando se utilizan microsatélites dinucleótidos (picos stutter, picos A+ y A-, pérdida alélica, alelos nulos, microvariantes) (Butler, 2005)

En la segunda investigación, utilizando 10 marcadores también de bovinos (Angel-Marin *et al.*, 2010) muestrearon 588 individuos de 12 hatos bufaleros de 5 razas o grupos genéticos (Murrah brasileiro, Murrah búlgaro, búfalo colombiano, mestizos de los tres grupos anteriores y el denominado Murrah por absorción). Se encontró que tres marcadores de los utilizados INRA37, SPS115 y BM2113 tenían un buen número de alelos observados entre 7 y 16, sin embargo, llamaba la atención que el número de alelos efectivos mostraba una reducción significativa entre 1.9 y 5.7 y que particularmente, para el microsatélite INRA37 a pesar de tener 16 alelos solo 6 tenían frecuencia poblacional es decir alelos efectivos ( $N_e=5.1$ ,  $PIC=0.78$ ). Dos de los marcadores utilizados mostraron tener un comportamiento monomórfico (ETH225 y MGTG7) y los demás no eran polimórficamente informativos (número de alelos observados menor de 5). Adicionalmente, en dicho estudio donde se utilizó la técnica de gel en poliacrilamida 6% y tinción con nitrato de plata para la electroforesis de los fragmentos, no fueron claros los criterios de selección de las muestras, el rango de edad de los animales ni la proporción de machos y hembras evaluados. También se utilizó la técnica de gel en poliacrilamida 6% y tinción con nitrato de plata para la electroforesis de los fragmentos genéticos analizados.

## **2 METODOLOGÍA**

### **2.1 SELECCIÓN DE LOS INDIVIDUOS Y CASUÍSTICA DE LA INVESTIGACIÓN**

En el año del 2010, el Fondo Bufalero del Centro S.A (FBC) con sede en Manizales y el Instituto de Genética del Eje Cafetero (IGEC) se asociaron para realizar la genotipificación de las búfalas lecheras élite, superior y fundadoras, así como de los machos reproductores que en la base de datos del FBC tuviesen los mejores registros de producción de leche en litros diarios. Se realizó el muestreo de 1501 búfalos, los cuales pertenecen a la Hacienda “La Suiza” para crear un banco genético de éstos individuos, los cuales habían nacido entre el año de 1986 y el 2010.

A los individuos se les tomó muestra de sangre total la cual fue goteada en tarjeta FTA ® (Whatman® Cat No. WB120205 FTA classic card 4-sample area). El Instituto de Genética de la Universidad Nacional fue contactado para hacer el asesoramiento de éste proyecto y hacer el estudio poblacional de éstas muestras. Para la selección de la población del estudio, se tomó una muestra de 360 animales del banco genético original del convenio FBC-IGEC, pero teniendo en cuenta que no existían registros genealógicos paternos y los maternos presentaban inconsistencias en algunos casos, se procedió a seleccionar aquellos individuos provenientes de una misma generación o intervalo generacional para evitar redundancia: es decir, muestras de padres e hijos. Así mismo se seleccionaron individuos ubicados en un mismo rango de edad y se esperaba obtener un número similar de ejemplares machos y hembras que estuviesen aportando sus genes a la población actual. Se tomó como referencia los datos de la especie bubalina aportados por Drost M. (2007),

donde se calculó el intervalo generacional para los búfalos en 4 años aproximadamente, debido a que se contó con información parcial de los pedigríes y no se pudo calcular un intervalo generacional específico para ésta población. Finalmente se seleccionaron aquellos animales nacidos entre el 2006 y el 2009, 205 machos reproductores y 155 hembras.

**Tabla 1.** Características de los marcadores microsatélites propios de la especie bubalina y seleccionados para la caracterización de una población de búfalo colombiana

<b>Marcador</b>	<b>Primer Forward</b>	<b>Primer reverse</b>	<b>°Tm</b>	<b>NA</b>	<b>RA pb</b>
CCMB211 <sup>a</sup>	AAAGGCACATTTTCTCCCTTC	GTTTCTTCAGCCCAAGAACCTAGGAGA	60	9	113-133
CCMB099 <sup>a</sup>	CCTCCTCTTCTGATTGCTTGAC	GTTTCTTAATCACGTTTGTGCCTGTTTT	52	11	152-178
CCMB001 <sup>a</sup>	CCTCCAACACACAACACAC	GTTTCTTCAGTCCATTCCCATTTCAC	52	13	200-224
CCMB208 <sup>a</sup>	GAAGCGAGTTAGTGACACAG	GTTTCTTCAGCAGTCCCTGTTGAGACA	60	5	246-252
CCMB168 <sup>v</sup>	GGCACAGCACATGCTTAGAA	GTTTCTTACCAGGCCAGGTATTCTTCC	60	7	101-116
CCMB126 <sup>v</sup>	CCAAGGATAGAAGAGCCTGGT	GTTTCTTCCCGGAAGACTGACAGTTGA	60	9	136-157
CCMB005 <sup>v</sup>	AAGTAACGGAGCACACCAGAGT	GTTTCTTAAGTGAGACTGGATTCCGACAG	60	17	178-202
CCMB045 <sup>v</sup>	CTCTCACTGCAGCTCCATCC	GTTTCTTTTTACCTCTGACACCTCCCAAC	52	14	229-255
CCMB093 <sup>v</sup>	CTGACGACACATTCCTCCAAT	GTTTCTTCGGTTCCTCGTTTTTAAGCAATA	52	10	306-320
CCMB238 <sup>m</sup>	TCTTCTATACAGCAAAGTGATGAGC	GTTTCTTTGTGATAAACCCACAGTGAAAA	60	10	90-108
CCMB078 <sup>m</sup>	TTTGAAGGTAAACTGGCAGGAT	GTTTCTTCAATCTGATTCACTTGGGATGA	50	7	124-138
CCMB159 <sup>m</sup>	GAGCCCTCCTGACTCCAGA	GTTTCTTACCAAGATGCTGACATGTGG	60	11	159-175
CCMB071 <sup>m</sup>	TCAAACCTGCATTTCTTGTGTC	GTTTCTTCCTTTCACAGAATCCCCCTTA	50	12	224-247
CCMB060 <sup>m</sup>	CCACTTGGTTTCAAGGCTCAG	GTTTCTTCACATACACACCCCTCCTATCA	56	6	274-281
CCMB006 <sup>r</sup>	TGAGGAAGAAGCCAGGTGAG	GTTTCTTTTCCGAGGAATTCAGTCCAG	52	9	113-133
CCMB207 <sup>r</sup>	CTGACGTGTTTTCTGTTGAATAGG	GTTTCTTGAACAGTCTCTCACAAAACAGTG	60	13	150-174
CCMB113 <sup>r</sup>	TTTTCTATCTGCCCCACCT	GTTTCTTTACCACTGTGAAGCGATGGA	58	11	197-218
CCMB077 <sup>r</sup>	AGTCAACGCTCGCTGAGAAG	GTTTCTTACGAGAAGGTATGGGTGTGTCT	52	7	234-250

La temperatura de anillamiento (°Tm), el número de alelos (NA), y el rango de amplificación (RApb), corresponden a los parámetros reportados por Nagarajan *et al.*, (2009). Los fluoromarcajes para cada conjunto de marcadores microsatélites fueron <sup>a</sup> 6 FAM, <sup>b</sup> VIC, <sup>m</sup> NED y <sup>r</sup> PET

## 2.2 SELECCIÓN DE LOS LOCI MICROSATÉLITES PRÓPIOS DE LA ESPECIE BUBALINA Y FLUOROMARCAJE.

Del conjunto de microsatélites aislados por Nagarajan *et al.* (2009), de 107 *loci* microsatélites polimórficos dinucleótidos generados a partir de una librería genómica de *Bubalus bubalis*, se seleccionaron 18 *loci* microsatélites para ser utilizados en una PCR múltiplex. Los criterios de selección usados para la selección de los marcadores microsatélites fueron los siguientes: que no hubiesen mostrado previamente desequilibrio de ligamiento en el estudio realizado por Nagarajan *et al.* (2009), que no reportaran alelos nulos para disminuir el riesgo de errores durante la asignación alélica, que presentaran un alto polimorfismo (más de 4 alelos), que presentaran temperaturas de anillamiento en un rango comprendido entre 52°C y 60°C favoreciendo la estandarización de la PCR múltiplex y finalmente que el rango de amplificación reportado generara el mínimo solapamiento entre los marcadores seleccionados facilitando la agrupación por fluoromarcaje de 4 conjuntos de microsatélites dentro del panel propuesto. De esta forma se buscó optimizar el diseño de un panel de 18 marcadores microsatélites en una sola reacción de amplificación para su posterior electroforesis capilar en el analizador genético.

Una vez definidos los 18 marcadores microsatélites, se establecieron 4 conjuntos de microsatélites de acuerdo a sus rangos de amplificación y se les asignó un determinado fluorocromo que permitiera la adecuada discriminación de cada uno de ellos durante la electroforesis capilar. Como lo recomienda la casa comercial Life technologies®, el filtro G5 permitió tener 4 canales espectrales, uno por cada fluorocromo (6-FAM, VIC, NED, PET), e incluir los 4 conjuntos de microsatélites y llevar a cabo en una sola reacción la amplificación de los 18 microsatélites (Tabla 1). Un quinto fluorocromo (LIZ), se reservó para el marcaje del “size standard” o estándar

de peso. Adicionalmente, se agregó al extremo 5' de los primers "reverse" una "pig-tail" (5'-GTTTCTT-3') para favorecer la adición de adenina y así evitar errores en la asignación alélica por "split peaks" (Brownstein *et al.*, 1996)

### **2.3 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE SECA EN TARJETAS FTA**

Inicialmente, se utilizó el protocolo de extracción recomendado por la casa comercial Whatman® con el reactivo *FTA purification reagent* (Whatman® Cat No. WB12 0204, 500 ml) siguiendo las recomendaciones del fabricante, pero debido al exceso de muestra que presentaban las tarjetas no fue posible eliminar la presencia de restos de hemoglobina. Debido a esto se hizo necesario implementar una metodología que pudiera resolver éste inconveniente (figura 1). Se probaron cinco protocolos de extracción de ADN (Anexo C) con los que se pudo obtener ADN de doble cadena susceptible de amplificación por PCR, los cuales fueron probados previamente en muestras animales y vegetales (Smith & Burgoyne, 2004; Quintanilla *et al.*, 2011).

### **2.4 ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS MARCADORES MICROSATÉLITES**

Se inició verificando los rangos alélicos reportados previamente por Nagarajan *et al.* (2009), la presencia de artefactos propios del marcaje con fluorocromos y la especificidad de amplificación para cada marcador, amplificando los marcadores por separados.. El procedimiento permitió verificar el comportamiento (es decir, especificidad, tamaño de alelos etc) de cada marcador e identificar aquellos que por su desempeño conformarían el panel final de marcadores empleado en la PCR multiplex. La reacción de PCR monoplex se llevó a cabo utilizando la siguiente mix de PCR para

un volumen final de 20  $\mu$ l: 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 1.25 U/ $\mu$ l de AmpliTaq Gold® (Life technologies), 200  $\mu$ M de mix de dNTP's (dATP , dTTP dGTP, dCTP), 1X de PCR Gold Buffer® (Life technologies), 0.2  $\mu$ M de cada Primer y Agua grado biología molecular estéril. La concentración de ADN era desconocida pues no es posible cuantificar la cantidad de ADN que contenía cada tarjeta.

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador C1000 Touch™ (BioRad, Thermal Cycler with 96-Well Fast Reaction). Las condiciones de la PCR se describen en la tabla 2.

Posteriormente se realizó estandarización de la PCR multiplex de aquellos marcadores que amplificaron en óptimas condiciones en las monoplex, así como los componentes y concentraciones finales de la master mix empleada durante la PCR multiplex lo que permitió amplificar los marcadores microsatélites seleccionados y caracterizar la población bubalina objeto de estudio (1.8 mM de  $MgCl_2$ , 2 U/  $\mu$ l de AmpliTaq Gold® de Life technologies, 200  $\mu$ M de dNTP's (dATP , dTTP dGTP, dCTP), 1X de PCR Gold Buffer® de Life technologies, 0.2X de la Mix Primer (ver la concentración final en PCR de cada primer en la Tabla 4) , Buffer pre CESII (0.54 M de betaína, 1.34 mM de DTT, 1.34% de DMSO y 11  $\mu$ g/ml de BSA).

Para el proceso de estandarización y optimización de la PCR multiplex por cada fluorocromo, se tuvo que realizar la optimización de algunas variables importantes que influyen en el desempeño de la reacción de PCR, entre ellas: la concentración de  $MgCl_2$ , la concentración de ADN polimerasa (AmpliTaQ Gold® Life technologies), la concentración de cada uno de los primers de los marcadores seleccionados, las condiciones de amplificación (número de ciclos, temperatura de anillamiento y tiempo de extensión final) y el uso de una mezcla recomendada por Ralser *et al.*, (2006) con mejoradores de PCR (Butler *et al.*, 2005, Moretti *et al.*, 2001, Wallin *et al.*, 2001, Henegariu *et al.*, 1997).



**Figura 1.** Muestra de sangre seca de búfalo obtenida de un ejemplar del Fondo Bufalero del Centro y goteada en tarjeta FTA ®. Se observa un exceso de sangre goteada en la tarjeta. Las especificaciones del fabricante recomiendan gotear hasta 500 µl de sangre en un área de 1.2 mm de diámetro para obtener entre 5 a 20 ng de ADN de doble cadena (General Electric Healthcare ®2011)



**Tabla 2.** Condiciones para las PCR monoplex empleadas con cada marcador microsatélite.

Condiciones	Denaturación inicial	PCR x 28 ciclos			Extensión final	Final
		Denaturación	Anillamiento	Extensión		
Temperatura	95°C	94°C	50 a 60°C*	72°C	60°C	4°C
Tiempo	11 min	20 seg	2 min	1 min	60 min	∞

\* Variable según temperatura de cada marcador genético de la Tabla 1.

**Tabla 3.** Condiciones finales establecidas para una PCR multiplex de 16 marcadores microsatélites específicos para la especie bubalina.

Condiciones	Denaturación inicial	PCR x 30 ciclos			Extensión final	Final
		Denaturación	Anillamiento	Extensión		
Temperatura	95°C	94°C	59°C	72°C	60°C	4°C
Tiempo	11 min	20 seg	2 min	1 min	60 min	∞

#### 2.4.1 Validación de la concentración de primers:

- Se determinó la concentración óptima de primers de forma empírica probando concentraciones que oscilaban entre 0.1 a 0.5  $\mu\text{M}$ , con variaciones de 0.1  $\mu\text{M}$  para cada ensayo. Los criterios para definir la concentración óptima de primer fueron:
  - Las concentraciones de los primers son tan bajas que producen una amplificación poco eficiente o nula.
  - Las concentraciones de los primers son tan altas que producen una amplificación de productos no específicos y exceso de dímeros de primer.

#### 2.4.2 Validación de la concentración de $\text{MgCl}_2$ :

La concentración de cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) requerido para la amplificación óptima de los microsatélites en la PCR dependió de las características del set de primers y del ADN molde.

La concentración ideal de  $\text{MgCl}_2$  fue determinada mediante un gradiente, debido a que una concentración muy alta (es decir mayor de 4.0 mM.) o muy baja (es decir menor de 1.0 mM) de éste ión reduce la eficiencia de la amplificación o produce la amplificación de productos no deseados o inespecíficos.

Se utilizaron las siguientes condiciones de trabajo para determinar la concentración óptima de  $\text{MgCl}_2$  (Henegariu *et al.*, 1997):

- A partir del punto medio o punto de variación 0%, que para éste caso fue 1.5 mM, se realizó un gradiente de concentración variando 10% por encima y por debajo de la concentración inicial, es decir, las siguientes

concentraciones: 1.05 mM (-30%), 1.2 mM (-20%), 1.35 mM (-10%), 1.65 mM (10%), 1.8 mM (20%) y 1.95 mM.

- Se utilizó la concentración de primers según lo que se estandarizó en el punto anterior y que se encuentra en la Tabla 4, la concentración de dNTP's fue de 200 µM para todas las reacciones.

- **Uso de mezcla de mejoradores de PCR Buffer CES (Raiser *et al.*, 2006):**

Raiser *et al.* (2006) propusieron el uso de una mezcla de mejoradores de PCR denominada “*buffer preCESII*” la cual está compuesto de betaína, ditioneitol (DTT), dimetilsulfóxido (DMSO) y Albúmina Sérica Bovina (BSA). Se empleó como alternativa para mejorar la eficiencia y rendimiento de la PCR en presencia de moléculas inhibitoras de la PCR como los derivados del grupo hemo. Adicionalmente, también permitió mejorar el anillamiento de los primers en presencia de estructuras secundarias y secuencias con alto contenido de CG.

#### **2.4.3 Condiciones de PCR multiplex:**

Debido a la diferencia de temperaturas del set de primers seleccionados, se realizaron varios ensayos para establecer la temperatura óptima de anillamiento para la amplificación de todos los marcadores evaluados sin afectar la eficiencia de la reacción y optimizando el gasto de reactivos. Se ensayaron 5 temperaturas de anillamiento: 55°C, 57°C, 59°C, 61°C y 63°C.

#### 2.4.4 Validación de la especificidad de los microsatélites utilizados:

Para verificar la especificidad de los marcadores a nivel de especie, se utilizó ADN de la especie *Bos taurus* (control positivo bovino del kit Stockmarks® for cattle genotyping, Life technologies™, 20 ng/μL) y ADN humano (Control positivo humano del kit AmpFISTR®, 0.10 ng/μL). En cada amplificación, se realizó un control negativo de PCR y la amplificación de un blanco de extracción para asegurar la fiabilidad de los resultados.

## 2.5 DESARROLLO DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR Y ANÁLISIS DE ELECTROFEROGRAMAS

A los fragmentos amplificados, se les realizó electroforesis capilar automatizada en un analizador genético ABI 3500 XL®. Se utilizó el polímero POP4® y el estándar de peso GENE SCAN LIZ 600®, el cual contiene 36 fragmentos que varían entre 20 y 600 pb, proporcionando una mayor precisión y lo hace ideal para ser utilizado en nuevas reacciones de análisis de fragmentos. Los pesos moleculares de los fragmentos del estándar fueron los siguientes: 20, 40, 60, 80, 100, 114, 120, 140, 160, 180, 200, 214, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 314, 320, 340, 360, 380, 400, 414, 420, 440, 460, 480, 500, 514, 520, 540, 560, 580 y 600 pb.

Se realizó la mezcla para el montaje en el equipo, de acuerdo a las siguientes condiciones: 9.0 μl de Formamida Hi-Di, 0.5 μl de Genescan LIZ 600 y 0.8 μl de muestra ó amplificado.

Posterior a la denaturación a 95°C por 5 minutos, la cual fue realizada en el termociclador, las muestras fueron sometidas a choque térmico en baño de hielo para asegurar que las cadenas de ADN en un medio con formamida quedaran en

estado de cadena sencilla. Se realizó la electroforesis capilar en un analizador genético ABI ® 3500 XL (Life Technologies™)

El análisis de los electroferogramas fue realizado en el programa GeneMarker ® (Softgenetics, 2010) el cual ofreció ventajas tales como: facilidad de análisis, velocidad y ayuda en la construcción del panel de análisis de los marcadores.

**Tabla 4.** Resultados de los marcadores genéticos y concentración óptima de los primers para la PCR múltiplex.

<b>Marcador</b>	<b>Resultado en la monoplex</b>	<b>Resultado en la multiplex</b>	<b>Concentración del primer en la multiplex</b>
CCMB211	Amplificó	Amplificó	0.15 $\mu$ M
CCMB001	Amplificó	Amplificó	0.5 $\mu$ M
CCMB208	Amplificó	Amplificó	0.3 $\mu$ M
CCMB168	Amplificó	Amplificó	0.2 $\mu$ M
CCMB126	Amplificó	Amplificó	0.15 $\mu$ M
CCMB005	Amplificó	Amplificó	0.4 $\mu$ M
CCMB045	Amplificó	Amplificó	0.4 $\mu$ M
CCMB093	Amplificó	Amplificó	0.3 $\mu$ M
CCMB238	Amplificó	Amplificó	0.5 $\mu$ M
CCMB078	Amplificó	Amplificó	0.2 $\mu$ M
CCMB159	Amplificó	Amplificó	0.1 $\mu$ M
CCMB060	Amplificó	Amplificó	0.4 $\mu$ M
CCMB006	Amplificó	Amplificó	0.2 $\mu$ M
CCMB207	Amplificó	Amplificó	0.2 $\mu$ M
CCMB113	Amplificó	Amplificó	0.2 $\mu$ M
CCMB077	Amplificó	Amplificó	0.2 $\mu$ M
CCMB071	No Amplificó	No Amplificó	No incluido
CCMB099	Picos inespecíficos. Sobrelapamiento con el CCMB001	Picos inespecíficos. Sobrelapamiento con el CCMB001	No incluido

## 2.6 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD, ESTRUCTURA GENÉTICA Y DE PARENTESCO.

Para el análisis de la variabilidad genética de la muestra, se evaluó la diversidad genética estableciendo la cantidad de alelos totales, los alelos efectivos en cada *locus* y el número medio de alelos observados en todos los *loci*. También se calcularon las heterocigocidades observadas y esperadas, las pruebas exactas de Fisher para evaluar el equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) en cada *locus* para la población total y también se hizo el análisis por sexo (machos y hembras) para establecer si había alguna diferencia en el manejo de acuerdo al género de los animales. Todos éstos análisis fueron calculados en el programa GENEPOP v.4.2. (Raymond & Rousset 1995).

La estimación de la endogamia (índice de fijación) a través de los marcadores moleculares analizados, se realizó con base en el  $F_{is}$  dentro de toda la población y dentro de los diferentes estratos por años de nacimiento de los individuos ya que todos fueron muestreados en el mismo lugar (individuos nacidos en 2006, 2007, 2008 y 2009) (Weir & Cockerham 1984).

Como los datos de genealogía (o registros de pedigrí) de los individuos muestreados fueron parciales, se realizó un análisis de hermandad con el propósito de reconstruir las relaciones genéticas de parentesco entre los individuos y filtrar la muestra y así intentar corregir valores errados como heterocigocidades observadas y esperadas, frecuencias alélicas, HWE y desequilibrio de ligamiento, entre otros.

Para los análisis de genealogía se utilizaron varios de los algoritmos propuestos para análisis de pedigrí. Para reconstruir los grupos de hermanos utilizando los genotipos obtenidos se realizó una combinación de dos algoritmos en el programa KINALYZER, el cual utiliza una optimización combinatoria basada en las reglas de herencia mendeliana para encontrar el menor número de grupos de hermanos que contienen todos los individuos de la muestra mediante el algoritmo "2-allele

*set cover*" y también dispone de un método de "consenso" que reconstruye grupos de hermanos utilizando subconjuntos de *loci* y encuentra el consenso de estas diferentes soluciones (Sheikh *et al.*, 2008, Ashley *et al.*, 2009). Como un método alternativo y conservador para hacer las inferencias de las relaciones genéticas entre los individuos se utilizó el programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.*, 2006) en el que se calcularon las estimaciones de máxima verosimilitud de la relación ( $r$ ) (Blouin *et al.*, 2003). Se eligió este método porque las estimaciones de máxima verosimilitud de la relación por lo general son más precisas que las proporcionadas por otros estimadores (Milligan B.G., 2003).

Éste programa fue una buena herramienta para discriminar entre las cuatro relaciones genealógicas comunes: (1) individuos no relacionados biológicamente (U), (2) medios hermanos (HS), (3) hermanos completos (FS) y (4) padres e hijos (PO). También permitió hacer una estimación de la relación de individuos específicos para verificar las relaciones de hermandad realizadas en KINALYZER.

Adicionalmente, se evaluó la presencia de estructura genética a nivel inter e intra-poblacional mediante: (1) Análisis multivariados mediante las técnicas de Análisis de coordenadas principales (PCoA) (2) análisis de correspondencias múltiples (ACM) con el programa GENETIX v.4.02.2 y Genealex version 6.5. (3) Estimaciones del número de posibles acervos genéticos y la mezcla racial presente en la muestra mediante el programa STRUCTURE versión 2.3 (Pritchard, Stephens & Donnelly., 2000), el cual se basa en un algoritmo bayesiano con un método de agrupamiento que utiliza una cadena de Monte Carlo Markov (*MCMC por sus siglas en Inglés*) para estimar el número probable de acervos probables (K) presentes en la muestra (length burn-in period: 200 000; MCMC: 50 000) y además evaluar diferentes valores de K (10) bajo modelos de ancestría de la población (origen de mezcla o no mezcla).



## **3.RESULTADOS**

### **3.1. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE TARJETAS FTA.**

Las cinco metodologías de extracción fueron eficientes y lograron eliminar la hemoglobina que causó inhibición de la PCR, según lo sugerido por el éxito de amplificación para todos los métodos de extracción. Debido a que el ADN quedó atrapado en la tarjeta FTA no fue posible realizar la cuantificación de la concentración y calidad del ADN obtenido por cada metodología. Sin embargo, el método que mostró mejores resultados en cuanto a la eficiencia de la PCR, por presentar menor cantidad de artefactos y más cantidad de *loci* amplificados, fue la metodología de extracción utilizando Tiocianato de Guanidinio (GITC) (Smith & Burgoyne, 2004).

### **3.2. ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES.**

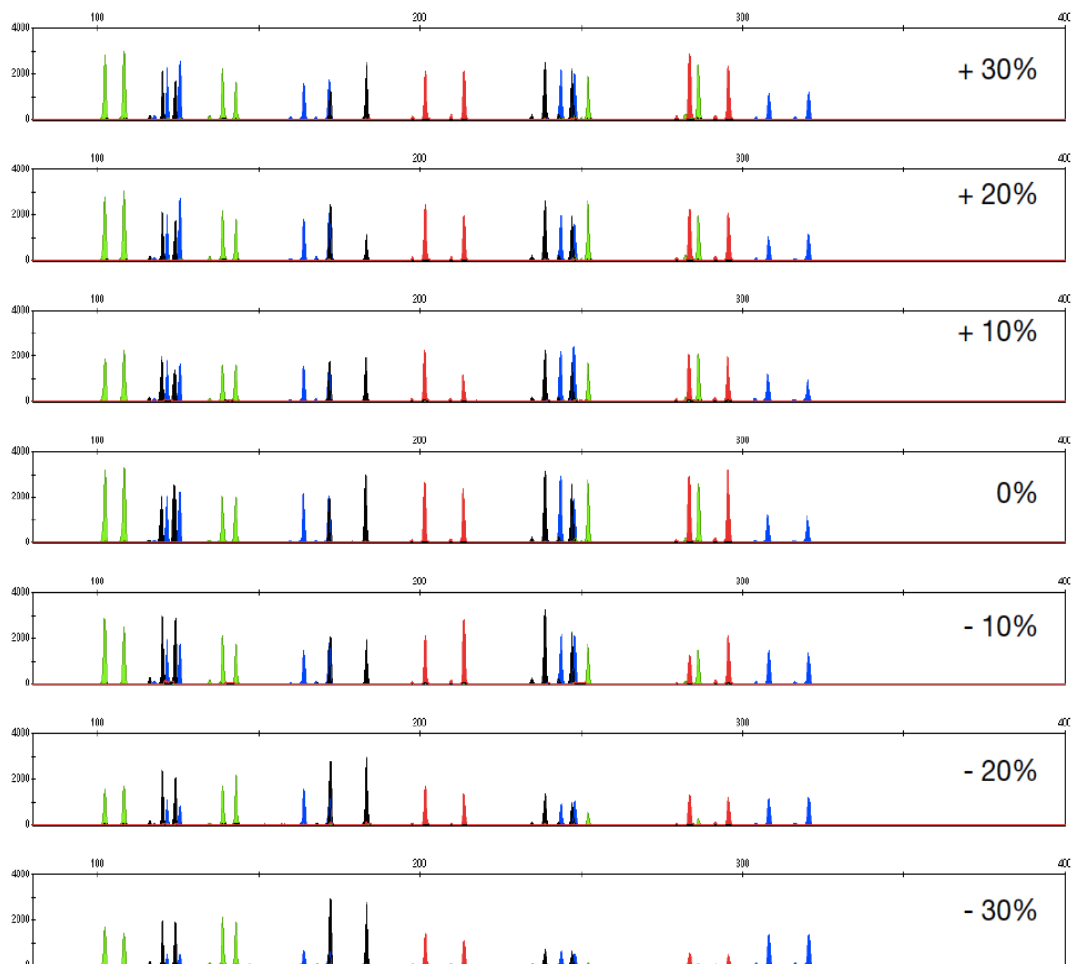
En cuanto se obtuvo ADN de buena calidad y cantidad, se procedió a realizar la verificación del funcionamiento de cada marcador en reacciones individuales de PCR o monoplex PCR utilizando tres muestras. Fue posible verificar el rango de amplificación, la presencia de artefactos propios del fluorocromo y/o marcador y verificar su idoneidad. Se seleccionaron 16 de los 18 microsatélites del panel inicialmente escogido (Tablas 1 y 4) y los resultados de las PCR individuales para cada marcador se pueden observar en el anexo B con más detalle. Se eliminó el marcador CCMB099 dado que mostraba un comportamiento errático debido a la presencia de una gran

cantidad de productos (es decir, picos) inespecíficos que no permitió una asignación clara de los alelos. En adición, se sobrelapaba con el marcador CCMB001. También se eliminó el marcador CCMB071 debido a que no amplificó ni en el monoplex ni cuando se intentó hacer en multiplex (anexo B3 y B18).

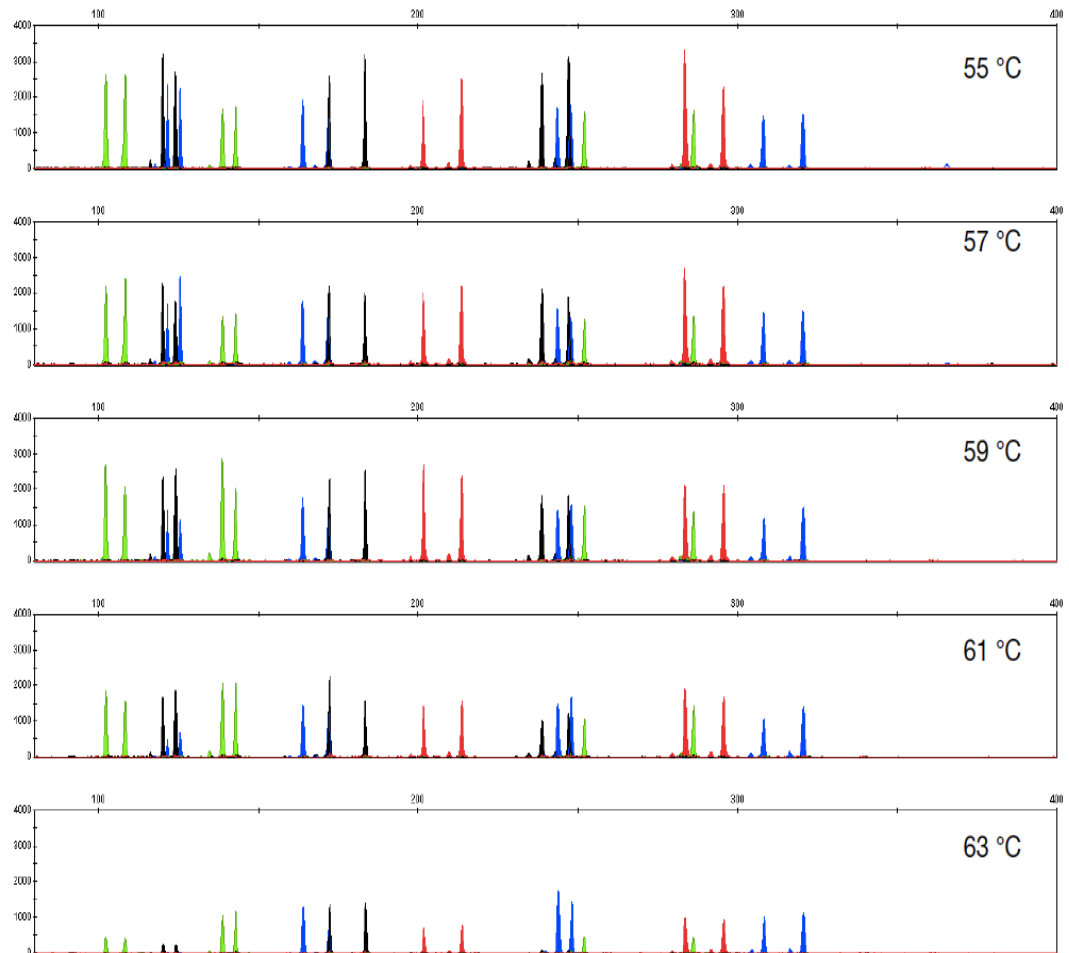
Como se observa en la Figura 2, después de definir la concentración de primers sin la variable del  $MgCl_2$  (Henegariu *et al.*, 1997), como se evidencia en los resultados crudos de los análisis comparativos de la intensidad de la señal en términos de UFC, la concentración de  $MgCl_2$  aumentada en un 20% (1.8mM) respecto a la concentración 0% (1.5mM) que correspondía a la utilizada en la estandarización de las PCR monoplex y producía una mejor eficiencia en la PCR. No se seleccionó una concentración mayor porque se observó la generación de inespecificidades y exceso de picos “*stutter*”, tampoco se seleccionaron concentraciones menores, porque se percibía la disminución de la eficiencia de la PCR.

Debido a la diferencia de temperaturas del set de primers seleccionados y como se muestra en la figura 3, se pudo evidenciar que a una temperatura de 59°C por dos minutos y con 30 ciclos se podían amplificar los 16 marcadores genéticos del panel seleccionado sin comprometer las características inicialmente mostradas de cada uno de ellos en las reacciones en PCR individual.

En el anexo A se encuentra el perfil genético obtenido para otras especies probadas y para verificar la especificidad de los primers, el haber encontrado solo amplificación del marcador CCBM211 utilizando control positivo de ADN del kit comercial Stockmarks for cattle genotyping® de Life technologies y ninguna amplificación con el control de ADN humano AmpFISTR® Control DNA 007..



**Figura 2.** Evaluación de diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> sobre la calidad de los amplificadores obtenidos en una PCR 16-plex con marcadores microsatélites específicos para la especie bubalina



**Figura 3.** Evaluación de diferentes temperaturas de anillamiento sobre la calidad de los amplificadores obtenidos en una PCR 16-plex con marcadores microsatélites específicos para la especie bubalina.

### **3.3. SELECCIÓN DE LA MUESTRA Y ÉXITO DE LA AMPLIFICACIÓN.**

Con la metodología descrita anteriormente se logró estandarizar y optimizar 16 marcadores tipo microsatélite dinucleótidos específicos para Búfalo de agua. Posteriormente se realizó la validación de la metodología realizando la amplificación de las 360 muestras seleccionadas para el muestreo. Se logró obtener la amplificación y perfiles genéticos de buena calidad de 282 de los 360 individuos seleccionados inicialmente con la tipificación de entre 14 y 16 *loci* microsatélites de los seleccionados y estandarizados en el panel definitivo, esto debido a que en algunos individuos solo fue posible obtener perfiles parciales (menos de doce *loci* amplificados) o ninguna amplificación (perfil negativo), lo cual se relacionó con la cantidad y calidad del ADN extraído de las muestras. Además, de algunos individuos se logró determinar según los registros de la base de datos que eran medios hermanos de madre (en la asociación no se lleva el registro del padre biológico, toda la población anterior al 2006 no tiene registro de pedigrí ni materno ni paterno) por lo que fue necesario eliminar uno de los individuos del análisis genético poblacional para evitar el efecto de la redundancia (tabla 5).

**Tabla 5.** Total de muestras amplificadas por PCR 16-plex y número de marcadores en los cuales fue posible observar alelos específicos.

<b>Número de loci</b>						
<b>amplificados</b>	<b>Género</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>Total</b>
16-14	Femenino	51	18	16	28	112
16-14	Masculino	54	40	46	30	170
	Total	104	58	62	58	<b>282</b>
<14 loci amplificados (perfil incompleto) ó perfil negativo						43
Relación de parentesco (hermanos maternos según base de datos)						35
<b>Total muestras</b>						<b>360</b>

### 3.4. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y DE PEDIGRÍ.

#### 3.4.1. Índices de diversidad estándar.

##### 3.4.1.1. Índices de diversidad estándar población total

Los 16 microsatélites seleccionados y estandarizados presentaron un comportamiento polimórfico en la población analizada, el número medio de alelos por locus fue  $9.51 \pm 0.49$ . Los valores de heterocigocidad esperada para la población fueron más altos ( $H_e = 0.721 \pm 0.015$ ) con respecto a los valores de heterocigocidad observada ( $H_o = 0.698 \pm 0.017$ ), es decir se encontró un exceso de homocigotos, lo que puede explicar que 13 de los 16 marcadores (CCMB211, CCMB208, CCMB168, CCMB126, CCMB005, CCMB238, CCMB078, CCMB060, CCMB006, CCMB207, CCMB001, CCMB077 y CCMB045) se encontraban con desviaciones respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0.01$ ). Solo 3 marcadores se encontraban en equilibrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) (CCMB043, CCMB159 y CCMB113) tal y como se observa en la Tabla 6.

En cuanto al análisis realizado en la población muestreada por años de nacimiento de los individuos, se observó que para los individuos nacidos en el 2006 y en el 2007 hay un déficit de heterocigotos mucho más marcado, que en aquellos individuos nacidos en el 2008 y el 2009, de la misma manera, se observa que el índice de fijación (F) muestra un valor calculado de endogamia más marcado en los individuos nacidos en el 2006 y en el 2007 y valores menores en los individuos nacidos entre el 2008 y el 2009 (Tabla 7).

Se observa también un mayor número de alelos en los individuos nacidos en el 2006 ( $11.56 \pm 0.93$ ), sin embargo, a pesar de tener la mitad de muestra (57), los individuos nacidos en el 2009 presentan un número de alelos comparable ( $9.51 \pm 0.49$ ) lo que puede significar

una mayor diversidad genética de éstos individuos y un mejor manejo reproductor. También llama la atención que en todos los años analizados el número de alelos efectivos en la población oscilaba en un promedio de  $4.40 \pm 0.26$ , lo que evidencia una fuerte presión selectiva en éstos individuos (Tabla 7).

Los marcadores CCMB208 y CCMB060 fueron los que presentaron los valores de  $F_{IT}$  y  $F_{IS}$  más altos, lo que puede estar dado debido al exceso de homocigotos.

En cuanto a los índices de  $F_{st}$  ningún marcador obtuvo un valor que indicara estructuración genética de la población (por años de nacimiento), el marcador que mostró el valor de  $F_{st}$  más alto fue CCMB208 con 0.064, que según los índices de Wright se considera en moderada divergencia (Weir & Cockerham 1984).

El reporte de las frecuencias alélicas para la población utilizada de la raza Buffalypso presente en la bufalera la Suiza del FBC se puede encontrar en el anexo D para la población total analizada (282 individuos).



**Tabla 6.** Estadísticos de diversidad molecular F (S. Wright) de la muestra de búfalos de la Hacienda la Suiza para cada marcador ( $F_{st}$ ,  $F_{is}$  y  $F_{it}$ )

Locus	Na	Ht	He	Ho	$F_{is}$	$F_{it}$	$F_{st}$	F	$G^2$	Signif	Nm
CCMB211	9	0.557	0.551	0.534	0.032	0.042	0.010	0.073	<0.01	P<0.001	23.830
CCMB001	12	0.891	0.874	0.834	0.046	0.065	0.019	0.055	<0.01	P<0.05	12.715
CCMB208	16	0.752	0.704	0.558	0.207	0.258	0.064	0.256	<0.01	P<0.001	3.670
CCMB168	16	0.680	0.675	0.742	- 0.099	-0.091	0.007	- 0.063	<0.01	P<0.001	35.589
CCMB126	11	0.669	0.661	0.665	- 0.006	0.005	0.011	0.034	<0.01	P<0.001	22.031
CCMB005	18	0.888	0.862	0.820	0.049	0.077	0.029	0.074	<0.01	P<0.001	8.270
CCMB045	16	0.887	0.878	0.937	- 0.067	-0.056	0.010	- 0.060	<0.01	P<0.001	24.123
CCMB043	9	0.804	0.767	0.741	0.034	0.078	0.046	0.071	0.663	ns	5.175
CCMB238	20	0.803	0.784	0.726	0.074	0.096	0.023	0.116	<0.01	P<0.001	10.579
CCMB078	11	0.549	0.546	0.508	0.069	0.075	0.007	0.093	<0.01	P<0.001	37.709
CCMB159	7	0.649	0.641	0.644	0.004	0.012	0.008	0.009	0.334	ns	29.572
CCMB060	6	0.753	0.722	0.627	0.132	0.168	0.041	0.155	<0.01	P<0.001	5.781
CCMB006	15	0.539	0.528	0.541	- 0.025	-0.004	0.021	0.005	<0.01	P<0.001	11.655
CCMB207	13	0.808	0.802	0.775	0.033	0.041	0.008	0.030	<0.01	P<0.001	32.870
CCMB113	12	0.838	0.827	0.831	0.005	0.014	0.008	0.026	0.954	ns	30.074
CCMB077	5	0.717	0.713	0.701	0.017	0.023	0.006	0.016	<0.01	P<0.05	43.668
<b>Media</b>	9.516		0.698	0.721	0.032	0.050	0.020	0.056	<0.001	P<0.001	21.082
<b>DS</b>	0.492		0.017	0.015	0.018	0.021	0.004	0.020			3.247

\*Ht: heterocigocidad total, He: heterocigocidad esperada, Ho: heterocigocidad observada, Nm: número de migrantes,  $F_{is}$ : Coeficiente de endogamia para un individuo con respecto a la subpoblación,  $F_{it}$ : Coeficiente de endogamia para un individuo con respecto al total de la población,  $F_{st}$ : Coeficiente de endogamia de la subpoblación con respecto al total de la población,  $G^2$ : valor-P para el radio de probabilidad de la desviación EHW,  $F = \text{índice de fijación} = (He-Ho)/He = 1 - (Ho/He)$

#### 3.4.1.2. Índices de diversidad estándar para machos

En lo que respecta al análisis realizado tomando todos los machos, los 16 microsatélites analizados mantuvieron un comportamiento polimórfico, el número medio de alelos por *locus* fue ligeramente mayor al observado para la población total ( $10.812 \pm 4.27$ ). Los valores de heterocigocidad esperada para la población fueron mucho más altos con respecto a los valores de heterocigocidad observada, al igual que ocurrió con la población total, sin embargo, se observó un exceso de homocigotos mucho más marcado en los machos que en la población total, lo que evidenciaba un manejo más dirigido en la selección de machos ( $H_o: 0.73249 \pm 0.13$ ;  $H_e: 0.77706 \pm 0.09$ ).

Ocho de los dieciseis marcadores (CCMB211, CCMB208, CCMB168, CCMB126, CCMB005, CCMB238, CCMB078, CCMB006) mostraron desviaciones significativas respecto al EHW ( $p < 0.01$ ).

El microsatélite más polimórfico fue el CCMB238 (18) al igual que en la población total y los menos polimórficos CCMB060 y CCMB077 con tan solo 5 alelos, ver Tabla 8.

#### 3.4.1.3. Índices de diversidad estándar para hembras

En cuanto al análisis realizado tomando todas las hembras, también los 16 microsatélites analizados mostraron un comportamiento polimórfico, el número medio de alelos por *locus* fue menor que el observado en los machos y en la población total ( $8.312 \pm 2.17$ ).

Los valores de heterocigocidad esperada para la población fueron más altos con respecto a los valores de heterocigocidad

observada al igual que ocurrió con la población total, sin embargo eran más bajos que los encontrados con los machos ( $H_o: 0.69393 \pm 0.09$ ;  $H_e: 0.71201 \pm 0.15$ ). En comparación con los machos solo 4 de los 16 marcadores (CCMB126, CCMB005, CCMB045 y CCMB060) mostraban desviaciones significativas respecto del EHW ( $p < 0.01$ ), lo que evidenció una mayor diversidad genética presente en las hembras que en los machos analizados.

El microsatélite más polimórfico fue el CCMB005 y el menos polimórfico fue CCMB126 con 15 y 4 alelos respectivamente, ver Tabla 8.

**Tabla 7.** Índices de diversidad estándar para la población de búfalos de la Hacienda la Suiza nacida durante los años 2006 a 2009.

POBLACIÓN		N	Na	Ne	I	Ho	He	F
<b>AÑO 2006</b>	media	102.125	11.563	4.398	1.719	0.702	0.742	0.058
	DS	1.165	0.935	0.428	0.082	0.034	0.022	0.026
<b>AÑO 2007</b>	media	56.875	8.563	4.371	1.578	0.682	0.709	0.033
	DS	0.539	1.016	0.601	0.120	0.034	0.033	0.027
<b>AÑO 2008</b>	media	61.875	8.500	4.259	1.560	0.702	0.705	0.001
	DS	0.085	0.837	0.533	0.113	0.040	0.037	0.027
<b>AÑO 2009</b>	media	57.563	9.438	4.587	1.643	0.707	0.731	0.028
	DS	0.316	1.025	0.589	0.111	0.031	0.029	0.028
<b>Total</b>		<b>N</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>I</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>F</b>
	media	69.609	9.516	4.403	1.625	0.698	0.721	0.030
	DS	2.399	0.492	0.265	0.053	0.017	0.015	0.013

\* N: tamaño de la muestra, Na: Número de alelos, Ne: número de alelos efectivos, I: índice de información, Ho: heterocigocidad observada, He: heterocigocidad esperada, uHe: heterocigocidad esperada imparcial, F: índice de fijación.

**Tabla 8.** Índices de diversidad estándar, discriminados por hembras y machos, de la población de búfalos de la Hacienda la Suiza

Locus	NA		HO		HE		G <sup>2</sup>	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
CCMB211	9	8	0.585	0.380	0.762	0.401	0.003	0.058
CCMB001	11	10	0.913	0.844	0.879	0.860	0.146	0.296
CCMB208	9	8	0.462	0.531	0.575	0.577	0.037	0.245
CCMB168	16	6	0.887	0.520	0.850	0.605	<0.01	0.056
CCMB126	11	4	0.585	0.600	0.770	0.622	<0.01	0.009
CCMB005	16	15	0.736	0.837	0.814	0.811	0.005	0.035
CCMB045	16	9	0.925	0.980	0.894	0.856	0.652	0.020
CCMB093	8	9	0.792	0.814	0.770	0.774	0.659	0.255
CCMB238	18	12	0.875	0.897	0.909	0.880	<0.01	0.324
CCMB078	11	5	0.585	0.420	0.774	0.409	<0.01	0.221
CCMB159	6	6	0.717	0.680	0.707	0.672	0.503	0.845
CCMB060	5	6	0.608	0.729	0.629	0.740	0.275	0.054
CCMB006	14	11	0.750	0.600	0.778	0.592	0.035	0.310
CCMB207	10	8	0.849	0.860	0.844	0.821	0.126	0.744
CCMB113	10	11	0.736	0.771	0.808	0.835	0.548	0.621
CCMB077	5	5	0.717	0.700	0.671	0.700	0.128	0.244
Media	10.812	8.312	0.73249	0.69393	0.77706	0.70347		
D.S	4.277	2.983	0.13803	0.17184	0.09413	0.14986		

*Na:* Número de alelos, *Ho:* heterocigocidad observada, *He:* heterocigocidad esperada, *G<sup>2</sup>:* valor-P para el radio de probabilidad de la desviación EHW

### **3.4.2 Análisis de estructura genética de la población muestreada.**

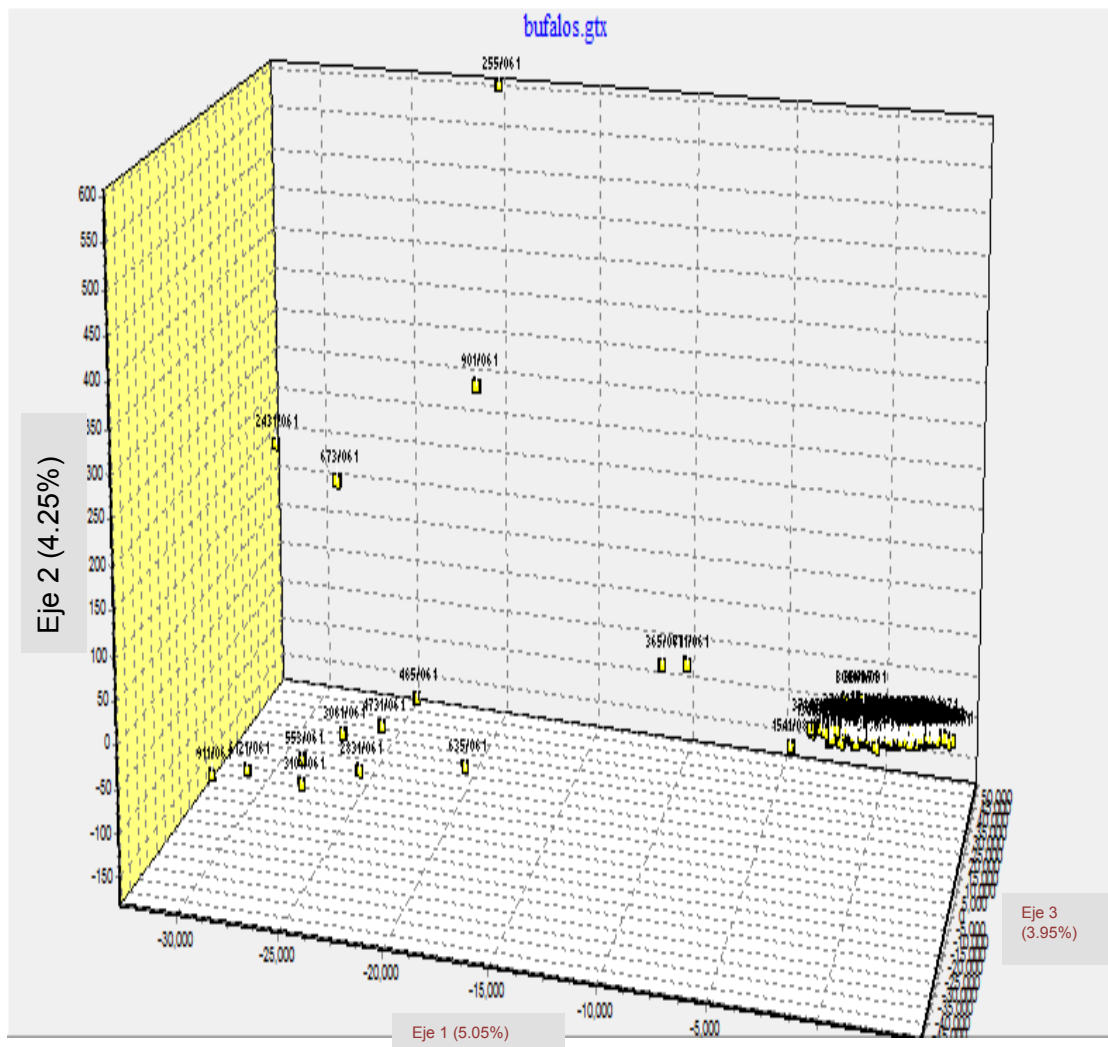
Una vez establecida la diversidad genética presente en la población, se realizó un análisis de estructura de la población a través de dos herramientas: 1) análisis multivariados que incluyeron Análisis de correspondencias múltiples (ACM) y Análisis de coordenadas principales (PCoA) y 2) análisis bayesianos de estructura genética, para realizar un estudio descriptivo y establecer si los individuos evaluados mostraban alguna tendencia a formar agrupamientos dependiendo de: los alelos presentes en cada uno de sus marcadores, la fecha de nacimiento y el sexo entre otros. Cada uno de los análisis realizados tuvo un enfoque diferente, pero mostraron cierto grado de correlación entre ellos.

#### **3.4.2.1 Análisis de correspondencias múltiples.**

En el análisis de correspondencias múltiples se realizó una matriz de similitudes de los genotipos obtenidos. En la figura se observa la representación espacial de los animales por años (2006, 2007, 2008 y 2009) empleando como variable clasificatoria los genotipos individuales para los 16 microsatélites (*Genetix* version 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004)). Se obtuvo un agrupamiento de la mayoría de los individuos alrededor de un único eje central y solo 15 individuos machos nacidos en el 2006 se ubicaron fuera del eje factorial, lo que pudo explicarse por la presencia de alelos raros y casi exclusivos para dichos individuos (alelos de muy baja frecuencia en la población). Estos genotipos fueron verificados descartando errores de genotipificación ó asignación alélica.

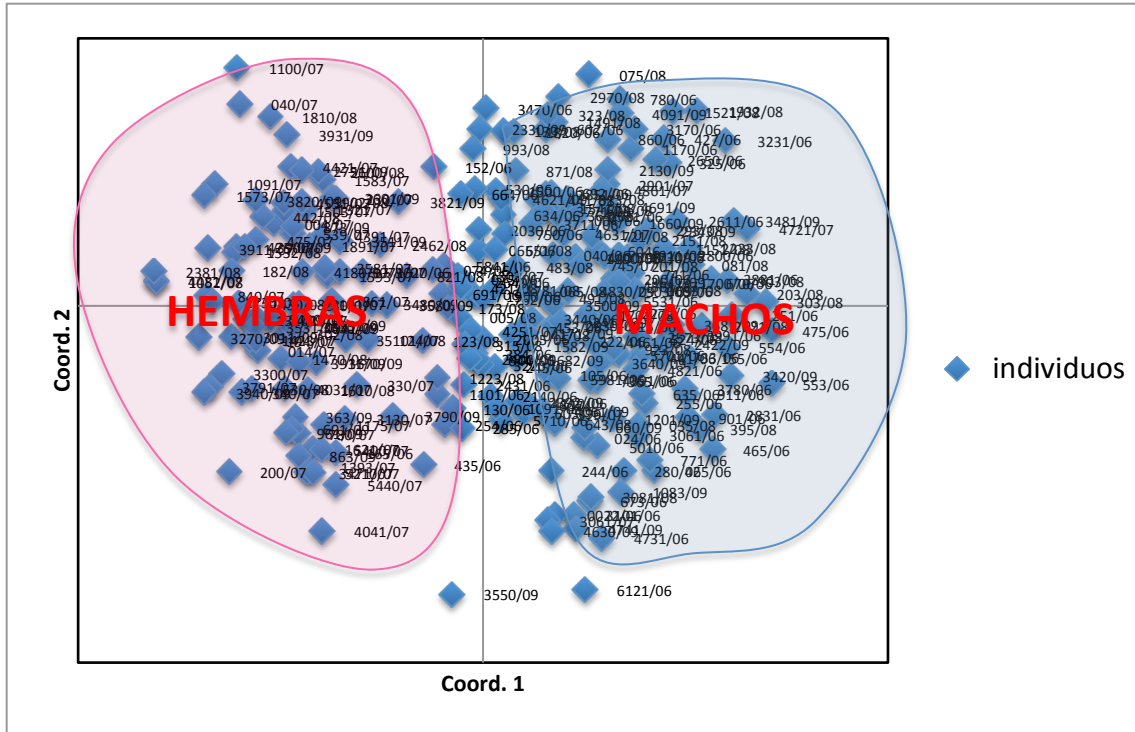
#### **3.4.2.2 Análisis de coordenadas principales.**

Otro análisis realizado, fue el análisis de coordenadas principales (PCoA) utilizando el programa *GenAlex* 6.5 (Peakall & Smouse 2006, 2012). Se realizó una matriz de disimilaridad teniendo en cuenta los alelos y los genotipos de los individuos (Figura 5). Éste análisis reveló una tendencia a la formación de dos agrupamientos; cuando se exploró más a fondo para deducir de que individuos se trataba y su sexo, se observó que en la línea media entre los dos grupos no había ninguna relación entre la fecha de nacimiento, ni el género (macho o hembra) respecto al agrupamiento, sin embargo, en cuanto se formaba el agrupamiento del eje factorial de la derecha se observaba un predominio masculino y en el eje factorial de la izquierda dominio femenino, se individualizaron cada uno de éstos individuos y se formaron dos poblaciones teóricas para calcular el valor del  $F_{st}$  el cual dio como resultado un valor de  $0.0634 \pm 0.002$  ( $p < 0.05$ ), es decir, una diferenciación entre los machos y las hembras muestreados del 6%, lo que según la escala de Wright indica moderada divergencia, esto pudo estar relacionado como ya se mencionó anteriormente, con un exceso de homocigotos más marcado en los machos que en las hembras, por lo que tendieron a agruparse y diferenciarse debido a que los machos son más parecidos entre sí (Tabla 8 y Figura 5).



**Figura 4.** Análisis de Correspondencias Múltiples (ACM) obtenido con los genotipos de individuos nacidos durante el periodo comprendido entre los años 2006 a 2009

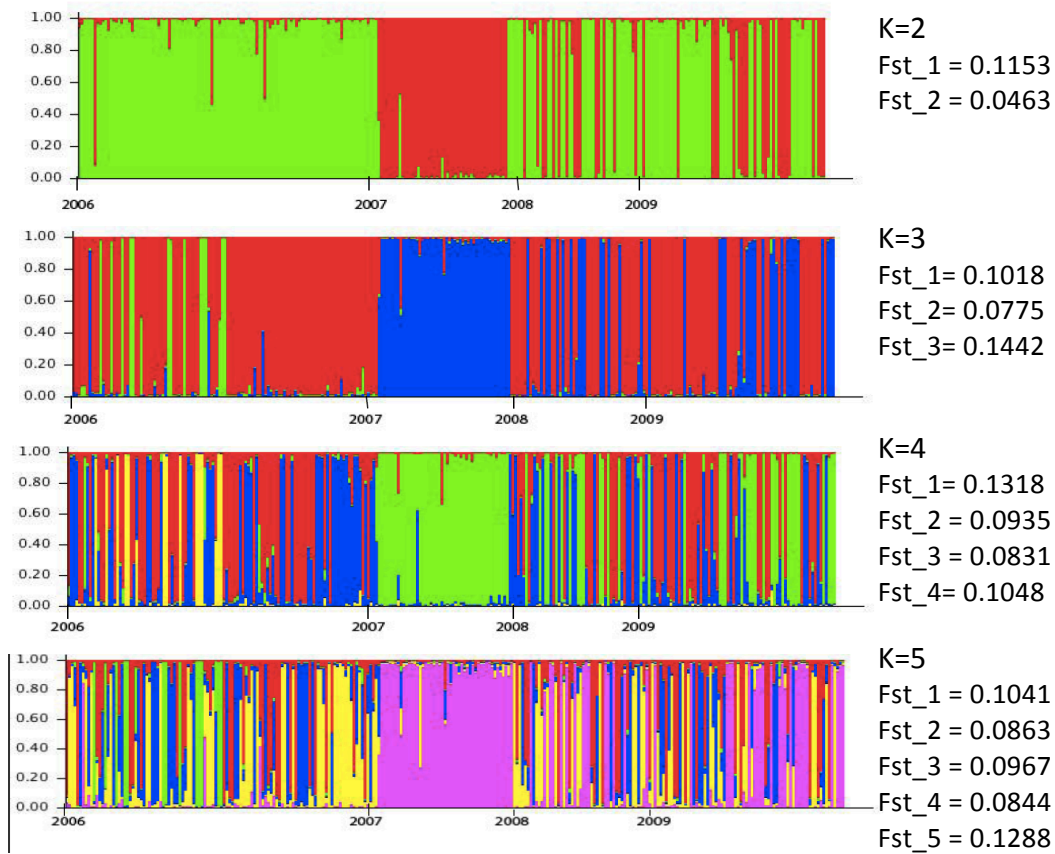




**Figura 5.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) obtenido con los genotipos de los individuos nacidos durante el periodo comprendido entre los años 2006 a 2009.

### 3.4.2.3 Análisis bayesianos de estructura genética

Los análisis realizados en el programa Structure versión 2.3 (Pritchard, Stephens & Donnelly., 2000) para los 282 individuos con genotipos completos se pueden detallar en la figura 6. Cada individuo está representado por una barra de colores divididos en K, según los clúster acervos genéticos encontrados. Estadísticamente, se identificó 5 acervos genéticos en la población evaluada (K=5), sin embargo, al comparar los resultados obtenidos desde K=2 hasta K=5, se observó una clara tendencia a la formación de dos acervos genéticos (Figura 6), la cual se mantuvo a pesar de la disgregación generada durante las simulaciones. En los individuos nacidos en el 2007 (machos y hembras) se observó un acervo genético completamente diferente al presente en la población de individuos nacidos en el 2006 y adicionalmente se observó una mezcla de éstos dos acervos en los animales nacidos en el 2008 y 2009 en K=2 (color verde y rojo). En K=3 (barras color azul, rojo y verde) se resaltó los acervos genéticos correspondientes a los 15 individuos que presentaron alelos raros y representados en color verde (Figura 6), también se observó cómo los acervos de dichos individuos no se manifiestan en los individuos nacidos en el 2008 y 2009.



**Figura 6.** Representación gráfica de los acervos genéticos encontrados en 282 individuos con genotipos completos mediante el programa STRUCTURE. Cada individuo fue representado por una barra de colores divididos en K, según los clúster encontrados.

### 3.4.3. Análisis de parentesco

Como se mencionó previamente, debido a las desviaciones encontradas en el EHW en 13 de los 16 microsatélites analizados y a los análisis de estructura y diversidad genética de la población que mostraron un fuerte déficit de heterocigotos, un núcleo poblacional muy cerrado y adicionalmente, debido a la falta de datos “*a priori*” para lograr establecer el parentesco de las muestras de ésta población, se realizó un análisis de parentesco por dos vías que utilizaron el análisis de máxima verosimilitud combinado con las probabilidades de herencia mendeliana de los alelos compartidos por los individuos.

En el análisis con el programa KINALYZER (disponible en: <http://kinalyzer.cs.uic.edu/>) (Berger et al., 2007) se encontraron 101 grupos de posibles hermanos con los 282 individuos genotipificados, solo 18 individuos (machos nacidos en el 2006 con alelos de baja frecuencia en su genotipo) no mostraron relación de parentesco con los demás individuos de la población; se debe tener en cuenta que el programa utiliza dos algoritmos para reconstruir grupos de hermanos completos (FS) para los casos en que los genotipos de los padres no están disponibles y además utiliza la optimización combinatoria basada en las reglas de herencia mendeliana, para encontrar el menor número de grupos de hermanos que contienen todos los individuos de la muestra (Anexo E)

Para asegurar las conclusiones obtenidas por ésta metodología, se confirmaron los resultados utilizando el programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.*, 2006), que implementa un algoritmo que busca la máxima probabilidad de que haya parentesco en todos los individuos de la muestra sobre la base de sus genotipos. Este programa también considera la frecuencia de los errores debidos a la pérdida

alélica (alelos nulos y/o mutaciones). Como no se tenían datos de los padres porque se seleccionaron individuos nacidos entre el 2006 y el 2009, es decir una misma generación y como se explicó previamente, se eliminaron aquellos de los que no se tenían datos *a priori* de su parentesco por línea materna.

Se pudo establecer que la frecuencia de errores fue de 5%. Para hacer la búsqueda de parentesco, se eligió el sistema de apareamiento polígamo, tanto para machos como para hembras y no se definió "*a priori*" el tamaño de los grupos de hermanos. Como las hembras de búfalo demoran entre el nacimiento y el primer parto entre 35 a 36 meses y un su periodo de gestación es de 310 días aproximadamente con gestaciones intrauterinas únicas o gemelares, se realizó la simulación bajo estos supuestos para sobreestimar la probabilidad de hermandad.

Por lo tanto, se esperaba que la violación a la hipótesis de que la población tuviese un apareamiento al azar no afectara la estimación de la hermandad. Con las asignaciones resultantes se calculó el porcentaje de individuos en la muestra que mostraron una probabilidad de relación superior al 95%, la cual según los postulados verbales de Hummel indica una relación de parentesco muy probable (Hummel & Ihm., 1975) para medios hermanos (HS), hermanos completos (FS) y/o padres e hijos (PO).

Los análisis realizados con ésta metodología revelaron proporciones similares en la cantidad de hermanos completos y medios hermanos en los 282 individuos analizados. La mayoría de los individuos de la muestra eran miembros de una pareja de medios hermanos (91.09% o 5255 parejas), mientras que un número mucho menor de individuos mostraron pertenecer a una pareja de hermanos completos (8.04% o 464 parejas) y el algoritmo solo arrojó que el 0.84%, es decir, 49 parejas de individuos mostraban una relación de padres e hijos, situación que fue revisada en cada caso sin arrojar resultados concluyentes debido a que en su mayoría estos

individuos nacieron durante el mismo año y que como se explicó previamente si se tiene en cuenta las características reproductivas de la especie, entre el nacimiento del padre y/o madre y el nacimiento de la primera cría hay un periodo mínimo de 4 años aproximadamente, situación que solo se presentó entre individuos nacidos entre el inicio del 2006 y el final del 2009, lo que redujo las parejas de padres e hijos a tan solo 5, es decir el 0.08%.

Sin embargo, la combinación de éstas dos estrategias de análisis de relaciones de parentesco, reflejó un deficiente manejo del programa de apareamiento dirigido y del control de cruzamientos a que ha sido sometido ésta población, emparentando probablemente individuos emparentados, al parecer por línea paterna. Para corroborar manualmente los resultados obtenidos por KINALYZER, se empleó uno de los grupos de hermanos (sub-set 77) del cual se tenía la información de pedigrí materno. Según la Tabla 12, se encontró que los individuos no eran hijos de una misma madre, de acuerdo a la información de la base de datos, sin embargo, se pudo establecer que los tres individuos comparten al menos un alelo en cada uno de los marcadores genéticos analizados, por lo que es posible que fueran hijos biológicos del mismo padre. Para corroborar ésta teoría sería necesario genotipificar a las madres de éstos tres individuos para poder deducir sus alelos obligados paternos (AOP) y de esta forma ver si realmente comparten sus alelos en todos los sistemas genéticos analizados y así reconstruir el perfil del presunto padre y calcular una probabilidad de paternidad con las frecuencias alélicas reportadas.

**Tabla 9.** Sub-Set77 deducido por KINALYZER mostrando los individuos que comparten al menos un alelo en cada marcador analizado.

Marcador	Individuo 1700/06		Individuo 244/06		Individuo 203/08		Posible perfil reconstruido del presunto padre
	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra	Macho	Macho	
CCBM211	145	151	145	149	149	151	151/145-149
CCBM001	223	225	221	223	219	223	223/x
CCBM208	253	253	251	253	253	253	253/x
CCBM168	102	106	102	102	102	112	102/112-106
CCBM126	134	136	134	136	134	152	136/x
CCBM005	184	184	184	184	184	184	184/x
CCBM045	232	250	232	248	232	250	250/x
CCBM043	307	309	307	309	309	313	307/309
CCBM238	86	96	86	96	86	102	86/x
CCBM078	133	133	131	133	133	135	133/x
CCBM159	163	167	163	163	163	169	163/x
CCBM060	275	277	275	275	275	277	275/277
CCBM006	120	120	120	130	120	120	120/x
CCBM207	158	158	158	158	158	162	158/162
CCBM113	199	209	207	209	209	209	209/x
CCBM077	242	242	242	246	242	246	242/x
	Madre 1357/95		Madre 244/99		2007(1994)		

#### **3.4.4. Probabilidad de exclusión y probabilidad de identidad obtenidas con los 16 marcadores utilizados.**

Se calculó la probabilidad exclusión “*a priori*” con los 16 marcadores estandarizados para probar tres hipótesis comunes en pruebas de filiación biológica y buscando la combinación mínima de marcadores para alcanzar una probabilidad superior o igual a 99.99%. Los análisis fueron realizados utilizando el programa GENALEX versión 6.5. (Peakall & Smouse 2006, 2012). El primer análisis (P1) se llevó a cabo simulando uno de los padres erróneamente identificado, el segundo (P2) cuando el genotipo de uno de los padres no estaba disponible y el tercero (P3) cuando ambos padres estaban erróneamente identificados.

Como se puede observar en la Figura 7 para la primera hipótesis (P1), se necesita una combinación de más de 6 marcadores de los validados en ésta investigación para alcanzar una probabilidad de exclusión “*a priori*” de 99.99%. En la Figura 8 se observa la simulación para la segunda hipótesis (P2) donde para poder alcanzar un valor de probabilidad de exclusión de paternidad de 99.99% se necesita una combinación de más de 8 de los *loci* utilizados y validados en ésta investigación. Finalmente, en la figura 9 se observa que teniendo la hipótesis tres (P3) se necesitan más de 3 microsatélites de los seleccionados para lograr valores iguales o superiores de probabilidad de exclusión de 99.99%

El segundo análisis pretendió mostrar la probabilidad de coincidencia genética entre individuos, para su aplicación en genética forense y con éste resultado, conocer cuántos marcadores de los seleccionados se requerían para obtener un individuo con huella o perfil genético único. Se realizaron comparaciones basadas en

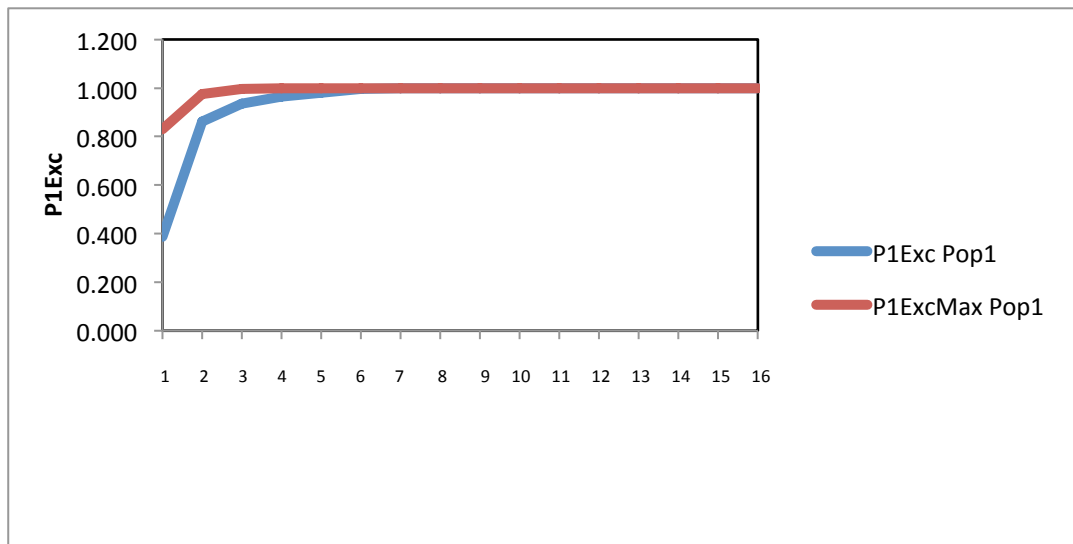


---

probabilidades para evaluar si un individuo al azar de la población coincidía con otro, en cuantos *loci* coincidía y si con dichos marcadores era posible individualizar los animales de la muestra a pesar de las relaciones de filiación obtenidas. Como se muestra en la Tabla 13, con una combinación de más de 7 marcadores los 282 individuos analizados mostraron tener genotipos únicos, sin embargo, al utilizar más de 15 marcadores no se encontraron coincidencias en ningún *loci*. Es importante resaltar que se evidenciaron 13 individuos con genotipo único en un solo marcador, lo que pudo estar relacionado con los individuos machos que mostraron alelos raros o de baja frecuencia en la población, confirmado que éstos animales tenían alelos prácticamente y por eso se alejaron de la población.

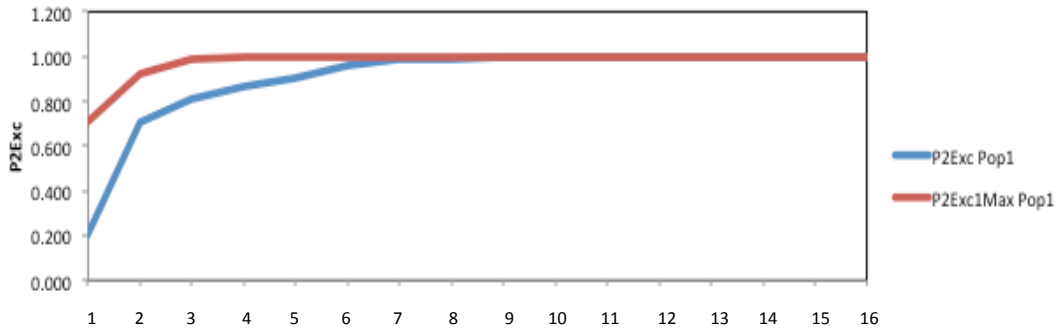
**Tabla 10.** Número de individuos con coincidencias genéticas y combinaciones mínimas de marcadores para obtener un genotipo único dentro de la población.

Número de <i>loci</i>	Con genotipo coincidente	Con genotipo único	Coincidencia en 1 locus	Coincidencia en 2 locus	Coincidencia en 3 locus
1	269	13	0	0	0
1+2	225	57	282	0	0
1+2+3	155	127	282	281	0
1+2+3+4	49	233	206	282	281
1+2+3+4+5	20	262	134	248	282
1+2+3+4+5+6	0	282	39	172	266
1+2+3+4+5+6+7	0	282	11	74	195
1+2+3+4+5+6+7+8	0	282	6	41	131
1+2+3+4+5+6+7+8+9	0	282	4	20	86
1+2+3+4+5+6+7+8+9+10	0	282	2	11	46
1+2+3+4+5+6+7+8+9+10+11	0	282	0	2	15
1+2+3+4+5+6+7+8+9+10+11+12	0	282	0	2	8
1+2+3+4+5+6+7+8+9+10+11+12+13	0	282	0	2	4
1+2+3+4+5+6+7+8+9+10+11+12+13+14	0	282	0	2	2
1+2+3+4+5+6+7+8+9+10+11+12+13+14+15	0	282	0	0	3
1+2+3+4+5+6+7+8+9+10+11+12+13+14+15+16	0	282	0	0	0



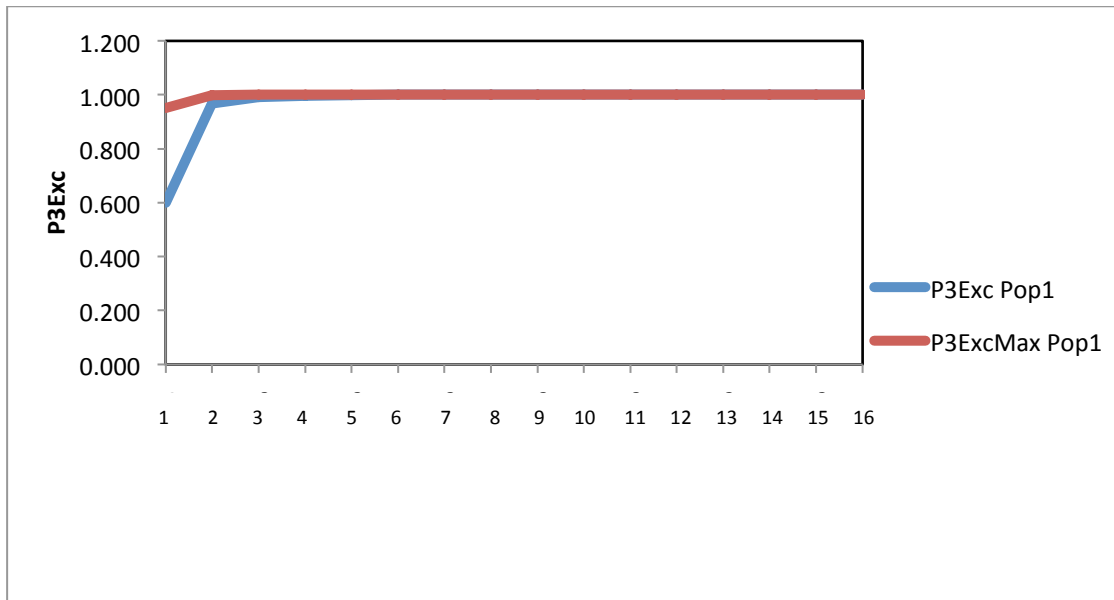
**Figura 7.** Variaciones en los valores de probabilidad de exclusión calculada de acuerdo a la combinación de un número variable de loci evaluados en los casos donde uno de los padres se identifica erróneamente.

\*En el eje Y se pueden encontrar los valores de probabilidad de exclusión a priori y en el eje X se pueden encontrar la cantidad de marcadores del panel de marcadores combinados (desde 1 hasta 16)



**Figura 8.** Variación en los valores de probabilidad de exclusión calculada de acuerdo a la combinación de un número variable de loci evaluados en los casos donde el genotipo de uno de los padres no está disponible

\*En el eje Y se pueden encontrar los valores de probabilidad de exclusión a priori y en el eje X se pueden encontrar la cantidad de marcadores del panel de marcadores combinados (desde 1 hasta 16)



**Figura 9.** Variación en los valores de probabilidad de exclusión calculada de acuerdo a la combinación de un número variable de loci evaluados en los casos donde ambos padres están erróneamente identificados

\*En el eje Y se pueden encontrar los valores de probabilidad de exclusión a priori y en el eje X se pueden encontrar la cantidad de marcadores del panel de marcadores combinados (desde 1 hasta 16)

## 4 DISCUSIÓN

Se evidencia la importancia de utilizar un panel de microsatélites propio de la especie *Bubalus bubalis* para realizar estudios poblacionales sobre una especie que cada día toma más importancia en nuestro país, debido, al poder de adaptación que poseen los búfalos a ambientes extremos como los del trópico y también a las características de sus productos derivados (leche, cuero y carne) que han mostrado ser una buena alternativa para consumidores y productores que encuentran en el búfalo una respuesta a sus necesidades de productos de calidad. En relación a lo dicho anteriormente, cobra importancia primero para validar la herramienta y adicional a esto establecer el grado de diversidad y saber si existe o no algún nivel de estructura genética en la población de nuestro país e incluso mundial de búfalo de agua doméstico, determinar si existe o no flujo genético entre las poblaciones, establecer si existen niveles de endogamia reales y a partir de ésta información generar alertas u orientar de alguna manera los programas de cruzamiento que contribuyan a mejorar los parámetros productivos, sin los problemas metodológicos que puede tener el uso de marcadores de otra especie como los que ya se mencionaron (Nagarajan *et al.*, 2009, Chakraborty *et al.*, 1992).

Cuando se compara el presente estudio, con otros estudios realizados en Colombia y en el mundo, cabe resaltar que, es primero hasta donde se conoce en utilizar algunos de los microsatélites desarrollados por Nagarajan *et al.*, 2009 y que hasta la fecha es el único estudio de nuestro país que ha estandarizado y validado 16 marcadores microsatélite para hacer los análisis de diversidad genética y parentesco en una de las poblaciones más representativas de la especie bubalina utilizando una sola reacción de PCR multiplex en Colombia, lo que a futuro puede hacer de ésta una herramienta molecular económica y fácil de utilizar para ayudar a resolver los problemas de genealogías y acercar a los productores y asociaciones a utilizar ésta herramienta como un sistema biométrico de control de parentesco y problemas de sanidad que se puedan presentar.

En la conferencia de Edimburgo (Escocia) del 2010, la *international Society for animal genetics (ISAG)* en cabeza de la doctora Daniela Lamartino de Italia se sugirió utilizar un panel de 10 marcadores que mostraron un buen nivel de polimorfismo y no evidenciaron presencia de alelos nulos y que provenían de microsateles dinucleótidos bovinos y caprinos (BM1706, BCM1013, CSSM019, CSSM038, CSSM042, CYP21, INRA006, INRA026, MAF65 y RM4), una año después, La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura “FAO” por sus siglas en inglés, sugirió 30 microsateles para realizar estudios de diversidad y filiación en búfalos, sin embargo, éstos organismos internacionales no sugieren un panel de acuerdo a una PCR multiplex (rangos alélicos, especificidad, fluoromarcaje, condiciones de termociclaje, amplificación. entre otras), no establecen límites de detección de la prueba y como se evidencia en el documento de la FAO no se han mapeado en el genoma bubalino. Ahora bien, la mayoría de laboratorios que realizan pruebas de identificación genética en animales a través de marcadores moleculares utilizan algunos de éstos microsateles para genotipificar Bufalos y a través de los ejercicios comparativos llegan a estandarizar el nombramiento alélico, sin embargo, al no tener una validación y estandarización de la prueba, las diferencias en los resultados son enormes (exclusiones aisladas en uno o dos marcadores) y se encuentran errores de asignación alélica.

El panel planteado en ésta investigación, como ya se mostró puede ser utilizado como como una herramienta adicional a los marcadores moleculares ya existentes, debido a que se ha realizado una estandarización y validación de unas condiciones de la prueba (multiplex), también porque se demostró que no tiene amplificación cruzada al menos en las especies probadas en ésta investigación (Ver anexo 1), lo cual a nivel forense evita problemas de contaminación cuando se procesan muestras de diversas especies en un mismo espacio.

El utilizar paneles de marcadores moleculares, específicamente microsateles estandarizados y validados para bubalinos, puede ayudar a resolver los problemas actuales que se evidencian en los ejercicios de comparación de la ISAG (ISAG, 2010) y se pueden empezar a identificar otros problemas que se generan al realizar pruebas de filiación, que pueden interferir en los resultados, tales como los que ya se han mencionado: presencia de alelos nulos, errores de tallaje por adición de los primers a un

ADN no plantilla o molde (longitud similar del amplificado, pero diferente secuencia del alelo), presencia de microvariantes ó alelos raros, cambio en las tasas de mutación del marcador y exceso de productos “stutter”, entre otros (Hauge & Litt, 1993, Walsh et al., 1996, Bacher & Schumm, 1998, Magnuson *et al.*, 1996, Kimpton *et al.*, 1993, Brownstein *et al.*, 1996, Gill *et al.*, 1996, Butler *et al.*, 2004, Crouse *et al.*, 1999, Kline *et al.*, 1998).

Otro punto en el que el panel propuesto puede generar gran impacto para la población estudiada, fue como se demostró ser una herramienta importante para resolver los pedrigrees paternos hasta donde sea posible, cuando a futuro se genotipifiquen las madres de los individuos de los que se tienen muestras en el banco genético, se deduzca el Alelo Obligado Paterno (AOP) y se pueda realizar la reconstrucción de un posible perfil paterno y generar un valor de probabilidad de paternidad, calculando una razón de verosimilitud, que en cálculos de paternidad se conoce como Índice de Paternidad (IP) así:  $IP=X/Y$ , donde X=Probabilidad de los hallazgos genéticos, bajo la hipótesis de que el presunto padre sea el padre biológico y Y=Probabilidad de los hallazgos genéticos, bajo la hipótesis de que el presunto padre no sea el padre biológico. El IP es igualmente expresado en forma de porcentaje de probabilidad de paternidad (W) así:  $W=X/(X+Y)$ , considerando un valor de creencia a priori de la paternidad de 0.5, lo que significa que antes de realizada la prueba el presunto padre tenía la misma probabilidad de ser el padre como de no serlo (Luque, 1999, Brenner, 1999) (<http://www.dna-view.com/Forensic Mathematics>).

En estudios poblacionales a gran escala como el que pretende realizar el FBC en asociación con el Instituto de Genética del Eje Cafetero a nivel nacional, el uso del multiplex de marcadores propuesto en éste trabajo puede arrojar resultados interesantes sobre la población del búfalo doméstico presente en nuestro país, corrigiendo algunas fallas que se evidenciaron en el muestreo.

Debido a las dificultades propias de la recolección de muestra en campo de éstos animales, las muestras en FTA fueron mal goteadas y se presentó un exceso de muestra, según las indicaciones del fabricante se deben colocar en la tarjeta entre 125 y 500  $\mu$ l como máximo y en éste caso se excedió esta cantidad, trayendo como consecuencia de esto, exceso de hemoglobina en las muestras e inhibición de la PCR, se ha descrito previamente que el grupo hemo y sus derivados son inhibidores potentes de la reacción en cadena de la polimerasa (Akane, 1994) (Figura 1).



En cuanto al análisis de la variabilidad genética de la población estudiada, lo primero que cabe resaltar es el marcado exceso de homocigotos presentes en general en toda la muestra (machos y hembras) lo que como ya se mencionó, demuestra que el lote de hembras en general se mantiene generacionalmente debido a que las hembras son necesarias para procrear y producir leche (debido a que son animales doble propósito, es decir, son utilizados para producir leche y carne) y por tanto tienen un aporte genético mayor en la población total, lo que es un efecto totalmente contrario a lo que sucede con los machos, donde la presión de selección es mucho más fuerte debido a los programas de mejoramiento que se hacen de acuerdo a los parámetros de interés del productor, venta de machos para ceba y consumo, es decir sale el material genético de la población, introgresión de material genético importado desde Brasil, Rumania e Italia, entre otros.

Como ya se mencionó, el marcado exceso de homocigotos en la muestra analizada es la causa de la presencia de desviaciones del EHW en 13 de los 16 microsatélites utilizados y como se pudo observar, cuando se realiza el análisis por separado el número de loci en desviaciones del EHW en hembras es mucho menor que el encontrado en machos, no se puede atribuir éste problema a la herramienta (por ejemplo un problema de ligamiento genético), debido a que se encuentra en casi todos los marcadores y no en unos pocos.

Los microsatélites más polimorficos fueron el CCMB238 y CCMB005 los cuales mostraron 20 y 18 alelos respectivamente. Estos resultados diferían de lo reportado por Nagarajan et al., 2009, pues en éstos mismos marcadores en la población analizada por éste grupo para el locus CCMB238 solo se encontraron 10 alelos. Éstas diferencias pueden ser causadas debido a que en la investigación realizada en la India se analizaron razas puras y para las muestras del presente estudio se contaba con una población con una gran mezcla genética fundadora, es decir, el Buffalypso.

Por otro lado, los resultados generales de los análisis de diversidad genética de la población sugieren que las muestras analizadas y utilizadas para éste estudio poblacional no están diferenciadas entre sí por años ( $F_{st}=0.020 \pm 0.004$ ) y según sin embargo, también se evidencia un fuerte déficit global de heterocigotos en los individuos nacidos en el 2006 y en el 2007, lo que también influye cuando se realiza el

cálculo de índice de fijación (F) se véa una tendencia más marcada hacia la endogamia en los individuos nacidos en éstos años y se observa como para los años 2008 y 2009, tal vez, se toman acciones correctivas en éste punto en el programa de mejoramiento y reproducción de la Bufalera “La Suiza” y se disminuye el valor de F y también el deficit de heterocigotos. Para verificar que los valores de heterocigocidad encontrados en el sistema CCBM208 que mostraban un exceso de homocigotos en éste sistema genético (Ho: 0.558; He: 0.704), las genotipificaciones de los individuos fueron confirmadas para ver si era un efecto del tallaje y se descartó un problema en el marcador como alelos nulos o error de la asignación alélica (Tabla 9).

Como se observa en la Tabla 9 , Para el total de la población, se encontraron valores de FIT y FIS de  $0.050 \pm 0.021$  y  $0.032 \pm 0.018$ , respectivamente. Estos valores reflejan el apareamiento dirigido entre individuos emparentados en éste ható, esto puede ser consecuencia de la falta registros de paternidad y control de cruzamientos, lo cual concuerda con los valores de Fis y Fit encontrados en ésta población. ,Esto puede ser consecuencia como ya se dijo del sistema de reproducción que maneja el FBC alrededor de 5000 vientres en un sistema denominado “la ruleta” y se caracteriza por escoger a los machos reproductores de acuerdo a sistema de clasificación por los registros de producción que ha tenido su madre en cuanto a volumen de leche (fundadoras, elite, superior y en servicio ), es importante recalcar que no se realizan registros de paternidad ni control de montas, ni de cruzamientos, lo cual genera alertas debido a que se lleva a cabo un programa de cruces sin saber el origen de las familias, ni el grado de parentesco entre los individuos.

En cuanto a las diferencias encontradas en los análisis realizados para machos y para hembras, llama la atención el marcado exceso de homocigotos presentados en los machos a pesar de tener un muestreo mayor y como efecto las desviaciones respecto al EHW en ocho de los dieciseis marcadores utilizados, esto puede explicarse dado que en los animales domésticos generalmente se mantiene el lote de hembras constante y lo que se varía para realizar la selección o mejoramiento de las características de interés productivo son los machos.

No es posible extrapolar, los resultados de ésta investigación al comportamiento de la población total del país, pues como se explicó en el capítulo de la metodología, el muestreo se sesgó solo a un lote de animales considerados importantes por sus

características reproductivas y productivas (principalmente de leche) y por tanto las frecuencias alélicas para los marcadores utilizados en éste trabajo solo podrán utilizarse en los animales de la Hacienda la Suiza, sin embargo, debido a que es el primer estudio que utiliza éste panel de microsatélites y que utiliza individuos de la raza Buffalypso en nuestro país, puede utilizarse como una aproximación inicial para realizar calculos de probabilidad en pruebas de parentesco.

Los resultados en cuanto a la diversidad estandar de toda la población, también quediferían respecto a los estudios realizados en Colombia, como ya se mencionó en el realizado con 6 marcadores (Martinez et al.,2009) donde se caracterizó genéticamente la raza Murrah mediante el análisis de marcadores moleculares del tipo microsatélite de bovinos. Evidenciaron que 4 marcadores (BM1824, Inra37, SPS115 y BM2113) fueron polimórficos y 2 marcadores (ETH10 y ETH225) fueron monomórficos. El mayor número de alelos fue 11 para el marcador Inra37 y el menor número de alelos fue 7 para el marcador BM2113. Nos llama la atención que a pesar de utilizar diferentes tipos de muestreo (dos hatos) y diferentes poblaciones y razas, ninguno de los marcadores polimórficos utilizados en esa investigación se encontraban desviaciones respecto al equilibrio Hardy-Weinberg (100% de los loci polimórficos en desviacion respecto al EHW), lo que se correlacionaba con los encontrado en nuestro análisis, es decir, en términos de porcentaje el 81.25 % de marcadores desviados de EHW (13 marcadores de los 16 seleccionados). Esto puede indicar, que el comportamiento de las poblaciones de búfalos presentes en nuestro país debido a que proviene de un pequeño lote de sus parientes asiáticos que son mucho más diversos debido a que son la población origen de ésta especie (lo que en genética de poblaciones se conoce como efecto fundador), también porque además de esto no se tiene la buena práctica agropecuaria del manejo de base de datos, por tanto, en la mayoría de ganaderías donde se lleva a cabo cría de búfalos no se tiene control de cruzamientos, ni registros de pedigrí.

En la segunda investigación hecha con microsatélites en nuestro país y con la cual podemos comparar nuestros resultados, es el estudio realizado por Angel-Marin et al., (2010), quienes utilizando 10 marcadores también de bovinos (*Bos taurus*) muestrearon 588 individuos de 12 hatos bufalinos de 5 razas ó grupos genéticos (Murrah brasileiro, Murrah búlgaro, búfalo colombiano, Mestizos (cruce de los tres anteriores) y el

denominado Murrah por absorción) y se encontró que tres marcadores de los utilizados Inra37, SPS115 y BM2113 tenían un buen número de alelos observados entre 7 y 16, sin embargo, llamaba la atención que el número de alelos efectivos mostraba una reducción significativa entre 1.9 y 5.7 y que particularmente, para el microsatélite Inra37 a pesar de tener 16 alelos solo 6 alelos reportaban una frecuencia poblacional es decir alelos efectivos ( $N_e = 5.1$ ,  $PIC = 0.78$ ). Dos de los diez marcadores utilizados mostraron tener un comportamiento monomorfo (ETH225 y MGTG7) y los demás no eran polimórficamente informativos (número de alelos observados menor de 5). Es importante resaltar que a pesar de la gran cantidad de muestras analizadas (588 muestras de 12 hatos del país) seis (6) de los 10 marcadores mostraban desviaciones significativas de EHW (CSSM36, BM1824, INRA37, BM1258 y TGLA227) lo que equivale a un 75% de los loci usados en desequilibrio EHW lo que concordaba con nuestro hallazgo 81.25 % de los loci desviados de EHW, lo que nos indicaba que también con otra estrategia de muestreo y en otras razas bubalinas presentes en el país se tenía el mismo comportamiento, lo que nos confirmaba que esas desviaciones no eran generadas por la herramienta (microsatélites) si no por el comportamiento de la población, sin embargo, no eran muy claros en cuales fueron los criterios de selección de las muestras, que rango de edad tenían los animales, ni que proporción de machos y hembras había en el estudio. En las dos investigaciones mencionadas anteriormente el análisis fue realizado utilizando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida 6% y tinción con nitrato de plata, la cual, es una técnica de detección que requiere gran habilidad del personal que realiza los análisis por los artefactos y errores de genotipificación que pueden generarse cuando se utilizan microsatélites dinucleótidos (picos stutter, picos A+ y A-, pérdida alélica, alelos nulos, microvariantes) (Butler, 2005).

# 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 5.1 Conclusiones

Al evaluar genéticamente la población de reproductores y de hembras lecheras clasificadas como élite, superior y fundadoras de la Hacienda la Suiza de la especie búfalo doméstico de río (*Bubalus bubalis sub. Rio*) de la raza “Buffalypso” muestreada por el FBC nacidos entre el año 2006 y el 2009 mediante el empleo de marcadores moleculares nucleares tipo microsatélite específicos para la especie se pudo determinar que son una población cerrada y al parecer muchos se encuentran emparentados, también, se observaron diferencias importantes al generadas por el género de los animales (machos ó hembras) debido a la presión de selección del sistema de mejoramiento utilizado más evidente en machos que en hembras, esto también puede estar causado entre otras por el sistema de apareamiento de los búfalos; a pesar que se tiene un (1) reproductor por cada treinta (30) hembras, sólo se aparee el macho alfa y esto explica en parte la falta de control del parentesco paterno. Se pudo observar también que las hembras fueron menos homogéneas y tuvieron un menor número de marcadores con desviaciones de EHW.

La estandarización y validación de la PCR multiplex utilizando un panel de 16 microsatélites dinucleótidos específicos para la especie *Bubalus bubalis* será de gran utilidad para realizar la caracterización de toda la población bubalina del país y será de gran utilidad para prestar servicios de genotipificación y pruebas de filiación en Búfalos, también será una herramienta muy útil en la reconstrucción de genealogías, evaluación de grupos familiares, resolución de conflictos judiciales como abigeatos, entre otras aplicaciones.

También se muestra a la metodología de extracción con GITC como una excelente alternativa por su economía, rapidez y eliminación completa de Grupo-Hemo, para

trabajar con muestras de humanos, animales domésticos ó silvestres donde la metodología de Whatman ® no pueda ser utilizada debido a la presencia de un exceso de muestra y de ésta manera evitar utilizar protocolos más peligrosos como el Fenol-Cloroformo- Alcohol isoamílico.

Se pudo determinar que todos los marcadores utilizados en éste trabajo resultan ser informativos para la aplicación en estudios genéticos de filiación en las poblaciones estudiadas como se dijo anteriormente, los resultados obtenidos en ésta investigación son apropiados para el lote reproductor del FBC, pero podría ser la base para ser usado como una referencia en la raza "Buffalypso" en Colombia debido a que hasta el momento no hay otra referencia.

## 5.2 Recomendaciones

A futuro se recomienda realizar un ajuste en el nombramiento ó tallaje alélico para evitar confusiones sobretodo en pruebas de filiación y es importante recalcar que es necesario ajustar las condiciones de estandarización propuestas aquí a las características intrínsecas del laboratorio que vaya a realizar pruebas a partir del panel de microsatélites propuesto, porque éstas pueden variar por los equipos usados, variaciones ambientales, y técnica de electroforesis (diferentes analizadores genéticos, geles en poliacrilamida al 6%, polímero, etc.)

Se invita a los directivos, personal de la junta y técnicos del Fondo Bufalero del Centro a tomar conciencia y a hacer extensiva la invitación a los productores de la importancia de llevar registros del pedigrí (materno y en lo posible paterno) de los animales para evitar que las poblaciones que tengan ciertos parámetros productivos interesantes puedan entrar en un problema de endogamia y así mantener la eficiencia biológica de la especie en términos de diversidad genética.

También se recomienda al Fondo Bufalero del Centro y en general a todas las asociaciones de ganado y productores, mejorar el sistema de control de montas (puede

---

ser un sistema biométrico utilizando microchips) y se invita a llevar el registro de cruzamientos y pedigrís (manejo adecuado de bases de datos) y adicional a esto en lo posible tener una muestra de los reproductores en bancos genéticos para resolver más fácilmente futuros inconvenientes (filiación).

Más adelante se puede proponer una metodología de trabajo que incluya realizar análisis de ADN mitocondrial para establecer linajes y así utilizar ésta herramienta como apoyo al establecimiento de los pedigrís de la “Bufalera La Suiza”

Finalmente, analizar si los individuos que tenían alelos raros ó con baja frecuencia pueden llegar a contribuir a mejorar la variabilidad genética de los machos dependiendo de las características productivas que puedan aportar a la población debido a que el manejo reproductivo que se le ha dado a la población muestra un exceso de homocigotos muy marcado en machos y un nivel de parentesco muy grande para ser una muestra seleccionada al azar.

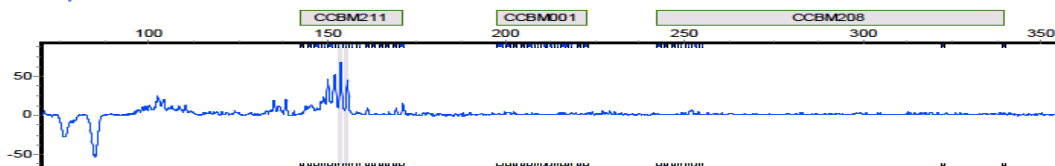
# A. Anexo: Electroferogramas empleados para la validación de la amplificación de ADN de otras especies en loci específicos para *Bubalus bubalis*

A1-1. Electroferograma mostrando los alelos obtenidos después de una amplificación con ADN de la especie *Bos taurus* en 16 loci de *Bubalus bubalis* (Control positivo de ADN *Bos taurus* del kit Stockmarks for cattle genotyping® de Life technologies™ - 20 ng/μL.)

SoftGenetics Allele Report 11/24/2013 11:07:19 PM  
GeneMarker V2.4.1 Page 1

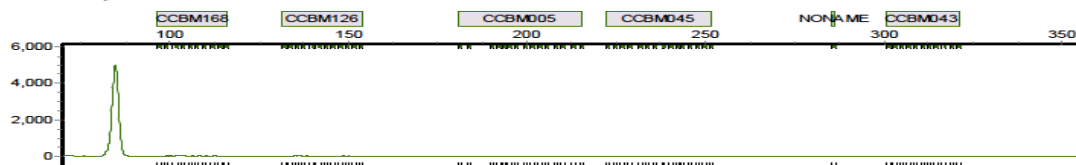
Sample 1: Run date and time: 08/19/2012 - 13:04:22 -> 08/19/2012 - 13:37:07

Dye: Blue - 2 peaks - CONTROL BOVINOSTOCKMARKS-B01.hid



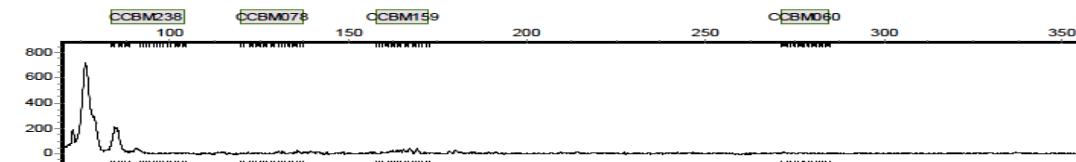
No	Size	Height	Area	Marker	Allele	Difference	Quality	Score	Sample Comments
1	153.8	68	501	CCBM211	153	1.0	Pass	1.3	
2	155.8	45	293	CCBM211	155	1.0	Pass	0.6	

Dye: Green - 1 peaks - CONTROL BOVINOSTOCKMARKS-B01.hid

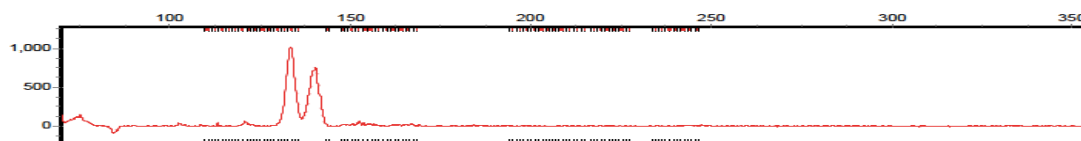


No	Size	Height	Area	Marker	Allele	Difference	Quality	Score	Sample Comments
1	84.8	5002	100350		OL	1.0	Undetermined	97.5	

Dye: Yellow - 2 peaks - CONTROL BOVINOSTOCKMARKS-B01.hid



No	Size	Height	Area	Marker	Allele	Difference	Quality	Score	Sample Comments
1	76.5	714	15014		OL	1.0	Undetermined	3.7	
2	366.6	1851	14727		OL	1.0	Undetermined	224.6	



No	Size	Height	Area	Marker	Allele	Difference	Quality	Score	Sample Comments
1	133.7	1018	26561	CCBM006	134	0.1	Check	2.5	
2	140.2	750	21756		OL	1.0	Undetermined	1.5	
3	367.3	1316	11328		OL	1.0	Undetermined	116.2	



**A 2-1. Electroferograma mostrando los alelos obtenidos después de una amplificación control positivo que trae el kit Stockmarks for cattle genotyping® de Life technologies TM - ADN de la especie Bos taurus 20 ng/μL,**

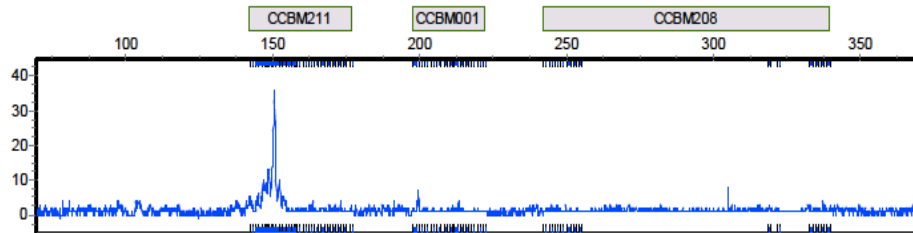
SoftGenetics  
GeneMarker V2.4.1

**Allele Report**

12/14/2013 7:50:50 PM  
Page 1

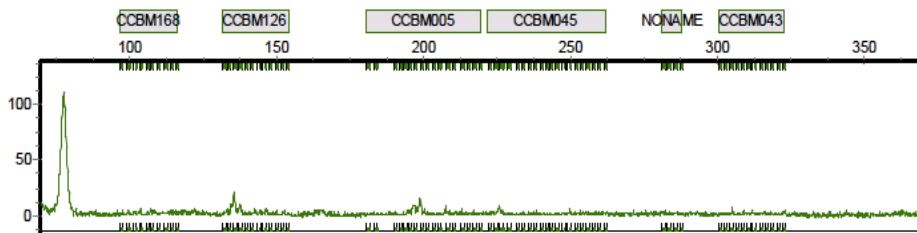
Sample 1: Run date and time: 10/14/2013 - 13:31:42 -> 10/14/2013 - 14:20:02

Dye: Blue - 0 peaks - CONTROL 007-HUMANO\_D01.fsa



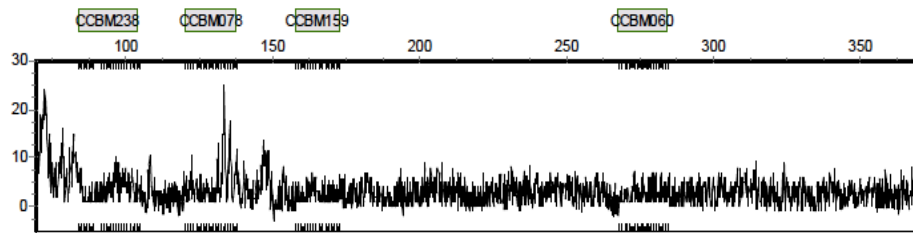
No	Size	Height	Area	Marker	Allele	Difference	Quality	Score	Allele Comments	Sample Comments
----	------	--------	------	--------	--------	------------	---------	-------	-----------------	-----------------

Dye: Green - 0 peaks - BK-FTA\_D01.fsa



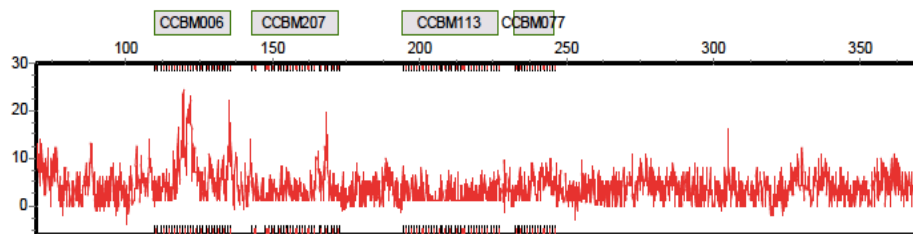
No	Size	Height	Area	Marker	Allele	Difference	Quality	Score	Allele Comments	Sample Comments
----	------	--------	------	--------	--------	------------	---------	-------	-----------------	-----------------

Dye: Yellow - 0 peaks - CONTROL 007-HUMANO\_D01.fsa



No	Size	Height	Area	Marker	Allele	Difference	Quality	Score	Allele Comments	Sample Comments
----	------	--------	------	--------	--------	------------	---------	-------	-----------------	-----------------

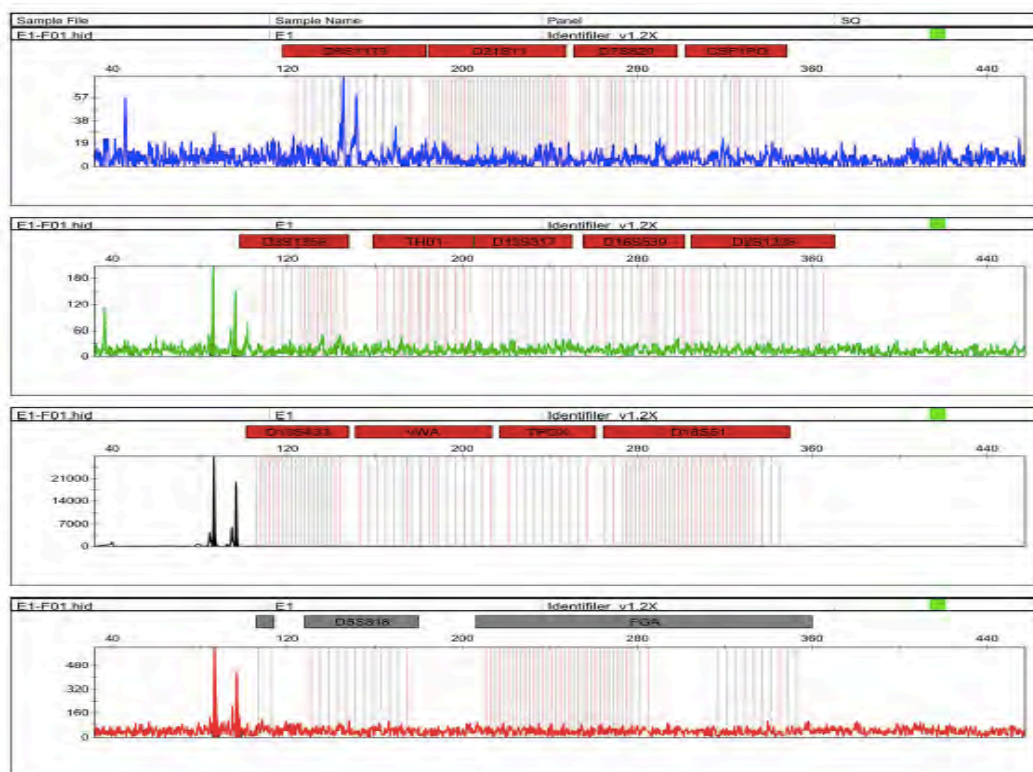
Dye: Red - 0 peaks - CONTROL 007-HUMANO\_D01.fsa



No	Size	Height	Area	Marker	Allele	Difference	Quality	Score	Allele Comments	Sample Comments
----	------	--------	------	--------	--------	------------	---------	-------	-----------------	-----------------

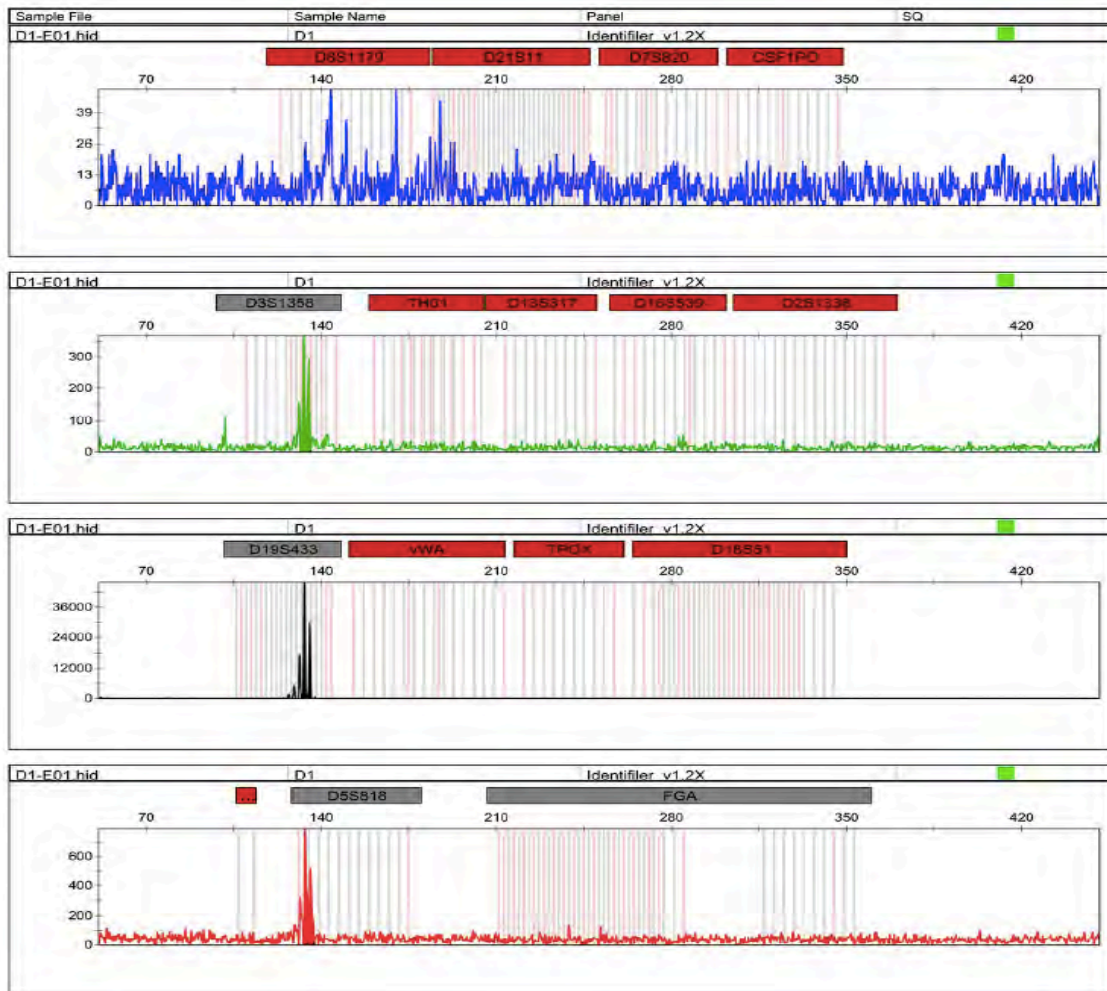
## B. Anexo: Electroferogramas resultados individuales de la validación de las reacciones monoplex y multiplex

### B1. CCMB238- NED



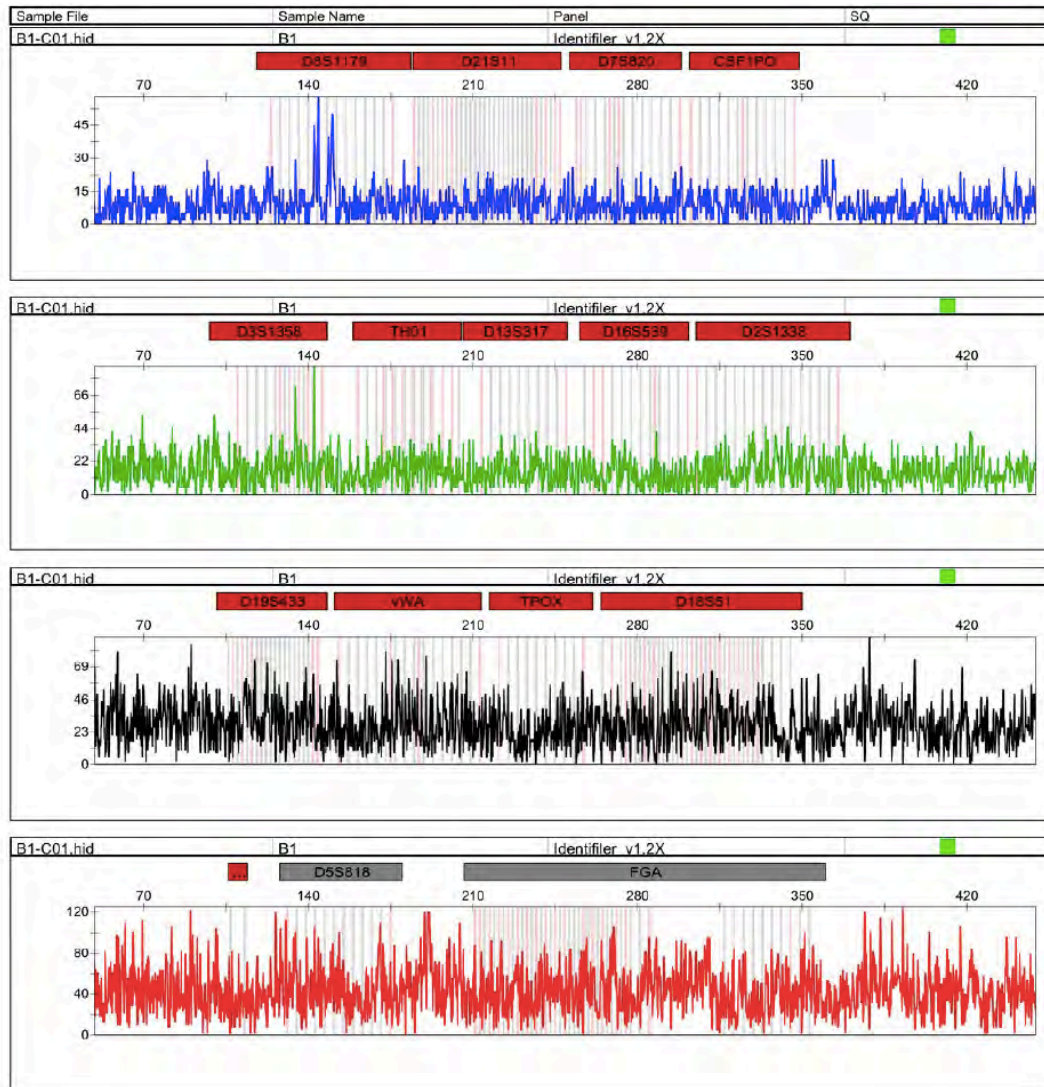
1	<span style="color: green;">■</span>	G,1	E1-F01.hid	86.03	208	1652	2998
2	<span style="color: green;">■</span>	G,2	E1-F01.hid	96.09	153	1097	3102
3	<span style="color: yellow;">■</span>	Y,4	E1-F01.hid	86.32	27790	200069	3001
4	<span style="color: yellow;">■</span>	Y,8	E1-F01.hid	96.38	20052	137415	3105
5	<span style="color: red;">■</span>	R,2	E1-F01.hid	86.6	605	5820	3004
6	<span style="color: red;">■</span>	R,5	E1-F01.hid	96.68	438	4183	3108

**B2. CCMB078-NED**



1	<span style="color: green;">■</span>	G,1	E1-F01.hid	86.03	208	1652	2998
2	<span style="color: green;">■</span>	G,2	E1-F01.hid	96.09	153	1097	3102
3	<span style="color: yellow;">■</span>	Y,4	E1-F01.hid	86.32	27790	200069	3001
4	<span style="color: yellow;">■</span>	Y,8	E1-F01.hid	96.38	20052	137415	3105
5	<span style="color: red;">■</span>	R,2	E1-F01.hid	86.6	605	5820	3004
6	<span style="color: red;">■</span>	R,5	E1-F01.hid	96.68	438	4183	3108

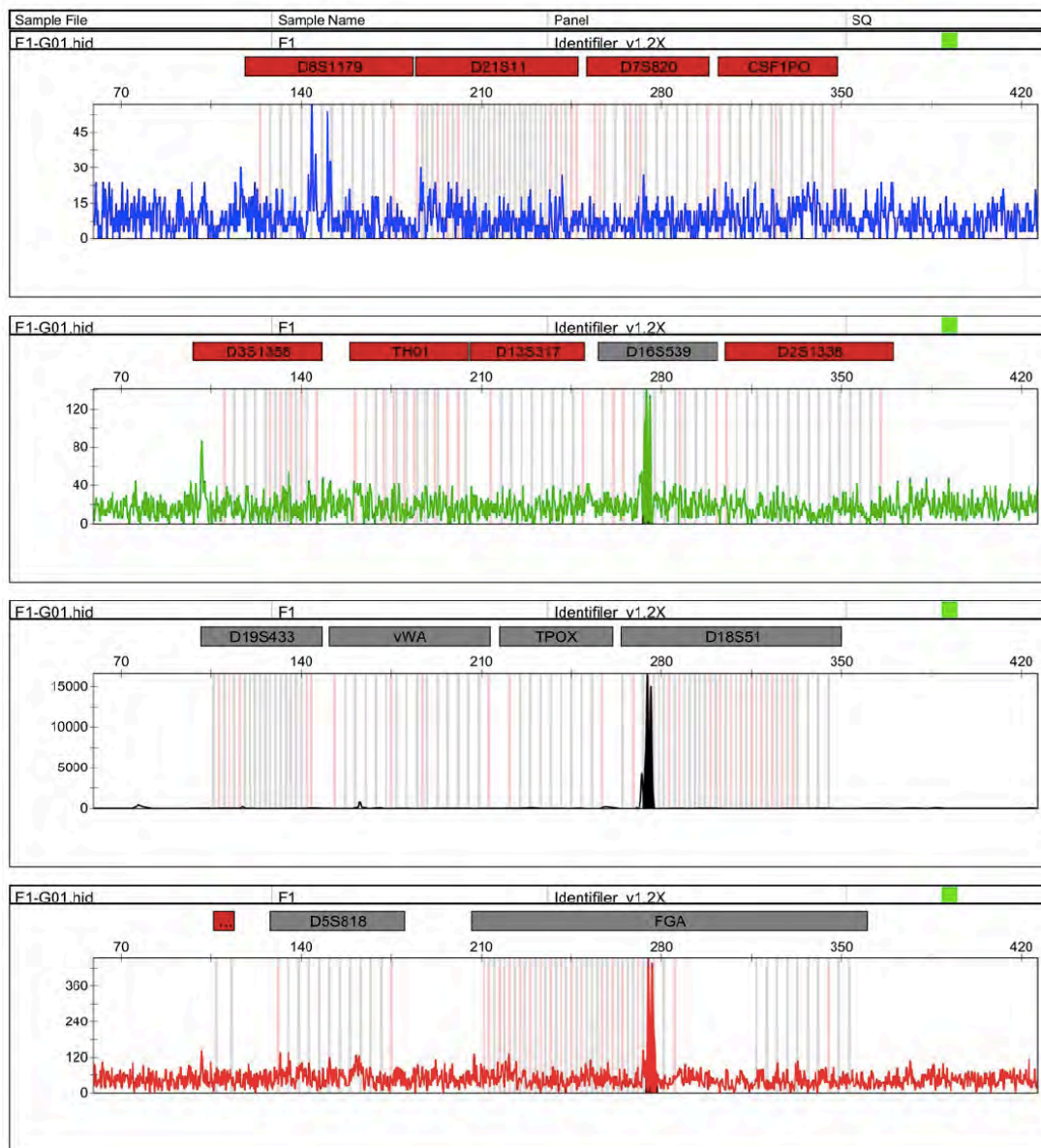
**B3. CCMB071-NED**



**NO SE OBTUVO AMPLIFICACIÓN ni en monoplex ni en multiplex**

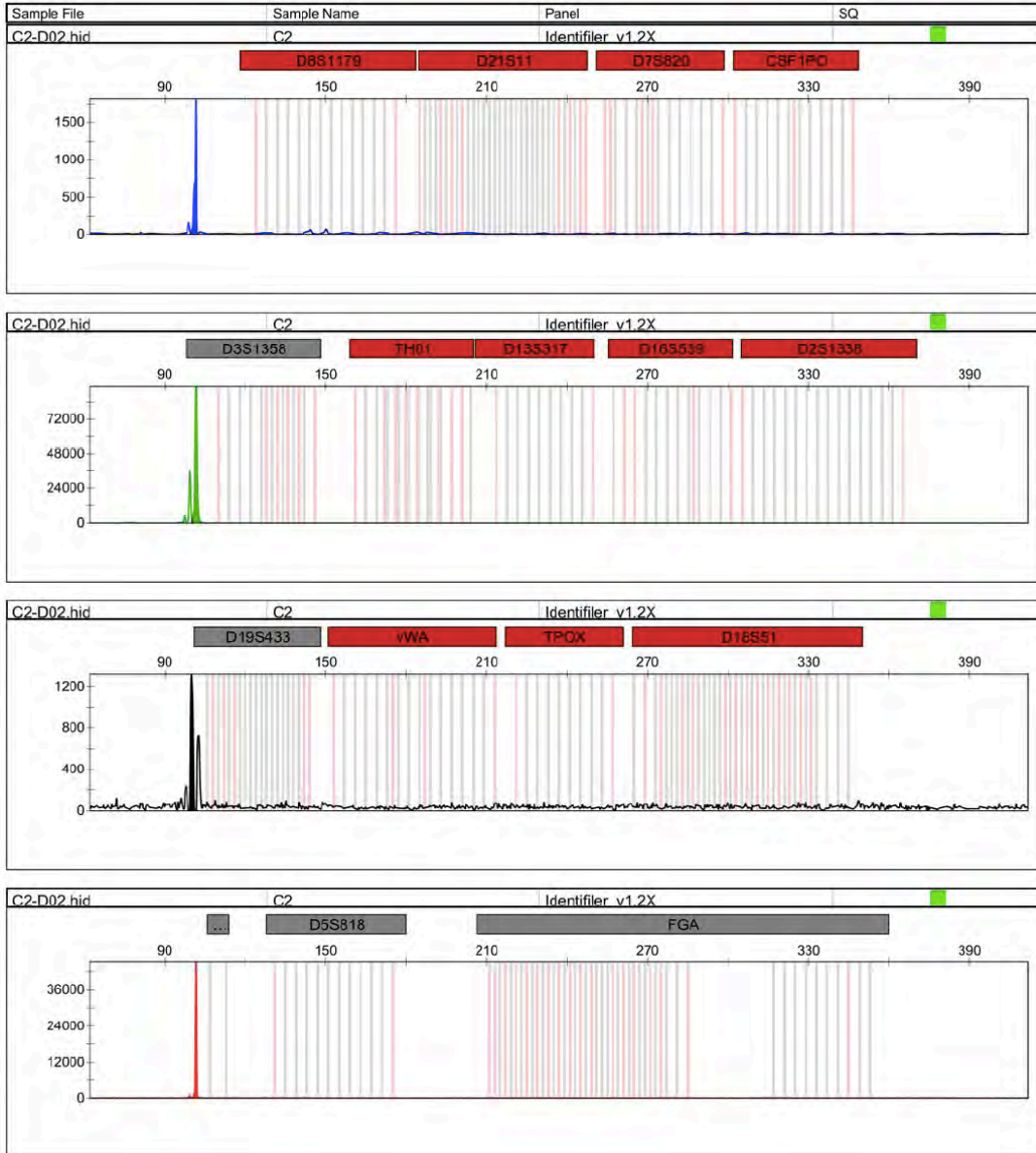


#### B4. CCMB060-NED



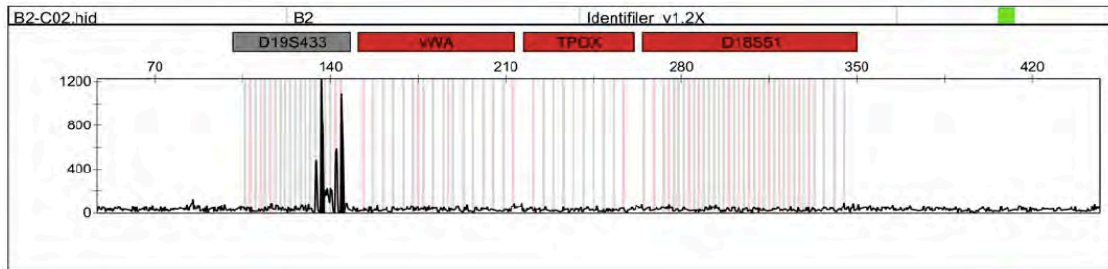
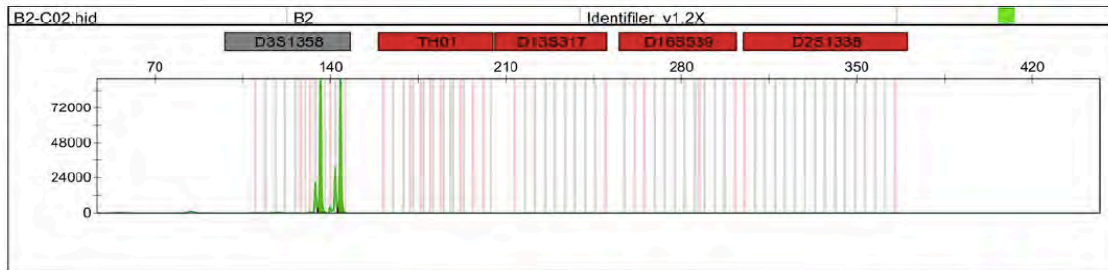
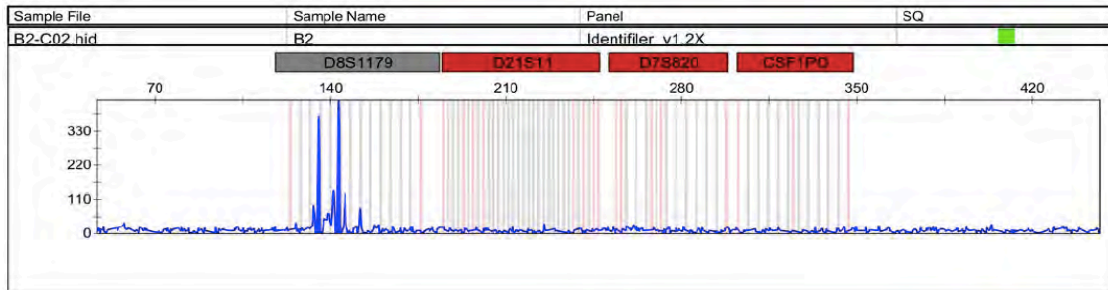
1	<span style="color: green;">■</span>	G,1	F1-G01.hid		274.2	141	1443	4793
2	<span style="color: green;">■</span>	G,2	F1-G01.hid		275.56	135	798	4805
3	<span style="color: yellow;">■</span>	Y,17	F1-G01.hid		274.54	16605	166083	4796
4	<span style="color: yellow;">■</span>	Y,18	F1-G01.hid		275.9	15066	120834	4808
5	<span style="color: red;">■</span>	R,23	F1-G01.hid		274.88	453	2919	4799
6	<span style="color: red;">■</span>	R,24	F1-G01.hid		276.24	438	4257	4811

**B5. CCMB168-VIC**



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	B,2	C2-D02.hid			101.68	1818	11022	3171
2	G,11	C2-D02.hid			101.68	94872	863652	3171
3	Y,3	C2-D02.hid			100.0	1320	13776	3154
4	R,6	C2-D02.hid			101.68	45147	206631	3171

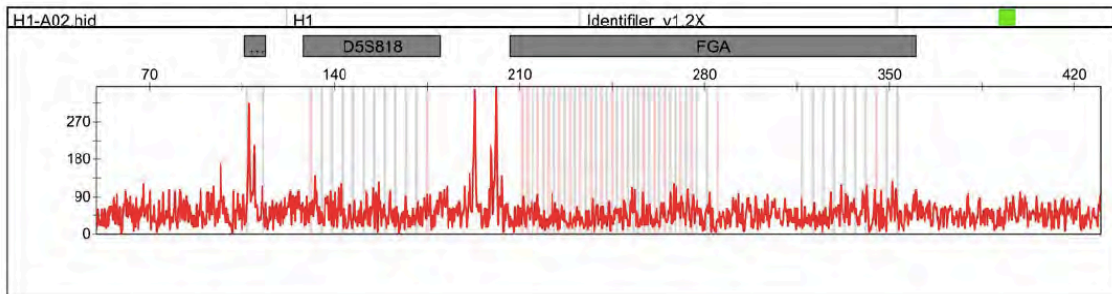
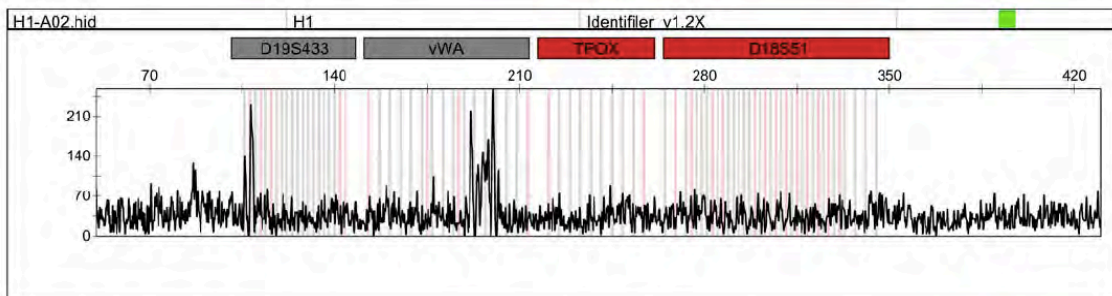
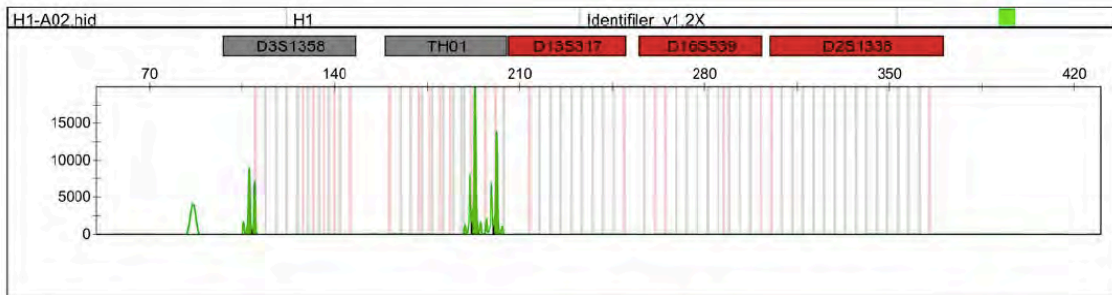
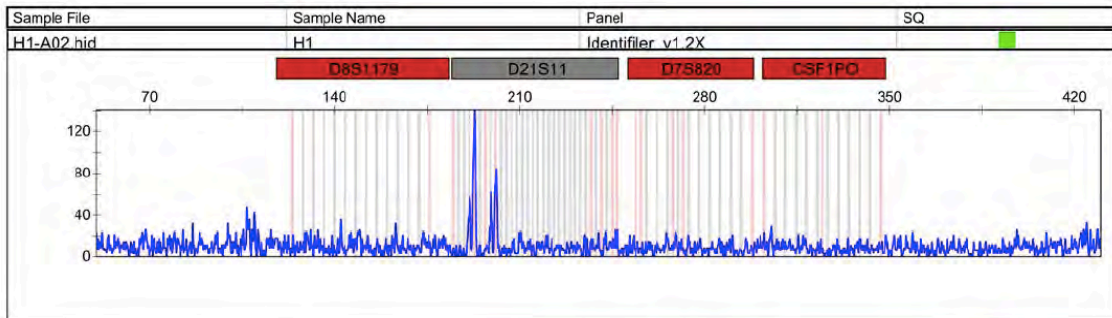
**B6. CCMB126-VIC**



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	B,1	B2-C02.hid			135.22	378	2880	3500
2	B,3	B2-C02.hid			143.21	432	3324	3578
3	G,16	B2-C02.hid			135.82	91077	680334	3506
4	G,20	B2-C02.hid			143.84	92088	679869	3584
5	Y,3	B2-C02.hid			136.23	1227	11169	3510
6	Y,7	B2-C02.hid			144.25	1095	8550	3588
7	R,9	B2-C02.hid			135.82	16707	57705	3506
8	R,13	B2-C02.hid			143.84	22644	78276	3584



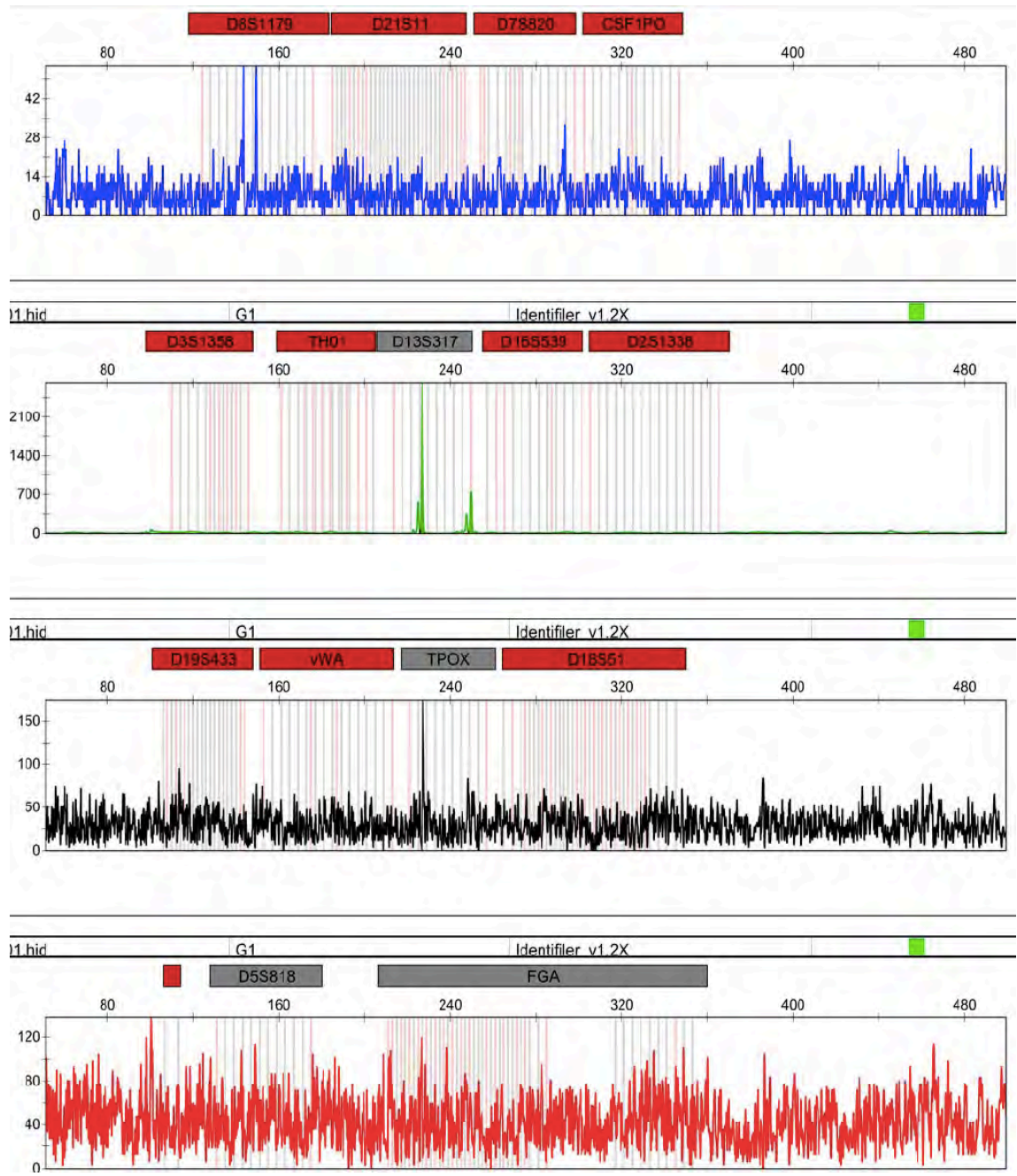
**B7. CCMB005-VIC**



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	G,7	H1-A02.hid			107.75	9048	71601	3249
2	G,8	H1-A02.hid			109.71	7185	46494	3269
3	G,16	H1-A02.hid			193.25	19974	156651	4089
4	G,20	H1-A02.hid			201.46	13860	105378	4166

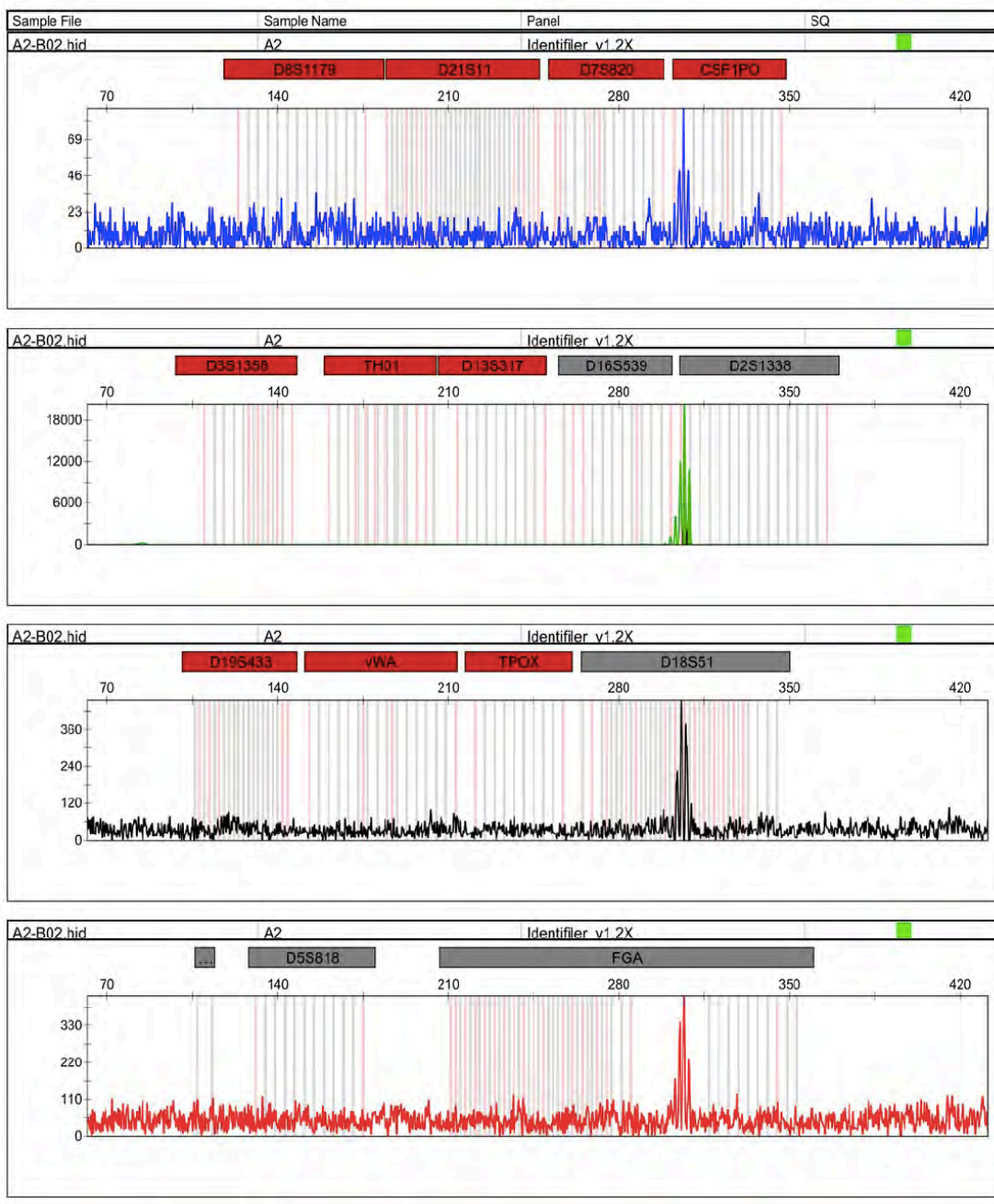


**B8. CCMB045-VIC**



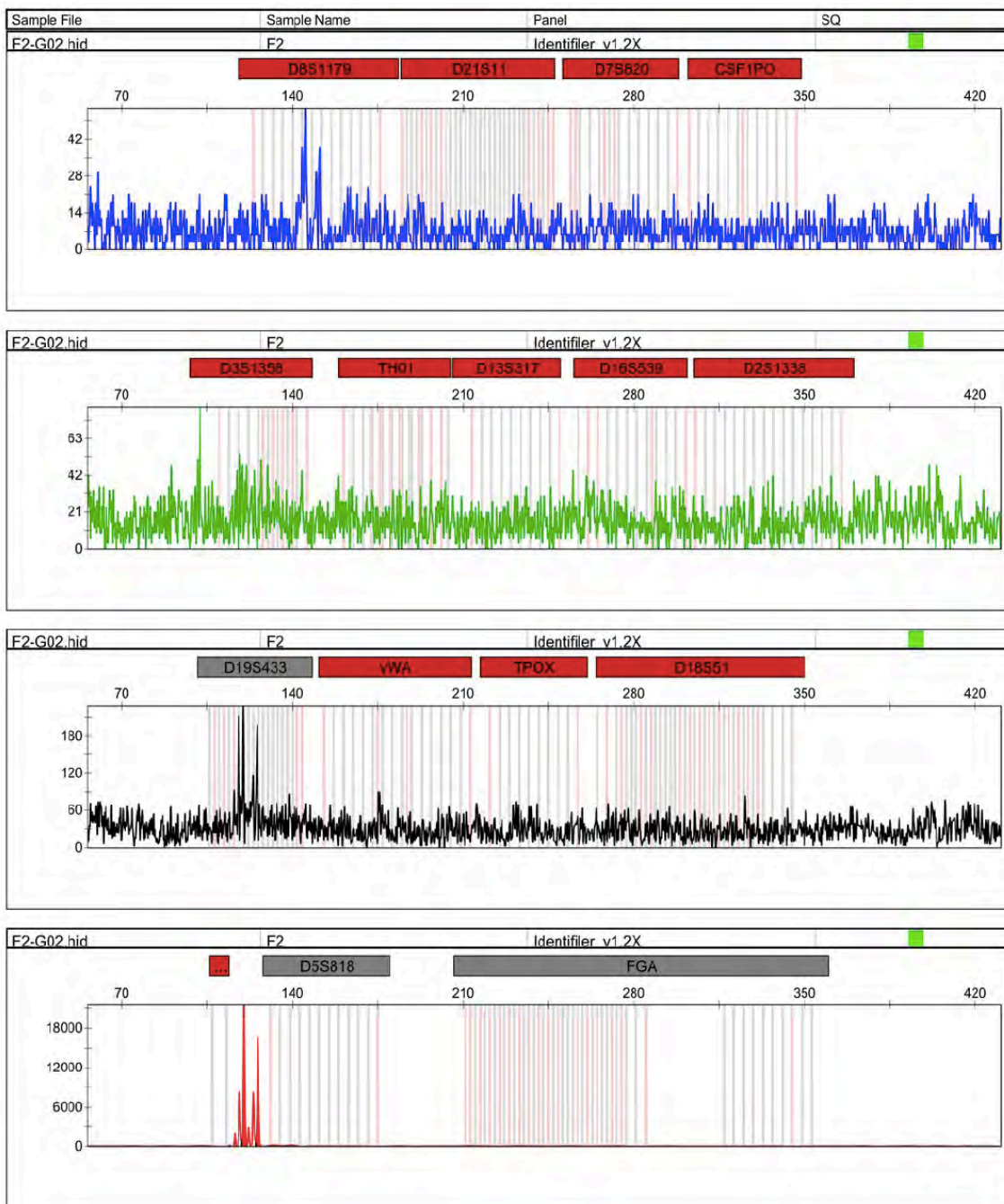
	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	G.2	G1-H01.hid			226.84	2715	19848	4389
2	G.4	G1-H01.hid			249.66	738	5493	4595

**B9. CCMB093-VIC**



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	G,10	A2-B02.hid			306.93	20255	156439	5115
2	G,11	A2-B02.hid			308.89	10835	76135	5132

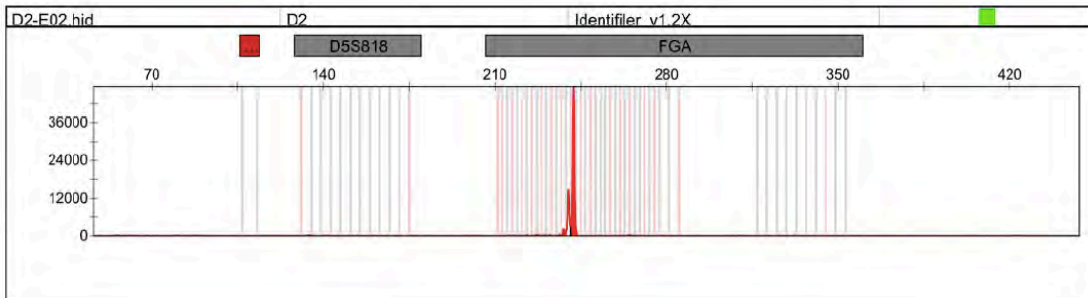
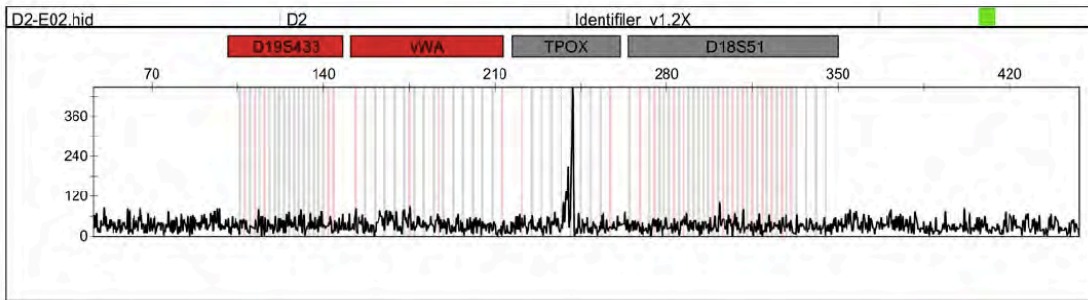
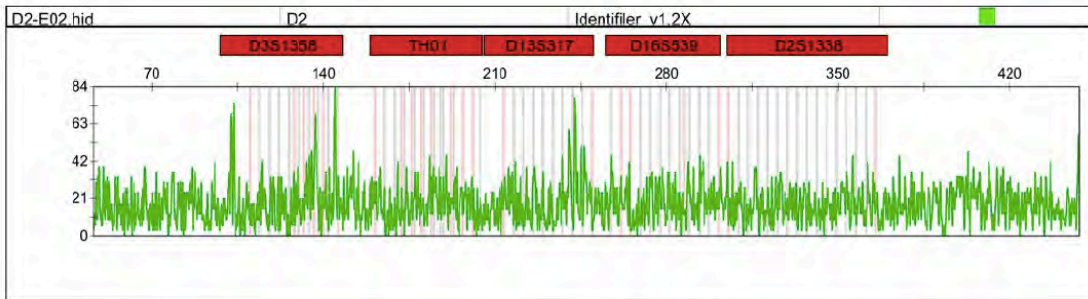
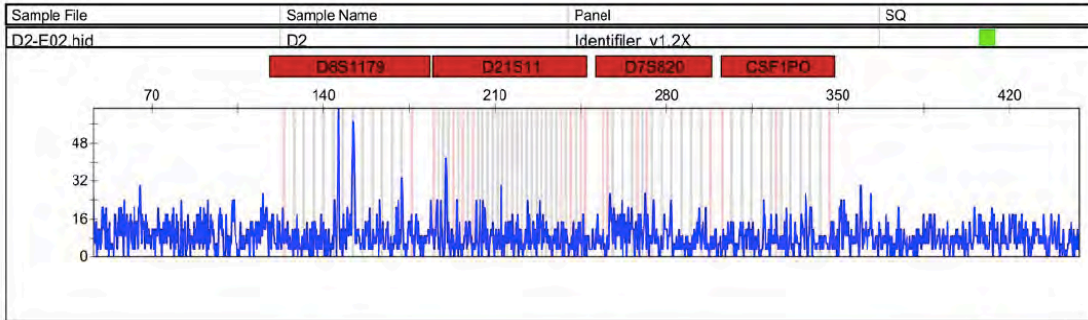
**B10. CCMB006-PET**



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	R,9	F2-G02.hid			120.1	21486	161037	3349
2	R,12	F2-G02.hid			125.85	16644	118461	3408

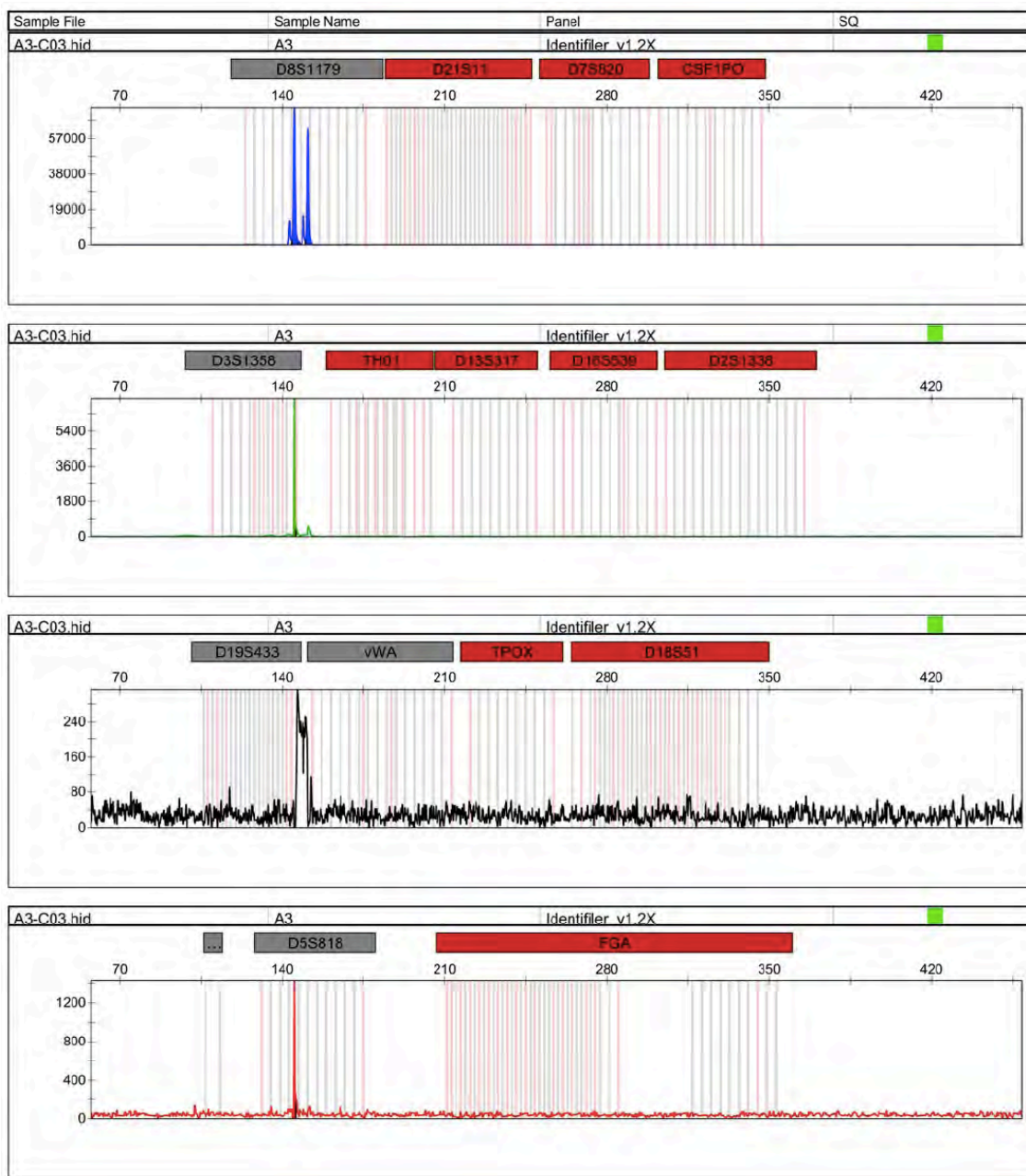


**B11. CCMB077-PET**



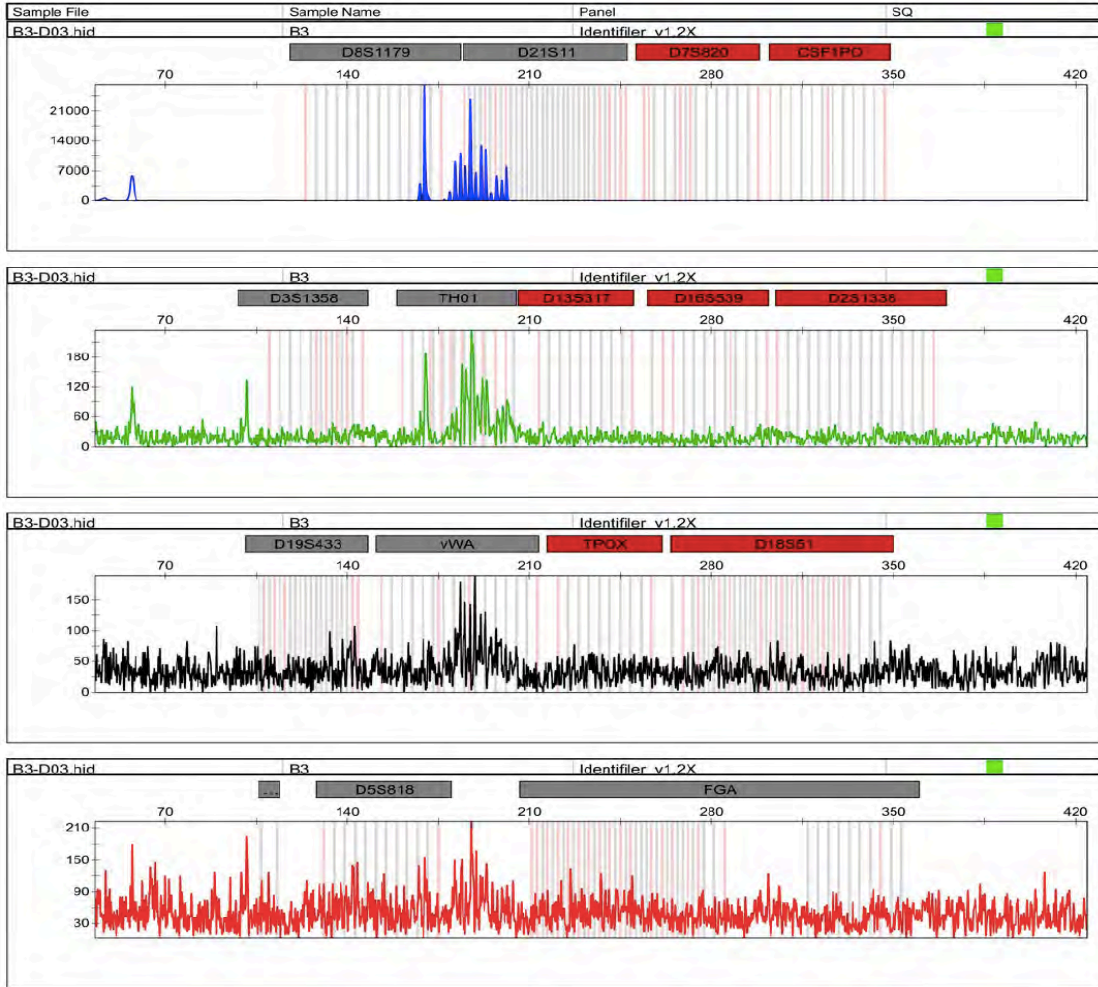
	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	<span style="color: red;">■</span> R,34	D2-E02.hid			242.05	47298	353337	4493

**B12. CCMB211-FAM**



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	B,9	A3-C03.hid			145.16	73770	571839	3603
2	B,12	A3-C03.hid			151.09	62510	446615	3660
3	G,2	A3-C03.hid			145.16	7080	26548	3603
4	R,5	A3-C03.hid			145.16	1426	5920	3603

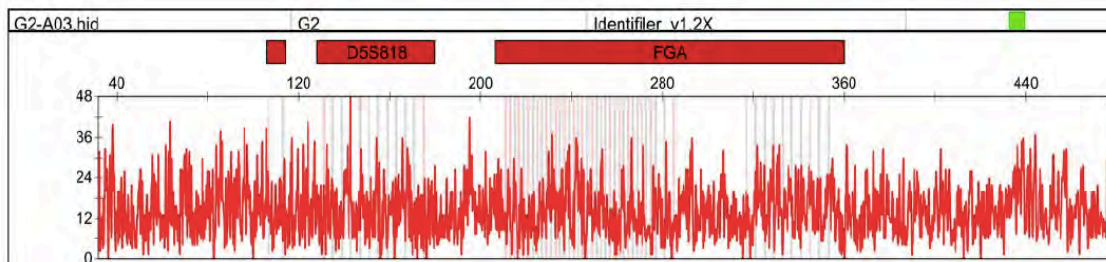
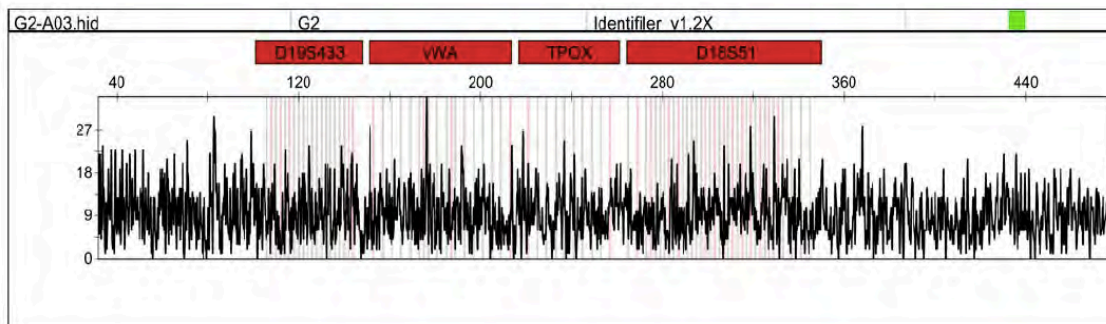
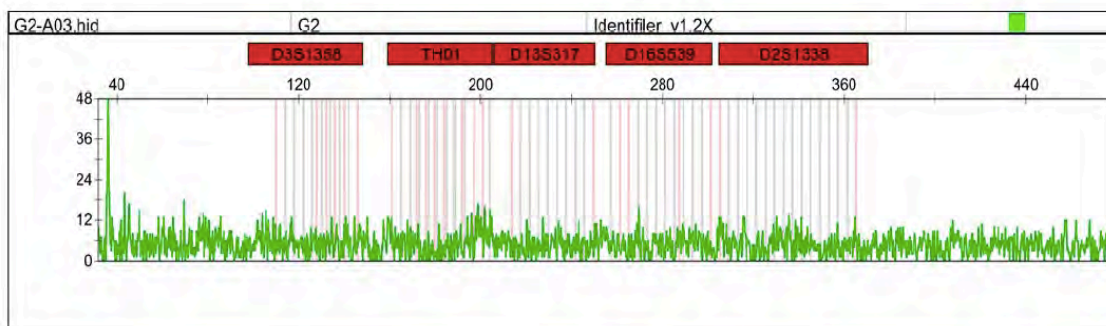
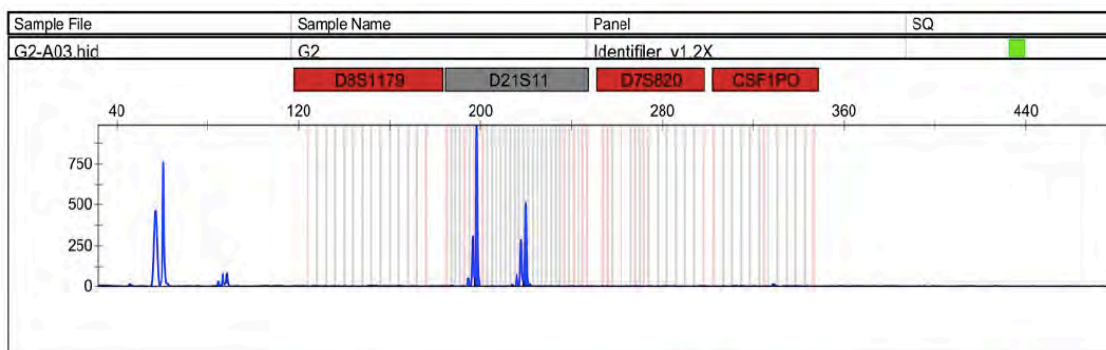
**B13. CCMB099-FAM**



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	B,3	B3-D03.hid			165.79	306	1488	3811
2	B,4	B3-D03.hid			167.77	4338	37110	3830
3	B,5	B3-D03.hid			169.74	27228	222408	3849
4	B,6	B3-D03.hid			177.48	630	3168	3923
5	B,7	B3-D03.hid			179.47	2490	13656	3942
6	B,8	B3-D03.hid			181.4	9342	58248	3960
7	B,9	B3-D03.hid			183.45	11070	70632	3979
8	B,10	B3-D03.hid			185.39	8217	51660	3997
9	B,11	B3-D03.hid			187.44	23736	166740	4016
10	B,12	B3-D03.hid			189.39	6723	41403	4034
11	B,13	B3-D03.hid			191.33	12930	85932	4052
12	B,14	B3-D03.hid			193.28	12045	79011	4070
13	B,15	B3-D03.hid			195.34	2187	11307	4089
14	B,16	B3-D03.hid			197.4	5916	38844	4108
15	B,17	B3-D03.hid			199.35	4839	30753	4126
16	B,18	B3-D03.hid			201.27	8052	51936	4144

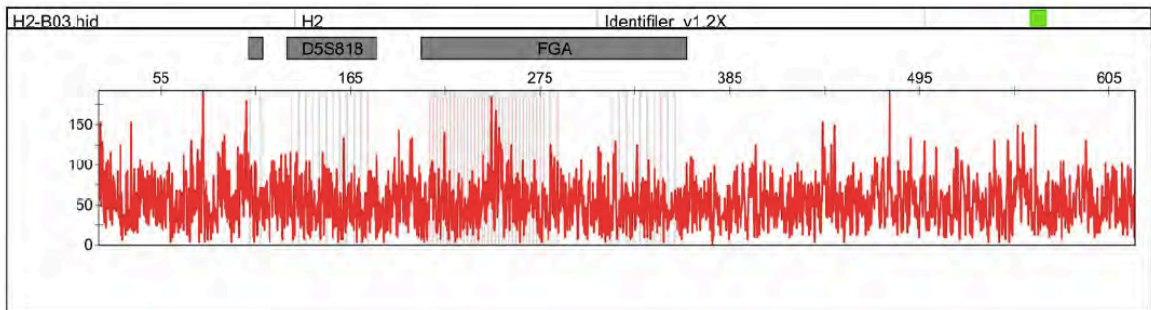
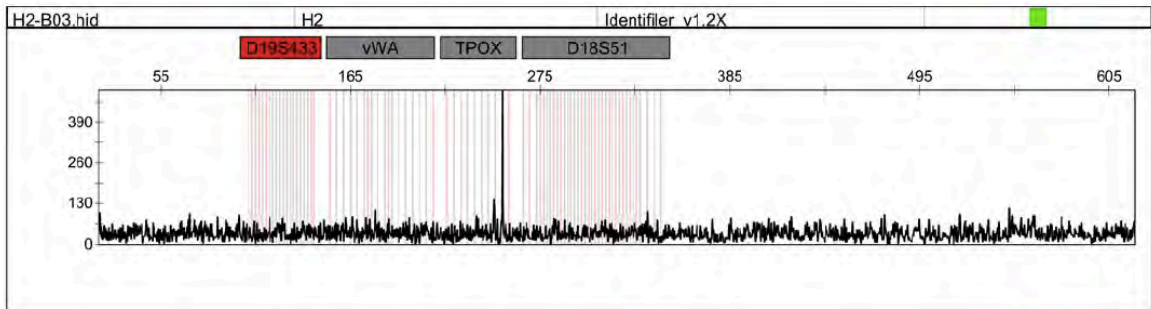
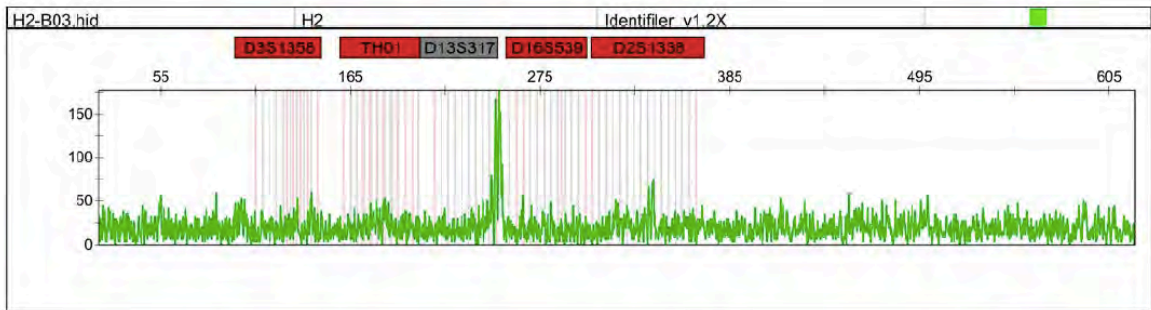
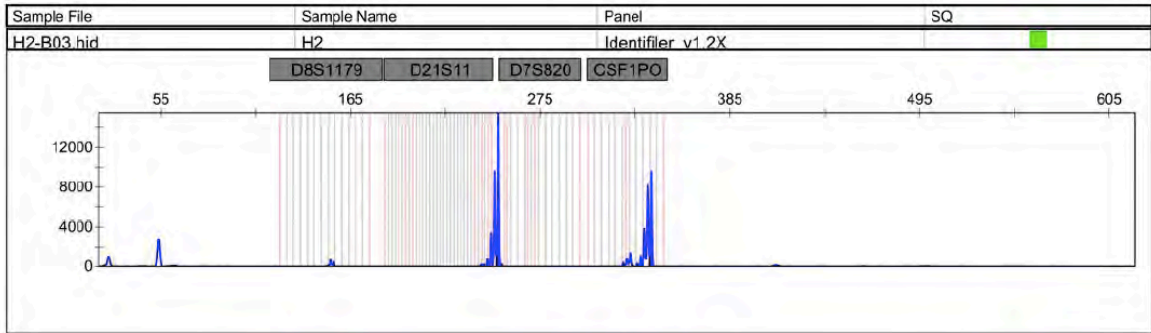


**B14. CCMB001-FAM**



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	B,2	G2-A03.hid			198.37	991	7502	4130
2	B,4	G2-A03.hid			219.89	511	3659	4330

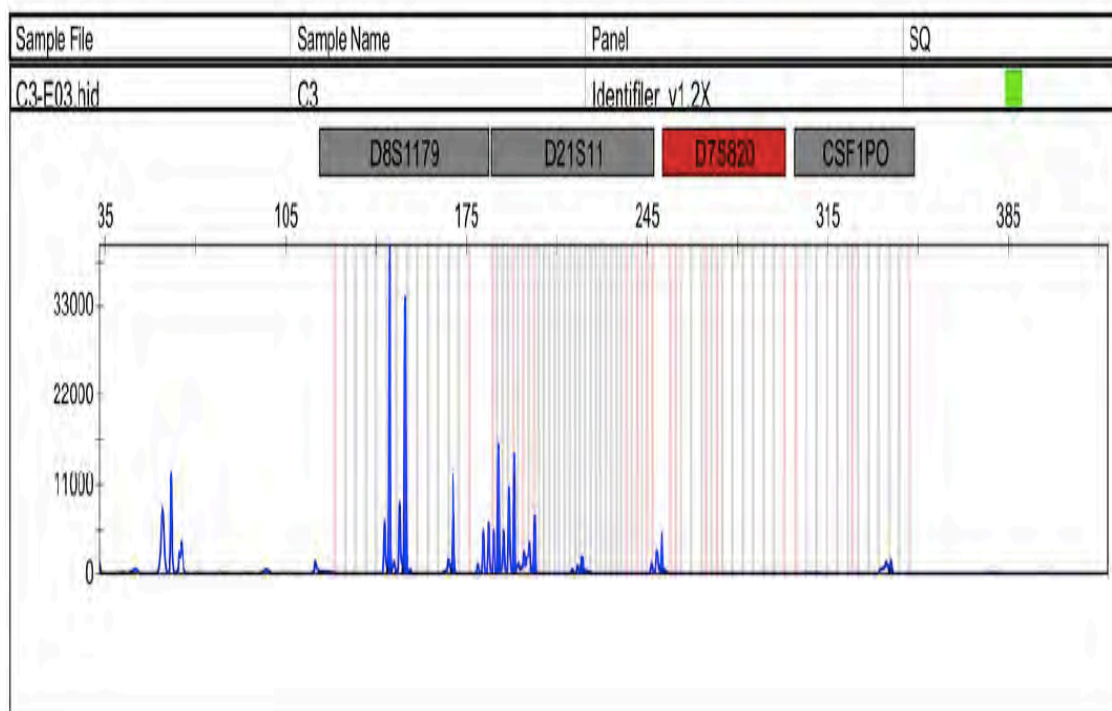
**B15. CCMB208-FAM**



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	B,14	H2-B03.hid			250.55	15534	110412	4595
2	B,27	H2-B03.hid			339.25	9642	73605	5372



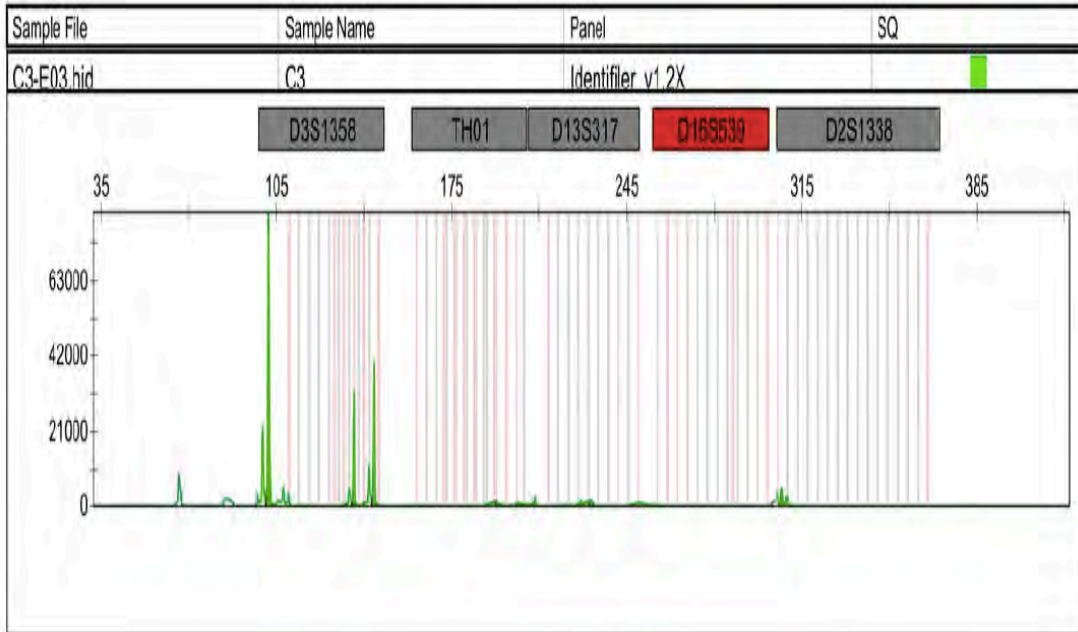
**B16. MULTIPLEX-FLUOROCROMO 6-FAM- 4 MARCADORES**



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	B,4	C3-E03.hid			145.08	40569	278610	3598
2	B,7	C3-E03.hid			151.14	34071	230148	3656
3	B,10	C3-E03.hid			169.81	12240	83370	3834
4	B,15	C3-E03.hid			187.4	16026	104853	4000
5	B,18	C3-E03.hid			193.31	14868	96543	4055
6	B,22	C3-E03.hid			201.28	7398	50718	4129
7	B,25	C3-E03.hid			219.89	2679	18459	4302
8	B,30	C3-E03.hid			250.66	5556	38358	4579
9	B,33	C3-E03.hid			339.43	2019	15309	5354

- Con estos resultados se concluye que la multiplex de primers debe:
- El sistema CCMB099 presenta muchos picos no se puede tallar es mejor eliminarlo no funciona bien ni en monoplex, ni en multiplex.
- El sistema CCMB208 en monoplex tiene un pico adicional en 339,25 parece un alelo-subir concentracion (TABLA. 4)
- Subir concentracion DE CCMB001 (TABLA. 4)
- Disminuir la concentraci3n de CCMB211 (TABLA. 4)

**B17. MULTIPLEX-FLUOROCROMO VIC- 5 MARCADORES**



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	G,5	C3-E03.hid			101.7	82512	577038	3161
2	G,11	C3-E03.hid			135.92	31665	221856	3509
3	G,15	C3-E03.hid			143.84	40233	275652	3586
4	G,19	C3-E03.hid			193.2	2376	17751	4054
5	G,21	C3-E03.hid			201.38	2283	17358	4130
6	G,24	C3-E03.hid			208.32	3450	25695	4195
7	G,26	C3-E03.hid			226.86	2235	15159	4366
8	G,28	C3-E03.hid			230.81	2295	16770	4402
9	G,33	C3-E03.hid			306.96	6249	45195	5081
10	G,34	C3-E03.hid			308.9	3534	23988	5098

Con estos resultados se concluye que la multiplex de primers debe:

El sistema CCMB168 se disminuye la concentración para la multiplex (TABLA. 4).

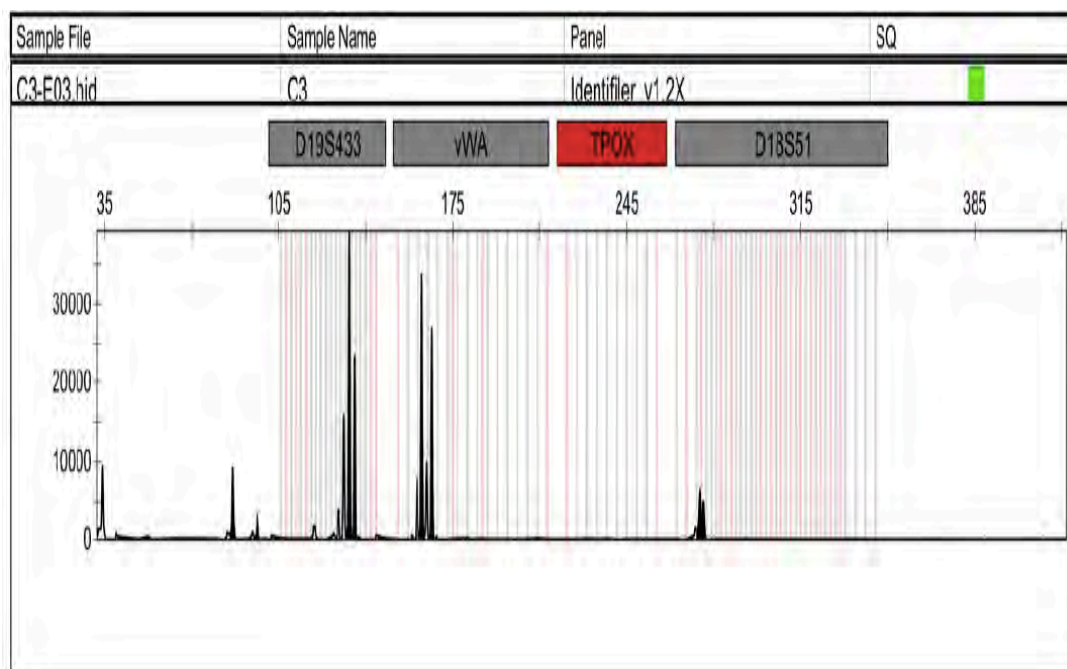
El sistema CCMB126 no necesita modificación (TABLA. 4)

El sistema CCMB005 se aumenta la concentración en multiplex (TABLA. 4)

El sistema CCMB045 se aumenta la concentración en multiplex (TABLA. 4)

El sistema CCMB093 se aumenta la concentración en multiplex (TABLA. 4)

**B18. MULTIPLEX-FLUOROCROMO NED- 5 MARCADORES**



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	Y,2	C3-E03.hid			86.38	9396	66393	3003
2	Y,4	C3-E03.hid			96.4	3729	24837	3107
3	Y,10	C3-E03.hid			133.3	39483	257163	3483
4	Y,11	C3-E03.hid			135.42	23715	144597	3504
5	Y,16	C3-E03.hid			162.5	33906	223212	3764
6	Y,18	C3-E03.hid			166.46	27258	163101	3802
7	Y,21	C3-E03.hid			274.57	6444	59613	4794
8	Y,22	C3-E03.hid			275.81	5376	40854	4805

Con estos resultados se concluye que la multiplex de primers debe:

El sistema CCMB238: funcionó bien en monoplex funciono bien en multiplex hay que subir la concentracion (TABLA. 4)

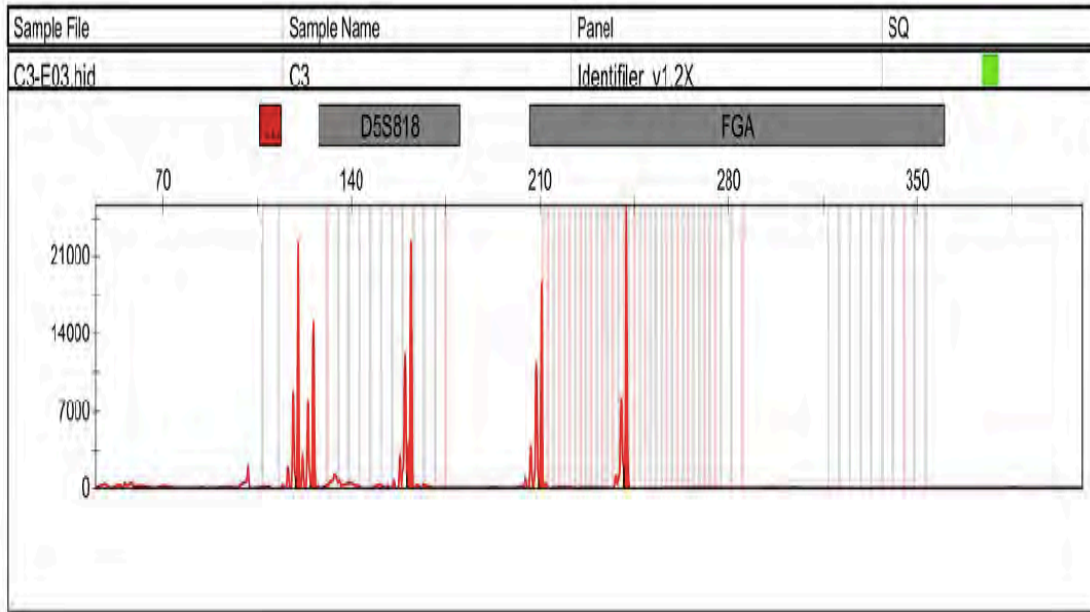
El sistema CCMB078 se disminuye la concentracion (TABLA. 4)

El sistema CCMB159: se disminuye la concentracion (TABLA. 4)

El sistema CCMB071: No Amplificó ni en monoplex ni en multiplex se saca el sistema de la multiplex final

El sistema CCMB060: funcionó bien en monoplex funciono bien en multiplex hay que subir la concentracion (TABLA. 4).

**B19. MULTIPLEX-FLUOROCROMO PET- 4 MARCADORES**



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
1	R,6	C3-E03.hid			120.1	22290	158487	3349
2	R,9	C3-E03.hid			125.75	15213	104427	3407
3	R,17	C3-E03.hid			162.08	22341	168522	3760
4	R,22	C3-E03.hid			210.46	18705	129870	4215
5	R,26	C3-E03.hid			241.94	25671	191130	4502

CON ESTOS RESULTADOS SE CONCLUYE QUE LA MULTIPLEX DE PRIMERS DEBE:

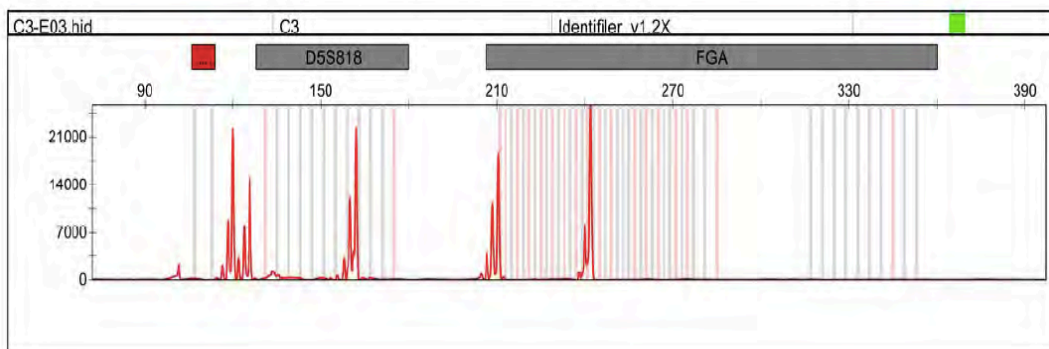
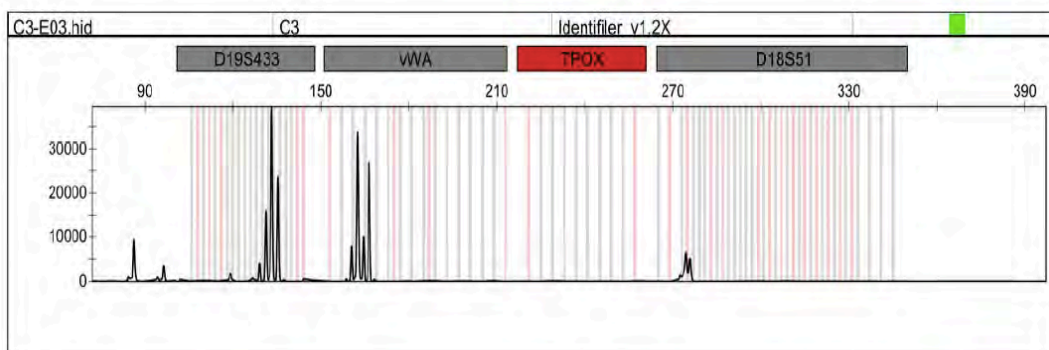
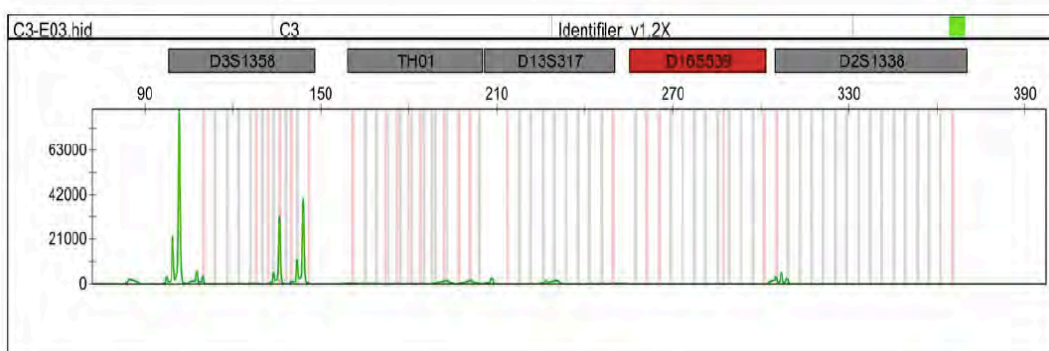
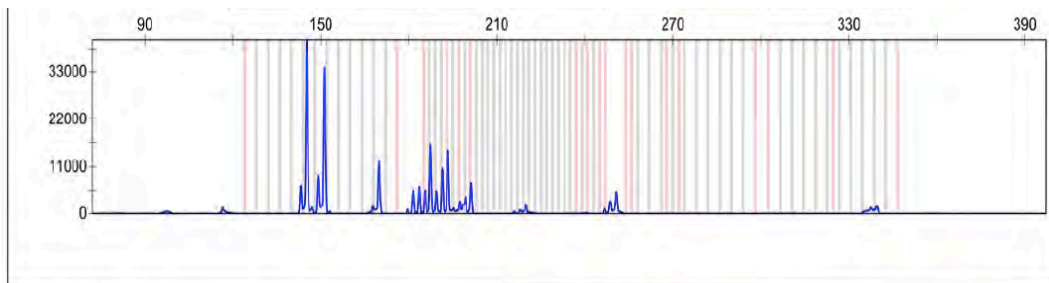
El sistema CCMB006: funcionó bien en monoplex funciono bien en multiplex no se modifica (TABLA. 4)

El sistema CCMB207: funcionó bien en monoplex funciono bien en multiplex no se modifica (TABLA. 4)

El sistema CCMB113: funcionó bien en monoplex funciono bien en multiplex no se modifica (TABLA. 4)

El sistema CCMB077: funcionó bien en monoplex funciono bien en multiplex no se modifica (TABLA. 4)



**B20. MULTIPLEX-18 MARCADORES PERFIL COMPLETO ANTES DE LA OPTIMIZACIÓN**

**B20. MULTIPLEX-16 MARCADORES PERFIL COMPLETO DESPUÉS DE LA OPTIMIZACIÓN**

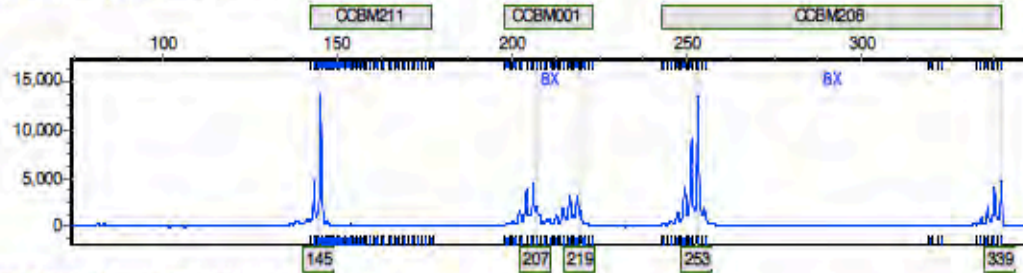
SoftGenetics  
GeneMarker V2.4.1

**Allele Report**

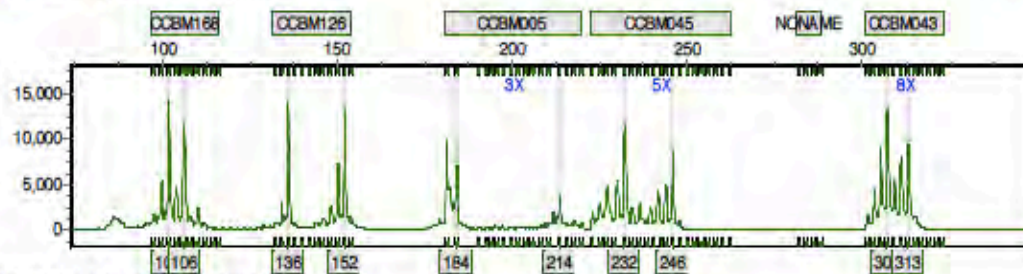
12/11/2013 10:32:12 AM  
Page 1

Sample 1: Run date and time: 10/04/2012 - 17:11:19 -> 10/04/2012 - 17:44:16

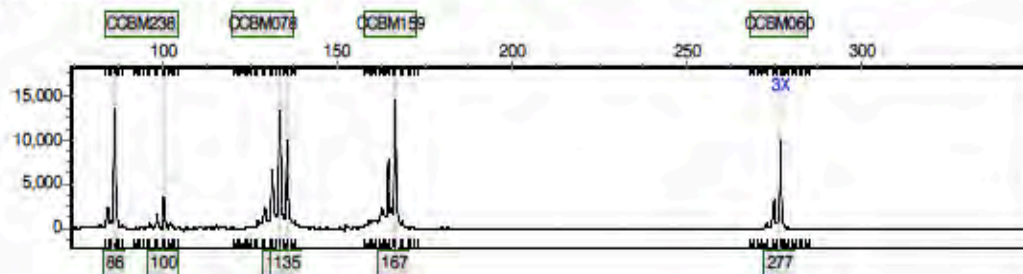
Dye: Blue - 13 peak - 2573-08-H11.hid



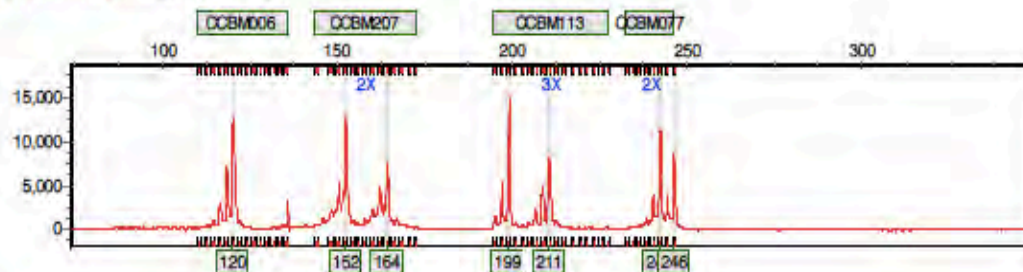
Dye: Green - 14 peak - 2573-08-H11.hid



Dye: Yellow - 8 peak - 2573-08-H11.hid



Dye: Red - 16 peak - 2573-08-H11.hid



## **C. Anexo: Descripción de los protocolos de extracción de ADN utilizados para la investigación**

### **C1. Protocolo de extracción utilizando Fenol- Cloroformo- alcohol isoamílico (F.C.A) y CTAB (Quintanilla *et al.*, 2011) modificado:**

- Con ayuda de un sacabocados de 1mm de diámetro se cortaban 5 rodetes de la muestra las cuales eran colocados en tubos eppendorf de 1.5 *ml* previamente marcados y se hacían tres repeticiones para asegurar la reproducibilidad de los resultados
- Se colocaron 750  $\mu$ l de buffer de extracción CTAB 2X (2% de Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB Sigma® H-5882), 1.4M de NaCl, 20mM de EDTA pH 8.0, 100mM Tris-HCl pH 8.0, 1% Polivinil pirrolidona (PVP)) en el tubo eppendorf de 1.5 *ml*
- Se agregaron 125  $\mu$ l de Proteinasa K 10 *mg/ml*
- Se incubó toda la noche a 56°C
- Al día siguiente se se centrifugó el tubo a 5000 RPM durante tres minutos.
- Se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 *ml* y se agregó la misma cantidad de FCA 25:24:1 y se mezcló suavemente por inversión hasta que se homogenizó todo completamente.
- Se centrifugó el tubo a 10.000 R.P.M por 3 minutos.
- Se traspasó la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf previamente marcado y se agregaron 28  $\mu$ l de acetato de amonio 7.5 M y 250  $\mu$ l de isopropanol frio, se agitó por inversión y se dejó precipitando toda la noche a -20 °C .

- Al día siguiente se centrifugó el tubo a 10.000 R.P.M por 3 minutos y después se descartó el sobrenadante
- Se agregó al pellet 700  $\mu$ l de etanol frío al 70 % y se centrifugó el tubo a 10.000 R.P.M por 1 minuto y se descartó el sobrenadante.
- Se secó la boca del tubo con una toalla de papel
- Se agregó al pellet 700  $\mu$ l de etanol frío al 99 % y se centrifugó el tubo a 10.000 R.P.M por 1 minuto y se descartó el sobrenadante.
- Se secó la boca del tubo con una toalla de papel
- Se dejó secar a temperatura ambiente bajo cabina de extracción por 2 horas.
- Se resuspendió en 50  $\mu$ l de buffer TE 1 X pH 8.0 (10mM Tris-HCl y 1mM EDTA ).

**C2. Protocolo de extracción utilizando buffer SDS-EDTA (Smith y Burgoyne, 2004) modificado:**

- En un tubo eppendorf de 0.2 ml previamente marcado, se cortó un rodete de muestra con un sacabocados de 1mm
- Se agregaron 200  $\mu$ l de la solución de extracción que contenía (1% de Sodio Dodecil sulfato (SDS) y 2mM de EDTA pH 8.0)
- Se dio un vórtex fuerte
- Se incubó en un horno por 30 minutos a 56°C
- Se realizaron tres lavados con buffer TE 1X
- Se agregó 200  $\mu$ l de isopropanol frío y se dejó incubar a temperatura ambiente por 2 minutos
- Se retiró el isopropanol y se dejó secar el rodete de FTA a temperatura ambiente.

**C3. Protocolo de extracción utilizando NaOH (Smith y Burgoyne, 2004) modificado:**

- En un tubo eppendorf de 0.2 ml previamente marcado, se cortó un rodete de muestra con un sacabocados de 1mm
- Se agregaron 200  $\mu$ l la solución de extracción (10mM de NaOH )
- Se realizó un vórtex fuerte
- Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Se realizaron dos lavados con 200  $\mu$ l con Buffer TE 1X



- Se realizó un vórtex fuerte en cada lavado
- Se realizó un lavado con 200  $\mu$ l con agua Milli-Q estéril y BSA 1mg/ml (1:5) por 5 minutos
- Se realizó un vórtex fuerte
- Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el rodete de FTA a temperatura ambiente.

**C4. Protocolo de extracción fenol (Smith y Burgoyne, 2004) modificado:**

- En un tubo eppendorf de 0.2 ml previamente marcado, se cortó un rodete de muestra con un sacabocados de 1mm
- Se realizaron 2 lavados bajo campana de extracción de solventes orgánicos cada uno con 200  $\mu$ l de fenol líquido. Se agitó suavemente por inversión
- Se descartó el fenol y posteriormente se realizaron tres lavados con 250  $\mu$ l con una solución de lavado que contenía 80% de isopropanol y 5% de Tris realizando un vórtex fuerte entre cada lavado
- Se dejó secar a 56°C por 20 minutos

**C5. Protocolo de extracción utilizando tiocianato de guanidinio (GITC) (Smith y Burgoyne, 2004) modificado:**

- En un tubo eppendorf de 0.2 ml previamente marcado, se cortó un rodete de muestra con un sacabocados de 1mm
- Se agregó 200  $\mu$ l de una solución de extracción compuesta por 0.1% de SDS y 100mM de Tris -HCl pH 8.0 , se realizó un vórtex fuerte y se incubó por 30 minutos a 56°C en un horno.
- Se realizó un segundo lavado con una solución de tiocianato de guanidinio 5M por 5 minutos
- Se realizó 1 lavado con agua Milli-Q y se incubó por 5 minutos
- Se realizaron 2 lavados con buffer TE 1X con periodos de incubación entre cada lavado de 5 minutos
- Se realizó un lavado final con etanol absoluto por 2 minutos
- se descartó el etanol y se dejó secar a 56°C por 10 minutos en el horno a 56°C

## D. Anexo: Frecuencias alélicas para población muestreada por locus.

Locus	Alelo	Población FBC
<b>CCBM211</b>	<b>N</b>	<b>282</b>
	141	0.002
	145	0.108
	147	0.011
	149	0.025
	151	0.635
	153	0.041
	155	0.059
	157	0.002
	161	0.051
	171	0.057
	173	0.005
175	0.005	
<b>CCBM001</b>	<b>N</b>	<b>257</b>
	199	0.051
	201	0.154
	203	0.109
	205	0.039
	207	0.078
	208	0.002
	209	0.019
	211	0.035
	213	0.010
	215	0.012
	217	0.109
	219	0.169
	221	0.097
223	0.117	
<b>CCBM208</b>	<b>N</b>	<b>280</b>
	243	0.016
	245	0.029
	247	0.043
	249	0.070
	250	0.002
	251	0.305
	253	0.395

	255	0.011
	257	0.002
	319	0.002
	323	0.005
	325	0.014
	329	0.002
	331	0.014
	333	0.002
	335	0.007
	337	0.032
	339	0.050
	<b>N</b>	<b>282</b>
<b>CCBM168</b>	82	0.002
	88	0.002
	94	0.002
	98	0.002
	100	0.087
	102	0.422
	104	0.002
	106	0.342
	108	0.035
	110	0.016
	112	0.014
	114	0.039
	116	0.016
	120	0.012
	124	0.005
126	0.002	
	<b>N</b>	<b>282</b>
<b>CCBM126</b>	130	0.004
	134	0.158
	136	0.489
	138	0.004
	140	0.018
	142	0.005
	144	0.231
	146	0.002
	148	0.007
	152	0.080
154	0.004	
	<b>N</b>	<b>279</b>
<b>CCBM005</b>	176	0.002
	178	0.022
	180	0.043
	182	0.127
	184	0.276
	186	0.009
	190	0.022
	192	0.030
194	0.029	

	196	0.027
	198	0.032
	200	0.025
	202	0.020
	204	0.016
	206	0.004
	208	0.079
	210	0.072
	212	0.032
	214	0.088
	216	0.023
	218	0.011
	220	0.013
<b>CCBM045</b>	<b>N</b>	<b>280</b>
	208	0.002
	214	0.002
	220	0.002
	226	0.059
	228	0.186
	230	0.129
	232	0.107
	234	0.004
	236	0.039
	238	0.038
	240	0.002
	242	0.011
	244	0.080
	246	0.125
	248	0.077
	250	0.129
252	0.004	
254	0.002	
256	0.004	
258	0.002	
<b>CCBM093</b>	<b>N</b>	<b>265</b>
	286	0.002
	287	0.002
	303	0.002
	305	0.136
	307	0.313
	309	0.177
	311	0.079
	313	0.192
	315	0.064
	317	0.008
319	0.021	
321	0.004	
<b>CCBM238</b>	<b>N</b>	<b>267</b>
	80	0.009
	86	0.225
88	0.009	

	90	0.004
	92	0.002
	94	0.004
	96	0.245
	98	0.101
	100	0.191
	102	0.170
	104	0.006
	106	0.013
	108	0.004
	110	0.004
	112	0.006
	114	0.007
	<b>N</b>	<b>282</b>
<b>CCBM078</b>	119	0.004
	121	0.016
	123	0.009
	125	0.004
	127	0.046
	129	0.119
	131	0.057
	133	0.645
	135	0.066
	137	0.011
	139	0.014
	141	0.011
	<b>N</b>	<b>282</b>
<b>CCBM159</b>	159	0.002
	161	0.002
	163	0.301
	165	0.044
	167	0.479
	169	0.151
	171	0.021
	<b>N</b>	<b>276</b>
<b>CCBM060</b>	169	0.002
	269	0.043
	271	0.020
	273	0.254
	275	0.268
	277	0.333
	279	0.060
	281	0.018
285	0.002	
	<b>N</b>	<b>281</b>
<b>CCBM006</b>	106	0.004
	108	0.002
	112	0.018
	114	0.032
	116	0.046

	120	0.646
	122	0.061
	126	0.020
	128	0.018
	130	0.114
	132	0.014
	134	0.007
	136	0.014
	138	0.004
	140	0.002
<b>CCBM207</b>	<b>N</b>	<b>282</b>
	144	0.002
	148	0.002
	150	0.009
	152	0.243
	154	0.030
	156	0.004
	158	0.131
	160	0.009
	162	0.220
	164	0.220
	166	0.119
	168	0.005
172	0.007	
<b>CCBM113</b>	<b>N</b>	<b>280</b>
	195	0.002
	197	0.114
	199	0.055
	201	0.086
	203	0.007
	205	0.152
	207	0.018
	209	0.220
	211	0.259
	213	0.002
	219	0.018
	221	0.034
223	0.016	
225	0.018	
<b>CCBM077</b>	<b>N</b>	<b>282</b>
	236	0.137
	238	0.005
	240	0.190
	242	0.420
	244	0.014
246	0.234	

## E. Anexo: Resultados del análisis de hermandad realizados con el programa KINALYZER.

Set de hermanos encontrados	Individuos Relacionados
SibsSet0	255-06,3550-09
SibsSet1	3780-06,3670-09
SibsSet2	465-06,4861-07
SibsSet3	028-07,230-07
SibsSet4	2831-06,6121-06
SibsSet5	4391-07,4551-07,5420-07
SibsSet6	5710-06,780-06,6046
SibsSet7	3061-06,4041-09
SibsSet8	673-06,911-06
SibsSet9	155-06,3231-06,524-06
SibsSet10	2431-06,3911-07
SibsSet11	1303-07,4421-07
SibsSet12	635-06,771-06
SibsSet13	4391-06,379-07,3511-09
SibsSet14	1091-07,539-07,1810-08
SibsSet15	1175-07,3071-07,3911-09
SibsSet16	901-06,4031-07
SibsSet17	3681-09,3820-09
SibsSet18	5400-07,1902-08,442-08
SibsSet19	1393-07,2600-08
SibsSet20	280-07,4630-09
SibsSet21	453-06,3170-06,2343-09
SibsSet22	040-07,4481-07,3630-09
SibsSet23	2640-06,2650-06,081-08
SibsSet24	014-07,3270-09,3940-09
SibsSet25	1573-07,1583-07,3931-09
SibsSet26	491-08,2400-09,3420-09

SibsSet27	363-09,3821-09,601-09
SibsSet28	3101-07,425-07
SibsSet29	340-07,35101-07,2381-08
SibsSet30	182-08,3790-09
SibsSet31	3991-06,1891-07,2970-08
SibsSet32	2611-06,427-06,435-06
SibsSet33	425-06,863-09
SibsSet34	1423-07,4041-07,840-07
SibsSet35	425-06,2462-08
SibsSet36	0022-06,6074,4621-09
SibsSet37	2140-06,1091-08,643-08
SibsSet38	2005-06,200-07,5440-07
SibsSet39	074-06,1321-07,441-08
SibsSet40	075-06,750-06,173-08
SibsSet41	3881-06,130-06,4061-09
SibsSet42	2233-08,1083-09,1201-09
SibsSet43	024-06,644-06,2412-09
SibsSet44	040-06,3470-06,813-08
SibsSet45	280-06,4821-06,5701-06
SibsSet46	004-06,745-07,303-08
SibsSet47	5841-06,602-06,4631-07
SibsSet48	3020-06,730-06,923-08
SibsSet49	4180-07,1470-08,3900-09
SibsSet50	475-06,3440-06,903-08
SibsSet51	3581-07,124-08,530-08
SibsSet52	4731-06,1730-08
SibsSet53	634-06,4251-07,861-07
SibsSet54	1593-07,721-08,3481-09
SibsSet55	1521-08,1712-09,3771-09
SibsSet56	530-06,1932-08,3901-09
SibsSet57	1900-06,330-07,873-09
SibsSet58	325-06,222-06,3640-09
SibsSet59	2521-06,3711-06,384-06
SibsSet60	364-06,554-06,2621-08
SibsSet61	1101-06,1100-06,860-06,041-08
SibsSet62	762-06,1781-08,323-08
SibsSet63	254-06,2640-06,254-06,780-07



SibsSet64	3061-07,2751-09
SibsSet65	3791-07,1430-08,3991-09
SibsSet66	733-06,2800-06,4911-09
SibsSet67	1151-08,315-08,2330-09
SibsSet68	215-06,4110-06,651-08
SibsSet69	1610-08,421-08,3580-09
SibsSet70	105-06,5010-06,395-08
SibsSet71	670-06,4691-09,4830-09
SibsSet72	441-06,605-96,741-06
SibsSet73	691-06,3601-09
SibsSet74	3130-07,3300-07,302-08
SibsSet75	3101-06,1582-09
SibsSet76	165-06,245-06,1653-08
SibsSet77	1700-06,244-06,203-08
SibsSet78	871-08,1660-09,4741-09
SibsSet79	553-06,3480-09
SibsSet80	1503-07,3471-07,1532-08
SibsSet81	285-06,2901-07,475-07
SibsSet82	1820-06,4400-06,821-08
SibsSet83	2573-08,2303-09,3851-09
SibsSet84	3081-08,1682-09,2392-09
SibsSet85	1621-07,123-08,133-08
SibsSet86	065-06,5981-06,000-06
SibsSet87	152-06,035-08,623-08
SibsSet88	2930-06,4461-06,4721-07
SibsSet89	194-07,5210-07,961-09
SibsSet90	2270-06,1491-08,201-08
SibsSet91	1251-06,4561-07,2130-09
SibsSet92	1223-08,1541-08,483-08
SibsSet93	200-06,5531-06,293-08
SibsSet94	1500-06,005-08,075-08,4091-09
SibsSet95	2151-08,3500-09,660-09
SibsSet96	1170-06,3220-06,065-08
SibsSet97	664-06,1701-08,993-08
SibsSet98	692-06,2422-09,3641-09
SibsSet99	004-07,1052-08,3011-09
SibsSet100	365-06,2030-06
SibsSet101	1100-07,131-09,3531-09

# BIBLIOGRAFÍA

1. AKANE, A., MATSUBARA, K., NAKAMURA, H., TAKAHASHI, S., KIMURA, K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J. Forensic Sci.* 39: (1994) p.362–72
2. AJMONE-MARSAN, P., COLLI, L., NICOLAZZI, E., NEGRINI, R., ZJALIC, M., ROSATI, A. New approaches to investigate the genetic basis of animal adaptation to different environments. *Animal farming and environmental interactions in the Mediterranean region* (8): (2012). p. 12-22
3. ALMAGUER PÉREZ, YANARA. El búfalo, una opción de la ganadería. *REDEVET Rev. electrón. vet.*, VIII:(8), (2007) p. 1-23.
4. AMANO, T., MIYAKOSHI, y., TAKADA, T., KIKKAWA, Y. & SUZUKI, H. Genetic variants of ribosomal DNA and mitochondrial DNA between Swamp and River buffaloes. *Anim. Genet.* 25 (Suplemento 1): (1994). p. 29-36
5. AMINAFSHAR. M., AMIRINIA. C & VAEZ TORSHIZI. R. Genetic Diversity in Buffalo Population of Guilan Using Microsatellite Markers. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 7(11): (2008). p. 1499-1502
6. AMMENDRUP S & BARCOS L.O. The implementation of traceability systems. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 25:(2): (2006) p. 763-773.
7. ANDERSON S., DEBRUIJN M., COULSON A., SANGER F., & YOUNG I., Complete sequence of bovine mitochondrial DNA: Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156: (1982) p. 683-717.
8. ÁNGEL-MARÍN, P.A., CARDONA, H., MORENO-OCHOA, M., CERÓN-MUÑOZ, M.F. Analysis of genetic diversity in Colombian buffalo herds. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.*, 23: 4: (2010) p. 411-421
9. ANGULO R., AGUDELO-GOMEZ D., CERÓN-MUÑOZ M.F., JARAMILLO-BOTERO S. Genetic parameters in buffalo calves fed at full milk in beef production system in middle Magdalena región of Colombia. *Liv. Res. Rur. Dev*; 18: (2006). Artículo 180.
10. ANNEX B., y WILLIAMS R.S. Mitochondrial DNA Structure and Expression in Specialized Subtypes of Mammalian Striated Muscle. *Mol. Cell. Biol.* 10: (1990) p. 5671-5678.
11. ASHLEY, M.V., CABALLERO, I.C., CHAOVALITWONGSE, W., DASGUPTA, B., GOVINDAN, P., SHEIKH, S.I., BERGER-WOLF, IDAD. KINALYZER, a computer program for reconstructing sibling groups. *Mol Ecol Resour.*9(4). (2009) p. 1127-1131
12. BARKER, J.S.F., MOORE, S.S., HETZEL, D.J.S., EVANS, D., TAN, S.G. & BYRNE, K. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. *Animal Genetics* 28: (1997) p.103-115.
13. BARREIRO M. El mercado de la carne desde el punto de vista del consumidor. XXI Curso de especialización FEDNA. Madrid, Retailer Services Manager Acnielsen España. 7 y 8 de noviembre de 2005.
14. BAUMUNG, R., SIMIANER, H., HOFFMANN, I. Genetic diversity studies in farm animals – a survey. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 121: (2004) p. 361-373
15. BEJA-PEREIRA, A., CARAMELLI, D., LALUEZA-FOX, C., VERNESI, C., FERRAND, N., CASOLI, A., GOYACHE, F., ROYO, L.J., CONTI, S., LARI, M., MARTINI, A., OURAGH, L., MAGID, A., ATASH, A., ZSOLNAI, A., BOSCATO, P., TRIANTAPHYLIDIS, C., PLOUMI, K., SINEO, L., MALLEGNI, F., TABERLET, P., ERHARDT, G., SAMPIETRO, L.,

- BERTRANPETIT, J., BARBUJANI, G., LUIKART, G., BERTORELLE, G. The origin of European cattle: Evidence from modern and ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 103: (2006) p. 8113–8118
16. BELKHIR, K., BORSA, P., CHIKHI, L., RAUFASTE, N. & BONHOMME, F. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier. (1996-2004)
  17. BERGER-WOLF .T.Y., SHEIKH. S.I., DASGUPTA. B., ASHLEY. M.V, CABALLERO. I.C., CHAOVALITWONGSE. W., PUTREVU. SL. Reconstructing sibling relationships in wild populations. *Bioinformatics*. 23(13): (2007) p. 49-56.
  18. BICALHO H.M., PIMENTA C.G., MENDES I.K., PENA H.B., QUEIROZ E.M. & PENA S.D. Determination of ancestral proportions in synthetic bovine breeds using commonly employed microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research* 5: (2006) p. 432-437.
  19. BISHOP, S. & GETTINBY G. Modelling Farm Animal Diseases. In: *Breeding for disease resistance in farm animals*. United Kingdom: CAB Publishing, cap. 2: (2000) p. 27-47
  20. BLASI, M., MOHAMED, MAHASSEN M. Biodiversity in Mediterranean buffalo using two microsatellite multiplexes. *Livestock Science*, 114:( 2 ): (2008) p. 341-346.
  21. BLOTT S.C., WILLIAMS J. L. & HALEY C. S. Genetic relationships among European cattle breeds. *Animal Genetics* 29: (1998) p. 273-282.
  22. BLOUIN MS. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis. *TRENDS in Ecology and Evolution*. 18 (10): (2003) p. 503-511.
  23. BOGENHAGEN D.F. Repair of mtDNA in Vertebrates. *Am. J. Hum. Genet* 64: (1999) p.1276-1281.
  24. BRADLEY, D.G., MACHUGH, D.E., CUNNINGHAM, P., LOFTUS, R.T. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: (1996) p. 5131-5135.
  25. BRENNER CH. Kinship Analysis by DNA When There Are Many Possibilities, *Progress in Forensic Genetics* 8 (1999).
  26. BROWNSTEIN, M. J., CARPTEN, J. D. , SMITH, J. R. Modulation of non-templated nucleotide addition by taq DNA polymerase: Primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques*, 20: (1996) p.1004-1010
  27. BUTLER, J.M. *Forensic DNA typing biology, technology, and genetics of STR markers*. Elsevier Academic Press, Segunda edición, Londres- Inglaterra. (2005) cp 4, 7, 12 y 13
  28. BUTLER, J.M. STR Typing. *Current Protocols in Human Genetics*. Short Tandem Repeat Analysis for Human Identity Testing. (2003) cp. 14.8.
  29. CERÓN-MUÑOZ M, GÓMEZ-ARROYAVE F, RAMÍREZ-TORO J, CIFUENTES T Y GUTIÉRREZ-MOLINA S.ñ Parámetros genéticos para la producción de leche, grasa y proteína en búfalos de Colombia. *Livestock Research for Rural Development*. 24:30: (2012)
  30. COMISIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA LA ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Plan De Acción Mundial Sobre Los Recursos Zoogenéticosy La Declaración De Interlaken aprobados por la Conferencia Técnica Internacional sobre los Recursos Zoogenéticos para la Agricultura y la Alimentación Interlaken, Suiza, 3–7 septiembre 2007
  31. COCKRILL, W. R. The husbandry and health of the domestic buffalo. FAO, Roma. (1974) p.19-754
  32. DROST M. Bubaline versus bovine reproduction. *Theriogenology* 68: (2007) p. 447-449
  33. EDING, H., CROOIJMANS, R.P., GROENEN, M.A., MEUWISSEN, T.H. Assessing the contribution of breeds to genetic diversity in conservation schemes. *Genetic Selection and Evolution* 34: (2002) p. 613–633

34. EL NAHAS, S.M., DE HONDT, H.A. AND WOMACK, J.E. Current status of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) gene map. *Journal of Heredity* 92: (2001) p. 221-225.
35. ELBELTAGY, A.R., GALAL, SALAH., ABDELSALAM, A.Z., EL KERABY, F.E., Biodiversity in Mediterranean buffalo using two microsatellite multiplexes. *Liv Sci*; 114: (2008) p. 341-346
36. EUROPEAN CATTLE GENETIC DIVERSITY CONSORTIUM. Marker-assisted conservation of European cattle breeds: An evaluation. *Animal Genetics* 37: (2006) p. 475-481
37. FAO. Informe De La Conferencia De La FAO. 34º período de sesiones. Roma, 17-24 de noviembre de 2007
38. FAO. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture, editado por Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. Roma. (2008)
39. FAO. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines. No. 9. Rome. (2011)
40. FELMER R, CHÁVEZ R, CATRILEO A, ROJAS C. Tecnologías actuales y emergentes para la identificación animal y su aplicación en la trazabilidad animal. *Arch. Med. Vet.* 38:3: (2006)
41. FLAMAND, J.R.B., VANKAN, D., GAIRHE, K.P., DUONG, H. AND BARKER, J.S.F. Genetic identification of wild water buffalo in Nepal. *Anim. Coserv.* (6):(2003) p. 265-270
42. FONDO BUFALERO DEL CENTRO SA, "nuestra empresa: Fondo bufalero, Nuestras bufaleras". {En línea}. {23 abril de 2014} disponible en: (<http://www.fondobufalero.com/site/index.php/empresa/fondo-bufalero>).
43. FU, Q., ZHANG, M., QIN, W.S., LU, Y.Q., ZHENG, H.Y., MENG, B., LU, S.S., & LU, K.H. Cloning the swamp buffalo SRY gene for embryo sexing with multiplex nested PCR. *Theriogenology* 68: (2007) p.1211-1218
44. GLOWATZKI-MULLIS, M. L., GAILLARD, C., WIGGER, G., FRIES, R. Microsatellite-based parentage control in cattle. *Animal Genetics* 26: (1995) p. 7-12
45. GENERAL ELECTRIC HEALTHCARE. Application note: STR amplification of DNA from buccal and blood samples stored long-term on Whatman™ FTA™ cards, 29-0082-33, Edition AA. (2011).
46. HENEGARIU, O., HEEREMA, N.A., DLOUHY, S.R., VANCE G.H & VOGT P.H. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques.* (23): (1997) p. 504-511.
47. HOFFMANN, I., AJMONE MARSAN, P., BARKER, J.S.F., COTHRAN, E.G., HANOTTE, O., LENSTRA, J.A., MILAN, D., WEIGEND, S. & SIMIANER, H. New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: recommendations of a joint ISAG/FAO working group. *Proceedings of the 29th International Conference on Animal Genetics, Tokyo, Japan, 11-16 Septiembre.* (2004) p.123
48. HUMMEL, K. & IHM, P. A method to calculate the plausibility of paternity using blood groups results of any relatives. *Z. Immunitätsforsch. Exper. Klin. Immunol.* (149): (1975) p. 405-416.
49. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). Resolución 002341 de 2007. Por la cual se establecen las condiciones sanitarias y de inocuidad en la producción primaria de ganado bovino y bufalino destinado al sacrificio para consumo humano. 23 DE AGOSTO DE 2007.
50. INTERNATIONAL SOCIETY FOR ANIMALS GENETICS "ISAG". Cattle molecular markers and parentage testing workshop. ISAG conference, Edinburgo, Escocia. ISAG. (2010)
51. JANN, O.C., IBEAGHA-AWEMU, E.M., OZBEYAZ, C., ZARAGOZA, P., WILLIAMS, J.L., AJMONE-MARSAN, P., LENSTRA, J.A., MOAZAMI-GOUDARZI, K., ERHARDT, G. Geographic distribution of haplotypes diversity at the bovine casein locus. *Genetic Selection and Evolution* 36: (2004) p. 243-257
52. JOOST, S., A. BONIN, M.W. BRUFORD, L. DESPRES, C. CONORD, G. ERHARDT AND P. TABERLET. A spatial analysis method (SAM) to detect candidate loci for selection:

- towards a landscape genomics approach to adaptation. *Molecular Ecology* 16: (2007) p. 3955-3969
53. JOOST, S., L. COLLI, P.V. BARET, J.F. GARCIA, P. J. BOETTCHER, M. TIXIER-BOICHARD, P. AJMONE-MARSAN AND GLOBALDIV CONSORTIUM. Integrating geo-referenced multiscale and multidisciplinary data for the management of biodiversity in livestock genetic resources. *Anim Genet.*, 41:(1): (2010) p. 47-63
  54. KALINOWSKI ST, AP WAGNER, ML TAPER. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6: (2006) p. 576-579.
  55. KANTANEN J, OLSAKER I., HOLM L-E., LIEN S., VILKKI J., BRUSGAARD K., EYTHORSDDOTTIR E, DANELL B., ADALSTEINSSON S. Genetic diversity and population structure of 20 European cattle breeds, *American Genetic Association* 91: (2000). p. 446-457
  56. KIKKAWA, Y., YONEKAWA, H., SUZUKI, H., & AMANO, T. Analysis of genetic diversity of domestic water buffaloes and anoas based on variations in the mitochondrial gene by cytochrome b. *Anim. Genet.* 28: (1997) p.195-201
  57. KIKKAWA, Y. TAKADA, T. SUTOPO, K. NOMURA, T. NAMIKAWA, H. YONEKAWA, H. AMANO, T. Phylogenies using mtDNA and SRY provide evidence for male-mediated introgression in Asian domestic cattle. *Animal Genetics*, 34: (2003) p. 96-101
  58. KOLBEHDARI, D., Z. WANG, J.R. GRANT, B. MURDOCH, A. PRASAD, Z. XIU, E. MARQUES, P. STOTHARD & MOORE, S.S. A whole-genome scan to map quantitative trait loci for conformation and functional traits in Canadian Holstein bulls. *J Dairy Sci.*, 91: (2008) p. 2844-2856
  59. KUMAR, S., GUPTA, J., KUMAR, N., DIKSHIT, K., NAVANI, N., & NAGARAJAN, M. Genetic variation and relationships among eight Indian riverine buffalo breeds. *Mol. Ecol.* 15: (2006) p. 593–600
  60. KUMAR,S., NAGARAJAN, M.,SANDHU, J.S., KUMAR, N., BEHL, V. Phylogeography and domestication of Indian river buffalo. *BMC Evol Biol.* Oct 4;7: (2007) p.186
  61. LAPPALAINEN, T., E. SALMELA, P.M. ANDERSEN, K. DAHLMAN-WRIGHT, P. SISTONEN, M.L. SAVONTAUS, S. SCHREIBER, P. LAHERMO & J. KERE. Genomic landscape of positive natural selection in Northern European populations. *Eur J Hum Genet.*, 18: (2010) p. 471-478.
  62. LEI, C.Z., CHEN, H., YANG, G.S., SONG, L.S., LEI, X.Q., SUN, W.B., LI, R.B., Liu, X.L. Study on mitochondrial DNA genetic diversity of some cattle breeds in China. *Acta Genet. Sin.* 31: (2004) p. 57-62.
  63. LOFTUS, R.T., MACHUGH, D.E., BRADLEY, D.G., SHARP, P.M., CUNNINGHAM, P., Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: (1994) p. 2757-2761
  64. LUIKART G., BIJU-DUVALM.P., ERTUGRULO., ZAGDSUREN Y MAUDET C., TABERLET P. Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). *Anim. Genet.*, 30: (1999) p. 431 – 438.
  65. LUIKART, G.H., P. ENGLAND, D.A. TALLMON, S. JORDAN & P. TABERLET. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome-typing. *Nature Rev Genet.*, 4: (2003) p. 981-994
  66. LUQUE, J.A., CRESPILO, M., RAMIREZ, E., FERNANDEZ, R.M., PAREDES, M., VALVERDE, J.L. Valoración estadística en identificaciones y paternidades complejas. IV Jornadas de genética Forense del GEP-ISFG. La Gomera, 1999.
  67. MACEACHERN, S., B. HAYES, J. MCEWAN AND M. GODDARD. An examination of positive selection and changing effective population size in Angus and Holstein cattle populations (*Bos taurus*) using a high density SNP genotyping platform and the

- contribution of ancient polymorphism to genomic diversity in Domestic cattle. *BMC Genomics* 10: (2009) p. 181
68. MACHUGH D.E., SHRIVE R M.D., LOFTUS R.T., CUNNINGHAM P., BRADLEY D.G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of Taurine and Zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genet.*, 146: (1997) p.1071-1086.
  69. MARQUES, J.R.F.MARTÍNEZ, A.M., COSTA, M.R., ALBUQUERQUE, M.S.M., QUIROZ, J., VEGA-PLA, J.L., DELGADO, J.V. Genetic diversity of Brazilian buffaloes (*Bubalus bubalis*) using DNA microsatellites, *Archivos de Zootecnia*. 60:232: (2011) p.1214
  70. MARTÍNEZ, E., TIRADO, JF., CERÓN-MUÑOZ, M.F., MORENO, M., MONTOYA, A., CORRALES, JD., CALVO, SJ. Caracterización genética del búfalo Murrah en Colombia usando marcadores microsatélite. *Liv Res Rur Dev.*, 21: (2009) Artículo 14.
  71. MARTÍNEZ CORREAL, GERMÁN. Plan Nacional de Acción para la conservación, mejoramiento y utilización sostenible de los recursos genéticos animales de Colombia. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO). Bogotá D.C., (2010) p. 1-180.MATÉ, M.L., BUSTAMANTE, A., GIOVAMBATTISTA, G., DE LAMO,D., VON THÜNGEN, J., ZAMBELLI, A., VIDAL-RIOJA, L. Genetic diversity and differentiation of guanaco populations from Argentina inferred from microsatellite data. *Animal Genetics* 36: (2005) p. 316–321
  72. MCKAY, S.D., R.D. SCHNABEL, B.M. MURDOCH, L.K. MATUKUMALLI, J. AERTS, W. COPPIETERS, D. CREWS, E. DIAS NETO, C.A. GILL, C. GAO, H. MANNEN, Z. WANG, C.P. VAN TASSELL, J.L. WILLIAMS, J.F. TAYLOR & MOORE, S.S. An assessment of population structure in eight breeds of cattle using a whole genome SNP panel. *BMC Genet* 9: (2008) p. 37.
  73. MILLIGAN BG. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics*. (163): (2003) p.1153-1167.
  74. MITAT, A. Curva de lactancia en hembras lecheras Buffalypso y mestizas Carabao. II Congreso de Producción Animal Tropical. I Simposio Internacional de Producción de Rumiantes, Instituto de Ciencia Animal, La Habana. (2007) p. 86.
  75. MOIOLI. B., GEORGOUDIS. A., NAPOLITANO. F., CATILLO. G., LUCIOLI. S., LIGDA. C & BOYAZOGLU. J. Genetic diversity between Italian and Greek buffalo populations. *Animal Genetic Resources Information. Livestock Production Science* (70): (2001) p. 203-211.
  76. MORETTI, T., BAUMSTARK, A., DEFENBAUGH, D., KEYS, K., SMERICK, J., & BUDOWLE, B. Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: Performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J.Forensic Sci.* 46(3): (2001) p. 647–660.
  77. NAGARAJAN M, KUMAR N, NISHANTH G, HARIBASKAR R, PARANTHAMAN K, GUPTA J, MISHRA M, VAIDHEGI R, KUMAR S, RANJAN AK, KUMAR S. Microsatellite markers of water buffalo, *Bubalus bubalis* -development, characterization and linkage disequilibrium studies. *BMC Genet.* Oct (21);10:68: (2009) p. 1-7.
  78. NAVANI. N., JAIN. P. K., GUPTA. S., SISODIA. B. S & KUMAR, S. A set of cattle microsatellite DNA markers for genome analysis of riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Genetics* 33(2): (2002). p. 149-154
  79. NEGRINI R. , NIJMAN, I. J. , MILANESI, E. , MOAZAMI-GOUDARZI, K., WILLIAMS, J. L., ERHARDT, G., DUNNER, S., RODELLAR, C., VALENTINI, A., BRADLEY, D. G., OLSAKER, I., KANTANEN, J., AJMONE-MARSAN, P., & LENSTRA, J. A. Differentiation of European cattle by AFLP fingerprinting. *ANIMAL GENETICS*. 38:1: (2007) p.60–66.
  80. NEGRINI, R., NIJMANN, I.J., MILANESI, E., MOAZAMI- GOUDARZI, K., WILLIAMS, J.J., ERHARDT, G., DUNNER, S., RODELLAR, C., VALENTINI, A., BRADLEY, D.G., OLSAKER, I., KANTANEN, J., AJMONE-MARSAN, P., LENSTRA, J.A. The European Cattle Genetic Diversity consortium Differentiation of European Cattle by AFLP fingerprinting. *Animal Genetics* 38: (2007) p. 60–66

81. OLEKSYK, T.K., M.W. SMITH & S.J. O'BRIEN, Genome-wide scans for footprints of natural selection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365: (2010) p. 185-205.
82. PARISSET, L., S. JOOST, P. AJMONE MARSAN, A. VALENTINI & ECONOGENE CONSORTIUM, Landscape genomics and biased FST approaches reveal single nucleotide polymorphisms under selection in goat breeds of North-East Mediterranean. *BMC Genet.* 10: 7:(2009).
83. PARMA, P., FELIGINI, M., GREPPI, G. & ENNE, G. The complete coding region sequence of River buffalo (*Bubalus bubalis*) SRY gene. *DNA sequence* 15: (2004) p. 77-80
84. PETER, C., BRUFORD, M., PEREZ, T., DALAMITRA, S., HEWITT, G., ERHARDT, G. & THE ECONOGEN CONSORTIUM. Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Animal Genetics* 38: (2007) p. 37-44
85. PEAKALL, R. & SMOUSE P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes.* 6: (2006) p. 288-295
86. PEAKALL, R. & SMOUSE P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: (2012) p. 2537-2539
87. PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M., & DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: (2000) p. 945-959
88. QUINTANILLA-QUINTERO, SR., GÓMEZ-GUTIÉRREZ, A., ORTIZ-VALDIVIESO, P., BERNAL- VILLEGAS, J.E. Phylogenetic relationships among genera of the subtribe onciidiinae (epidendroideae: orchidaceae) and a new genus: santanderella. *Phytologia.*, 93:(3): (2011) p. 388 - 406
89. RALSER, M., QUERFURTH, R., WARNATZ, HJ., LEHRACH, H., YASPO, M.L., KROBITSCH, S. An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 1;347(3): (2006) p. 747-751
90. RITZ, L.R., GLOWATZKI, M-L., MACHUGH, D.E. AND GAILLARD, C. Phylogenetic analysis of the tribe Bovini using microsatellites. *Animal Genetics* 31: (2000) p.178-185.
91. SANCRISTOBAL, M., CHEVALET, C., HALEY, C.S., JOOSTEN, R., RATTINK, A.P., HARLIZIUS, B., GROENEN, M.A., AMIGUES, Y., BOSCHER, M.Y., RUSSELL, G., LAW, A., DAVOLI, R., RUSSO, V., DÉSAUTÉS, C., ALDERSON, L., FIMLAND, E., BAGGA, M., DELGADO, J.V., VEGA-PLA, J.L., MARTINEZ, A.M., RAMOS, M., GLODEK, P., MEYER, J.N., GANDINI, G.C., MATASSINO, D., PLASTOW, G.S., SIGGENS, K.W., LAVAL, G., ARCHIBALD, A.L., MILAN, D., HAMMOND, K., CARDELLINO, R. Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. *Animal Genetics.*, 37: (2006) p.189-198
92. SANINT, L. F. Pasado, presente y futuro del búfalo en Colombia. III Simposio Búfalo de las Américas 2006 en Medellín. (2006) p. 32-4
93. SELKOE, KIMBERLY A. AND TOONEN ROBERT J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters.* 9: (2006) p.615-629
94. SENO, L.O., CARDOSO, V. L., & TONHATI, H. Responses to selection for milk traits in dairy buffaloes. *Genetics and Molecular Research* 5: (2006) p. 790-796
95. SHEIKH, S.I., BERGER-WOLF, T.Y., ASHLEY, M.V., CABALLERO, I.C., CHAOVALITWONGSE, W., DASGUPTA, B. Error tolerant sibship reconstruction in wild populations. *Comput Syst Bioinformatics Conf.* (7): (2008) p. 273-284.
96. SHRIVER, M.D., JIN, L., BOERWINKLE, E., DEKA, R., FERRELL, R.E., & CHAKRABORTY, R. A. Novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. *Molecular Biology and Evolution* 12, p. 914-920.
97. SIMONSEN, B.T., SIEGISMUND, H.R., ARCTANDER, P. Population structure of African buffalo inferred from mtDNA sequences and microsatellite loci: high variation but low differentiation. *Molecular Ecology.* (7): (1998) p. 225-237

98. SLATKIN M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: (1995) p. 457-462.
99. SMITH LM, BURGOYNE LA. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. *BMC Ecol.* 8:4:4: (2004) p. 1-11
100. STELLA, A., P. AJMONE-MARSAN, B. LAZZARI & P. BOETTCHER, identification of selection signatures in cattle breeds selected for dairy production. *Genetics* 185: (2010 ) p. 1451-1461
101. TABERLET, P., A. VALENTINI, H.R. REZAEI, S. NADERI, F. POMPANON, R. NEGRINI & P. AJMONE-MARSAN. Are cattle, sheep and goats endangered species? *Molecular Ecology* 17: (2008) p. 275-284
102. TABERLET, P., VALENTINI, A., REZAEI, H.R., NADERI, S., POMPANON, F., NEGRINI, R., AJMONE-MARSAN, P. Are cattle, sheep, and goats endangered species? *Mol Ecol.*, 17:(1): 2:(2008) p. 75-84
103. Tanaka, K., Solis, C. D., Masangkay, J. S., Maeda, K., Kawamoto, Y. & Namikawa, Y. Phylogenetic relationship among all living species of the genus *Bubalus* based on DNA sequences of the cytochrome b gene. *Biochem. Genet.* 34: (1996) p. 443-452.
104. TAPIO, I., VÄRV, S., BENNEWITZ, J., MALEVICIUTE, J., FIMLAND, E., GRISLIS, Z., MEUWISSEN, T.H., MICEIKIENE, I., OLSAKER, I., VIINALASS, H., VILKKI, J., KANTANEN, J. Prioritization for conservation of northern European cattle breeds based on analysis of microsatellite data. *Conservation Biology.*, 20:(2006) p. 1768 – 1779
105. VAN HOOFT, W.F., GROEN, A.F., PRINS, H.H. Phylogeography of the African buffalo based on mitochondrial and Y-chromosomal loci: Pleistocene origin and population expansion of the Cape buffalo subspecies. *Mol. Ecol.* 11(2): (2002) p.267-79
106. VAN HOOFT, P., GREYLING, B.J., PRINS, H.H.T., GETZ, W.M., JOLLES, A.E. Selection at the Y chromosome of the African buffalo driven by rainfall. (2007) *PLoS ONE* 10.
107. VAN HOOFT, W.F., PRINS, H.H.T, GETZ, W.M., JOLLES, A.E., VAN WIEREN, S.E. Rainfall-driven sex-ratio genes in African buffalo suggested by correlations between Y-chromosomal haplotype frequencies and foetal sex ratio. *BMC Evol Biol.* (2010) p.10
108. VALE, W., & RIBEIRO, H. Características reproductivas dos bubalinos, puberdade, ciclo estral, involucao uterina e atividade ovariana no pós-parto. En: memorias del III simposio búfalos de las américas; Septiembre 6-8; Medellin- Colombia. (2006) p. 1-8
109. VIJH, R. K., TANTIA, M. S., MISHRA, B & BHARANI-KUMAR, S.T. Genetic relationship and diversity analysis of Indian water buffalo (*Bubalus bubalis*). *American Society of Animal Science. Journal of Animal Science* (86): (2008) p.1495–1502.
110. WALLIN, J.M., HOLT, C.L., LAZARUK, K.D., NGUYEN, T.H., WALSH, P.S. Constructing universal multiplex PCR systems for comparative genotyping. *J. Forensic Sci.* (47): (2002) p.52–65.
111. ZHANG, Y. SUN, D. YU, Y. ZHANG, Y. Genetic diversity and differentiation of Chinese domestic buffalo based on 30 microsatellite markers. *Animal Genetics*, 38: (2007) p. 569-575