



Gobierno
Bolivariano
de Venezuela

Ministerio del Poder Popular
para la Agricultura y Tierras

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas

Zootecnia
tropical

Zootecnia
tropical

Zootecnia
tropical

tropical

ecnia
tropical

Zootecnia
tropical

Zootecnia tropical

Depósito Legal: pp. 198302AR214

ISSN: 0798 - 7269

AÑO 32 VOL. 32 No. 3 2014

ZOOTECNIA TROPICAL

Zootecnia Trop.

**Revista trimestral del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas,
Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras
Maracay, Venezuela**

TABLA DE CONTENIDO Vol. 32 N° 3

Artículos Científicos

| | |
|--|-----|
| Manrique A. J. y Colmenares O. Selección de abejas propolizadoras en el municipio Guaicaipuro del estado Miranda, Venezuela..... | 195 |
| Galíndez R., Peña I., Albarrán Á. y Prospert J. Peso e indicadores de calidad interna del huevo de cuatro razas de gallinas reproductoras venezolanas | 207 |
| Ruiz A. Z. y Pérez Machado J. R. Relación de expresión del IGF-IR en secreciones uterinas de vacas de diferentes razas y grados de endometritis posparto | 217 |
| Vásquez G. S., Salazar E., Dickson L. y Castro L. Caracterización genética de la raza bovina Carora mediante el uso de marcadores microsatélites..... | 227 |
| Carreño Pérez Y. Y., Salazar E., Martínez Marrero S., Castillo González O. E. y Castro Chacín L. D. Variabilidad genética en cachamas de Los Llanos venezolanos, usando marcadores RAPD..... | 237 |
| Salazar E., Crespo V., Manrique A. J., Castro L., Vallejo E. y Torrealba M. Caracterización molecular preliminar de abejas Angelita (<i>Tetragonisca Angustula</i>) del estado Guárico mediante marcadores moleculares RAPD..... | 247 |
| De La Rosa O., Vásquez Marín B. J., Márques Urdaneta A. F. y Dickson L. Variabilidad genética en el microsatélite "A" del extremo 3'UTR del gen <i>SLC11A1</i> en un rebaño de cabras Criollas (<i>Capra hircus</i>)..... | 257 |
| Nota Técnica | |
| Muñoz Milano G. M., Granda Y. y Rosas B. Caracterización Etnológica del ecotipo "Caprino Criollo" de la Microrregión Cauderales, Lara, Venezuela..... | 269 |
| Vásquez Marín B. J., De La Rosa O., Márques Urdaneta A. F., Seijas Pedroza G. y Aranguren Méndez J. A. Optimización del análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple. Caso gen del receptor de hormona Luteinizante bovino | 275 |
| Instrucciones al autor | 287 |

TABLE OF CONTENTS Vol. 32 N° 3

Scientific Articles

| | |
|--|-----|
| Manrique A. J. and Colmenares O. Selección de abejas propolizadoras en el municipio Guaicaipuro del estado Miranda, Venezuela..... | 195 |
| Galíndez R., Peña I., Albarrán Á. and Prospert J. Weight and egg`s internal quality indicators of four breeds of Venezuelan breeding hens | 207 |
| Ruiz A. Z. and Pérez Machado J. R. Relationship of IGF-IR expression in uterine secretions of cows of different breeds and levels of postpartum endometritis..... | 217 |
| Vásquez G. S., Salazar E., Dickson L. and Castro L. Caracterización genética de la raza bovina Carora mediante el uso de marcadores microsatélites..... | 227 |
| Carreño Pérez Y. Y., Salazar E., Martínez Marrero S., Castillo González O. E. and Castro Chacín L. D. Genetic variability of the french angelfish from the Venezuelan plains using RAPD markers..... | 237 |
| Salazar E., Crespo V., Manrique A. J., Castro L., Vallejo E. and Torrealba M. Preliminary molecular characterization of Angelita Bees (<i>Tetragonisca Angustula</i>) from Guarico State through RAPD markers | 247 |
| De La Rosa O., Vásquez Marín B. J., Márques Urdaneta A. F. and Dickson L. Genetic variability in the microsatellite “A” at region 3’UTR of the <i>SLC11A1</i> gene in a herd of native goats (<i>Capra hircus</i>) | 257 |
| Technical note | |
| Muñoz Milano G. M., Granda Y. and Rosas B. Ethnological Characterization of the “Creole Goat” ecotype of the Cauderales Microrregion, Lara, Venezuela..... | 269 |
| Vásquez Marín B. J., De La Rosa O., Márques Urdaneta A. F., Seijas Pedroza G. and Aranguren Méndez J. A. Optimization of single-strand conformational polymorphis manalysis. Bovine luteinizing hormone receptor gene case..... | 275 |
| Instructions to the author | 287 |

Selección de abejas propolizadoras en el municipio Guaicaipuro del estado Miranda, Venezuela

Propolised honeybee's selection in the Municipality Guaicaipuro of Miranda state, Venezuela

Antonio J. Manrique¹ y Omar Colmenares²

¹Federación Bolivariana de Apicultores de Venezuela (FEBOAPIVE). Correo electrónico: tonyman77@terra.com.

²Universidad Rómulo Gallegos (UNERG). Área de Agronomía. Correo electrónico: omarcolqui@gmail.com

RESUMEN

El presente trabajo de investigación, se realizó desde febrero de 2009 hasta febrero de 2012 en la Estación Experimental "Jaime Henao Jaramillo" de la Universidad Central de Venezuela, ubicada en municipio Guaicaipuro, estado Miranda, Venezuela. Algunas colonias de abejas, *Apis mellifera* producen más propóleos que otras, esta característica tiene control genético y en general, se producen propóleos por raspado, dado que en ciertas zonas las mallas se encuentran llenas de cera y no de propóleos. Los objetivos fueron: Seleccionar y mejorar genéticamente abejas propolizadoras y determinar la estacionalidad en la producción de propóleos con el uso de mallas colectoras de plástico. La población base fue de 50 colonias de abejas africanizadas, siendo evaluadas 25. Se seleccionó la mejor colonia para obtener las madres de la siguiente generación, evaluando 11 colonias seleccionadas (S) versus 13 colonias no seleccionadas (NS), evaluadas durante dos años (A_1 y A_2) consecutivos. Los resultados obtenidos muestran que las Sx_{A_1} , Sx_{A_2} fueron ($P < 0,05$) superiores a las NSx_{A_1} y NSx_{A_2} , con valores medios en gramos de propóleos/colonia/año de 623,36; 684,45; 365,61 y 420,61, respectivamente. La producción de propóleos fue superior en los meses de diciembre, enero y febrero. Se determina que las abejas responden a la selección para aumentar la producción de propóleos, hubo estacionalidad en la recolección de propóleos y las mallas funcionan para colectarlo, en las condiciones evaluadas.

Palabras claves: *Apis mellifera*, mejoramiento genético, propóleos, selección.

ABSTRACT

The present research was done since february 2009 to february 2012, in Experimental Station "Jaime Henao Jaramillo", Universidad Central de Venezuela, located in Guaicaipuro municipality, Miranda state, Venezuela. Some colonies of bees (*Apis mellifera*) produce more propolis than others, and this characteristic is genetically controlled; usually these propolis are produced by scraping, doubt to in certain areas the nets are full of beeswax and not with propolis. The objectives were to select and improve (genetically) propolis collector bees, and to determine seasonality in propolis production, using collector plastic screen. Base population were 50 colonies of Africanized honey bees, being evaluated 25. The best colony was selected as parent of the next generation, evaluating 11 selected colonies (S_1) versus 13 non selected colonies (NS_1) the first year, and 11 selected colonies (S_2) versus 13 non selected colonies (NS_2) thesecond year. Obtained results indicated higher values of propolis production in S_1 and S_2 , statistically different ($P < 0.05$) to NS_1 and NS_2 , with averages of 623.36; 684.45; 365.61 y 420.61 g of propolis/colony/year, respectively. The propolis production was superior during December, January and February. Determined the bees respond to selection to improve the propolis production, there was seasonality collection propolis and the used nets were useful to collect them, in the evaluated conditions.

Key word: *Apis mellifera*, breeding, propolis, selection.

INTRODUCCIÓN

El principal objetivo en el mejoramiento genético es la obtención de linajes con características deseables, por medio de selección (Gramacho, 2008).

A pesar de diversos estudios realizados, por Mackensen y Nye, (1966), Crow y Roberts (1950), Ruttner (1968), Rinderer (1977) y Harbo (1996), la evaluación genética en abejas no es tan avanzada como en otras especies animales. Ello, se debe a que en abejas, el parentesco en una colonia puede variar de 0,25 a 0,75 (Crow y Roberts, 1950; Laidlaw y Page, 1984) debido al apareamiento múltiple de las reinas con promedio de 7-17 machos, aunado a la presencia de machos haploides.

La reina ofrece contribución ambiental a sus hijas obreras, por medio de la cantidad y calidad de huevos producidos y por la cantidad de feromonas (Bienefeld y Pirchner, 1990). Esto, se puede medir directamente en la reina, a través de su progenie. Este impacto, sobre las obreras es estrictamente ambiental, mientras que, la habilidad de la reina de producir huevos en cantidades suficientes y producir feromonas está determinado por el genotipo de la reina y por el ambiente (Bienefeld *et al.*, 2007). Estos mismos autores señalan que los índices de selección, se están volviendo poco comunes, en función de la influencia ambiental, y a las diferencias genéticas en los apareamientos.

Es posible, utilizar mejor la variabilidad genética existente en una población por medio de esquemas de selección actuales, y de esa forma, reducir la tasa de consanguinidad y su efecto depresivo, sin perjudicar el progreso genético (Sánchez *et al.*, 1999). En abejas, las relaciones genéticas y la consanguinidad son dependientes del método de mejoramiento y del sistema de apareamiento utilizados (Bienefeld *et al.*, 2007). Así mismo, muchas de las características de valor económico, tales como producción de miel, propóleos y polen, pueden ser medidas sólo en las colonias, por lo tanto, la identificación de características asociadas a la producción y de fácil medición, son utilizadas para selección indirecta (Souza *et al.*, 2002).

El sistema haplo-diploide en *Apis mellifera*, le permite al zángano transferir a su descendencia

todo el material genético proveniente de su madre (Laidlaw y Page, 1984). De esta forma, las características expresadas por la colonia, tales como producción de propóleos, miel, jalea real y polen, tienen su origen en gran medida en la reina.

En función de estas relaciones, el tamaño de las reinas, se ha asociado fenotípica y genéticamente con características productivas y de comportamiento de las colonias. Kahya *et al.*, (2008); Hoopingarner y Farrar (1959), afirman, que el peso al nacer de las reinas esta correlacionado con su potencial reproductivo; A tal efecto, Faquinello (2007), asoció características morfométricas de reinas recién nacidas, con producción de jalea real en minirecrías y encontró, potencial de selección para producción, basado en el ancho del abdomen.

Según Page y Laidlaw (1997), para lograr éxitos en el mejoramiento genético selectivo en abejas, se necesitan cuatro elementos, 1) Selección; las colonias deben estar identificadas y deben existir entre ellas diferencias seleccionables que formen el potencial de la población parental; 2) Conservación de la variabilidad genética; 3) Control de los apareamientos y 4) Mantenimiento de colonias reservas durante todo el programa. Por su parte, Maia (2009) añade dos elementos, 1) Estimación de parámetros genéticos, que posibiliten la predicción del valor genético del animal y por ende, la identificación de los animales genéticamente superiores y 2) Ofrecer un subsidio a los apicultores, como forma de asesoría en la optimización de los recursos genéticos presentes en sus apiarios.

La producción de propóleos es una propiedad innata de las abejas; diversos factores están involucrados en este proceso y deben ser observados, cuando se busca un aumento de la productividad. Dentro de estos factores, están la estacionalidad y el tipo de colector utilizado (Breyer 1995; Moura, 2001).

La estacionalidad posee gran influencia en la actividad de colecta de propóleos. Los patrones estacionales observados han sido explicados, principalmente, por las variaciones de la temperatura, insolación, intensidad luminosa, humedad relativa y precipitación, entre otros factores (Kerr *et al.*, 1970)

Generalmente, el propóleo es colectado por el apicultor mediante el raspado de las partes móviles de la colmena, pudiendo presentar materias contaminantes como pedazos de madera, tierra y otros materiales. En busca de la mejora de la calidad de propóleos; otras técnicas, se han desarrollado para estimular su producción, tales como, el uso de mallas colectoras debajo de la tapa interna (entretapa), colector de propóleos inteligente (CPI), Pirassununga, entre otros.

Entretanto, la producción de propóleos puede variar conforme a la técnica de colecta usada por el apicultor (Breyer, 1995; Brighenti e Guimarães, 2000; Cunha e Evangelista, 2000; Moura, 2001; Thimann y Manrique, 2001).

Mediante la recolección de resinas, bálsamos, ceras, aceites volátiles y polen; las abejas producen propóleos, producto que varía en las proporciones de sus componentes, dada la biodiversidad existente en el lugar donde se encuentre la colmena, a las variaciones estacionales y también, al potencial genético de las abejas en la cosecha de estos materiales (Meyer, 1956; Ghisalberti, 1979; Crane, 1990; Woyke, 1992). Por lo tanto, la instalación de las colonias de abejas en zonas con abundancia de plantas productoras de precursores de propóleos, junto con programas de selección y mejoramiento genético, puede incrementar la producción de propóleos, generando mayores ganancias en la apicultura (Breyer, 1995; Manrique y Soares, 2002a; Tiemilnoue *et al.*, 2007; Pickler, 2009). La composición del propóleos depende en gran medida del origen botánico (Bankova, 2009), especie de abeja (Londoño *et al.*, 2008), época y método de recolección.

En climas templados el propóleos, se produce entre la primavera y el verano, en otras ocasiones a veces a principios de otoño. Mientras que bajo condiciones tropicales puede producirse durante casi todo el año. (Manrique, 2001).

Con respecto a los métodos de recolección, se han utilizado, el método tradicional de raspado y el empleo de mallas plásticas. Generalmente; del primero, se obtienen propóleos con gran cantidad de impurezas (Idarraga, 2003) y contaminantes, como metales pesados (plomo,

hierro y cobre) que pueden provenir de la atmósfera o ser incorporados en la cosecha y la extracción (Sales *et al.*, 2006).

El mejoramiento genético, es uno de los grandes aliados del humano en la agricultura actual, ayudándolo en la mejora de la calidad y productividad. En la apicultura esto sucede mediante la sustitución de reinas poco productivas por reinas jóvenes y seleccionadas, fortaleciendo y aumentando la población de obreras y por ende la productividad de la colonia.

Muller *et al.*, (2010), evaluaron 103 colonias durante cinco meses y tres colectas, el valor máximo fue de 63,6 gramos y el menor 0,04 gramos. Resaltan que 33 colonias no produjeron propóleos, sugiriendo, que estas colonias tienen bajo potencial propolizador, poca habilidad genética de colectar resinas o de depositar propóleos fuera de los colectores.

El propóleos es depositado preferencialmente en los laterales de los colectores, que reciben mayor intensidad de rayos solares y vientos, principalmente en el invierno. Las colmenas con reinas hijas de madres seleccionadas acumularon entre 5 y 34 veces más propóleos que las colonias con reinas hijas de madres poco propolizadoras (Nicodemo *et al.*, 2012). La producción de las primeras fue de 16 gramos/colonia en los dos meses de evaluación. Las pequeñas cantidades de propóleos obtenidos, aún en las colmenas más productivas, se debe al hecho de que la región del experimento, se caracteriza por el monocultivo de caña de azúcar, la zona carece de plantas que proporcionen materias primas para el propóleos.

De las 36 colmenas que fueron incluidas en el proceso selectivo, siete fueron eliminadas, porque mostraron un bajo rendimiento en la producción de cría y alimentación, además de no producir propóleos. La producción de propóleos no mostró una distribución normal, ya que 16 colmenas (55,2% del total) acumularon menos de un gramo de propóleos en un plazo de dos meses (Nicodemo *et al.*, 2012). La cantidad de propóleos producido, puede variar de 300 gramos/colonia/año, según Prost-Jeana 700 gramos/colonia/año, mediante la implementación de técnicas de estímulos (Breyer, 1995).

Los objetivos del trabajo fueron, 1) Seleccionar y mejorar genéticamente abejas propolizadoras y 2) Determinar la estacionalidad de la producción de propóleos con el uso de mallas colectoras.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo, se realizó desde febrero de 2009 hasta febrero de 2012, en la Estación Experimental "Jaime Henao Jaramillo" de la Universidad Central de Venezuela, ubicada en municipio Guaicaipuro, estado Miranda, Venezuela, con una superficie de 453 hectáreas, localizada a 25 kilómetros de Caracas. Situada entre los 10°21' y 10°23' de latitud Norte y entre los 63°53' y 66°54' de longitud Oeste. La región, se encuentra enmarcada dentro de la zona de vida del bosque húmedo premontano (bhp), a 1410 m.s.n.m. (Ewel y Madriz, 1968; Holdridge, 1957), con una precipitación anual de 1.250 mm, distribuida homogéneamente entre mayo-noviembre con precipitaciones aisladas en el período diciembre-abril, sin embargo, desde abril de 2010 hasta febrero de 2012, no ocurrió un mes seco. La temperatura promedio fue de 18 °C con mínima de 7 °C y máxima de 27 °C y la humedad relativa media de 80%. La vegetación predominante estuvo conformada por: copey (*Clusiainor*), eucalipto (*Eucalyptusglobulus.*), pino caribe (*Pinuscaribaea*), tara (*Oyedaeaverbesinoides*), zamurito (*Oliganthessp.*), sangregao (*Crotongossypiifolius* Vahl), matagusano (*Clibadiumsp.*), bucare (*Erythrinapoeppigiana*), guamo (*Inga sp*), café (*Coffeaarabica*), flor amarilla (*Sclerocarpuscoffeaecolus*), tarita (*Verbesinaturbacensis*), araña gato (*Mimosa pudica*), majagua (*Heliocarpusamericanus*) y árboles de la familia Myrtaceae. Toda esta vegetación produce cantidades elevadas de néctar, polen y resinas durante casi todo el año (Manrique, 1996; Gomez, 1986)

Selección de abejas

Se realizó en dos etapas.

1) Primera etapa (Selección de la población base)

La población base (o generación parental) para la selección estuvo formada por 50 colonias de abejas africanizadas *A. mellifera* pero debido a pérdidas por causas naturales, pillajes y

robos, fueron evaluadas finalmente 25 colonias. Durante el periodo de febrero 2009 a febrero de 2010, se realizó la selección de la mejor colonia, la cual fue usada como matriz en la siguiente generación (F_1), basado en los registros de producción de propóleos, que tuviese una productividad al menos de 40% mayor que el promedio general de las colonias durante el periodo evaluado. En este periodo no se realizó cambio de reinas, siendo sustituidas por las propias abejas de cada colmena.

Todas las colonias fueron identificadas con un número en la parte posterior de la cámara de cría. Las abejas no fueron alimentadas durante todo el proceso experimental y recibieron el mismo manejo. Las colmenas estaban compuestas de una cámara de cría Langstroth y dos alzas mieleras con una población aproximada de más de 70.000 abejas. La cantidad de abejas puede influenciar el desempeño de la colonia, debido a su crecimiento diferenciado, aun cuando reciban el mismo tratamiento alimenticio o manejo general (Topal *et al.*, 2008).

Por tal razón, el número de abejas de cada colonia fue estimado indirectamente, mediante el conteo de cuadros con abejas adultas adheridas a los mismos.

2) Segunda etapa

Esta etapa, de marzo 2010 a febrero de 2012, se realizó en un solo apiario con 24 colonias de abejas. Con el uso de la técnica de Doolittle (1899), se produjeron 11 reinas hijas (F_1) de la reina madre seleccionada (F_0) en la etapa anterior. Estas reinas se introdujeron en núcleos de 21,5l de cinco cuadros para su respectiva fecundación en vuelo libre. Después de fecundadas y cuando estaban ovipositando, estas reinas (F_1), eran marcadas en el tórax, se les recortaba parte del ala derecha y, se introducían en sustitución de las reinas de 11 colonias, para ser probadas contra 13 colonias con reinas no seleccionadas, a las cuales no se les cambiaba las reinas, permitiendo que ellas mismas cambiaran la reina.

Al finalizar el periodo de evaluación de 2010-2011, se seleccionó la reina de la colonia (la número 14) más productora de propóleos, para producir reinas hijas (F_2) que se fecundaron en vuelo libre e igualmente, sustituyeron las reinas

F₁ de 11 colonias y se probaron versus las otras 13 colonias no seleccionadas, evaluando su producción de propóleos de marzo de 2011 a febrero de 2012.

Producción de propóleos

La colecta de propóleos, se realizó mensualmente durante el periodo marzo de 2009 a febrero de 2012, abarcando ambas etapas. Se usaron mallas plásticas con orificios romboides de 3mm x 3mm (Figura 1) como colector, instaladas entre el alza y la tapa interna. Las mallas eran retiradas mensualmente y se sustituían inmediatamente por otra no propolizada. También, se raspaba el propóleos acumulado entre la malla y la parte superior de los bastidores, después de retirar las mallas. Inmediatamente, las mallas y el propóleos raspado se colocaban en bolsas negras para proteger la calidad del propóleos. Posteriormente, se congelaban durante 24 horas y se retiraba el propóleos al torcer las mallas y rasparlas con una palanca (pata de cabra).

Todas las muestras obtenidas fueron pesadas y registradas las cantidades de propóleos producidas por cada colmena.

Tratamientos

Las colonias fueron distribuidas en dos grupos, el primero conformado por 11 colonias a las cuales, se les sustituyeron las reinas obtenidas en F₁ y F₂ y se denominaron S, el segundo grupo estuvo conformado por 13 colonias donde no se sustituyeron las reinas y se identificaron como NS.

Ambos grupos fueron evaluados durante dos periodos anuales (2010-2011 y 2011-2012, y durante doce meses consecutivos (desde marzo hasta febrero del siguiente año).

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados empleando un modelo completamente aleatorizado con arreglo factorial, siendo considerados los

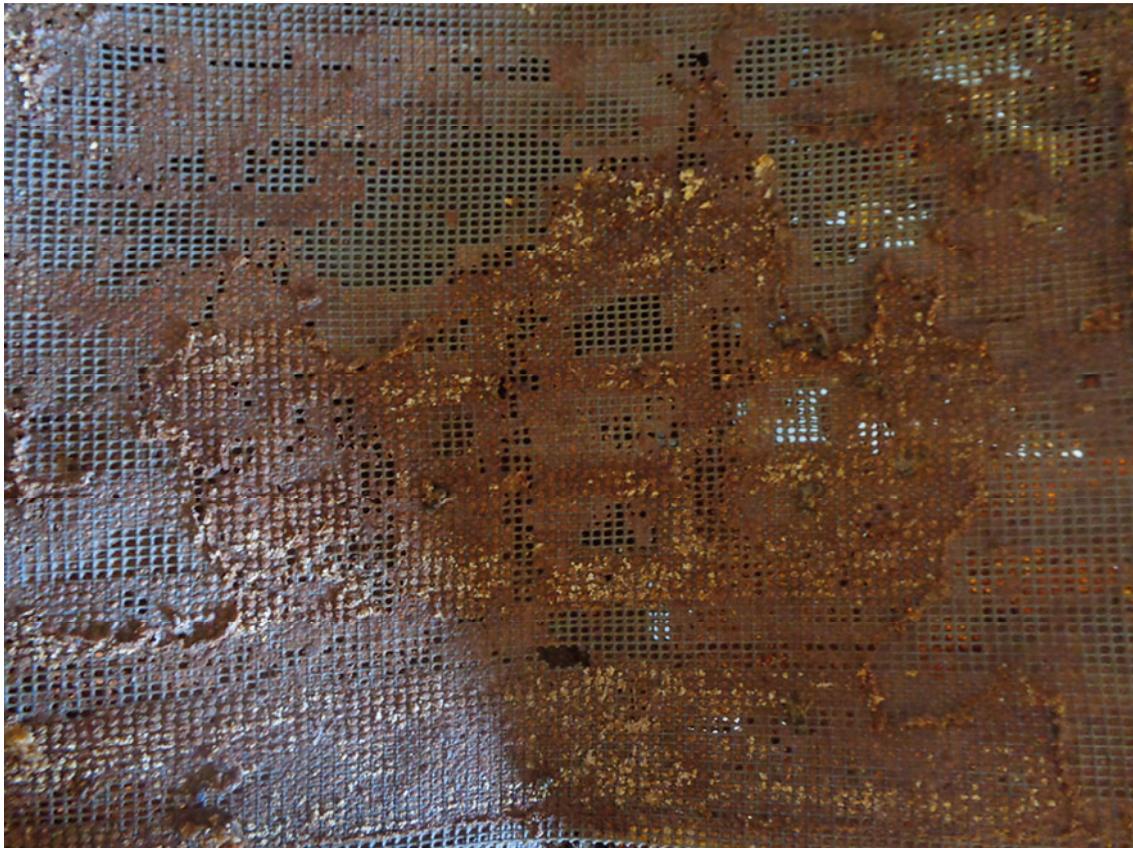


Figura 1. Malla colectora de propóleos.

factores grupo de colonias (S y NS), año (A_1 y A_2) y mes (marzo a febrero). Las medias obtenidas fueron comparadas usando la prueba de Tukey con la utilización del SAS, Derr y Everitt (2002)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección inicial de la población parental

El valor promedio de las colonias en la evaluación preliminar fue de 390,44 g/colonia/año, con mínima de 164 g y máxima producción de 662 g (colonia 7) que fue seleccionada como matriz para producir reinas hijas de la siguiente generación (F_1). La colonia 7 mostró una superioridad productiva de 167% respecto de la media de la población. Este comportamiento productivo, pudiera ser explicado principalmente por características genéticas de las abejas y por la edad de la reina (Manrique y Soares, 2002a), dado que todas las colonias tuvieron el mismo manejo. El tamaño poblacional no influencia la producción de propóleos, según verificaron Manrique y Soares (2002b) quienes iniciaron un proceso de mejoramiento genético con colonias de abejas silvestres no mejoradas y obtuvieron resultados donde las colonias más pobladas colectaron menos propóleos que las menos pobladas.

Los resultados promedios del presente ensayo, superan a los obtenidos en Uruguay por Martínez (1991), quien refiere una producción media entre 102 y 163 g/colonia con el uso de mallas, y son muy superiores a los obtenidos por el mismo autor, con rendimientos de 50-70 g de propóleos/colonia, mediante la técnica del raspado del propóleos. Igualmente son superiores a los resultados referidos por Tiemilnoue *et al.* (2007) durante un año en Botucatu, Brasil, quienes obtuvieron una producción media de 114,8±70,6 g/colonia/año con el colector inteligente de propóleos (CPI), 120,9±49,8 g/colonia/año con mallas plásticas y 85,7±49,2 g/colonia/año mediante el raspado, aunque no hubo diferencias estadísticas. Pastore (2007), realizó experimentos de colecta de propóleos en la región de Jaboticabal, São Paulo, Brasil, sin alimentar las colonias y obtuvo un promedio de 104,68 g/colonia/año, con mayor producción en el otoño (marzo-junio) con media de 45 gramos.

La Figura 2, muestra la producción promedio de propóleos en la evaluación preliminar. La diferencia porcentual en la producción de propóleos entre las colonias S y NS fue de 73,65% a favor de las primeras. Se observa, un comportamiento estacional en la producción promedio de propóleos, con una diferencia significativa ($P<0,05$) para los meses de diciembre, enero y febrero. Estos resultados pueden deberse a la mayor oferta de alimentos (néctar y polen) y a una temperatura más baja en la madrugada (mínimas variables entre 10 °C y 12 °C) que estimula a las abejas a coleccionar más propóleos para protegerse del frío, pero con el agregado de que en el día es superior a los 20°C, dado que si fuesen menores, inhibiría su comportamiento colector. No obstante, este comportamiento productivo diverge de lo que ocurre en climas templados, donde las abejas coleccionan la mayor cantidad de resinas en los periodos menos fríos. Ghisalberti (1979) menciona, que en las regiones templadas del hemisferio norte, las abejas coleccionan propóleos en el periodo más caliente (desde finales de primavera, verano y principio de otoño).

Por otro lado, es notoria la baja producción de propóleos durante el mes de agosto en todo el periodo muestreado (aun cuando en dicho mes la oferta de néctar y producción de miel es buena), dado que las abejas llenan las mallas de cera y no de propóleos, lo cual pudiera deberse tanto a la facilidad de transformar néctar en cera y a la intensidad de las lluvias, dado que en ese mes las lluvias son abundantes y la mayoría de los días permanecen nublados con muy poco sol, inhibiendo el comportamiento colector de resinas.

Segunda y tercera generación F_1 y F_2

En la Figura 3, se muestran los datos de producción media de propóleos de las colonias F_1 y F_2 , donde, se presentaron diferencias estadísticas ($P<0,05$) entre las colonias con reinas seleccionadas (S) y las no seleccionadas (NS), según la prueba de Tukey. La media de las colonias S fue de 623,36 g de propóleos/año, mientras que el promedio de las colonias NS fue 365,61 g de propóleos/año, con una media general de 483,75 g/colonia/año.

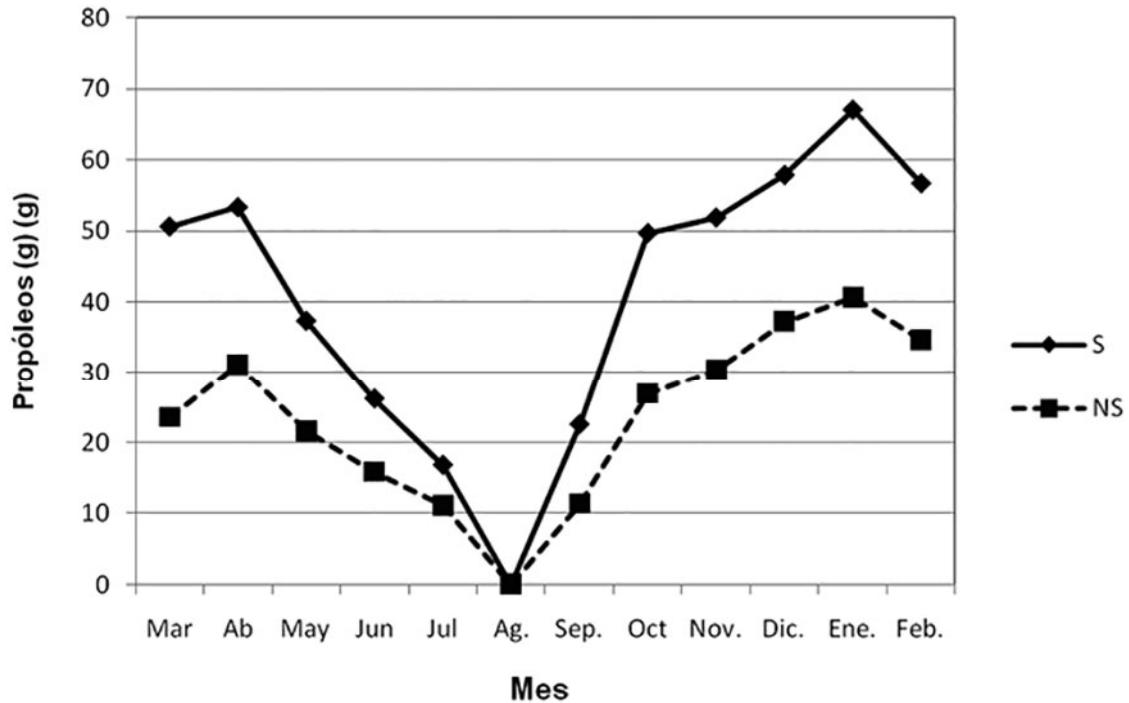


Figura 2. Producción promedio de propóleos (g/colonia/mes) para los dos grupos de colonias en la evaluación preliminar. S (Más propolizadoras) y NS (Menos propolizadoras) durante el periodo marzo de 2009 a febrero de 2010.

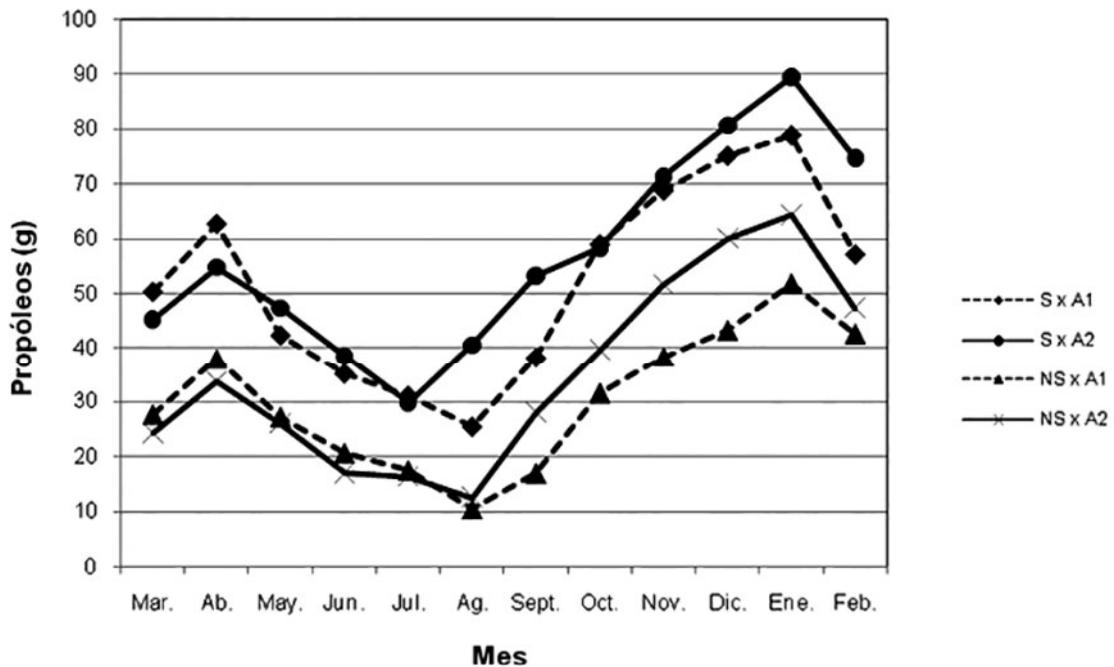


Figura 3. Producción de propóleos (g/colonia/mes) para poblaciones seleccionadas y no seleccionada durante los dos años de evaluación (desde marzo de 2010 a febrero de 2012).

Resalta el hecho, de que la mejora productiva global respecto a la población parental fue de 23,89% (93,31 g), aun cuando, la producción de las colonias S duplica las de las NS. A tal efecto, Vencovsky y Kerr (1982) concluyeron que usando el método de sustitución de las 25% peores reinas, por hijas de las 25% mejores; la productividad aumentaba en un 20% en las próximas generaciones. No obstante, en términos porcentuales la mejora es mucho menor que la reportada por Manrique y Soares (2002b), quienes obtuvieron mejoras de 181,61% hasta 334,27% en la producción de propóleos de una generación a otra en colonias seleccionadas en el estado de São Paulo, bajo condiciones de muy baja productividad. Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente ensayo, contrastan con los de Pickler (2009), quien refiere que la población base, tuvo mejor producción de propóleos con respecto a la población hija seleccionada, lo cual, pudo deberse más a un efecto ambiental que genético, al muestrear solamente en tres meses en años sucesivos.

Sin embargo, es importante resaltar que en los períodos evaluados, se mantienen diferencias porcentuales similares a la diferencia encontrada en la población base entre las colonias seleccionadas y no seleccionadas, la cual fue de 73,65%, con valores de 78,69% y 81,09% para F_1 y F_2 , respectivamente; Este resultado sugiere, que el mayor progreso genético se produciría con la selección y eliminación de las reinas de las colonias poco propolizadoras, y no tanto con la introducción de hembras mejoradas en un grupo, en sistemas que utilicen la fecundación libre en vuelo, debido a que en la sustitución natural de las reinas de las colonias no seleccionadas existe una elevada posibilidad que las nuevas reinas se aparen con zánganos de las colonias seleccionadas, dado el carácter de apareamiento múltiple de las reinas.

CONCLUSIONES

El mayor impacto en un programa de mejoramiento genético para producción de propóleos, se logra con la eliminación de colonias poco propolizadoras.

La sustitución de reinas mejoradoras puede producir cambios porcentuales menores, de

entre 2 y 5%, en poblaciones sometidas a fecundación en vuelo libre.

Se observó una estacionalidad en la producción de propóleos, obteniéndose los valores más altos durante los meses de diciembre, enero y febrero.

LITERATURA CITADA

- Bankova, V. 2009. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(2):23–28.
- Bienefeld, K. and F. Pirchner. 1990. Heritabilities for several colony traits in the honeybee (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie*, 21(2): 175-183.
- Bienefeld, K., K. Ehrhardt and F. Reinhardt. 2007. Genetic evaluation in the honey bee considering queen and worker effects. A BLUP-Animal Model Approach. *Apidologie*. 38(1): 77-85.
- Breyer H., F. E. 1995. Aspectos de produção, coleta, limpeza, classificação e acondicionamento de própolis bruta de abelhas *Apis mellifera*. Simpósio Estadual de Apicultura Do Paraná e VII Exposição de Equipamentos e materiais Apícolas. Prudentópolis, PR, Brasil. 143 p. (Resumos).
- Brighenti, D. M. e C. R. Guimarães. 2000. Análise comparativa da produção de três métodos de coleta de própolis em colmeias de *Apis mellifera*. 13º Congresso Brasileiro de Apicultura. Florianópolis, SC, Brasil. (CD-ROM).
- Crane, E. 1990. Bees and beekeeping, science, practice and world resources. New York: Cornell University Press. 614 p.
- Crow, J. and W. Roberts. 1950. Inbreeding and homozygosity in bees. *Genetics*, 25: 612-621.
- Cunha, P. M. and A. Evangelista. 2000. Análise comparativa da produção de três métodos de coleta de própolis em colmeias de *Apis mellifera*. 13º Congresso Brasileiro de

- Apicultura. Florianópolis, SC, Brasil. (CD-ROM).
- Der, G. and B. Everitt. 2002. A Handbook of Statistical Analyses using SAS. Second edition. Chapman y Hall/CRC. Boca Raton, USA. 351 p.
- Doolittle, G. M. 1899. Scientific queen-rearing. Chicago: Newman. 176 p.
- Ewel, J., y A. Madriz. 1968. Zonas de vida de Venezuela, memoria explicativa sobre el mapa ecológico. Ministerio de Agricultura y Cría. Dirección de Investigación. Caracas, Venezuela. 112 p.
- Faquinaldo, P. 2007. Avaliação genética em abelhas *Apis mellifera* africanizadas para a produção de geléia real. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR, Brasil. 53 p.
- Ghisalberti, E. L. 1979. Propolis: a review. *BeeWorld*, 60(2): 59-84.
- Gómez, R. 1986. Formaciones vegetales de importancia apícola en Venezuela. En: Manejo de la abeja africanizada. L. H. Anzola. Ed. Caracas, Venezuela. pp. 179-202.
- Gramacho, K. P. 2008. Uso do comportamento higiênico nos programas de melhoramento genético de abelhas. Anais do 17º Congresso Brasileiro de Apicultura. Belo Horizonte, MG, Brasil. (CD-ROM).
- Harbo, J. 1996. Evaluating colonies of honey bees for resistance to *Varroa jacobsoni*. *Bee science*, 4: 100-105.
- Holdridge, L. 1957. Determination of world plant formations from simple climatic data. *Science*, 105 (2727): 367-368.
- Hoopingarner, R. and L. Farrar. 1959. Genetic control of size in queen honey bees. *Journal of Economic Entomology*, 52(4): 547-548.
- Idarraga, H. 2003. El propóleo: comparación de diferentes trampas para su cosecha. *Carta Apícola*, 15 (3):1-16.
- Kahya, Y., H. Gençer and J. Woyke. 2008. Weight at emergence of honey bee (*Apis mellifera* caucasica) queens and its effect on live weight at the pre and post mating periods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2): 118-125.
- Kerr, W. E., L. S. Gonçalves e L.F. Blotta L. F. 1970. Biología comparada entre as abelhas italianas (*Apis mellifera ligustica*), africanizadas (*Apis mellifera adansonii*) e suas híbridas. Congresso Brasileiro de Apicultura. Florianópolis, PR, Brasil. pp. 151-185. (Resumos)
- Laidlaw, H. and R. Page. 1984. Polyandry in honey bees (*Apis mellifera* L): Sperm utilization and intracolony genetic relationship. *Genetics*, 108: 985-997.
- Londoño, A., J. Penieres, C. García, L. Carrillo, M. Quintero y S. García. 2008. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleos de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. *Tecnología en Marcha*, 21(1):49-55.
- Mackensen, O. y W. Nye. 1966. Selecting and breeding honey bees for collecting alfalfa pollen. *Journal of Apicultural Research*, 5(2):79-86.
- Maia, F. M. C. 2009. Aspectos genéticos da produção de mel e comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* africanizadas. Tese de Doutorado. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil. 81 p.
- Manrique, A. 1996. Potencial apícola del bosque húmedo premontano. *Zootecnia Tropical*, 14(1):89-97.
- Manrique, A. J. 2001. Selección de abelhas africanizadas para a melhoria na produção de propolis. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil. 108 p.
- Manrique, A. J. e A. E. E. Soares. 2002a. Selección de abelhas africanizadas para produção de propolis. *Zootecnia Tropical*, 20(2): 235-246.
- Manrique A. J. e A. E. E. Soares. 2002b. Início de um programa de seleção de abelhas

- africanizadas para a melhoria na produção de própolis e seu efeito na produção de mel. *Interciencia*, 27(6):312-316.
- Martínez, N. 1991. Empleo de mallas plásticas para producción y cosecha de propóleos. *Industria Apícola*, 5: 30-35.
- Meyer, W. 1956. Propolis bees and their activities. *Bee World*, Cardiff, 37(2): 25-36.
- Moura, L. P. P. 2001. Longevidade, produção de própolis e áreas de desenvolvimento de colmeias de *Apis mellifera* africanizada, submetida a quatro técnicas de coleta, em quatro períodos do ano. Tese de Doutorado em Zootecnia. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Jaboticabal, SP, Brasil. 111 p.
- Muller, P. H. P., K. de S. Leão e G. Venturieri. 2010. Seleção de abelha africanizada (*Apis mellifera* L., Hymenoptera, Apidae), visando maior produção de própolis, em São João de Pirabas, PA. Anais do IX Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto, SP, Brasil. 348. p. (Resumos).
- Nicodemo D., R. H. C. Couto, E. B. Malheiros and D. de Jong. 2012. Propolis production and its relation to wax production rate in *Apis mellifera* beehives. *Científica*, 40 (1): 90-96.
- Page, R. and H. Laidlaw. 1997. Honeybee genetics and breeding. In: *The hive and the honeybee*. Dadant and Sons. Graham J M (Ed), Illinois. pp. 253-257.
- Pastore, I. 2007. Métodos de coleta de própolis em colmeias de *Apis mellifera* africanizada em quatro estações do ano. Monografia Graduação em Zootecnia. Campus Marechal Cândido Rondon, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Marechal Rondon, PR, Brasil. 33 p.
- Pickler, M. A. 2009. Defensividade, higiene, produção de própolis e mel com duas gerações de *A. mellifera*. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Campus Marechal Cândido Rondon, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Marechal Rondon, PR, Brasil. 59 p.
- Prost-Jean, P. 1985. *Apicultura*. 2. ed. Madrid: Ediciones MundiPrensa. 573 p.
- Rinderer, T. 1977. A new approach to honey bee breeding at the Baton Rouge USDA, Laboratory. *American Bee Journal*, 117: 146-147.
- Ruttner, F. 1968. Methods of breeding in honey bees: Intra-racial selection or inter-racial hybrids? *Bee World*, 49: 66-72.
- Sales, A., A. Álvarez, M. R. Areal, L. Maldonado, P. Marchisio, M. Rodríguez and E. Bedascarrasbure. 2006. The effect of different propolis harvest methods on its lead contents determined by ET AAS and UV-vis. *Journal Hazardous Materials*, 137(3): 1352-1356.
- Sánchez, L., M. Toro and C. García. 1999. Improving the efficiency of artificial selection: more selection pressure with less inbreeding. *Genetics*, 151: 1103-1114.
- Souza, D. C., D. C. Cruz, L. A. O. Campos e A. J. Regazzi. 2002. Correlação entre a produção de mel e algumas características morfológicas em abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). *Ciência Rural*, 32(5): 869-872.
- Thimann, R. y A. Manrique. 2001. Recolección de propóleos en colonias de abejas africanizadas durante la temporada de lluvias en el apiario de la UNELLEZ, Guanare, Venezuela. *Revista UNELLEZ de Ciencia y Tecnología*, 16 (1): 64-73.
- Tiemilnoue, H. T., E. A. Sousa de, R. O. Orsi, S. R. C. Funari, L. M. R. C. Barreto e A. P. S. DIB. 2007. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, Caracas. 15 (2): 65-69.
- Topal, M., B. Emsen and A. Dodoluglu. 2008. Path analysis of honey yield components using different correlation coefficients in Caucasian honey bees. *Journal of Animal and Veterinaries Advances*, 7(11): 1440-1443.
- Venkovsky, R. and W. E. Kerr. 1982. Melhoramento genético em abelhas. II.

Teoria e avaliação de alguns métodos de seleção. Brazilian Journal of Genetics, 5(3): 493-503.

Woyke, L. 1992. Diurnal flight activity of African bees *Apis mellifera adansonii* in different seasons and zones of Ghana. Apidologie, 23 (2): 107-117.

Peso e indicadores de calidad interna del huevo de cuatro razas de gallinas reproductoras venezolanas

Weight and egg`s internal quality indicators of four breeds of Venezuelan breeding hens

Rafael Galíndez*, Iván Peña, Álvaro Albarrán y Juan Prospert

Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Instituto de Producción Animal. Apdo. 4579. Maracay 2101, Aragua. Venezuela. Correos electrónicos: galindezr@agr.ucv.ve, galindez70@yahoo.com

RESUMEN

Para comparar el peso y calidad interna del huevo de las razas de gallinas reproductoras venezolanas GDB, IPA, Maracay y FAGRO (UCV), se condujo un ensayo en el Laboratorio – Sección de Aves (FAGRO–UCV). Se suministró una ración entre 80 g y 110 g de alimento/ave. El programa sanitario incluyó la vacunación contra las enfermedades de Newcastle y Bronquitis Infecciosa. Se registraron 8.689 pesos de huevos y se usaron 3.142 huevos para calidad interna, incluyendo la medición de las alturas de yema y albumen con un vernier de trípode; asimismo, con estos datos, se calcularon las unidades Haugh. Se realizó análisis de varianza considerando un diseño completamente aleatorizado, incluyendo el efecto de la raza y semana de edad de la gallina en el modelo. Para analizar la calidad interna del huevo según la edad de la gallina, solo se consideró este último efecto. Se estimó la regresión lineal del peso del huevo sobre la semana de edad de la gallina. Se realizaron pruebas de “t” de Student con un nivel de significación de 0,05. Hubo diferencias ($P<0,05$) del peso del huevo entre razas a favor de las gallinas FAGRO–UCV (56,4 g), sin variaciones para la calidad interna. El peso del huevo aumentó 0,23 g sobre el promedio por cada semana de edad de la gallina. Se concluye que la raza FAGRO–UCV presenta ventajas comparativas sobre las otras en cuanto al peso del huevo y que la edad afecta ($P<0,05$) el peso de este, siendo más pesados los huevos de gallinas de mayor edad.

Palabras clave: unidades Haugh, albumen, yema, gallinas Criollas.

ABSTRACT

In order to compare weigh and internal quality of egg of four Venezuelan breeding hens, it conducted an experiment in the Laboratorio – Sección de Aves (FAGRO–UCV). It provided a ration between 80 g and 110 g of food/bird (depending on age). Health program included immunization against Newcastle and Infectious Bronchitis diseases. Were recorded 8.689 egg weights and 3.142 eggs were used for internal quality; calculating the Haugh units. Variance analyses were performed considering a design completely randomized, including breed and age of hen in week effect in the model. To analyze internal quality of the egg according to the age of the hen, only was considered this last effect. Lineal regression of egg weight over week of age of the hen was estimated. Were realized “t” Student test with a significance level of 0.05. There were differences ($P<0.05$) of egg weight between breeds. FAGRO–UCV was higher (56.4 g), without differences for internal quality. Egg weight increased 0.23 g over average for each week of age of the hen. It concluded that FAGRO–UCV breed show comparatives advantages over other breeds about the egg weight and older hen eggs are heavier.

Key words: Haugh units, albumen, folk, Creole hens.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se sabe que el huevo es un alimento muy completo y que posee elevadas propiedades nutricionales y culinarias (Juárez–Caratachea *et al.*, 2010a). La formación del huevo es un proceso complejo que implica que los diferentes componentes deben ser dispuestos en el orden y cantidad adecuados. Por otra parte, la calidad del huevo depende, en gran manera, de la alimentación y confort a que es sometida la gallina; no debiéndose descuidar el manejo y condiciones de almacenamiento posteriores a la postura, puesto que existen evidencias de deterioro de la calidad interna del huevo por causas de altas temperaturas y mayor tiempo de almacenamiento (Scott y Silversides, 2000; Campos *et al.*, 2010).

En la literatura se han reportado valores de peso del huevo que oscila entre 48 g y 62 g para aves Criollas y comerciales ubicadas en condiciones disimiles de explotación (Álvarez *et al.*, 2007; Juárez - Caratachea *et al.*, 2010a; Congo, 2011); mientras que para la calidad interna se han reportado valores de altura del albumen que se ubican en el rango de 3 mm – 9,2 mm y unidades Haugh entre 65 y 95 (Scott y Silversides, 2000; Singh *et al.*, 2009; Campos *et al.*, 2010; Juárez - Caratachea *et al.*, 2010a; Congo, 2011).

Muchos de estos estudios se han desarrollado para determinar la calidad del huevo de ponedoras comerciales pasando por métodos físicos, químicos y algunos subjetivos; no obstante, poco se ha estudiado sobre la calidad del huevo de gallinas Criollas (Abadía *et al.*, 1998). Por lo antes expuesto, el objetivo de la presente investigación fue comparar el peso e indicadores de calidad interna del huevo de gallinas reproductoras venezolanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló en el Laboratorio Sección de Aves de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (FAGRO – UCV), municipio Mario Briceño Iragorry, estado Aragua, situado a 10°16'50" N y 67°35'01" O y altitud de 452 m.s.n.m., con una temperatura media de 25°C, precipitación promedio anual de 1068 mm y humedad relativa promedio anual de 75% (USICLIMA, 2013).

Las gallinas se ubicaron en el galpón "A" de gallinas reproductoras, cuyas dimensiones son de 60 m de largo x 6 m de ancho, dividido en 60 corrales de 2 m x 2 m, con una altura de pared de 80 cm y el resto es tela de gallinero, cada corral cuenta con tres nidales con trampa, comederos tipo tolva y bebederos tipo plason. Se emplearon animales de las razas de gallinas reproductoras venezolanas GDB- UCV (n=46), aves de plumaje gris y blanco, también conocidas como barradas, IPA- UCV (n=42), plumaje negro, Maracay- UCV (n=66), aves de plumaje rojizo y FAGRO- UCV (n=43), aves con plumaje blanco (Galíndez, 2008).

Una vez que las aves cumplieron 18 semanas de edad se procedió a hacer una selección visual de las gallinas y se descartaron todas aquellas aves con defectos en fenotípicos, luego los animales seleccionados para iniciar la fase reproductiva se separaron por raza y se dispusieron en los corrales en forma aleatoria, de la siguiente manera (cada corral con la presencia de un gallo de la misma raza):

GDB – UCV: 5 corrales x 8 gallinas + 1 corral x 6 gallinas.

IPA – UCV: 3 corrales x 8 gallinas + 2 corrales x 9 gallinas.

Maracay – UCV: 6 corrales x 8 gallinas + 2 corrales x 9 gallinas.

FAGRO – UCV: 2 corrales x 8 gallinas + 3 corrales x 9 gallinas.

Los registros se tomaron a partir de la semana 20 hasta la 71 de edad, la recolección de huevos se hizo de forma diaria e individual, plasmando la información en planillas de registros ubicadas en cada corral, tres veces al día (8:00 am, 11:30 am y 4:00 pm). Los huevos recolectados diariamente se identificaron (corral, gallina, raza y fecha), seguidamente se pesaron y se seleccionaron para incubar. El alimento consumido por los animales fue preparado en la planta procesadora de alimentos ubicada en el Laboratorio Sección de Aves (FAGRO – UCV). Este alimento fue previamente formulado ofreciendo 2.800 kcal/kg de energía metabolizable, entre 14 y 18% de proteína, 4,1% de calcio, 0,42% de fósforo, 0,90% de lisina y 0,43% de metionina (Hy – Line, 2009 – 2011). Se suministró una ración entre 80

g y 110 g de alimento/ave (según la edad) en el horario comprendido entre 7:30 - 8:00 am.

El programa sanitario incluyó la inmunización contra las enfermedades de Newcastle y Bronquitis Infecciosa, en el agua de bebida en la primera semana de edad, posteriormente se reforzó la inmunización a los 21 días y la 4^{ta} semana de edad. Las gallinas se desparasitaron en la semana 15 de edad con fenbendazol al 10% y aplicándose una segunda dosis 21 días después. Las gallinas fueron sometidas a un programa de iluminación natural, con dirección aproximada del fotoperiodo de 12 horas.

El peso del huevo se midió diariamente desde la semana 20 hasta la semana 71 de edad; utilizando una balanza digital marca KERN modelo FCB de 0,5 g de apreciación. El número de registros para esta variable fue de 8.689. La calidad interna se determinó en los huevos no incubables recolectados durante toda la semana, los cuales fueron almacenados (desde 1 hasta 7 días) a una temperatura de 21°C, no se llevaron registros de humedad relativa. Los huevos fueron pesados, posteriormente el contenido interno del huevo se vació en una bandeja lisa de vidrio, luego con la ayuda de un vernier de trípode se midió la altura de la yema (**AY**) y el albumen (**AA**). Se usaron 3.142 huevos. Asimismo, se calcularon las unidades Haugh (**UH**) a partir de la siguiente ecuación (Eisen *et al.*, 1962):

$UH=100 \text{ Log } (AA - 1.7Ph^{0.37} + 7.6)$, donde:

AA = altura del albumen en milímetros.

Ph = peso del huevo en gramos.

Se realizaron análisis de varianza considerando un diseño completamente aleatorizado. Para tal fin se empleó el programa estadístico SAS (Littell *et al.*, 2002), apoyado en el siguiente modelo estadístico:

$Y_{ijk} = \mu + R_i + Sem_j + e_{ijk}$, donde:

Y_{ijk} = peso promedio del huevo/UH/AY/AA de la raza de gallinas "i", en la semana "j".

μ = media teórica de la población.

R_i = efecto de la raza (IPA, FAGRO, Maracay, GDB).

Sem_j = efecto de la semana de edad de la gallina (20,...,71)

e_{ij} = residual con media cero y varianza σ^2 , normal e independientemente distribuido.

En análisis preliminares se probó el efecto de la interacción (raza x semana), la cual resultó no significativa, por tanto se retiró del análisis final.

Se realizaron pruebas de "t" de Student sobre los promedios ajustados para verificar las diferencias entre estos (Steel *et al.*, 1997). Se estableció un nivel de significación de 0,05; asimismo se estimó la regresión lineal del peso del huevo sobre la semana de edad de la gallina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Peso del huevo

La Figura 1 permite apreciar los pesos promedios del huevo de cada raza, observándose diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$). Destaca la raza FAGRO-UCV la cual produce los huevos más pesados; seguida de Maracay – UCV, GDB – UCV e IPA – UCV. En todos los casos, el peso del huevo supera los 50 g, aventajando entre 5% y 10% a los reportes de Alcalá y Flores (2010) y Juárez – Caratachea *et al.* (2010b), asimismo son similares a lo reseñado por Valera (2004), Segura *et al.* (2007), Singh *et al.* (2009) y Congo (2011) en gallinas Criollas y especializadas para la producción de huevos. Las diferencias entre el genotipo de huevos más pesados (FAGRO – UCV) y el de los huevos más livianos (IPA – UCV) están en el orden de 3,9 g, siendo las otras dos razas intermedias.

En torno a este tema, opiniones divergentes se han plasmado en la literatura; en este sentido, Keener *et al.* (2006) y Segura *et al.* (2007) manifiestan que no existen diferencias de peso del huevo entre los genotipos estudiados; mientras que Singh *et al.* (2009) y Congo (2011) reportan diferencias de peso del huevo entre las razas consideradas. Es indudable que las diferencias del peso del huevo entre razas, estirpes o razas tienen un basamento genético; por tanto, es probable que divergencias en la composición genética de las aves pueda introducir diferencias en la variable medida; caso contrario una composición genética similar derivará en pesos de huevos análogos entre los genotipos de las gallinas (Tharrintong *et al.*, 1999).

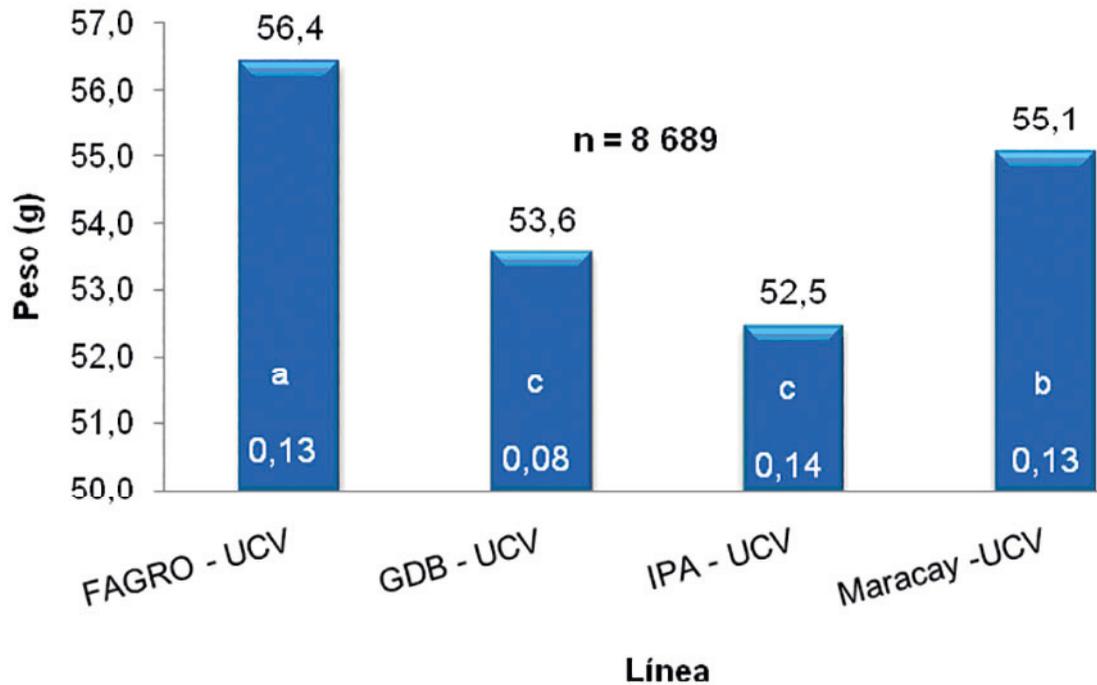


Figura 1. Peso promedio del huevo de cuatro razas de gallinas reproductoras venezolanas en el ciclo de postura.

El peso promedio del huevo para todas las razas aumentó ($P < 0,05$) con las semanas de edad de las gallinas (Figura 2), estimándose un coeficiente de regresión lineal de $b = 0,23$; es decir que el peso del huevo aumentó 0,23 g sobre el promedio por cada semana de edad de las gallinas. Cabe mencionar, que en análisis preliminares no se detectó efecto de la interacción (raza x semana), sobre el peso, por tanto se expresa el comportamiento promedio para todas las razas.

Asimismo, es necesario mencionar que probablemente algunas condiciones de manejo limitantes, principalmente alimentación, pudiesen estar enmascarando la expresión diferencial entre razas y la interacción entre estas y el medio ambiente. Se observó que al inicio de la etapa productiva el peso del huevo se ubicó alrededor de 45 g, para incrementarse paulatinamente hasta valores cercanos a 58 g para el final del ciclo de postura. El resultado se asemeja a los señalamientos de Terraes *et al.* (2006) y Segura *et al.* (2007). El peso del huevo durante las primeras siete semanas de producción se mantuvo inferior a 50 g, similar a lo descrito por Segura *et al.* (2007), sin embargo

difiere del reporte de Tharrintong *et al.* (1999), quienes evidenciaron pesos sobre los 52 g desde el inicio de la puesta.

Es de resaltar que las diferencias entre promedios en los distintos trabajos pueden ser consecuencia de manejos diferenciales, donde la alimentación, tipo de alojamiento y programa de iluminación juegan papel preponderante. Por otra parte, al final del ciclo, el peso promedio del huevo coincide con los reportes de gallinas Criollas latinoamericanas (Terraes *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2007; Segura *et al.*, 2007); no obstante diverge del reporte de Tharrintong *et al.* (1999), quienes reflejan valores de peso del huevo en torno a 68 g.

Es necesario resaltar, que es probable que un manejo limitante, sobre todo alimentación, pudo ocasionar disminución del peso del huevo a partir de la semana 53 de edad, por lo cual se alteró la tendencia de incremento lineal que se presentó en el período anterior, desencadenando en pesos inferiores a lo esperado al final del ciclo. Es necesario aclarar, que si bien es cierto que en Venezuela, desde el punto de vista comercial el peso del huevo no es importante, ya que los

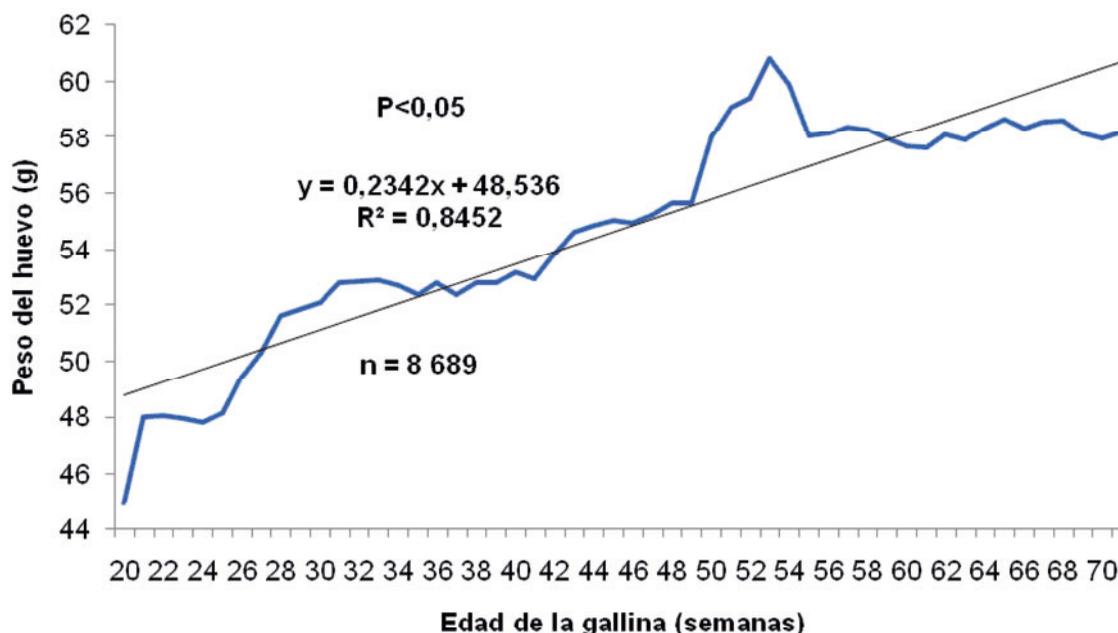


Figura 2. Peso promedio del huevo por semana de cuatro razas de gallinas reproductoras venezolanas.

huevos se venden por unidad y no por peso o tamaño, desde el punto de vista productivo si es relevante, puesto que para fines de incubación los huevos de las razas evaluadas se ubican en el rango esperado.

Calidad interna del huevo

La calidad de los huevos está relacionada con muchos factores; la alimentación, programas de iluminación, edad, clima, sanidad y constitución genética de las gallinas puede afectar la calidad interna del huevo. Se sabe que el tamaño del huevo, forma y color, son factores heredados, así como la calidad del albumen. El Cuadro refleja los indicadores de calidad interna del huevo considerados en el presente trabajo. En ningún caso hubo diferencias significativas entre las razas evaluadas.

El resultado diverge de los trabajos de Williams (1992), Tharrington *et al.* (1999), Scott y Silversides (2000), Keener *et al.* (2006), Singh *et al.* (2009) y Congo (2011). Se observó en la literatura consultada que las razas de gallinas ponedoras de huevos marrón superan en calidad interna las gallinas de huevos de cáscara blanca, sin embargo y como es de suponer aclaran que

la diferencia no se debe al color de la cáscara en sí, si no al origen de las aves, lo que deriva en una composición genética particular causante de la expresión de los caracteres analizados.

En este sentido, para la presente investigación no se consideró el efecto de la coloración de la cáscara del huevo sobre la calidad interna de este, por lo tanto, la teoría a esgrimir se fundamenta en el origen de las aves; por ello, es probable que para el presente estudio la igualdad en cuanto a los parámetros de calidad interna del huevo entre razas sea consecuencia de la constitución genética similar de estas para los loci que intervienen en la expresión de las características mencionadas.

Las razas evaluadas arrojaron valores superiores a 82 unidades Haugh (UH), 15 mm de altura de yema y 6 mm para la altura del albumen. Los hallazgos superan los reportes de Tharrington *et al.* (1999), Mota (2002), Méndez (2005), Keener *et al.* (2006), Juárez – Caratachea *et al.* (2010a). Por contraparte, en los estudios de Campos *et al.* (2010) y Congo (2011), se reportaron valores de calidad de los huevos de gallinas Criollas superiores a los obtenidos en este ensayo, lo que quizás se deba al efecto del almacenamiento

Cuadro. Promedios para indicadores de calidad interna del huevo (error estándar), de cuatro razas de gallinas reproductoras venezolanas (n = 3 142).

| Raza | Unidades Haugh | Altura de Yema (mm) | Altura del Albumen (mm) |
|---------------|----------------|---------------------|-------------------------|
| FAGRO – UCV | 82,8 (1,29) | 15,4 (0,25) | 6,8 (0,22) |
| GDB – UCV | 82,4 (0,62) | 15,1 (0,13) | 6,3 (0,11) |
| IPA – UCV | 84,9 (0,80) | 15,9 (0,19) | 6,9 (0,17) |
| Maracay - UCV | 84,1 (0,72) | 15,8 (0,17) | 6,9 (0,15) |
| Significancia | NS | NS | NS |

NS: No Significativo.

al que fueron sometidos los huevos, ya que al momento de realizar la prueba de calidad, estos habían sido almacenados desde uno hasta siete días.

El tiempo de almacenamiento es un factor que afecta la calidad de los huevos, esto fue reportado por Scott y Silversides (2000), Keener *et al.* (2006), en una prueba realizada en gallinas ISA-White e ISA-Brown. En este orden de ideas, la reducción de la calidad del albumen durante el almacenamiento ha sido relacionado con aumentos de pH y reducción de la capacidad buffer del mismo, lo que trae como consecuencia una liberación acelerada de dióxido de carbono, permitiendo la disociación del complejo (ovomucina - lisozima), el cual mantiene la viscosidad del albumen (Reis *et al.*, 1997; Lapao *et al.*, 1999; Scott y Silversides, 2000; Galíndez *et al.*, 2010).

En cuanto al comportamiento semanal (promedio de todas las razas) de la calidad interna, se apreciaron diferencias estadísticas significativas (Figuras 3 y 4).

Al igual que para el caso del peso del huevo no se encontró efecto significativo de la interacción raza*semana; sin embargo, debe considerarse que es probable que para las variables que expresan calidad interna del huevo, la influencia del manejo al momento de almacenarlos pueda estar enmascarando la expresión de la interacción genotipo*ambiente, sobre todo si se considera que los resultados reflejan valores de

calidad interna del huevo elevados para gallinas Criollas (>80).

Para todas las variables se observaron comportamientos inestables con ascensos y descensos constantes. Las diferencias de UH entre la mejor y peor semana de edad de las gallinas están en el orden de 12 puntos, lo cual es concordante con el reporte de Tharrintong *et al.* (1999) y Campos *et al.* (2010), investigadores que evidenciaron diferencias de hasta 15 puntos en unidades Haugh.

No obstante, el comportamiento errático observado en la presente investigación no se corresponde con lo expuesto por Tharrintong *et al.* (1999), quienes expresaron una reducción gradual de las UH durante las semanas de observación. En este punto es menester aclarar que probablemente la variación en el manejo del huevo posterior a la postura, sobre todo el almacenamiento antes de la prueba, puede estar ocasionando el comportamiento observado; asimismo, cambios climáticos que afectan la temperatura y humedad durante el almacenamiento pudiesen ser fuentes de variación.

A pesar de la inconsistencia de las alturas de la yema y el albumen, lo que refleja la diferencia estadística significativa, las divergencia máxima entre semanas es de 3,6 mm para ambas variables, lo cual se corresponde con el reporte de Singh *et al.* (2009).

Además, se ha comprobado que a pesar de las variaciones ocurridas a lo largo del período, la

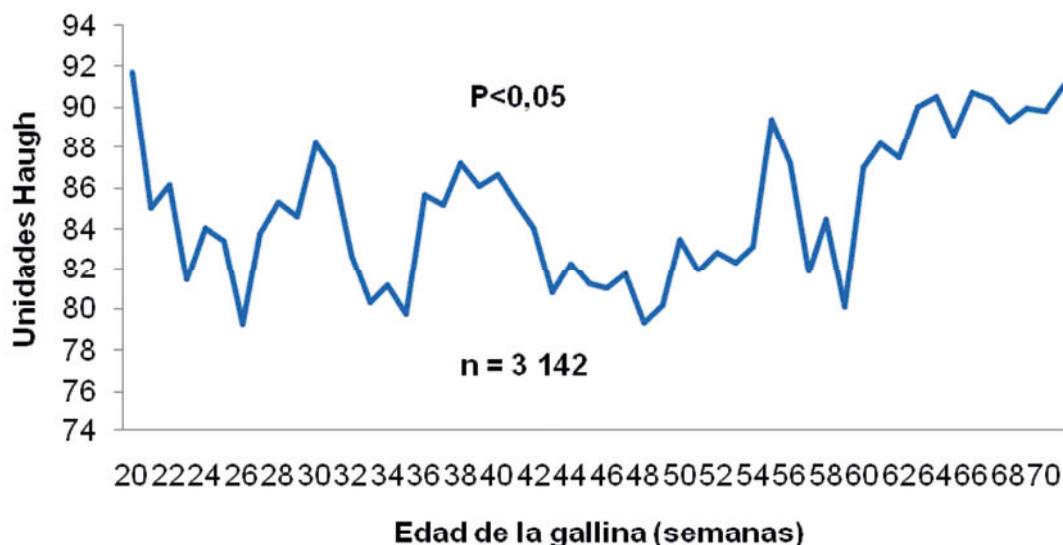


Figura 3. Promedio de unidades Haugh para cuatro razas de gallinas reproductoras venezolanas según la edad (semanas).

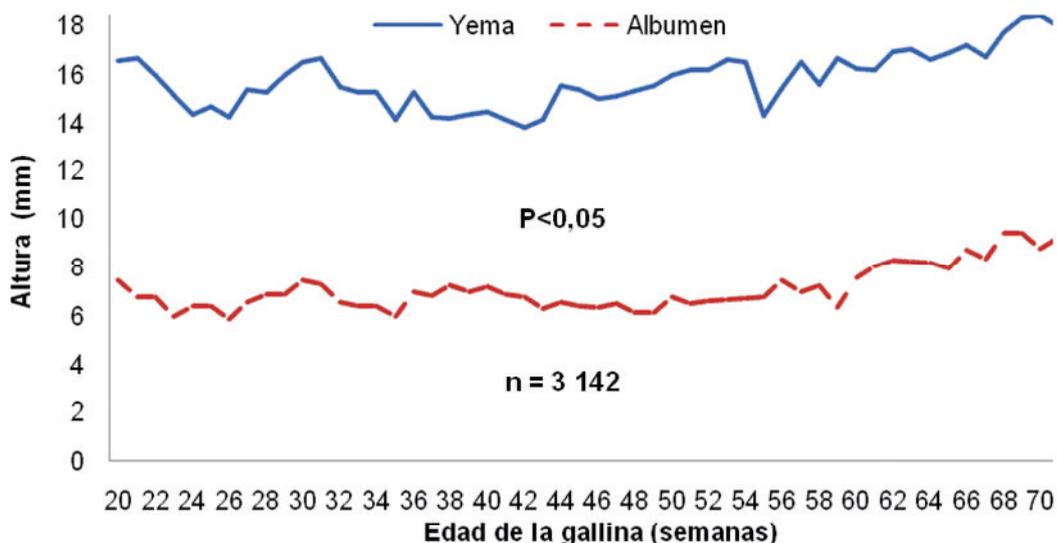


Figura 4. Promedios de altura de la yema y albumen para cuatro razas de gallinas reproductoras venezolanas según la edad (semanas).

alturas de la yema y albumen son las mismas al inicio y final de la experiencia, situación que difiere de las investigaciones llevadas a cabo por Applegate y Lilburn (1998), Lapao, *et al.* (1999), Arce *et al.* (2002) y Tumová y Gous (2012) quienes además expresan que ocurre un descenso en las medidas de calidad de yema y albumen con la edad de las gallinas debido a que los huevos de estas gallinas son más

porosos, por lo tanto ocurre una mayor tasa de intercambio de dióxido de carbono entre estos y el medio ambiente. En este sentido, es probable que el manejo del huevo y su almacenamiento, el cual es hasta de 7 días, este enmascarando el efecto de la edad al ocurrir cierta degradación de la ovomucina, que es la proteína responsable de mantener la integridad del albumen (Tumová y Gous, 2012).

CONCLUSIONES

La constitución genética de las gallinas juega un papel preponderante en el peso del huevo, observándose superioridad en peso del huevo de la raza FAGRO – UCV sobre las otras; no obstante estas diferencias no se expresaron en la calidad interna del huevo. Por otra parte, se evidenció que la edad de las gallinas influye sobre todos los caracteres evaluados, resalta el hecho de que el peso del huevo aumentó con la edad de las aves, mientras que las otras variables no expresaron una tendencia definida.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH – UCV) por la subvención del Proyecto Individual (N° PI - 01 – 7326 – 2008/2). A la empresa Alimentos Super – S, C.A. por el aporte realizado a través de Lay Orgánica de Ciencia Tecnología e Innovación (LOCTI).

LITERATURA CITADA

- Abadía, A., R. Harms and O. El – Hussein. 1998. Various methods of measuring shell quality in relation to percentage of cracked eggs. *Poul. Sci.*, 72: 2038-2043.
- Alcalá, F. y A. Flores. 2010. Evaluación del crecimiento y edad al 1^{er} huevo de dos híbridos nacionales de gallinas ponedoras UNESR. Tesis Ing. Agr. Maracay, Venezuela; Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 20 p.
- Álvarez, R., A. González y M. Barrios. 2007. Las especies de explotación zootécnica: Monogástricos. **En:** González, E; F. Bisbal, (Eds.). Los Recursos Zoogenéticos de Venezuela. Caracas, Venezuela. Ministerio del Poder Popular para el Ambiente. pp. 20-22.
- Applegate, T. and M. Lilburn. 1998. Effect of hen age, body weight, and age at photostimulation. 1. Egg, incubation, and poult characteristics of commercial turkeys. *Poult. Sci.*, 77: 433-438.
- Arce, J., E. Ávila y C. López. 2002. Edad de la reproductora pesada y peso del huevo sobre los parámetros productivos y la incidencia del síndrome arcínico en la progenie. *Rev. Técn. Pec. Méx.*, 40: 149-155.
- Campos, T., R. Galíndez y V. De Basilio. 2010. Efecto de la relación de apareamiento sobre la producción, fertilidad y calidad interna de huevos de la raza de gallinas ponedoras GDB-UCV. *Rev. Fac. Agron. (UCV)*, 36(1): 34- 41.
- Congo, R. 2011. Análisis de la interacción genotipo x ambiente entre sistemas de alojamiento y razas de gallinas ponedoras para indicadores de bienestar y calidad de huevo. Tesis de Máster. Máster interuniversitario en mejora genética animal y biotecnología de la reproducción. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Producción Animal. Valencia, España. 113 p.
- Eisen, E., B. Bohren and H. Mckean. 1962. The Haugh unit as a measure of egg albumen quality. *Poul. Sci.*, 41: 1461-1468.
- Galíndez, R. 2008. Fundamentos genéticos y de reproducción para el manejo de granjas avícolas con énfasis en gallinas ponedoras. Curso “Aspectos Básicos de la Producción de Gallinas Ponedoras”. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. CD-ROM.
- Galíndez, R., V. De Basilio, G. Martínez, D. Vargas, E. Uztariz y P. Mejía. 2010. Efecto del mes de incubación, caracteres físicos del huevo y almacenamiento, sobre la mortalidad embrionaria en Codornices Japonesas (*Coturnix coturnix japonica*). *Zootec. Trop.*, 28(1): 17 – 24.
- Hy-Line. 2009-2011. Guía de Manejo Comercial Variedad Brown. Hy-Line Internacional. Iowa, EUA. 40 p.
- Juárez – Caratachea, A., E. Gutiérrez, J. Segura – Correa y R. Santos – Ricalde. 2010a. Calidad del huevo de gallinas criollas criadas en traspatio en Michoacán, México. *Trop. and Subtrop. Agroec.*, 12: 109 – 115.
- Juárez – Caratachea, A., E. Gutiérrez, R. Garcidueñas y G. Salas. 2010b. Producción de huevos en gallinas criollas Cuello

- Desnudo (Nana) y con emplume normal (nana) en la región del altiplano mexicano. *Rev. Cub. Cien. Agríc.*, 44(3): 287-290.
- Keener, K., K. McAvoy, J. Foegeding, P. Curtis, K. Anderson and J. Osborne. 2006. Effect of Testing Temperature on Internal Egg Quality Measurements. *Poult. Sci.*, 85: 550–555.
- Lapao, C., L. Gama and M. Chaveiro. 1999. Effects of broiler breeder age and length of egg storage characteristics and hatchability. *Poult. Sci.*, 78: 640 – 645.
- Littell, R., G. Milliken, W. Stroup and R. Freud. 2002. SAS for linear Models. 4ed. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA. 633 p.
- Méndez, R. 2005. Evaluación de la cría y recría de dos híbridos de pollonas nacionales. Tesis Ing. Agr. Maracay, Venezuela; Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 40 p.
- Mota, B. 2002. Evaluación comparativa de la productividad y calidad de huevos de seis híbridos nacionales de ponedoras y un híbrido comercial. Tesis Ing. Agr. Maracay, Venezuela; Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 53 p.
- Reis, L., L. Gama and M. Chaveiro. 1997. Effects of short storage conditions and broiler breeder age on hatchability, hatching time, and chick weights. *Poult. Sci.*, 76: 1459 – 1466.
- Scott, T. and F. Silversides. 2000. The effects of storage and strain of hen on egg quality. *Poult. Sci.*, 79: 1725 - 1729.
- Singh, R., K. Cheng and F. Silversides. 2009. Production performance and egg quality of four strains of laying hens kept in conventional cages and floor pens. *Poult. Sci.* 88: 256–264.
- Segura, J., M. Salas, L. Sarmiento y R. Santos. 2007. Indicadores de producción de huevo de gallinas Criollas en el trópico de México. *Arch. Zootec.*, 56 (215): 309-317.
- Steel, R., J. Torrie and D. Dickey. 1997. Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. Third Edition. McGraw-Hill. USA. 666 p.
- Terraes, J., J. Rafart, F. Revidatti, M. Sindik Y C. Rollet. 2006. Variables productivas durante el primer ciclo de postura en gallinas Rubia INTA. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Balcarce, Argentina. p. V-025. (Resumen). Disponible en línea: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/index.htm>. [Feb. 18, 2011].
- Tharrington, J., P. Curtis, F. Jones and K. Anderson. 1999. Comparison of Physical Quality and Composition of Eggs from Historic Strains of Single Comb White Leghorn Chickens. *Poult. Sci.*, 78: 591–594.
- Tumová, E. and R. Gous. 2012. Interaction of hen production type, age, and temperature on laying pattern and egg quality. *Poult. Sci.*, 91: 1269–1275.
- USICLIMA. Unidad de Servicios Integrados Climatológicos para la Investigación en Agricultura y Ambiente. 2013. Resumen de datos mensuales. Servicio de Climatología Agrícola. Facultad de Agronomía-UCV. Versión digital (CD).
- Valera, E. 2004. Evaluación de la productividad y calidad de huevos de dos híbridos nacionales de gallinas ponedoras. Tesis Ing. Agr. Maracay, Venezuela. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 39 p.
- Williams, K. 1992. Factores que afectan a la calidad del huevo. *World's Poultry Sci. Jour.*, 48: 5-16.

Relación de expresión del IGF-IR en secreciones uterinas de vacas de diferentes razas y grados de endometritis posparto

Relationship of IGF-IR expression in uterine secretions of cows of different breeds and levels of postpartum endometritis

Ana Z. Ruiz¹ y José R. Pérez Machado^{2*}

¹Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra Fisiología Animal.

²Universidad Nacional Experimental Rómulo Gallegos (UNERG). Decanato de Ingeniería Agronómica. Departamento de Producción Animal. *Correo electrónico: jorapevet@gmail.com

RESUMEN

En sistemas ganaderos de producción tropical, al seleccionar hembras reproductoras es más importante considerar adaptabilidad al medio, reproducción y salud, que producción individual; para relacionar los aspectos anteriores se requiere medir variables como: raza, involución uterina y metabolismo posparto, a través de técnicas biotecnológicas pocas veces utilizadas en el diagnóstico de salud reproductiva en hembras bovinas. El objetivo planteado es: relacionar la expresión del receptor del factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-IR) en secreciones uterinas de vacas de diferente raza o tipo con el nivel de citología uterina durante el periodo posparto temprano. Metodología: Entre 30 a 45 días del posparto se tomaron raspados de la superficie endometrial (cytobrusch) y secreciones uterinas, a vacas Carora (n=19), Siboney (n=17) y F1 Holstein x Brahman (n=16), se cuantificó el número de neutrófilos presentes en la citología para determinar el grado de inflamación endometrial, diferenciando dos grupos: SC (endometritis subclínica/n=26) y EC (endometritis clínica/n=12); además de determinar por WesternBlot la expresión del IGF-IR en secreciones uterinas por raza y grupo. Resultados y conclusiones: El grupo SC de raza Carora (n=4) y Siboney (n=8), presentaron bandas de IGF IR (130 KDal), evidentemente más gruesas y marcadas, que las observadas en F1 y los grupos EC. La metodología aplicada puede servir para orientar la evaluación de salud uterina posparto y diferenciar la resistencia a la aparición de afecciones posparto, entre tipos raciales, bajo condiciones tropicales.

Palabras clave: Enfermedad uterina posparto, IGF IR, WesternBlot.

ABSTRACT

For tropical livestock production systems, in selecting breeding females is more important to consider adaptability to the environment, reproduction and health, that individual production; to relate the above aspects is required to measure variables such as breed, uterine involution and postpartum metabolism through biotechnology techniques rarely used in the diagnosis of reproductive health at bovine female. The stated goal is to relate receptor expression insulin-like growth factor I (IGF-IR) in uterine secretions of cows of different breed or type with the level of uterine cytology during the early postpartum period. Methodology: Between 30 to 45 days postpartum were taken by cytobrusch of uterine secretions, Carora cows (n = 19), Siboney (n = 17) and F1 Holstein x Brahman (n = 16), counted the number of neutrophils present in cytology to determine the degree of endometrial inflammation, differentiating two groups: SC (sub clinical endometritis / n = 26) and EC (clinical endometritis / n = 12); and to determine by Western blot expression of the IGF-IR in uterine secretions and breed. Results and conclusions: The SC Carora breed group (n = 4) and Siboney (n = 8) showed IGF IR bands (130 kDal) obviously thicker and marked, than those seen in F1 and EC groups. The methodology can be used to guide the evaluation of postpartum uterine health and resistance to differentiate the appearance of postpartum conditions, including breed types, under tropical conditions.

Key word: postpartal uterine health, IGF IR, WesternBlot.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, los sistemas de producción doble propósito representan más del setenta y cinco por ciento de las unidades de producción, encargadas de la producción de leche y carne, no es un secreto que dichos sistemas se han mantenido por muchas décadas estancados en su producción, determinando un déficit que es necesario suplir con masivas importaciones.

En sistemas de producción tropicales, es más importante considerar adaptabilidad al medio, reproducción y salud, que nivel de producción individual, cuando se pretenda lograr mejoras genéticas en los rebaños y esto solo se logra orientando la selección o realizando cruzamientos que permitan mejorar estos aspectos; algunos autores concuerdan que en el trópico, más que maximizar la producción potencial de leche por animal, se deben establecer estrategias destinadas a la obtención de vacas con niveles de producción y reproducción que puedan ser sustentadas por los sistemas pastoriles.

Para elevar los niveles de eficiencia reproductiva en los rebaños en sistemas de doble propósito, se requiere de vacas adaptadas a las condiciones agroecológicas (temperatura y humedad), alimenticias (pastoreo de forrajes de moderada a baja calidad), sanitarias (resistencia a enfermedades infectocontagiosas), que le permitan recuperar rápidamente las condiciones de homeostasis orgánica, después de eventos reproductivos (gestación y parto) y fisiológicos (lactación), para esto se requiere del conocimiento amplio de los procesos fisiológicos que ocurren durante el periodo posparto, que orienten la aplicación de medidas de manejo alimentario, sanitario y reproductivo, además de la mejor selección de hembras para la cría, orientadas a mejorar la rentabilidad del negocio ganadero en sistemas doble propósito, en función de esto es prioritario y necesario conocer cómo medir estas variables, para poder predecir su comportamiento y dar uso adecuado a las mismas.

En rebaños bajo sistemas de doble propósito en el trópico, son pocas las investigaciones que incluyen a su vez las variables: condición corporal y tipología racial, en relación con el proceso de involución uterina y en consecuencia su efecto sobre fertilidad posparto, que al final

determinará la futura producción de leche y carne indispensable para garantizar la nutrición y salud de la población nacional. Así mismo, es poca o casi nula la aplicación de biotecnologías que permitan diagnosticar y/o predecir la salud durante el posparto, con el fin de orientar la selección de reproductores con mejores índices reproductivos.

En la actualidad se promueve el uso de aplicaciones biotecnológicas que colaboren en el diagnóstico de las afecciones metabólicas y endocrinas que afecten la producción animal, entre ellas están los marcadores de respuesta metabólica como el factor de crecimiento semejante a insulina tipo I y su receptor (IGF-IR) los cuales a nivel endocrino actúan promoviendo la regeneración celular y de los tejidos orgánicos. (Llewellyn *et al.*, 2008).

Por estas razones, la determinación y relación de expresión del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IFG-IR) en secreciones uterinas y el grado de la citología uterina durante el periodo posparto temprano (cuarta a quinta semana), puede orientar en la determinación de la salud reproductiva, durante el proceso de involución uterina, lo que a su vez permitiría pronosticar el futuro reproductivo de la vaca; pudiese indicar diferencias en el comportamiento y resistencia a las afecciones posparto en las diferentes razas o tipos raciales y no menos importante, orientaría las estrategias para prevenir las afecciones puerperales que retardan el reinicio de la actividad ovárica.

Fundamentados en lo expuesto anteriormente, se plantea el objetivo de: relacionar la expresión del receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo I en secreciones uterinas de vacas Carora, F1 Holstein x Brahman y Siboney, con diferente grado de inflamación endometrial.

La utilidad e importancia de los resultados, radica en la aplicación de la técnica de *Western Blot*, para diferenciar la expresión del receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-IR) en secreciones uterinas de vacas con diferente grado de inflamación endometrial y perfil metabólico posparto; esta metodología podría servir para identificar vacas con resistencia a sufrir afecciones inflamatorias, vacas que reinician más temprano su actividad ovárica posparto bajo determinadas condiciones

de manejo, con esto orientar la selección genética de reproductores y aplicar medidas de manejo que mejoren los índices reproductivos en rebaños ganaderos de sistemas doble propósito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 4 grupos raciales de vacas preñadas en el último mes de gestación (n=65), con uno a cinco partos previos (Cuadro 1), con condición corporal (CC) entre 2,5 y 3 (Fattet y Jaurena, 1988), que no presentaran signos ni síntomas de afecciones infecto contagiosas o adquiridas. Todas las vacas se manejaron de forma similar, pastoreo en potreros con pasto *Urochloa brizantha*, durante la tarde y noche, con suplementación de 1,5 kg de alimento concentrado (16% proteínas) previo al único ordeño del día. El experimento se llevó a cabo en la Centro técnico productivo socialista "Florentino", en la población de Sabaneta, estado Barinas, altitud 90 a 120 msnm, precipitación anual 1000 a 1200 mm, durante la época de lluvias (Julio a Noviembre 2012).

Todas las vacas fueron muestreadas entre la cuarta semana y quinta semana (33 a 40 días posparto) donde suponemos, fundamentados en la bibliografía revisada, se ha completado el proceso de involución uterina; para obtener las siguientes muestras:

1.- Se tomaron muestras para citología uterina, por el método del cepillo uterino Gabler *et al.* (2010), para lo cual se realiza previamente limpieza del área perineal y vulvar del animal (agua y alcohol), se palpa vía rectal el cuello uterino, se procede a introducir el catéter

protegido (*citologybrush. Minitube17214®*) por vía vaginal, para atravesar el canal cervical y tomar el raspado uterino, que inmediatamente fue fijado (*Fixcell®*) en lámina de vidrio porta objeto, para su posterior coloración (*Wright-Giemsa* modificado, *Sigma-Aldrich* WG16-500® ml). Posteriormente, se cuantificó los neutrófilos presentes en la citología, contando cien células dentro del frotis coloreado, (LeBlanc, 2002; *et al.*, 2005), de esta manera se determinó el grado inflamatorio a nivel uterino.

2.- Se tomaron muestras de secreciones uterinas, por el método del cepillo uterino e inmediatamente lavar a presión el cepillo utilizando jeringa estéril con 2 mL de agua bidestilada estéril y lograr diluir la muestra, almacenadas de inmediato en crio viales y conservadas a -196 °C hasta su procesamiento.

3.- Para determinar la expresión de IGF IR a nivel del útero, se conformó un pool de muestras de secreción endometrial de vacas de la misma raza, con diagnóstico citológico de endometritis clínica Carora (CC), F1 HxB (F1C) y Siboney (SC) y con diagnóstico de endometritis sub clínica Carora (CS), F1 HxB (F1S) y Siboney (SS), para proceder por el método de *Western Blot* (Ruiz y Kittok, 2008) a evidenciar diferencias en la expresión del IGF-IR, entre razas e inter razas, con controles positivos de tejido adiposo, hepático y secreciones de vacas sin inflamación endometrial (sanas).

Fases de *Western blot*:

Extracción de proteínas: las muestras de secreción uterina de los tres grupos de estudio,

Cuadro 1. Número de vacas en el experimento, agrupadas por tipología.

| RAZA | N° vacas |
|--------------------------|----------|
| Carora | 19 |
| Siboney | 17 |
| F 1 (Holstein x Brahman) | 16 |
| Gyr | 16 |
| Total | 68 |

se descongelaron y se homogeneizaron durante 10 seg. Durante la extracción de proteína se mantuvo la temperatura tanto de las muestras como de los reactivos a 4°C. Cada muestra fue mezclada en una proporción 1:1 con buffer de extracción. Dicha solución inicial de la muestra fue centrifugada a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C, transfiriendo el sobrenadante a un microtubo de 1,5 mL, repitiéndose tres veces.

Quantificación de proteína total: se determinó la concentración proteica total de cada muestra mediante un método colorimétrico (BCA™ *protein assay kit*; *Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA*), Inicialmente se preparó una dilución 1/100 a partir de la solución inicial de la muestra para preparar siete tubos de las soluciones usadas en la cuantificación de la curva estándar, identificadas con letras desde la A hasta la I, conteniendo 5 mL de Buffer de extracción y una ampolla de 1mL de Albúmina Sérica Bovina (BSA) provista por el kit, en las proporciones calculadas: adicionalmente es necesario preparar 20mL del Reactivo de Trabajo, utilizando 19,6mL del Reactivo A y 0,4mL del Reactivo B (proporción 50:1), ambos provistos por el kit.

La placa se cubre con papel de aluminio y se incuba a temperatura ambiente durante 30min, para finalmente medir la concentración de proteína ($\mu\text{g/mL}$) haciendo uso de un espectrofotómetro (*Multiskan FC, Thermo Scientific*), a una longitud de onda de 560nm.

Electroforesis vertical: se preparó una solución de agarosa al 2%, con la finalidad de sellar, una vez polimerizada la solución, el borde inferior del equipo de electroforesis, inmediatamente después se prepara el gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), del tipo discontinuo (15%-5%) y se coloca el gel de corrida al 15% de una solución al 30% de Acrilamida/Bis acrilamida en el espacio dejado entre los dos vidrios del aparato de electroforesis, esperando 1 hora para lograr la solidificación. Seguidamente, se colocó el gel de apilamiento al 5% de la misma solución de Acrilamida/Bis acrilamida, insertando inmediatamente el peine plástico para la formación de los canales de descarga.

Para mantener hidratado el gel es necesario retirar el sello de agarosa del borde inferior del

aparato de electroforesis y sumergir el gel en Buffer de almacenamiento cubriendo el aparato con papel plástico y manteniéndolo a 4°C hasta el momento de la corrida electroforética.

En microtubos de 1,5 mL se prepara la solución a descargar en los canales del gel, dichos microtubos son agitados y sumergidos en agua a 100°C durante un minuto, procediendo inmediatamente a descargar las soluciones en el gel. Se usó una mezcla de marcador de Peso Molecular proteico (26681; *BlueRanger®; Pierce*) y control positivo (proteínas de tejido adiposo de ovejo). Se deja un canal vacío y luego se descargan cada una de las muestras. Se cierra el equipo de Electroforesis Vertical, se conectan correctamente los terminales a la fuente de poder (*ThermoScientific*), se ajusta a 138 voltios y se inicia la corrida a una temperatura de 4°C, durante tres horas.

Transferencia de proteínas del gel a la membrana: al sacar el aparato de electroforesis de la nevera, botar todo el líquido de su interior y de la bandeja. Se coloca el papel filtro en la cámara de transferencia, se humedece bien con el Transfer Buffer. Separar ambos vidrios ayudándose con el separador por la esquina superior. Al separar ambos vidrios, cortar inmediatamente sobre el vidrio el gel en el extremo superior izquierdo (lado donde se colocó el marcador molecular) para identificar la cara frontal del mismo y los sobrantes que quedan al retirar el peine.

Tomar el primer filtro que está en la cámara humedecido con Buffer y se coloca sobre el vidrio. Se voltea quedando el vidrio arriba y se coloca el filtro de nuevo en la cámara. Sacar la membrana de nitrocelulosa, la cual está entre dos papeles azules y dentro de ellos debe cortarse a la medida del gel, cuadrando que sobre membrana por los lados del gel. Humedecer con suficiente "Transfer buffer" de modo de evitar alguna burbuja y finalmente colocar otra lámina de papel filtro humedecida con "Transfer buffer" sobre la membrana.

Cerrar correctamente el equipo (cerrar perillas alternándolas), conectar los terminales a la fuente de poder (*Labnet*) y ajustar a 10 voltios y 300 mili amperes por un tiempo aproximado de 2 horas. Se utiliza esta fuente de poder porque el rango mínimo de la fuente de poder *Thermo*, es de 20 Voltios y se necesitan 10 Voltios.

Al culminar el tiempo establecido, retirar cuidadosamente el gel y la membrana del equipo de transferencia y colocarlos en recipientes diferentes. Añadir a la membrana, una pequeña cantidad de solución de Ponceau S (P7170 Sigma-Aldrich) y agitar por unos minutos hasta observar las bandas dejadas por las proteínas en su trayectoria. Lavar con NaOH al 0,1% y agua destilada hasta eliminar la coloración rojiza dejada por el Ponceau S en la membrana. Por otra parte, añadir al gel, una pequeña cantidad de "0,01% Azul Brillante Coomassie (20278 Pierce) y (Coomassie Blue, metanol y ácido acético), para observar la trayectoria dejada por las proteínas durante la corrida y las que no se transfirieron a la membrana. Se guarda el gel teñido en el recipiente tapado bañado en el colorante en la nevera a 4°C para escanearlo.

Bloqueo y colocación del primer anticuerpo: Para este trabajo se utilizó como primer Ac: IGF-IsR Código Sigma I-7151, 20 µL a una dilución de 1:500. Esta secuencia es de humano probado en Cabras (Human-Goat).

Se inicia sumergiendo la membrana en una bolsa (Ziploc®) con los 100 mL de "Blocking Buffer" (TBST + 5% de leche descremada), la bolsa es colocada en un recipiente en la plataforma rotatoria con movimiento suave durante una hora a 4°C. Se saca la membrana de la bolsa y se lava la membrana 2 veces por 5 minutos cada una con TBST con movimiento suave a 4°C directo en un recipiente.

Se coloca el primer anticuerpo (20µL) disuelto en 10mL de TBST + 5% de leche descremada, para dejar incubar con agitación durante toda la noche a 4 °C en una bolsa. Al culminar el tiempo, lavar la membrana 3 veces por 5 minutos cada una con TBST con movimiento suave a 4°C.

Colocación del segundo anticuerpo: en este caso como segundo Ac se utilizó Rabbit anti Goat Código A-5420, de Lab. Sigma 10 µL a una dilución de 1:1000. En este segundo Ac se encuentra conjugada la enzima peroxidasa. Colocar el segundo anticuerpo en 10mL de TBST + 5% de leche descremada (0,5g de leche en 10mL de TBST). Incubar con agitación de 1 a 3 horas en una bolsa. Culminado el periodo, sacar la membrana de la bolsa, colocar en un recipiente de plástico y lavar con TBST 3 veces

por 15 minutos cada una en agitación, fuera de la nevera.

Lavar 2 veces por 15 minutos cada una con TBS en agitación igualmente fuera de la nevera.

Reincubación de membrana: la membrana debe permanecer en bolsa con TBST, en la nevera a 4°C hasta que se vuelva a utilizar. Para reincubarla, se lava en un recipiente con TBST 3 veces x 2 min en la plataforma rotatoria. Aparte, se prepara el TBST (10mL) + leche descremada (0,5g) en un tubo de 15mL y colocamos el primer Ac y en este caso utilizamos 40µL. IGF-IR (1 1751). Se colocó en una bolsa y se deja toda la noche en movimiento en la plataforma a 4°C.

Preparación del cassette y revelado del film: preparar el cuarto oscuro antes del inicio del trabajo. Se necesitan 3 recipientes: uno para agua destilada, otro para el fijador y el tercero para el revelador. Se prepararon 1000mL de cada uno, diluyendo 200mL de fijador en 800mL de agua destilada.

Colocar la membrana de nitrocelulosa en un recipiente seco y sobre esta 2mL de "SuperSignal® West pico Luminol/Enhancer Solución" y 2mL de "SuperSignal® West pico Stable/PeroxideSolution" de manera consecutiva con movimiento suave y esperar si ocurre la reacción de quimioluminiscencia, la cual se manifiesta por la emisión de luz. Abrir el cassette y colocar la membrana de nitrocelulosa sobre el lado opuesto a la pantalla intensificadora (lado negro). Colocar el film sobre la membrana de nitrocelulosa y cerrar inmediatamente el cassette.

Luego proceder al revelado: deslizar suavemente el film en el recipiente con el revelador. Tapanlo y agitarlo por 5seg y dejarlo en reposo por 30seg. Este proceso debe repetirse entre 5 y 7 veces. En nuestro caso lo hicimos 6 veces. La agitación se realiza con movimientos de 180°, luego lavar en agua destilada, pasar a fijador por 3 min y enjuagamos por 30 seg. Para finalizar se observa la placa, identificando cada muestra y la expresión de la proteína, procediendo luego a escanear, guardar la información en computadora e imprimir en papel.

Análisis estadístico:

Se planteó un diseño de bloques completamente aleatorizados, considerando la raza como factor

cualitativo y el grado de inflamación del endometrio como los niveles. En todos los casos el nivel de confianza fue del 95%, determinando el nivel de significación estadística cuando $P < 0,05$ (Chacin, 2000). La determinación del tamaño de la muestra se realizó, considerando el nivel de la investigación (nivel III de correlación) y las variables cuantitativas insertadas en la investigación, basándose en la variabilidad o porcentajes de aparición reportado previamente por investigadores en trabajos similares (valor calculado de Z en tablas: 1,96).

Para las variables cuantitativas que no seguían una distribución normal como la raza (R) y los grados de inflamación endometrial (GIE) se empleó el test de *Kruskal-Wallis*. Los datos fueron analizados a través del Programa de análisis estadístico PASW Statistic 18.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Relación entre la raza y la susceptibilidad a sufrir endometritis posparto

No se determinó efecto de la raza de las vacas sobre la probabilidad de sufrir diferentes grados de inflamación endometrial en la quinta semana posparto, cuando se analizó por el método de *Kruskal Wallis* (no paramétricos) Cuadro 2 y Figura 1. Los resultados contrastan con los reportados por Pérez (2009), en vacas mestizas con niveles medios a bajos de producción en sistemas doble propósito, donde se observó una tendencia del tipo racial para la presencia de secreciones uterinas asociadas a mayor grado de inflamación endometrial.

En los grupos de vacas de diferente raza, se pudo observar un comportamiento similar en cuanto a la cantidad de vacas clasificadas por citología, como sanas (cito 0), con endometritis subclínica (cito 1) y con endometritis clínica (cito 2), respectivamente (Figura 1), con un total de 57,5% casos de vacas con afecciones inflamatorias posparto y 39,3% casos de endometritis subclínica obtenidos en el experimento para el periodo posparto en que se realizó la evaluación, coincidiendo estos resultados con los reportados por LeBlanc, (2012), que reporta 35-50% de vacas con al menos un tipo de patología inflamatoria entre la tercera y séptima semana pos parto, de las cuales 10 a 30% son endometritis diagnosticables citológicamente y resultados superiores a los reportados por Madoz *et al.* (2013), quienes indican prevalencia de 17% de casos de endometritis sub clínica en vacas a pastoreo, para similar intervalo pos parto.

Expresión del Receptor para factor de crecimiento similar a la insulina Tipo I

Se pudo evidenciar mayor intensidad de expresión del IGF-IR en las vacas Carora (CS) y Siboney (SS) que presentaron endometritis subclínica, en comparación con la menor expresión en vacas de la misma raza con endometritis clínica (CC y SC, respectivamente) y con las vacas F1 con endometritis subclínica y clínica (FC y FS) o las vacas sin inflamación endometrial o animales sanos (S), como se puede observar en la Figura 2.

El mayor nivel de expresión observado en vacas CS y SS, en comparación con las vacas con endometritis clínica, se pudiese explicar por el

Cuadro 2. Número de vacas con diferente grado de inflamación endometrial, para cada grupo racial.

| Raza | Sana | Sub Clínica | Clínica |
|----------|------|-------------|---------|
| Siboney | 9 | 4 | 4 |
| Carora | 8 | 8 | 2 |
| F1 (HxB) | 5 | 6 | 4 |
| Gyr | 6 | 8 | 2 |
| TOTAL | 28 | 26 | 12 |

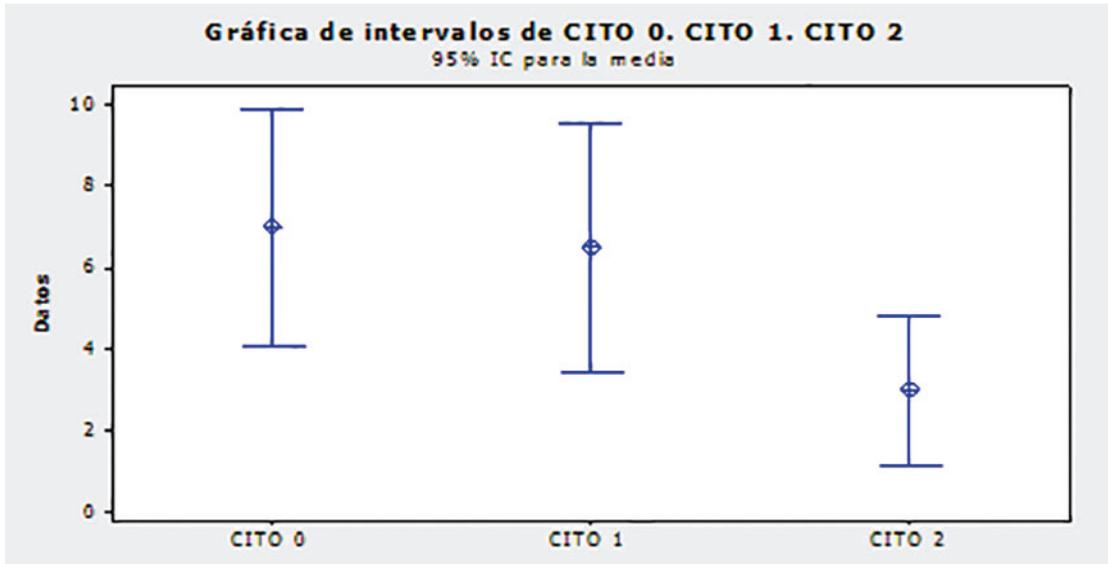


Figura 1. Intervalos de cito 0, cito 1 y cito 2, en la población total de vacas del ensayo.

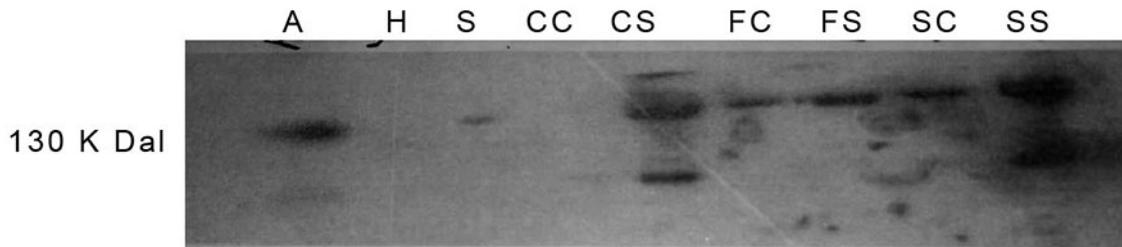


Figura 2. Expresión de IGF- IR (130 KDal) en secreciones uterinas de vacas de diferente raza y grado de inflamación endometrial (A control positivo IGF-IR, H muestra de tejido hepático, S vacas sanas, CC vacas Carora con endometritis clínica, CS vacas Carora con endometritis subclínica, FC vacas F1 con endometritis clínica, FS vacas F1 con endometritis subclínica, SC vacas Siboney con endometritis clínica y SS vacas Siboney con endometritis subclínica).

incremento en la síntesis proteica del IGF-IR en las células endometriales que responden al proceso de inflamación aguda que está ocurriendo en el útero, a lo anterior se suman el aporte de IGF-IR por los neutrófilos que invaden la superficie endometrial durante las primeras etapas del proceso de inflamación aguda endometrial. Esta respuesta se diferencia a la que ocurre en las vacas con cuadros de endometritis clínica, donde mayoritariamente se encuentran células muertas y detritus celulares consecuencia del proceso infeccioso provocado por invasión de bacterias que promueven la

degradación proteica y el estado de inflamación crónica, como lo evidenciado por O'Connor *et al.* (2008).

Llewellyn *et al.* (2008) señalaron que los cambios en la biodisponibilidad de la familia del IGF está implicada en la tasa de recuperación uterina y en la eficiencia reproductiva, al demostrar la expresión del IGF II y del IGF IR en el estroma profundo del endometrio y miometrio, así como de IGFBP-2-4 y 6 en el estroma caruncular e IGFBP-3 en epitelio endometrial.

No se conocen reportes previos a esta investigación, sobre la determinación de la expresión del IGF-IR, de muestras de secreciones uterinas; aunque si de la utilización del citobrush como método que permite obtener suficiente material de calidad para preparar citologías y extraer mRNA endometrial (Ghasemi *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

No se detectaron diferencias entre las razas estudiadas, en cuanto a la probabilidad de sufrir endometritis subclínica o clínica, cuando el nivel de CC (2,5 a 3) es similar en todas las vacas en estudio (*Kruskal Wallis*).

El método de *Western blot* permitió la detección por primera vez de la expresión del IGF-IR en secreción uterina, así mismo demostró ser útil para la determinación de diferencias en la expresión del IGF-IR, en vacas de diferentes razas y con diferentes grados de inflamación endometrial en sistemas doble propósito, por lo que puede ser considerado como método diagnóstico que colabore en la selección de vacas resistentes a las enfermedades uterinas posparto.

Las vacas Carora y Siboney con endometritis subclínica presentaron mayor expresión del IGF-IR, en comparación con las vacas de otra raza y de la misma raza pero con otros cuadros de inflamación endometrial. Basados en los resultados, se podría especular que durante el periodo de balance energético negativo del posparto temprano, las vacas de raza Carora y Siboney, mostraron más rápida recuperación del endometrio asociada esto a los factores metabólicos que van ligados a la regeneración celular que depende de la disponibilidad de IGF-IR en las células endometriales.

AGRADECIMIENTOS

A la tutora, Dra. Ana Ruiz y el laboratorio de biotecnología de la cátedra de fisiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV-Maracay. Así como al Personal del Centro Técnico Productivo Socialista Florentino (CTPSF) de Sabaneta estado Barinas, del convenio INIA- EMBRAPA (Empresa Brasileira

de Pesquisa Agropecuaria) y de la Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT).

LITERATURA CITADA

- Chacin, F. 2000. *Diseño y análisis de experimentos*. Ediciones del vicerrectorado académico Universidad Central de Venezuela. 387 p.
- Fattet, I. y M. Jaurena. 1988. El estado corporal de las vacas lecheras. Editorial: Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 8 p.
- Gabler, E. 2010: Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 8,152.
- Ghasemi, F., P. Gonzalez-Cano, P. Griebel and C. Palmer. 2012. Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis. *Theriogenology*. 78(7):1538-47. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.06.022. Epub 2012 Aug 25.
- Kasimanickan, R., T. Duffield, R. Foster, C. Gartley, K. Leslie, J. Walton and W. Johnson. 2005. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Canadian Veterinary Journal*. 46(3), 255-259.
- LeBlanc, S., T. Duffield, K. Leslie, K. Bateman, G. Keefe, J. Walton and W. Johnson. 2002. Defining and Diagnosing Postpartum Clinical Endometritis and its Impact on Reproductive Performance in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 85(9), 2223-2236.
- LeBlanc, S. J. 2012. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. *Reproduction Domestic Animal*. 47 5:18-30.
- Llewellyn, S., R. Fitzpatrick, D. Kenny, J. Patton and D. Wathes. 2008. Endometrial expression of the insulin-like growth factor system during uterine involution in the postpartum dairy cow. *Domestic Animal Endocrinology* 34.391-402.

- Madoz, L., M. Giuliadori, M. Jaureguiberry, J. Plöntzke, M. Drillich and R. de la Sota. 2013. The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J DairySci.* 96(7): 4333-9.
- O'Connor, J., R. McCusker, K. Strle, R. Johnson, R. Dantzer and K. Kelley. 2008. Regulation of IGF-I Function by Proinflammatory Cytokines: At the Interface of Immunology and Endocrinology. *Cell Immunol.* 252(1-2), 91–110.
- Pérez, J. 2009. Efecto de la tipología racial y manejo sobre condición corporal e involución uterina en vacas en sistemas doble propósito. Trabajo de ascenso. Área Ingeniería Agronómica. Universidad Rómulo Gallegos. San Juan de los Morros. estado Guárico. 55 p.
- Ruiz, A. y R. Kittok. 2008. La subunidad nmdar-1 del receptor n-Metil-D-Asparato (NMDAR) en el hipotálamo del ovino mediante el análisis de Western Blot. *Revista Científica. FCV-LUZ.* 18, 28-33.

Caracterización genética de la raza bovina Carora mediante el uso de marcadores microsatélites

Genetic characterization of the Carora cattle breed using microsatellites markers

Sundry Vásquez G¹., Efraín Salazar¹, Luis Dickson² y Luis Castro¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (INIA-CENIAP). Apartado 4653. Maracay, Aragua. Venezuela. Correo electrónico: sundryvg@gmail.com.

²Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. INIA-Lara. Venezuela.

RESUMEN

La raza bovina Carora de Venezuela, se originó mediante cruces empíricos entre las razas Criollo Amarillo de Quebrada Arriba y Pardo Suizo, principalmente. Es la raza bovina criolla que más contribuye a la economía ganadera de Venezuela y forma parte de un escaso número de razas locales que son parte de nuestro invaluable patrimonio genético. El conocimiento exhaustivo de sus características genéticas es primordial si se quiere contribuir con su preservación en el tiempo. El presente estudio tuvo como objetivo principal la realización de una caracterización genética de la raza Carora, el estudio de su variabilidad genética, así como de las relaciones genéticas con sus ancestros conocidos. Dado que el criollo Amarillo de Quebrada Arriba ya se extinguió se utilizaron muestras de la raza Criollo Limonero, pariente más cercano de esta y muestras de ejemplares de la raza Pardo Suizo para evaluar la estructura poblacional y filogenia. Se analizaron 35 muestras de la raza Carora, 20 de la raza Criollo Limonero y 20 de la raza Pardo Suizo, utilizando 10 marcadores microsatélites recomendados por FAO/ISAG, mediante los cuales fue posible estimar variables genético poblacionales, realizar pruebas de equilibrio de Hardy y Weinberg, para detectar la conformación de grupos genéticamente diferenciados. Como resultado se observó que la raza Carora posee una alta variabilidad genética, encontrándose cinco subtipos. Este estudio también evidenció, que la raza Carora a pesar de ser un híbrido producto de dos razas, ha evolucionado y desarrollado una identidad propia.

Palabras clave: Raza Carora, marcadores moleculares, Caracterización genética.

ABSTRACT

Cattle Carora breed originated from empirical crossing of cattle breeds Criollo Amarillo de Quebrada Arriba and Brown Swiss. Carora is the creole cattle breed that makes the greatest contribution to local cattle farming economy and it is part of a scarce number of local breeds that form Venezuela's invaluable genetic patrimony. The exhaustive knowledge of its genetic characteristics is indispensable to contribute to its preservation. Main objective of present study was to undertake a genetic characterization, genetic variability determining and establishing of phylogenetic relationships with its known ancestors. Since Criollo Amarillo of Quebrada Arriba is extinct 20 samples of closest relative Criollo Limonero were used among 35 of Carora and 20 Brown Swiss blood samples. 10 DNA molecular markers recommended by FAO/ISAG microsatellites were used to estimate a number of population genetic variables, test for Hardy and Weinberg, and to detect the formation of genetically distinct groups. Results show that the Carora breed possesses a high genetic variability. Five subtypes were observed. It can be concluded that despite of being a hybrid product of at least two races, Carora cattle has evolved and developed a proper identity.

Key words: Carora breed, molecular markers, genetic characterization.

INTRODUCCIÓN

La ganadería venezolana se realiza de manera tradicional en una variedad de sistemas y condiciones agroecológicas a lo largo y ancho del todo el territorio nacional. La misma se realiza en buena medida con razas de origen *Bos indicus* y algunas razas *Bos Taurus*, que de manera permanente se introducen desde otros países por productores y/o programas gubernamentales de apoyo a la actividad ganadera.

Esta introducción indiscriminada de razas, ha originado el desvanecimiento de las razas locales al punto de que algunas ya se han extinguido totalmente. No obstante todavía existen algunas razas como la Carora que han logrado sobrevivir y que contribuyen de manera importante a la producción ganadera nacional.

La raza Carora se originó del cruce del Criollo Amarillo de Quebrada Arriba (ya extinto) y su cruce empírico con la raza Pardo Suizo y se conocen por lo menos 3 tipos de raciales de la misma (Baya, Parda y Criolla) (ASOCRICA, 2013). Hace ya algunas décadas el ganado Carora comenzó a evidenciar desadaptación al clima, ya que algunas ganaderías se excedieron en el cruce absorbente con la raza Pardo Suizo y su mezcla con otras, como Holstein y Brahman.

La preocupación por la amenaza para la sobrevivencia de esta raza originó que a partir de 1984 se diseñara y pusiera en marcha un programa de apareamientos genéticos dirigidos a las mejoras en pro de la conservación de la raza (ASOCRICA, 2013).

A pesar, de los avances y estudios realizados a favor de la raza Carora, existe todavía muy poca información científica acerca de su constitución genética. La importancia que la caracterización de nuestro ganado puede tener en su utilización y conservación y el hecho de poder contar con la tecnologías y equipamiento necesario a nivel nacional, despertó el interés en realizar el presente estudio, que tuvo como objetivo principal, la caracterización genética, estudio de la variabilidad y determinación de relación filogenética de la raza Carora con otras razas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de sangre periférica de una población de bovinos de los tres grupos poblacionales o familias de la raza Carora (Baya, Parda y Criolla), pertenecientes a la Asociación venezolana de criadores de la raza Carora (ASOCRICA) provenientes de distintas zonas del país, además de muestras de las razas ancestrales Criollo Limonero, pariente más cercano del Criollo Amarillo de Quebrada Arriba y de Pardo Suizo. El muestreo se realizó seleccionando animales de ambos sexos entre jóvenes y adultos de diferentes familias que existen en el país (Cuadro 1).

La sangre periférica, a fin de obtener los glóbulos blancos necesarios para el estudio, se colectó en tubos vacutainers tapa morada con 500mM EDTA como anticoagulante, posteriormente se congeló a -20°C para conservarla hasta su uso.

La metodología utilizada para el aislamiento del ADN genómico, fue Dellaporta *et al.*, 1983, con modificaciones realizadas para este estudio, previamente se homogenizó la muestra durante 10 minutos y luego se colocó 300 μL de sangre dentro de un tubo para microcentrifuga de 1,5 mL. A cada tubo con sangre se agregó tampón de extracción (Tris HCL pH 8,0 100mM, EDTA pH 8,0 50 mM, NaCl 500 mM, SDS (w/v) 1,25%, bisulfito de sodio 0,38 g/100 ml), precalentado a 65°C , e incubado a 65°C por 45 minutos, con agitación de 1000 rpm. Luego se agregó proteinasa K a las muestras y posteriormente fueron incubadas a 55°C por 60 minutos y al 7.500 rpm para provocar la lisis celular y separar los ácidos nucleicos del restos de células.

Se realizó un lavado con Cloroformo Isoamil Alcohol (24:1) y se incubaron las muestras a -20°C por 15 minutos. Después se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 minutos. Se precipitó el ADN con Isopropanol frío y Acetato de Sodio 3M. Las muestras se incubaron a -20°C por 1 hora o se dejaron toda la noche. Las muestras fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C . Se lavaron los sedimentos etanol 70% frío y se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm por 5 minutos y se procedió a resuspender el sedimento con 50 μL de Tampón TE 1X (Tris-HCl 10 mM y 1 mM EDTA, pH=8). El siguiente paso fue agregar 1 μL de RNasa a 37°C durante

1 hr, la acción de la enzima se paralizó para luego colocar la muestra en hielo por 15 min, siendo almacenadas a -20 °C hasta su análisis.

Para este estudio se utilizaron 10 marcadores microsatélite recomendados por la FAO/ISAG, 2004 (Cuadro 2), realizando la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), estas reacciones se amplificaron en un ciclador de temperatura Marca MJ Research modelo PT2000. El programa de amplificación se inició con una etapa de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos constituidos por una etapa de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, una etapa de alineación de 30 segundos a 52°C-65°C y una etapa de alargamiento de 20 segundos a 72°C, para finalizar se realizó una etapa de elongación de 72°C por 20 minutos. La PCR se llevó a cabo en una reacción final de 15 μ L, constituida por 30 ng/ μ L de ADN genómico, Tampón 5X, MgCl₂ (25 Mmol), dNTP'S (5mM), Oligo 1 (6 μ M), Oligo 2 (6 μ M), Taq Polimerasa (5U/ μ l).

Los productos de amplificación fueron separados electroforéticamente junto con un marcador de tamaño molecular de secuencias de 25 pb (Promega), en cámaras verticales marca C.B.S. Scientific Company, con geles de poliacrilamida al 6% (19:1acrilamida:bisacrilamida) en condiciones desnaturalizantes (Urea 7M), durante 6 horas a 90 W, 2000 V, 45 mA a 60°C y se visualizaron los resultados con nitrato de

plata, utilizando el kit de tinción con plata de la marca PIERCE.

Análisis de datos

El análisis genético contempló la estimación de las variables poblacionales: Número de alelos (*na*), promedio de alelos (*pa*), además de la heterocigosis observada (*Ho*) y esperada (*He*). Posteriormente se estimó la distancia genética de Nei (Nei, 1987) y el índice de fijación *FST* (Wright, 1951). Los análisis se realizaron mediante los programas informáticos GenePop 4.0.10 (Raymond y Rousset, 1995) y FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995). La visualización gráfica de los resultados se llevó a cabo mediante la confección de árboles filogenéticos mediante el método de Neighbor joining (Saitou y Nei, 1987). Para la confección y validación de los árboles se utilizaron 1.000 repeticiones (bootstraps); en su cómputo y visualización se utilizaron los programas Population 1.2.30 (Langella, 2002) y Treeview 1.6.6 (Page, 2001).

Se realizó un análisis de conglomerados, que permite relacionar a los individuos más parecidos genéticamente. Dicho análisis utiliza un algoritmo bayesiano que emplea un modelo basado en el método Monte Carlo - cadena de Markov, que estima la distribución *a posteriori* de cada coeficiente de mezcla de cada individuo (*q*). La media de esta distribución representa una estimación de la proporción que el genoma

Cuadro 1. Distribución de las razas y su ubicación.

| RAZA | CANTIDAD | UBICACIÓN |
|-------------------------|----------|---|
| <u>Carora:</u> | 35 | |
| Baya | 11 | ASOCRICA |
| Parda | 11 | Carora Edo. Lara |
| Criolla | 13 | |
| <u>Criollo Limonero</u> | 20 | INIA-Zulia, Estación local Carrasquero, municipio Mara. |
| <u>Pardo Suizo</u> | 20 | Hacienda El Milagro (Pardo Suizo), Bejuma Edo. Carabobo |
| TOTAL: | 75 | |

Cuadro 2. Listado de los 10 *loci* microsatelites seleccionados.

| N° | Marcadores | Cro | Secuencia de Primers (5'-3') | Referencias | Tamaño (pb) |
|----|--------------------|-----|---|------------------------------------|-------------|
| 1 | INRA063 (D18S5) | 18 | ATTTGCACAAGCTAAATCTAACCC AAACCACAGAAATGCTTGGGAAG | Vaiman <i>et al.</i> (1994) | 167-189 |
| 2 | M M 1 2 (D9S20) | 9 | CAAGACAGGTGTTTCAATCT ATCGACTCTGGGGATGATGT | Mommens <i>et al.</i> (1994) | 101-145 |
| 3 | H E L 9 (D8S4) | 8 | CCCATTCAGTCTTCAGAGGT CACATCCATGTTCTCACCAC | Kaukinen y Varvio (1993) | 141-173 |
| 4 | CSRM60 (D10S5) | 10 | AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCCA AGGACCAGATCGTGAAAGGCATAG | Moore <i>et al.</i> (1994) | 79-115 |
| 5 | CSSM66 (D14S31) | 14 | ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG | Barendse <i>et al.</i> (1994) | 171-209 |
| 6 | HAUT24 (D22S26) | 22 | CTCTCTGCCTTTGTCCCTGT AATACACTTTAGGAGAAAAATA | Harlizius <i>et al.</i> (2012) | 104-158 |
| 7 | ETH3 (D19S2) | 19 | GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG | Solinas Toldo <i>et al.</i> (1993) | 103-133 |
| 8 | ETH10 (D5S3) | 5 | G TTCAGGACTGGCCCTGCTAACA CCTCCAGCCCCTTTCTCTTCTC | Solinas Toldo <i>et al.</i> (1993) | 207-231 |
| 9 | BM2113 (D2S26) | 2 | GCTGCCTTCTACCAAATACCC CTTAGACAACAGGGGTTTGG | Bishop <i>et al.</i> (1994) | 122-156 |
| 10 | BM1818 (D23S21) | 23 | AGCTGGGAATATAACCAAAGG AGTGCTTTCAAGGTCCATGC | Bishop <i>et al.</i> (1994) | 248-278 |

de un individuo tiene de las poblaciones ancestrales. Para el análisis se ha utilizado un periodo de burn-in de 100.000 repeticiones y 1.250.000 interacciones y el programa Structure 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de realizar las amplificaciones y visualización de los fragmentos de cada muestra de la población (Figura 1), se evidencia la optimización de la metodología en los fragmentos de ADN con el microsatélite tomando como ejemplo el locus MM12 que conforma el grupo de los 10 loci seleccionados, obteniendo en agarosa estos polimorfismos.

Estos loci fueron seleccionados por su alto polimorfismo, para hacer las respectivas comparaciones entre la raza Carora estudiada y

sus dos ancestros más significativos, obteniendo así la información sobre la variabilidad genética de cada una de estas razas. Por otro lado, la mayoría de estos microsatélites se encuentran entre los más referenciados en publicaciones científicas, como los usados por Villasmil-Ontiveros *et al.*, 2008, para la caracterización a través de la amplificación de 14 loci microsatélites, la raza Criollo Limonero, es importante decir que cinco utilizados para este estudio coinciden con la mencionada caracterización como lo son INRA63, HEL9, ETH3, ETH10, CSSM66.

En un estudio realizado por Piñeira *et al.*, 2011, donde se caracterizó genéticamente un rebaño de bovinos Criollos patagónicos chilenos, se utilizaron 10 marcadores microsatélites y se estimaron una serie de variables genético poblacionales lo que culminó en un aporte importante información de esta raza en cuanto a

su variabilidad genética, de estos microsatélites coincidieron ETH10, ETH03, BM2113.

Esto pone de manifiesto la confiabilidad de la información obtenida por el uso de estos microsatélite en estudios de diversidad genética en razas autóctonas y criollas en este estudio para la caracterización de la raza Carora.

Al visualizar la Figura 1, se demuestra la capacidad del cebador microsatélite MM12 para establecer polimorfismos en las tres razas estudiadas. De igual modo, la metodología estandarizada fue positiva para la identificación de polimorfismos en las tres razas estudiadas. Los resultados arrojados indican una mejor resolución de las bandas en las muestras de la raza Criollo Limonero, y una menor resolución en las bandas de las muestras de la raza Pardo Suiza. Los patrones de bandas visualizados en la raza Carora, son similares a los obtenidos en la raza Pardo Suizo. Las muestras de ADN de la raza Criollo Limonero, si bien comparte algunas de las bandas observadas en las otras dos razas analizadas, presenta generalmente un mayor número de bandas por muestra. Se

observaron, para la raza Criollo Limonero, entre 1 y 4 bandas.

Todos los Microsatélites utilizados (Cuadro 3), en este ensayo amplificaron y mostraron alto polimorfismo, detectándose 61 alelos en los 10 loci de los 35 Bovinos Carora estudiados, lo que corresponde a un promedio de 6,1 alelos/locus. El número de alelos por locus varió desde un máximo de 10 alelos en los loci HEL09 y hasta 3 alelos que correspondió al locus BM2118 y ETH10. Cabe destacar, que en 50% (5 de 10) de los marcadores presentaron 7 o más alelos diferentes, lo que se refleja que el promedio de alelos sea tan alto en la poblaciones. Por tal motivo, esta evaluación permite evidenciar un alto polimorfismo en marcadores seleccionados, haciéndolos adecuados para el estudio de la caracterización genética.

Por la dependencia de la cantidad de alelos del número de individuos muestreados, se recomienda utilizar la Heterocigosidad esperada (He) y Heterocigosidad observada (Ho), como indicadores para medir la variabilidad, tal como su nombre lo indica la Ho, representa el número

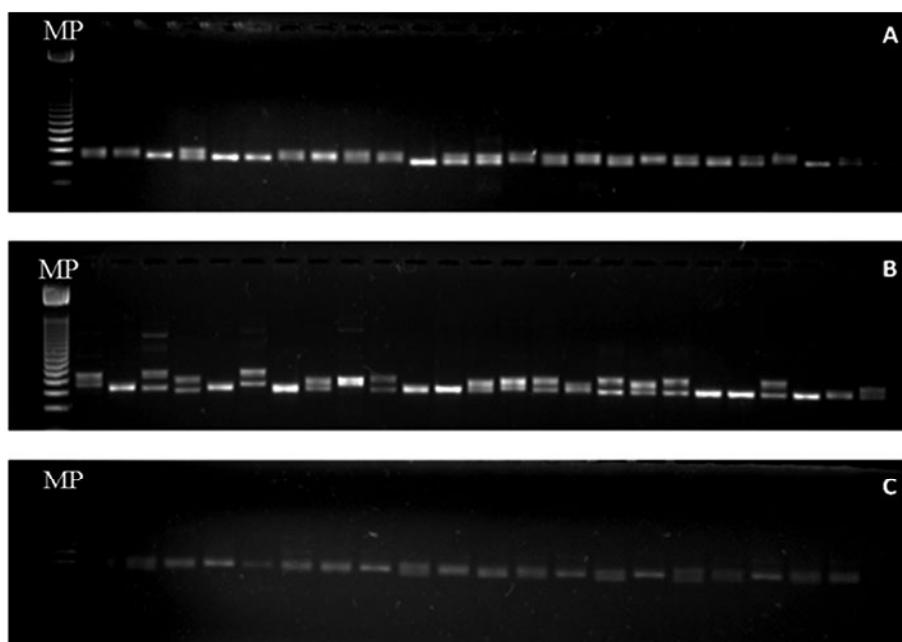


Figura 1. Amplificación de los fragmentos ADN del genoma en las poblaciones (A) Raza Carora, (B) Raza Criollo Limonero, (C) Pardo Suizo, con el locus microsatélite MM12, en geles de agarosa al 2,7% usando un (MP) Marcador de Peso molecular de 1 Kb.

relativo de individuos heterocigotos para cada locus que se encuentra en la población estudiada, y la H_e es la frecuencia relativa que se debería observar luego de apareamientos panmícticos, este valor de Heterocigosidad oscila entre 0 y 1 (Villasmil-Ontiveros, 2008). Mientras más cercano este de 1 mayor Heterocigosidad de la población.

En la investigación realizada, el promedio de la Heterocigosidad observada (H_o) en la raza Carora (Cuadro 3) fue de 0,649, comparándolo con otras investigaciones, este valor fue ligeramente más alto que el reportado por Villasmil-Ontiveros *et al.*, 2008, con la caracterización del ganado Criollo Limonero con un promedio de 0,602 y muy similar a lo reportado por Piñeira *et al.*, 2011 con la caracterización de los bovinos criollos patagónicos chilenos donde el promedio fue de 0,65 y como lo obtenido Barrera *et al.*, 2006 del estado genético de la raza Criolla Colombiana Casanare de 0,63. Esta comparación de datos nos indica que los análisis realizados para este estudio, están en concordancia con investigaciones acerca

de caracterización y/o conservación de razas autóctonas y criollas en otros países realizadas recientemente. En otras investigaciones donde el promedio de heterocigosis observada fue más bajo como el reportado por Mukesh *et al.*, 2004 en su estudio de la diversidad genética para razas autóctonas de la India con un 0,59 y los valores de Heterocigosidad observada obtenida de 0,61 por Lirón *et al.*, 2002 caracterización genética del ganado bovino Argentino y Boliviano.

El promedio de la Heterocigosidad esperada (H_e) en las raza Carora fue de 0,659, observándose que este valor fue similar al reportado por Villasmil-Ontiveros *et al.*, 2008 con un promedio 0,689 y por Lirón *et al.*, 2002 con un promedio de 0,62, por otro lado el promedio reportado por Piñeira *et al.*, 2011 fue más alto con un 0,79. Con respecto a la prueba de equilibrio de Hardy y Weinberg, se detectó una ligera inconsistencia en la Raza Carora (Cuadro 3), donde mostraron que la población manifestó un leve déficit de heterocigotos (F_{is} entre -0.009 y -0.131 respectivamente), detectándose así un desequilibrio significativamente bajo en la

Cuadro 3. Biodiversidad genética de la raza Carora.

| Locus | N. Alélos | H | H_o | H_e | F_{is} |
|----------|-----------|-------|-------|-------|----------|
| INRA063 | 4 | 0,702 | 0,742 | 0,692 | -0,058 |
| HEL09 | 10 | 0,690 | 0,657 | 0,680 | 0,049 |
| ETH03 | 7 | 0,734 | 0,800 | 0,724 | -0,090 |
| BM1818 | 3 | 0,341 | 0,314 | 0,336 | 0,081 |
| MM12 | 5 | 0,695 | 0,714 | 0,685 | -0,027 |
| ETH10 | 3 | 0,632 | 0,714 | 0,623 | -0,131 |
| HAUT24 | 9 | 0,655 | 0,571 | 0,646 | -0,100 |
| CSSM66 | 8 | 0,702 | 0,771 | 0,692 | 0,130 |
| CSRM60 | 8 | 0,702 | 0,742 | 0,692 | -0,059 |
| BM2113 | 4 | 0,736 | 0,742 | 0,726 | -0,009 |
| Promedio | 6,1 | 0,677 | 0,649 | 0,659 | |

H_o : Heterocigosidad media observada. **H_e :** Heterocigosidad media esperada.

H: Heterocigosidad sin sesgo (Nei 1978). **F_{is} :** Coeficiente de endocria.

población pudiéndose deber al número reducido individuos analizados para este estudio.

Luego de realizar los análisis para este estudio, se ha observado una consistencia en los resultados obtenidos demostrando la importante variabilidad genética que posee la raza Carora en relación a estudios realizados con microsatélites en razas criollas y/o autóctonas en donde han determinado la gran variabilidad del recurso genético que poseen.

En el estudio de la divergencia genética de la raza Carora en relación con las poblaciones de Criollo Limonero y Pardo Suizo (Cuadro 4), se determinó la Heterocigosidad observada (Ho), Heterocigosidad esperada (He) y el promedio de alélos (A) como indicadores de la variabilidad genética para cada una de las razas analizadas. Este análisis pudo evidenciar con el uso de los 10 *loci* microsatélites de manera clara, la variabilidad genética existente en las tres razas estudiadas.

La población de la raza Carora, reflejó una Ho de $0,67 \pm 0,14$, He de $0,65 \pm 0,11$ y un índice de $A = 4,6$, reflejando que la raza Carora posee los valores de Heterocigosidad mas altos con relación a las dos razas ancestrales. Comparando la población Carora con la población del Criollo Limonero, que obtuvo un promedio muy similar con una Ho de $0,65 \pm 0,18$ y He de $0,63 \pm 0,17$ pero un índice de $A = 5,6$ más alto, pudiéndose ver que ambas razas tiene una estrecha relación y cercanía entre ambas razas. En el caso de la población a población Pardo Suizo con una Ho de $0,55 \pm 0,10$, He de $0,56 \pm 0,10$ y un índice de $A = 2,8$ presentado los promedios en cuanto a variabilidad más bajos, y en relación con

la población Carora, pudiéndose decir que si existe una relación entre ambas razas, pero la raza Pardo Suizo más alejada que la raza Criollo Limonero.

El comportamiento de estas tres razas, se pueden ver evidenciadas en el árbol filogenético confeccionados a partir de las distancias genéticas interpoblacionales de Nei (Figura 2), en el que se manifiesta la formación de tres grupos muy bien definidos comportándose cada una de la razas de manera independiente de las otras. Este resultado es congruente con el análisis del Cuadro 4, donde se puede ver que la raza Carora a pesar de que es un híbrido de estas dos razas forma un grupo único, separada de sus dos ancestros, pero en donde se observa la relación producto de su conformación que se manifiesta como estrecha con la raza Criollo Limonero y la relación evidente pero no tan cercana con la Raza Pardo Suizo.

Empero se puede ver en el árbol filogenético a tres individuos pertenecientes a la raza Carora pero que guardan una estrecha relación con la población Pardo Suizo, pudiendo existir grupos de la raza Carora muy emparentados con el Pardo Suizo y gracias a lo anterior existe la conformación fenotípica de cada uno de sus grupos poblacionales.

Por otro lado, analizando el árbol filogenético, observamos que el grupo de individuos de la raza Carora se evidencia la formación de cinco subgrupos y no los tres subgrupos raciales Bayos, Criollos y Pardos, fenotipos característicos que conforman la raza.

Estos cinco fenotipos demuestran la posibilidad de que existan otros grupos poblacionales en la

Cuadro 4. Variabilidad en las tres razas analizadas por medio de la tipificación de 10 *loci* Microsatélites.

| Raza | Ho | He | H | A |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|
| Carora | $0,67 \pm 0,14$ | $0,65 \pm 0,11$ | $0,65 \pm 0,11$ | 4,6 |
| Pardo Suizo | $0,55 \pm 0,10$ | $0,56 \pm 0,10$ | $0,57 \pm 0,11$ | 2,8 |
| Criollo Limonero | $0,65 \pm 0,18$ | $0,63 \pm 0,17$ | $0,65 \pm 0,18$ | 5,6 |

Ho: Heterocigosidad media observada. **He:** Heterocigosidad media esperada. **H:** Heterocigosidad (Nei 1978). **A:** Número promedio de alélos

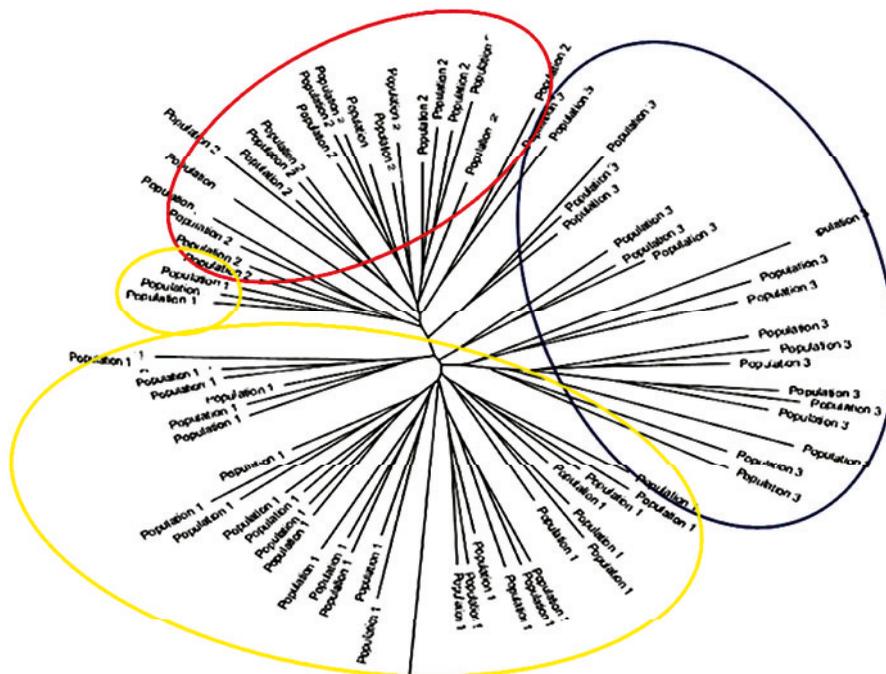


Figura 2. Árbol filogenético confeccionados a partir de las distancias genéticas interpopulacionales de Nei, (1987) para la **Población 1**: Raza Carora, **Población 2**: Pardo Suizo y **Población 3**: Criollo Limonero.

raza, en donde un subgrupo comparte relación estrecha con los individuos de la raza Criollo Limonero y existe un subgrupo muy relacionado con la raza Pardo Suizo, esto se evidencia en las características fenotípicas y la coloración del pelaje, en donde la raza posee un subgrupo poblacional con pelaje de color beige-marrón similar al Criollo Limonero y el otro subgrupo con coloraciones en gris semejante al Pardo Suizo.

Los dos subgrupos adicionales que se observan en el árbol filogenético integrados en la población de la raza Carora, manifiestan la presencia de otros fenotipos en la raza, como la existencia de individuos Carora con color de pelaje blanco. Estos manifiestos pueden tener relación con el proceso de la conformación de la raza durante tantos años y la intervención puntual de las razas con la Holstein y Brahman proporcionando una parte de sus características.

Realizando, posteriormente, un estudio con estos cinco grupos poblacionales de la raza Carora se pudo evaluar el comportamiento de cada una y

si estas conformaciones se mantienen como lo observado en el árbol filogenético (Figura 2) o si los resultados fueran diferentes. En la Figura 3, se ve reflejada un árbol de conglomerados de Nei a partir de las distancia genéticas entre las poblaciones, donde este resultado también es congruente con los resultados del análisis filogenético (Figura 2).

En este análisis, se pone de manifiesto el comportamiento independiente de las tres razas tal como se ve reflejado en la Figura 3, allí se confirma la relación cercana que existe entre la raza Carora y la raza Criollo Limonero y en donde también es notorio el comportamiento de un Carora que a pesar de ser una raza sintética o un híbrido producto de estas dos razas que le dieron origen, el mismo ha evolucionado y ha desarrollado un comportamiento autónomo y una identidad propia. Los resultados del presente estudio indican, que a pesar que la población y muestra de individuos Carora para este estudio no fue mayor (75 bovinos), estos presentaron un nivel de variabilidad genética comparable

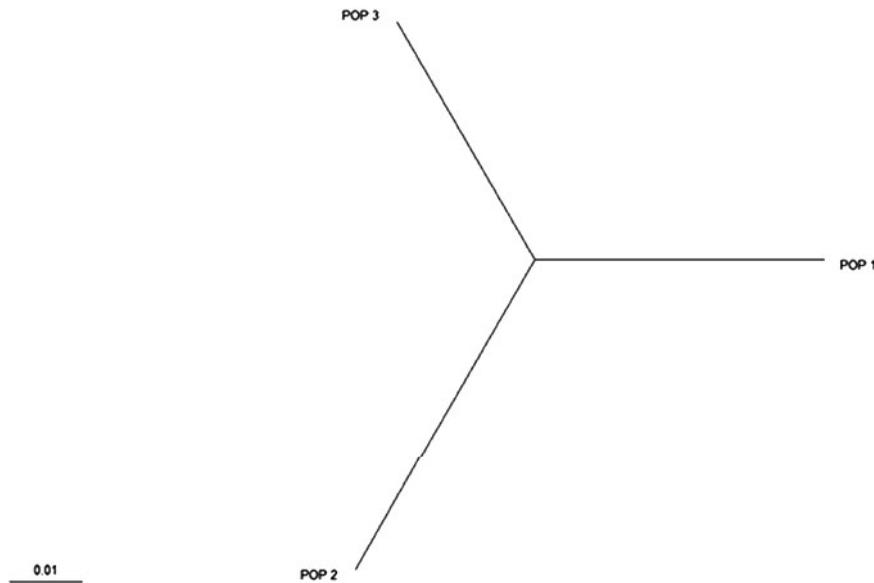


Figura 3. Árbol de Conglomerado confeccionados a partir de las distancias genéticas entre poblacionales de Nei, para la **Población 1:** Raza Carora, **Población 2:** Pardo Suizo y **Población 3:** Criollo Limonero.

a los observados en otras raza en Venezuela, como niveles de variabilidad analizados para el estudios raza Criollo Limonero (Villasmil-Ontiveros, 2008).

Dicha condición y comportamiento de la raza Carora, podría deberse a la acción del denominado efecto fundador y la deriva genética. El efecto fundador, como su nombre lo indica, es un fenómeno que se origina cuando una población es constituida por un número de individuos (censo efectivo N_e) muy reducido respecto de la población original (Falconer y Mackay, 1996). Como consecuencia, en la nueva población será posible encontrar una mayor frecuencia de alelos raros o carecer de otros comúnmente encontrados en la población de origen en este caso el ganado Criollo, como corolario de la selección de un grupo de animales sometido a cruces y selección que fueron evolucionando con la participación de raza Pardo Suizo.

CONCLUSIONES

Los microsatélites para el estudio mostraron que existe un alto polimorfismo lo que permite concluir que existe una alta variabilidad genética en la raza, con altos niveles de Heterocigosidad en la población.

En lo que respecta a la divergencia genética de la raza Carora con relación a las poblaciones de Criollo Limonero y Pardo Suizo, se determinó que existe una estrecha relación con estas, demostrando así su participación en la creación del Carora.

También puede determinarse que la raza Carora se comporta de manera autónoma como una raza única e independiente y que posee una identidad propia.

También se observó en el grupo de individuos de la raza Carora, la formación de cinco subgrupos y no tres tal y como se creía hasta ahora, en donde un subgrupo comparte relación estrecha con los individuos de la raza Criollo Limonero y otro está muy relacionado con la raza Pardo Suizo.

LITERATURA CITADA

- ASOCRICA. Asociación de Criadores de Ganado Carora. Disponible en línea: <http://www.razacarora.com>. [Mar. 20, 2013].
- Barrera, G., H. Sastre, R. Martínez y Y. Ortigón. 2006. Estado genético de la raza criolla colombiana Casanare. **En:** VII Simposio Iberoamericano sobre conservación y utilización de recursos zoogenéticos. Cochabamba, 12/5-7. Bolivia. pp. 41-43.
- Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A Plant Dna Minipreparation: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4):19-21.
- Falconer, D. Y. and T. Mackay. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th ed. Longman Scientific and Technical, New York, NY. pp. 49-83
- FAO/ISAG. 2004. Secondary Guidelines: Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): New Recommended Microsatellite Markers. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura, sociedad internacional de genética animal. Disponible en línea: <http://www.dad.fao.org>. [Abr.18, 2010].
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Ver. 2.9.3.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Heredity*, 86: 485-486.
- Herrera, D. 1960. *El Ganado Mestizo De Pardo Suizo Tipo Carora*. Tesis de M.Sc. Universidad Central de Venezuela. Venezuela. 100 p.
- Langella, O. 2002. Population 1.2.28. Logiciel de génétique des populations. Laboratoire Populations, génétique et évolution, CNRS UPR 9034, Gif-sur-Yvette.
- Lirón, J., M. Ripoli, J. De Luca, P. Peral-García and G. Giovambattista. 2002. Analysis Of Genetic Diversity And Populations Structure In Argentine And Bolivian Creole Cattle Using Five Loci Related To Milk Production. *Genetics And Molecular Biology*. 25: 413-419.
- Mukesh, M., M. Sodhi, S. Bhatia and B. Mishra. 2004. Genetic diversity of Indian Cattle breeds as analysed with 20 microsatellite loci. *J. Anim. Breed. Genet.* 121:416-424.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, Nueva York.
- PAGE. RDM. 2001. TreeView (Win32) version 1.6.6. Available on line: <http://www.taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>. [Feb. 25, 2013].
- Piñeira, J., F. Mujica, R. Felmer, M. Ortiz, G. Pizarro y M. Aracena. 2011. Caracterización Genética De Un Rebaño De Bovino Criollo Patagónico Chileno. *Revista Agro Sur Vol.* 39(1) 46-56.
- Pritchard, J. K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. GENEPOP, Version 3.3: population for exact test ecumenism. *J Heredity* 86: 248-249
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Villasmil-Ontiveros Y., R. Bravo, L. Yáñez-Cuéllar, G. Contreras, J. Jordana y J. Aranguren-Méndez. 2008. Diversidad Genética De La Raza Criollo Limonero Utilizando Marcadores De ADN Microsatélites. *Revista Científica Luz Vol.18, No.4*, pp. 415-423.
- Wright, S. 1951. The genetic structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.

Variabilidad genética en cachamas de Los Llanos venezolanos, usando marcadores RAPD

Genetic variability of the french angelfish from the Venezuelan plains using RAPD markers

Yamilys Y. Carreño Pérez^{1*}, Efraín Salazar Y.¹, Siomara Martínez Marrero³, Otto E. Castillo González² y Luis Castro¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agrícolas. INIA-CENIAP. Código postal 2101. Aragua. Venezuela. Correo electrónico: yamilys69@hotmail.com.

² Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales “Ezequiel Zamora” (UNELLEZ). Vicerrectorado de Producción Agrícola. Programa de Ciencias del Agro y del Mar. Portuguesa, Venezuela.

³ Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Mayabeque, Cuba.

RESUMEN

Resulta necesario conocer la huella genética de las poblaciones de reproductores existentes en las estaciones piscícolas del país, para garantizar la sostenibilidad de este patrimonio, ya que de ello depende implementar programas genéticos eficientes en la explotación de los mismos. La presente investigación consistió en una caracterización genética de las cachamas negras (*Colossoma macropomum*) y cachamas blancas (*Piaractus brachyomus*) en la estación piscícola de San Fernando de Apure e INIA Papelón de Los Llanos venezolanos. Se seleccionaron los diez cebadores más polimórficos capaces de establecer diferencias entre los individuos. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. Fueron visualizados bajo luz ultravioleta y se construyeron las matrices binarias para las bandas obtenidas (0 banda ausente y 1 banda presentes). Las matrices fueron analizadas mediante un análisis de conglomerado jerárquico, con el programa estadístico PAST versión 2.02, empleando el método Ward. Los valores para el índice de Shannon (H) fueron de entre 1,05 a 1,40 lo que indica que existe una baja diversidad genética dentro de las poblaciones, este resultado fue similar para el índice de Margalef en donde se obtuvieron valores de entre 1,68 a 2,50 siendo la población de cachamas negras del INIA Papelón la que presentó mayores índices de variabilidad genética.

Palabras clave: *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachyomus*, Diversidad genética, caracterización molecular.

ABSTRACT

It is necessary to know the genetic fingerprint of existing stocks in fish breeding stations in the country, to ensure the sustainability of this heritage through the implementation of efficient genetic programs that helps to improve productivity. This research involved a genetic characterization of black cachamas (*Colossoma macropomum*) and white cachamas (*Piaractus brachyomus*) at the fish stations from San Fernando de Apure and INIA “Papelón” in Portuguesa from the Plain zones venezuelan. Ten of the most capable primers ables to differente among individuals were selected. The amplification products were separated in agarose gel electrophoresis 1.5%. The products were visualized under ultraviolet light, and binary matrices were constructed from the bands obtained (0 means missing of the band and 1 means presence of the band). Arrays were analyzed using hierarchical cluster analysis, with the statistical program PAST version 2.02 using the Ward method. Values of the Shannon index (H) ranged from 1.05 to 1.40 indicate that there is low genetic diversity within populations, this result was similar to the Margalef index with values from 1.68 to 2.50 of the population. The black cachamas population from INIA Papelón scored for the highest genetic variability indexes.

Key words: *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachyomus*, Genétic Diversity, Molecular Characterization.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, la cachamicultura ocupa el segundo lugar en producción de proteína animal proveniente de la piscicultura (INAPESCA 2004), representada por la cachama negra (*Colossoma macropomum*), la cachama blanca o morocoto (*Piaractus brachypomus*) y el híbrido cachamoto, producto del cruce de las dos especies puras. Estas especies poseen características de importancia en la piscicultura como: Rápido crecimiento, adaptabilidad al manipuleo en cautiverio, aunado a que son de amplia distribución en la Cuenca de la Orinoquia venezolana. Pese a la importancia de la cachama blanca y la cachama negra en la piscicultura nacional, no existen planes para su mejoramiento genético y sólo se cuenta con un vago conocimiento de la procedencia.

A fin de contribuir con posibles programas de mejoramiento genético se hace necesario conocer la caracterización genética de las poblaciones, así como la diversidad genética presente y las posibles relaciones filogenéticas entre los individuos de ambas especies. Para este fin, los marcadores moleculares son una herramienta útil e indispensable para la acuicultura, ya que permiten una identificación más precisa de los individuos que está basada en su material genético, mediante el cual se facilita planificar los posibles cruces y manejo de la reproducción de estas especies en las estaciones piscícolas, haciendo más efectivo el mejoramiento genético, ayudando a minimizar la pérdida de variabilidad genética (Povh *et al.*, 2008; Montaña *et al.*, 2006).

Dentro de las técnicas moleculares, el uso de los marcadores de ADN Polimórfico Amplificado al Azar, RAPD por sus siglas en inglés, (Williams *et al.*, 1990) ha sido una estrategia utilizada para la caracterización preliminar de las poblaciones y el establecimiento de criterios generales de manejo de planes de mejora en peces (Rocco *et al.*, 2014; Faddagh *et al.*, 2012). De igual modo, los RAPD han sido útiles para determinar efectos genotóxicos en poblaciones de peces debido a contaminación con metales pesados (Salem *et al.*, 2014), confirmando la utilidad de estos marcadores en caracterizaciones moleculares y estudios genéticos en peces.

En el caso de cachamas o especies relacionadas, existen trabajos de caracterización genética mediante el uso de técnicas moleculares, Orozco y Narváez (2014) estudiaron la diversidad genética de poblaciones de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) en el río Magdalena utilizando marcadores microsátélites, corroborando la utilidad de los marcadores moleculares para la identificación de poblaciones ictícolas y su contribución a los programas de manejo y conservación de peces. De igual modo, Pineda *et al.* (2007) utilizaron los marcadores RAPD para caracterizar molecularmente poblaciones de *Brycon henni*, colocando muestras de cachama como control interespecífico para los grupos, demostrando que la técnica era útil para el estudio de diversidad genética en estas especies.

Aún cuando no se reportan estudios de diversidad genética en cachamas utilizando marcadores RAPD, Aguiar *et al.* (2013) estudiaron la diversidad genética de *Colossoma macropomum*, tanto nativas como cultivadas, analizando secuencias de ADN mitocondrial, encontrando niveles de diversidad genética similares entre las poblaciones estudiadas, y llamó la atención que las especies mejoradas y en cautiverio, presentaron una estructura genética similar a la encontrada en las poblaciones nativas. No obstante, es necesario realizar estudios más exhaustivos en cuanto a la caracterización genética de las especies de cachama producidas en condiciones artificiales.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar genéticamente a las cachamas negras y a las cachamas blancas cultivadas de dos estaciones piscícolas de Los Llanos venezolanos utilizando marcadores RAPD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área

La investigación se realizó en dos estaciones piscícolas ubicadas en Los Llanos venezolanos (Estación Piscícola San Fernando de la Gobernación del estado Apure cuyas coordenadas geográficas son 7° 52' 34" N y

67° 30' 8" W he INIA Papelón-Portuguesa con coordenadas geográficas 7° 52' 30" N y 69° 26' 50" W).

Tipo de muestra

Para el estudio del material genético de los individuos se colectaron inicialmente 5 gr aproximadamente de aleta caudal, los cuales se conservaron en etanol 70% a 4°C. El material genético fue aislado a partir de 2 gr del tejido anteriormente mencionado.

Número de muestras

La presente investigación se realizó con 82 ejemplares, de los cuales 30 individuos correspondieron a cachamas negras provenientes de la estación piscícola del INIA Papelón, y 26 provenientes de la estación piscícola San Fernando del estado Apure. Para el caso de las cachamas blancas se trabajó con 26 reproductores provenientes de la estación del estado Apure.

Protocolo de extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) modificado por Carreño *et al.*, 2014 (En prensa). Se maceraron 2 g de tejido blando de la aleta (en caso de ser tejido duro se debe cortar inicialmente en trozos muy pequeños) con 500 µL del tampón de lisis (Tris HCL pH 8.0 100mM, EDTA pH 8,0 50 mM, NaCl 500 mM, SDS (w/v) 1,25%, bisulfito de sodio 0,38 g/100 ml) precalentado a 65 °C. Se añadieron 50 µL de ditiotreitól (10mM) y las muestras se incubaron a 65 °C por 45 minutos agitándose constantemente a 1.000 rpm. Posteriormente, se agregaron 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y 50 µL de CTAB (2%) incubándose a -20°C por 15 minutos. Los macerados se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 minutos, transfiriéndose el sobrenadante a un tubo nuevo y repitiéndose los pasos desde agregar 500 µL de cloroformo isoamil alcohol (24:1) y 50 µL de CTAB. Se agregaron 500 µL de isopropanol frío y 50 µL de acetato de sodio (3M). Las muestras se incubaron a -20°C por media hora o durante toda la noche. Se centrifugaron los extractos a 14.000 rpm por 10 minutos, decantándose el isopropanol. El sedimento se lavó con 500 µL de etanol 70%

frío y la muestra se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos, repitiéndose este último paso hasta 3 veces. Las muestras se secaron finalmente por centrifugación al vacío (Concentrador 5301, marca Eppendorf) a 45 °C por 5 minutos y los sedimentos secados se resuspendieron en 50 µL de Buffer TE. Los ADN aislados se mantuvieron a -4 °C hasta su análisis.

La cuantificación y dilución del ADN

La cuantificación e integridad del ADN fue determinada midiendo la absorbancia en un Nano Drop ND-1000, marca Thermo Scientific, la calidad e integridad se observó mediante la separación electroforética de la muestra en un gel de agarosa 1%, con un campo eléctrico constante de 100 Volt ± 100 mA por 45 minutos. Para las reacciones de RAPD, los ADN de las muestras fueron diluidos a concentraciones de 10 ng/µL.

Condiciones de la amplificación por RAPD

La amplificación al azar de los ADN extraídos fue realizada en un termociclador marca MJ Research modelo PTC-200. Se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos de 94°C por 30 segundos, 37°C por 30 segundos y 72°C por dos minutos. Finalmente se realizó un paso para la extensión final de las cadenas a 72°C por siete minutos y las muestras se mantuvieron a 4°C. El volumen de la reacción fue de 15 µL conteniendo 2 µL (20 ng) de ADN, 2 µL del iniciador OPB04(6µM), el cual fue seleccionado al azar, 0,8 µL (1 unidad) de Red-Taq ADN polimerasa, platinum (Sigma, USA), 0,34 µL (10 mM) de cada dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Promega, USA), 1,5 µL de tampón Red- Taq 10X, 7,36 µL de agua bidestilada y 1 µL de BSA (Suero de Albumina Bovino) 10 mg/ml. En la amplificación se usó una reacción como control (N), a la cual se le añadieron 2 µl de agua bidestilada en lugar de ADN.

Selección de cebadores más polimórficos

Se usaron tres set (OPA, OPB y OPC) de 20 iniciadores cada uno, con un tamaño de 10 nucleótidos por iniciador, fueron adquiridos de Operon Technologies, USA. Se seleccionaron los diez cebadores que permitieron observar el mayor grado de polimorfismo, para continuar

con el estudio del total de las muestras. Para la detección del polimorfismo, solo se consideraron los fragmentos reproducibles, y claramente observados en el gel.

Detección de los productos de amplificación

Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1,5%, con buffer TBE 0.5X a pH 8.0. La tinción del gel se realizó con con 1µl de bromuro de etidio (10 mg/ml Promega, USA) añadidos al gel. Como marcador de peso molecular se utilizó la escalera de fragmentos 1 Kb (Promega, USA). Los geles fueron digitalizados en un equipo modelo Gel Doc XR, marca BIO-RAD. Los análisis de las bandas se realizaron utilizando el programa Quantity One de Biorad versión 4.2.

Diseño y análisis estadístico

La investigación se realizó siguiendo un diseño completamente al azar. Se analizó el porcentaje de bandas polimórficas y el contenido de información polimórfica de acuerdo a la fórmula de Roldán-Ruiz *et al.* (2000). Para el análisis fenético se construyó una matriz de ausencia y presencia de bandas, para cada una de las poblaciones, asignándose el valor 1 para la presencia de la banda o 0 para su ausencia. Se realizó un análisis multivariado de conglomerado jerárquico, mediante el programa estadístico PAST versión 2.02, con el método de agrupamiento de Unweighted Pair Group

Method with the Arithmetic Averaging (UPGMA) con base en el cálculo del coeficiente de similitud de Ward (1963).

El análisis de la variabilidad genética se realizó utilizando el porcentaje de fragmentos polimórficos y los índices de diversidad genética H (Shannon-Weaver, 1949) y M (Margalef, 1958).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizadas las amplificaciones, se seleccionaron las secuencias OPA1, OPA2, OPA3 OPA5, OPA7, OPA8, OPA11, OPA17, OPA18 y OPA20, como las que fueron capaces de evidenciar un alto grado de polimorfismo (99% de bandas polimórficas en promedio). Para las tres poblaciones se obtuvo un total de 273 bandas. La especie blanca fue la que menor número de bandas mostró con un total de 90, en comparación con el promedio de bandas para la especie negra, el cual se estimó en 93 bandas. Pero, como se puede observar en el Cuadro, el número de bandas para la especie negra fue diferente en función de la localidad.

Los cebadores seleccionados fueron capaces de evidenciar polimorfismos para las tres poblaciones, donde el número de bandas polimórficas producidas osciló de entre 2 y 15. Es importante señalar, que las bandas obtenidas se presentaron desde un mínimo de 1 hasta un máximo de 26 individuos, lo que indica una gran similitud entre los individuos. El 65% de

Cuadro. Resumen de polimorfismo generado de una población de (*P. brachypomus*) y dos poblaciones de (*C. macropomum*) en estaciones piscícolas del Los Llanos venezolanos, mediante el uso de RAPD.

| Especie/Localidad | NTB | NBP | %BP | PIC | Ees |
|------------------------------------|-----|-----|-----|------|------|
| (<i>P. brachypomus</i>) Apure | 90 | 90 | 100 | 0,20 | 0,03 |
| (<i>C. macropomum</i>) Apure | 79 | 77 | 96 | 0,21 | 0,05 |
| (<i>C. macropomum</i>)Portuguesa | 104 | 104 | 100 | 0,26 | 0,05 |

NTB= Número total de Bandas por especie y localidad de muestras, NBP= Número de bandas polimórficas, %BP= Porcentaje de bandas polimórficas, PIC=Contenido de Información Polimórfica y ees=error estándar asociado a los PIC.

las bandas estudiadas estuvieron presentes en menos de seis individuos, mientras que el 22% de las bandas se presentó de forma específica en un individuo.

Al observar los valores del contenido de información polimórfica, obtenemos valores promedios entre las tres poblaciones que van de entre 0,20 y 0,26, lo que demuestra que los marcadores utilizados, tienen una probabilidad media, de manera individual, de establecer polimorfismos entre los individuos estudiados, por ello es necesario el uso de varios marcadores RAPD para poder hacer un buen análisis de la variabilidad.

El análisis de los conglomerados jerárquicos usando el método de Ward dieron como resultado tres dendogramas que se presenta en

la Figura 1, 2 y 3 correspondiente a cada una de las poblaciones de cachamas, en los cuales se expusieron las relaciones fenéticas dentro de cada una de las poblaciones, demostrando que existen dos conjuntos de individuos presentes en cada una de las poblaciones. En todos los casos, las distancias genéticas entre los individuos resultaron pequeñas. Las 1.000 repeticiones de Booth trapping realizadas, indicaron una alta repetibilidad de las separaciones de grupos y subgrupos observadas.

La diversidad genética para la población de cachama blanca de San Fernando de Apure, tuvo un índice H de Shannon de 1,05 mientras que para el índice de Margaleff fue de 1,68. Estos valores indican una baja variabilidad genética en los individuos muestreados, por lo que se está en presencia de individuos estrechamente

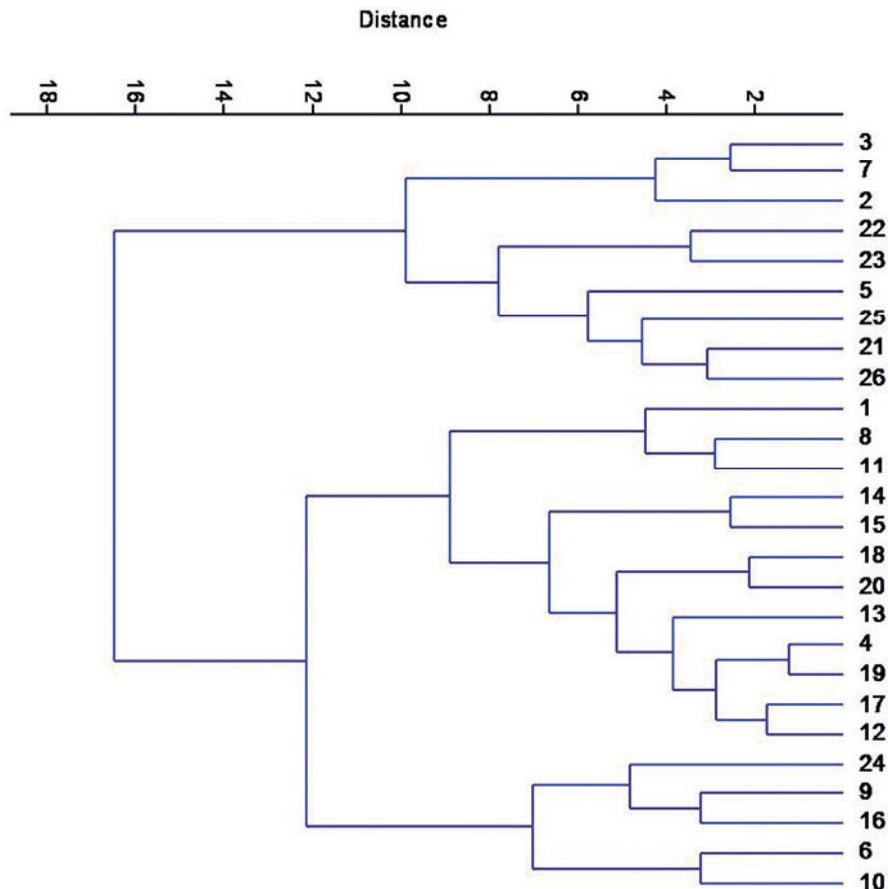


Figura 1. Dendrograma UPGMA, que muestra la relación genética entre 26 reproductores de cachama blanca de la estación piscícola de San Fernando de Apure. Soporte de rama 1.000 réplicas.

relacionados desde el punto de vista genético, como se muestra en la Figura 1. Así mismo para la población de cachamas negras de San Fernando de Apure, los índices de diversidad genética fueron de 1,21 para el índice H de Shannon y de 2,10 para el índice de Margaleff, lo que igualmente indica una baja variabilidad genética en esta segunda población. Ver la Figura 2.

Para el caso de la estación piscícola del INIA Papelón del estado Portuguesa, se obtuvo una diversidad genética para el índice H de Shannon de 1,4 y para el índice de Margaleff de 2,5 estos valores indican una baja variabilidad genética entre esta población según el primer índice, pero para el segundo índice los valores de variabilidad genética están dentro del rango de aceptación normal, a pesar de estar orientados hacia el nivel más bajo de variabilidad genética aceptada como normal o media.

La acuicultura como actividad económica en crecimiento requiere el empleo de técnicas y estrategias que le permitan solucionar los

problemas para ser más eficientes. Dentro del contexto del mejoramiento genético de los organismos cultivables, se requiere la selección de reproductores que posean las mejores características fenotípicas y genotípicas, que garanticen una producción de alevines en calidad y cantidad (Montaño *et al.*, 2006 y Atta, 2006). Conocer los parentescos entre los reproductores una vez que son capturados en el medio natural, permitirá realizar los cruces de forma más efectiva que garantice un flujo genético en equilibrio entre alelos homocigotos y heterocigotos. Los marcadores RAPD resultaron ser una herramienta útil para conocer y evitar la pérdida de variabilidad genética (Povh *et al.*, 2008).

Existen muchos factores a que se le puedan atribuir el que las poblaciones aquí estudiadas, tengan una baja diversidad genética. Pineda *et al.* (2007) estudiaron poblaciones silvestres de *Brycon henni* y encontraron que la diversidad genética de las misma fue discreta quizás por efectos antrópicos debido a la manipulación

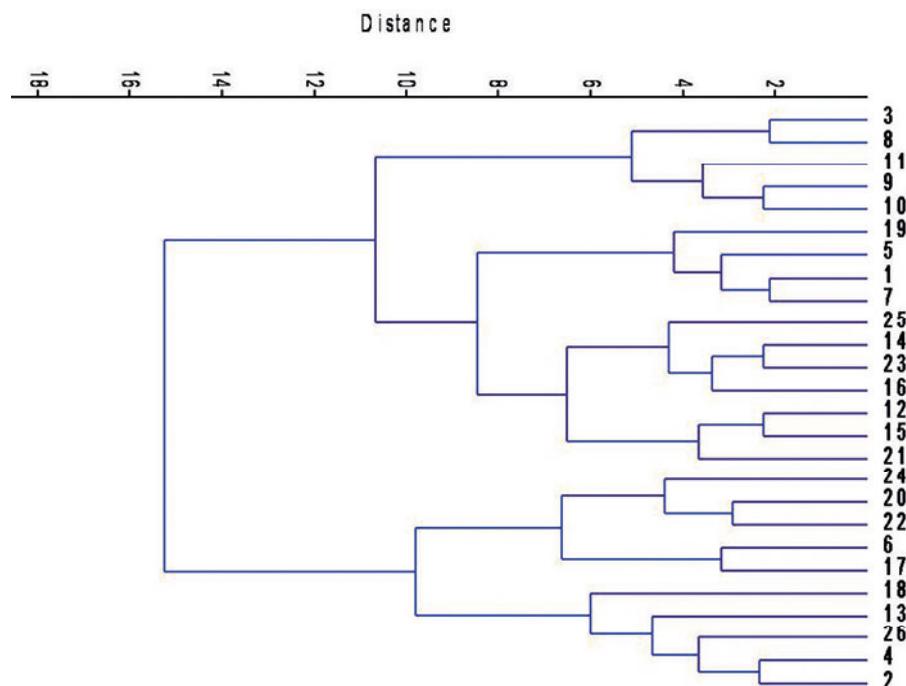


Figura 2. Dendrograma UPGMA, que muestra la relación genética entre 26 reproductores de cachama negra de la estación piscícola de San Fernando de Apure. Soporte de rama 1.000 réplicas.

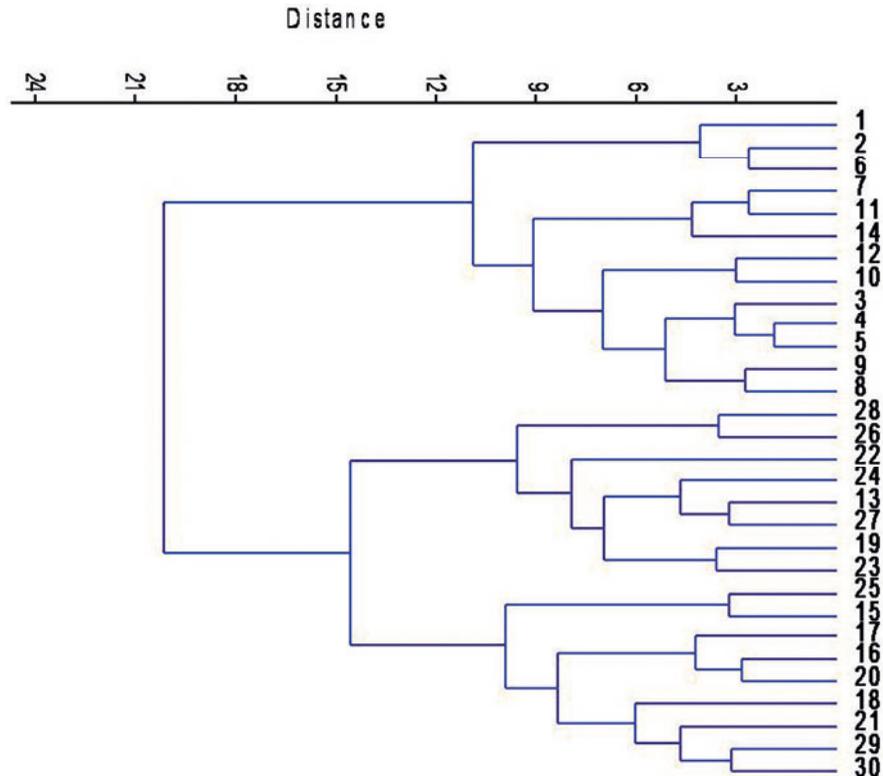


Figura 3. Dendrograma UPGMA, que muestra la relación genética entre 26 reproductores de cachama negra de la estación piscícola del INIA Papelón del estado Portuguesa. Soporte de rama 1.000 réplicas.

o acción del hombre, tanto en los ambientes naturales como en los controlados. Toda población cuenta con una serie de atributos que se resumen en su variabilidad genética y este es el material de partida sobre el cual los agentes (mutación, migración, deriva genética y selección natural) producen cambios estructurales (Álvarez, 1987). Actualmente estas estaciones piscícolas no cuentan con estudios genéticos necesarios para realizar una selección adecuada, distinguiendo los reproductores en base a los fenotipos, lo que lleva como consecuencia la realización de cruzamientos subjetivos, lo que puede incidir de forma negativa sobre la diversidad genética y las características desde el punto de vista productivo.

Así mismo estos resultados con una diversidad genética, aparentemente baja, se le pueden atribuir al número pequeño de reproductores dentro de las estaciones piscícolas. Lande

(1980) señaló que en una población fundadora que esté constituida por un número pequeño de reproductores, se espera un descenso de la heterocigosis en la primera generación con respecto a la población de origen en un 25%. En este orden de ideas, Álvarez (1987) indicó que la estocasticidad de una población debido a la deriva por el número finito o tamaños pequeños de una población, reduce considerablemente su diversidad genética.

Por lo tanto, el manejar dentro de estaciones piscícolas un número pequeños de reproductores, considerados superiores por algún criterio para la fundación del stock a partir de pocos individuos de una población natural (efecto fundador) es perjudicial, ya que reduce en cada generación la diversidad genética de los individuos y con ello sus cualidades productivas cuantificables. Esta práctica es común en estas estaciones piscícolas, dado a que los peces y moluscos por

ser de alta fecundidad, se pueden producir un gran número de individuos a partir de un número pequeño de reproductores.

Por otra parte Elorrieta (1993), realizó un trabajo con el fin de cuantificar la variabilidad genética intrapoblacional existente en varias poblaciones de tenca (*Tinca tinca*) en España y determinó su similitud genética, a nivel citogenético, bioquímico (isoenzimas) y molecular (PCR y RAPD), en donde encontró que las distancias génicas por cualquiera de los métodos fueron más bajas de lo esperado y deseable en poblaciones naturales, lo que indica que la variabilidad genética de estas poblaciones han perdido riquezas génicas ya sea por acción del hombre o por otros fenómenos naturales.

Así mismo Lopera *et al.* (2009) analizaron la diversidad genética de lotes de *Piaractus mesopotamicus* usados en programas de repoblamiento, mediante el marcador molecular RAPD, obteniendo que según el índice Shannon existía una alta diversidad genética en los lotes evaluados. Pero, se encontró una alta similitud genética entre los lotes debido posiblemente al efecto fundador, ya que los lotes se produjeron con reproductores recolectados en el río Paraná.

Por otro lado, a diferencia de estos resultados, Lupchinski *et al.* (2011) estudiaron diversidad genética de tres líneas de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), mediante el uso de 13 marcadores RAPD, donde analizaron tres líneas de dos piscifactorías, obteniendo una alta variabilidad genética dentro de cada línea. Del mismo modo, Lopes *et al.* (2009) analizaron la diversidad genética en reproductores de (*Colossoma macropomum*) de piscifactorías en Brasil, con 10 cebadores de RAPD, encontrando una alta variabilidad genética entre los lotes de reproductores estudiados, de igual modo, se encontró que el número de migrantes entre los dos lotes aumentaba con cada generación.

Así mismo, Pineda *et al.* (2007) mencionaron haber encontrado un alto porcentaje de individuos con fragmentos únicos de ADN y le atribuyen esto al aislamiento geográfico de los mismos y al cautiverio, pero que aún conservan las características propias de su grupo genético original. Esto concuerda con los resultados de esta investigación, en el que el porcentaje de individuos con fragmentos únicos de ADN

fue del 22%. Estos fragmentos únicos son de suma importancia para la caracterización e identificación de los genotipos, y de su seguimiento en programas estructurados de mejora genética piscícola.

El estudio genético de las poblaciones silvestres de donde se reponen los plantales de reproductores de las estaciones piscícolas deben ser evaluado constantemente, con el fin de conocer la evolución biológica y determinar si las especies sufren algún tipo de deriva genética, efecto fundador o cuello de botella, a fin de corregir las fuentes naturales de reproductores y evitar la consanguinidad. Por otro lado, Falconer (1981) comentó que la consanguinidad es una desviación de la panmixia o el incremento de apareamientos consanguíneos, aumentando la frecuencia de los homocigotos dentro de una población, afectando los caracteres cuantitativos.

Povh *et al.* (2008) establecieron la necesidad de monitorear la diversidad genética de las poblaciones nativas y de los lotes mantenidos en cautiverio para la conservación de las especies. La procedencia de la semilla puede ser un factor que afecte de forma, auténticamente, importante al cultivo de los peces y moluscos (Álvarez, 1987). Así mismo, para que la piscicultura sea exitosa se debe alcanzar un control de los aspectos biológicos y genético de los stock (Newkirk, 1980).

CONCLUSIONES

Los RAPD fueron capaces de separar las tres poblaciones de cachama blanca y cachama negra de las estaciones piscícolas de San Fernando de Apure e INIA Papelón de Los Llanos venezolanos, y a su vez confirmar que existe una baja variabilidad genética intrapoblacional en los reproductores cultivados de cachama blanca y cachama negra.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Biotecnología Agrícola del INIA-CENIAP por brindar las facilidades para la realización de este trabajo y al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por aprobar parte del financiamiento de este trabajo a través de los Proyectos de Estímulo a la Investigación (PEI).

LITERATURA CITADA

- Aguiar, J., H. Schneider, F. Gomes, J. Carneiro, S. Santos, L. R. Rodríguez y I. Sampaio. 2013. Genetic variation in native and farmed populations of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon: regional discrepancies in farming systems. *Ann. Acad. Bras. Cienc.* 85 (4): 1439-1447.
- Álvarez, G. 1987. Genética y Acuicultura. Plan de formación de técnicos superiores en acuicultura. Genética de poblaciones, pp. 2-3.
- Atta, S. y K. Roberto. 2006. Estudio comparativo en dos sistemas de propagación de los progenitores de *Piaractus brachypomus* (Estación acuícola "El Prado" departamento de Santa Cruz). Universidad Autónoma Gabriel René Moreno. Santa Cruz de la Sierra-Bolivia. pp. 34-44.
- Dellaporta, S. J., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Rep.* 1:19-21.
- Elorrieta, J. y A. María. 1993. Caracterización y análisis de la variabilidad genética en poblaciones españolas de tenca *Tinca tinca*. Departamento de genética de la Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid-España. 5-10.
- Faddagh, M. S., N.A. Hussain y A. I. Al-Badran. 2012. DNA Fingerprinting of Eight Cyprinid Fish Species of Iraqi Inland Waters Using RAPD-PCR Technique. *Advances in Life Sciences* 2(2): 9-16.
- Falconer, D. S. 1981. Introduction to quantitative genetics. Longman. Londres.
- INAPESCA. 2004. Estadísticas Pesqueras y Acuícolas. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Agricultura y Tierras. Caracas.
- Lande, R. 1980. Genetic variation and phenotypic evolution during allopatric speciation. *Am. Nat.* 116:463-479.
- Lupchinski, Jr., L. Vargas, N. Lopera, R. Ribeiro. J. Povh, E. Gasparino, P. Gomes y G. Braccini. 2011. Caracterización genética de tres líneas de tilapia del nilo (*oreochromis niloticus*). *Brasil. Arch. Zootec.* 60 (232): 985-995.
- Lopes, T., D. Streit, R. Ribeiro, J. Povh, N. Lopera, L. Vargas, C. Pinto y J. Queiroz 2009. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. *Arq. Brasil. Med. Vet. Zootec.*, V.61. n.3. pp. 728-735.
- Lopera, N., R. Pereira, J. Povh, L. Vargas, C. Bernal y P. Gomes. 2009. Diversidad genética de lotes de *piaractus mesopotamicus* usados en programas de repoblamiento y sus implicaciones en la conservación. *Agrociencia*, vol. 43, México. núm. 3, abril-mayo, pp. 249-256.
- Margalef, D.R. 1958. Information Theory in Ecology. *General Systematics* 3: 36-71.
- Montaño, P. Karla, E. Villalpando y F. Vargas. 2006. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphis) y su aplicación en la acuicultura. *Rev. Cien. Tecn. de América (INTERCIENCIA)*. Caracas-Venezuela. pp. 563-569.
- Newkirk, G. 1980. Review of the genetics and the potential for selective breeding of commercially important bivalve. *Aquaculture*, 19:209-228.
- Orozco, G. and J. C. Narváez. 2014. Genetic diversity and population structure of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Prochilodontidae) in the Magdalena River basin and its tributaries, Colombia. *Genet Mol Biol.* 37(1): 37-45.
- Pineda Santis, H., L. Arboleda, A. Echeverry, M. Olivera, D. Molina, S. Urcuchi J. Builes. 2007. Caracterización de la

- diversidad genética en el pez *Brycon henni* (Characiformes-Characidae) en Colombia central por medio de marcadores RAPD. *Rev. Bio. Trop. Col* Vol. 55 (3-4): Medellín Colombia. pp.1025-1035.
- Poma, C. A., 2004 Variabilidad genética de la *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus* en la región del alto madera (Amazonia Boliviana) para el análisis del polimorfismo de la longitud de secuencias intrónicas (EPIC-PCR). Universidad mayor de San Andrés. La paz-Bolivia. pp. 12-38.
- Povh, J. A., N. M. Lopera, R. P. Ribeiro, Jr. E. Lupchinski, P. C. Gomes y T. S. López. 2008. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Rev. Ciencia a Investigación Agraria* Vol. 35. Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual e Maringá. Maringá, Brazil.
- Rocco, I., I. V. Valentino, G. Scapigliati and V. Stingo. 2014. RAPD-PCR analysis for molecular characterization and genotoxic studies of a new marine fish cell line derived from *Dicentrarchus labrax*. *Cytotechnology* Volume 66, Issue 3, pp. 383-393.
- Salem, B. S., N. Capelli, E. Grisey, P. E. Baurand, H. Ayadi and L. Aleya. 2014. First evidence of fish genotoxicity induced by heavy metals from landfill leachates: The advantage of using the RAPD-PCR technique. *Ecotoxicology and Environmental Safety* Volume 101, pp. 90–96.
- Shannon, C. E. and W. Weaver. 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press. Urbana, IL, EEUU. 144 p.
- Ward, J. H., Jr. 1963, "Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function", *Journal of the American Statistical Association*, 58, pp. 236–244.
- Williams, J. G, A. R. Kubelik, K. L. Livak, J. A. Rafalski, S. V Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531–6535.

Caracterización molecular preliminar de abejas Angelita (*Tetragonisca Angustula*) del estado Guárico mediante marcadores moleculares RAPD

Preliminary molecular characterization of Angelita Bees (*Tetragonisca Angustula*) from Guarico State through RAPD markers

Efraín Salazar¹, Víctor Crespo², Antonio J. Manrique³, Luis Castro¹, Elba Vallejo¹ y María Torrealba¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Aragua, Venezuela. Correo electrónico: efra63@gmail.com.

²Universidad Nacional Experimental Rómulo Gallegos. Facultad de Agronomía. Guárico, Venezuela.

³Federación Bolivariana de Apicultores de Venezuela (FEBOAPIVE).

RESUMEN

Para caracterizar molecularmente abejas angelita *Tetragonisca angustula* del estado Guárico, se extrajo ADN en 20 abejas por localidad de 5 zonas identificadas como Minera (Muestra 1), San Juan (Muestra 2), Cruz (Muestra 3), Calzadilla (Muestra 4), UNERG (Muestra 5). Las amplificaciones de los ADN se realizaron mediante la amplificación al azar de ADN Polimórfico utilizándose 10 primers 10 mer de anclaje al azar. Los resultados permitieron asignarle a cada muestra un patrón de bandas característico convirtiéndose en su identidad genética. Se generaron 82 bandas con un 66% de bandas polimórficas. Las poblaciones estudiadas se orientan en un grupo principalmente, a excepción de la muestra colectada en San Juan, la cual se comporta como un material fuera de tipo. Sin embargo, la riqueza genética se estimó baja (Índice de Shannon $H=0.75$) posiblemente por ser la misma especie. El índice de Margalef ($I=1.25$) corrobora la baja diversidad genética, a pesar de la separación de las muestras como genotipos diferentes. La distancia de Jaccard osciló entre 0,43 y 0,86, lo cual resultó contradictorio con los valores obtenidos para los índices de diversidad. Los marcadores RAPD resultaron útiles para caracterizar preliminarmente las muestras de abejas angelitas seleccionadas.

Palabras clave: Variabilidad Genética, Abejas sin aguijón, Caracterización Molecular, RAPD.

ABSTRACT

In order to molecularly characterize stingless angelita bees (*Tetragonisca angustula*) from Guárico State, DNA was isolated from 20 bees per location from 5 zones identified as Minera (Sample 1), San Juan (Sample 2), Cruz (Sample 3), Calzadilla (Sample 4), UNERG (Sample 5). DNA amplifications were done using random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Results allowed to assign a characteristic band patterns to each sample which became their genetic fingerprint. 82 bands were generated with a 66% of polymorphic bands. Studied individuals were grouped in one cluster, except sample from San Juan, which behave as an outsider. However genetic richness was estimated as low (H Shannon index= 0.75) possibly due to be working with the same species. Margalef Index ($I=1.25$) corroborated that genetic diversity was low, in spite of the separation of samples as different genotypes. Jaccard distance ranged between 0.43 and 0.86, which resulted contradictory with the obtained values for diversity indexes. RAPD markers were useful to preliminary characterize samples of angelita bees.

Key words: genetic diversity, angelita bees, molecular characterization, RAPD.

INTRODUCCIÓN

La abeja sin aguijón angelita (*Tetragonisca angustula* Latreille, Hymenoptera, Apidae) representa una especie de gran importancia debido, entre otros aspectos, a su contribución en la formación y producción de bienes agroforestales gracias a su función como agente polinizador de las Angiospermas. Ellas cumplen un papel importante no sólo en la polinización de las plantas nativas de los trópicos y subtropicos sino que también se pueden explotar para la extracción de su miel y utilizar en la polinización de cultivos de importancia económica (Nascimento *et al.*, 2012).

La conservación de las diversas especies de abejas sin aguijón depende de la conservación de los bosques y viceversa (Chamorro *et al.*, 2013). Por ello los programas de reforestación se deben llevar a cabo en cada región acorde a las plantas nativas del lugar, no sólo para regenerar y proteger la tierra, sino también para tratar de restablecer el equilibrio ecológico. Muchos de los árboles utilizados por las abejas sin aguijón para establecer sus nidos son especies forestales que se pueden utilizar para muchos propósitos (forraje, madera, sombra, cercas vivas y alimentos.), sin embargo, la información que existe es muy poca o está dispersa. Estas abejas ya utilizadas desde tiempos precolombinos por nuestros indígenas están en peligro de extinción junto con los bosques, por ello se deben implementar proyectos donde el estudio de ambos sean el foco de atención (Aguilar, 1999).

La especie ha sido reportada con una amplia distribución en las zonas neotropicales de América Latina (Nogueira Neto, 1997), excepto en las montañas andinas y en algunas zonas de la selva nublada amazónica (Camargo *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2004). En Venezuela, Rodríguez-Parilli y Velázquez (2011) realizaron un estudio de distribución de abejas sin aguijón en el estado Guárico, y encontraron una amplia distribución de especies botánicas visitadas, y establecieron la presencia de poblaciones de *Tetragonisca angustula* en la zona.

A pesar de haberse realizado trabajos en la caracterización bioquímica (Castanheira y Contel, 2005), caracterización molecular basada en marcadores RAPD (Oliveira *et al.*, 2004), en

sitios de restricción del ADN mitocondrial (Koling y Moreto, 2010) y en el uso de microsatélites y ADN mitocondrial (Francisco *et al.*, 2014), la diversidad genética de esta especie, así como su taxonomía necesita ser estudiada más a fondo. La utilidad de los marcadores RAPD para la caracterización de especies de *Tetragonisca* ha sido demostrada. Oliveira *et al.* (2004) establecieron que primers RAPD como OPL-11 resultaron útiles para la identificación de subespecies de abejas angelita.

Sin embargo, Baitala *et al.* (2006) utilizaron los marcadores RAPD para la caracterización de especies del género *Tetragonisca*, reportando, que si bien se podía hacer la caracterización, no era posible la separación entre subespecies, incluso siguiendo el protocolo descrito en el trabajo de Oliveira *et al.* (2004).

Por su parte, en el caso de abejas, fue posible el estudio de diversidad genética de abejas productoras de miel (*Apis mellifera* L.) en la provincia de Mayabeque utilizando primers RAPD de las series OPA y OPB (Pérez *et al.*, 2013). Armas *et al.* (2011) utilizaron cebadores RAPD de la serie OPA, para la caracterización molecular de abejas sin aguijón del Género *Melipona*. Encontraron que solo 1 (OPA16) de las 18 secuencias analizadas fue capaz de generar polimorfismo en este grupo de individuos. Adicionalmente, utilizaron como unidad de análisis patas de 5 individuos.

La presente investigación es uno de los primeros esfuerzos en caracterizar molecularmente abejas angelita en Venezuela, y tuvo como objetivo general la caracterización preliminar de muestras de la especie *Tetragonisca angustula* proveniente de cinco zonas del estado Guárico, mediante la técnica de Amplificación al azar de ADN Polimórfico (RAPD).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron abejas angelita sin aguijón (*Tetragonisca angustula* L.) silvestres provenientes de cinco zonas del estado Guárico. Las abejas fueron recolectadas en bolsas plásticas y luego se congelaron a una temperatura de -40°C identificándose de acuerdo a lo descrito en el Cuadro 1. En todos los casos se recolectaron 20 individuos por localidad. La

unidad experimental estuvo conformada por 5 individuos y se realizaron 4 repeticiones por genotipo estudiado. Para el caso de los análisis moleculares se utilizaron los cuerpos completos de los individuos. Las colectas se realizaron entre Enero y Marzo del 2011.

Extracción y cuantificación del ADN

Para la extracción del ADN se procesaron muestras de *Tetragonisca angustula* según el protocolo Dellaporta *et al.* (1983) modificado (CIAT, 1999), y algunas variaciones realizadas en el presente trabajo. Los individuos completos de la unidad experimental (5 abejas) se maceraron juntos en nitrógeno líquido utilizando morteros de porcelana de 70ml de capacidad. Se agregaron 700 µl de Tampón de Extracción (CTAB 2%) precalentado a 65°C y las muestras se incubaron en un termal mixer Eppendorf, modelo confort, a 65°C por 45 min, en agitación constante a 700 rpm. Posteriormente se adicionó 400 µl de Acetato de Potasio 5 M, pH 4,0 y se mezclaron tres veces por inversión del tubo y se incubaron a -20°C por 30 min.

Las muestras se centrifugaron por 10 min a 6000 rpm a 4°C y el líquido sobrenadante de cada muestra se pasó a nuevos tubos, agregándose a cada uno 400 µl de Acetato de Potasio 5 M. Las muestras se agitaron nuevamente por inversión suave y repetida de los tubos, y se centrifugaron por 4 min a 6000 rpm a 4°C. Para cada muestra, la mitad del volumen del sobrenadante se colocó, respectivamente, en un tubo nuevo. A cada muestra se le agregó 400 µl de Isopropanol frío y 40 µl de Acetato de Sodio 3M, pH 5,2 y se centrifugaron por 5 min. a

12000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 400 µl de Etanol frío al 70% y se centrifugaron por 3 min. a 12.000 rpm a 4°C.

Los tubos se colocaron boca abajo, con la tapa abierta, sobre papel secante por unos minutos, a fin que escurriese el exceso de líquido y posteriormente se centrifugaron al vacío a 60°C en un Concentrador Eppendorf modelo SpeedVac durante 6 min. A cada muestra se le agregaron 100 µL de Buffer TE para resuspender el ADN. Los tubos se incubaron a 4°C toda la noche.

Las muestras completamente resuspendidas se mantuvieron a 4°C hasta el momento del análisis molecular. Una vez extraído el ADN genómico se verificó su calidad a través de electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con 100 voltios (v), durante 45 minutos utilizando Buffer TBE 0,5X como buffer de electrodo. Para estimar las concentraciones del ADN aislado se usó una solución 100 ng.µL⁻¹ del ADN del bacteriófago Lambda (Promega). Los análisis se realizaron en un digitalizador de imágenes Chemi-Doc de Bio Rad, usando el Software Quantity One versión 4,2.

Análisis espectrofotométrico de la concentración y pureza

Para el análisis espectrofotométrico se utilizó un espectrofotómetro Thermo modelo Biomate. Se utilizó la función de análisis de ácidos nucleicos. Se calibró el equipo colocando como blanco una muestra inicial conteniendo 500 µL de agua destilada estéril. Posteriormente, se procedió al análisis de cada muestra agregando en la cubeta

Cuadro 1. Procedencia geográfica de las muestras de *Tetragonisca angustula* analizadas.

| MUESTRAS | Procedencia | # individuos |
|----------|-------------|--------------|
| 1 | Minera | 20 |
| 2 | San Juan | 20 |
| 3 | Cruz | 20 |
| 4 | Calzadilla | 20 |
| 5 | UNERG | 20 |

490 μL de agua destilada estéril más 10 μL de la muestra de ADN aislado durante la extracción. La medida de la concentración de la solución se obtuvo en $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, previa conversión con el factor de dilución. La pureza del ADN aislado se estimó mediante la relación A_{260}/A_{280} , la cual para un ADN de doble cadena puro debe estar entre 1,7 y 2,0 (Warburg y Christian, 1942).

Amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD)

La amplificación al azar (RAPD) se realizó en tubos de pared extra delgada de 0,2mL de capacidad conteniendo 15 μL de mezcla de reacción. Para la caracterización molecular se utilizaron 10 oligonucleótidos iniciadores (OPB 01, OPB 02, OPB 03, OPB 04, OPB 05, OPB, 06, OPB 07, OPB 08, OPB 09 y OPB 10), desarrollados por Operon Technologies (Cuadro 2). La amplificación de los ADN se efectuó en un termociclador MJ-Research PT-200, con un segmento inicial de 95°C por 5 min, para la desnaturalización de la molécula. Posteriormente se aplicaron 45 ciclos de amplificación que incluyeron un segmento de 94°C durante 1 min, seguido por 36°C durante 30s y finalmente 72°C durante 2 min. Se realizó una fase final a 72°C para que la enzima de ADN polimerasa efectuase la extensión final de la cadena. Una vez finalizada la amplificación las muestras se

mantuvieron a 4°C hasta el momento del análisis de los productos de amplificación.

Separación electroforética de los Productos de Amplificación

Los productos de amplificación RAPD se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%) durante dos horas a 100v con Buffer TBE 0,5X. La visualización y análisis se realizó con el equipo ChemiDoc de Bio Rad, Software Quantity One Versión 4.2. Los productos RAPD se compararon con el patrón de tamaño molecular del ADN del fago Lambda (Promega) digerido con BstEII (Promega). Para cada iniciador se calculó el porcentaje de bandas polimórficas (%BP) y el Contenido de información Polimórfica (PIC) según la metodología de Roldán-Ruiz *et al.* (2000).

El conjunto de bandas de amplificación obtenidas por cada uno de los cebadores para cada muestra analizada, se convirtió en su patrón de bandas para el mencionado cebador. Se obtuvieron los patrones de bandas característicos para cada genotipo estudiado y se hizo un análisis descriptivo de los patrones encontrados a fin de establecer semejanzas o diferencias entre los genotipos. Adicionalmente, la información en los geles de agarosa permitió

Cuadro 2. Secuencias de los cebadores utilizados en el presente estudio.

| | |
|--------|------------|
| OPB 01 | GTTTCGCTCC |
| OPB 02 | TGATCCCTGG |
| OPB 03 | CATCCCCCTG |
| OPB 04 | GGACTGGAGT |
| OPB 05 | TGCGCCCTTC |
| OPB06 | TGCTCTGCCC |
| OPB 07 | GGTGACGCAG |
| OPB 08 | GTCCACACGG |
| OPB 09 | TGGGGGACTC |
| OPB 10 | CTGCTGGGAC |

realizar una matriz de presencia (1) y ausencia (0) de bandas por cebador.

La matriz obtenida con los marcadores polimórficos fue analizada con el programa estadístico InfoStat versión 2.0. La matriz fue utilizada para realizar el análisis de agrupamiento (dendrograma), a través del análisis multivariado de conglomerado jerárquico usando el método de agrupamiento de Ward y la distancia de Jaccard. Para el estudio de la diversidad genética se utilizó el índice H de Shannon y Wieber (1949) y el índice de Margalef (1969).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El protocolo de extracción de ADN genómico a partir de muestras de *Tetragonisca angustula* fue eficiente para el aislamiento de ADN intacto, tal como se observa en la Figura 1. Las bandas de ADN se ubican en la parte superior del gel como una unidad discreta. Las zonas que se observan como un barrido corresponden a fracciones ARN, las cuales no interfieren en el proceso de amplificación.

Los patrones de bandas obtenidos para cada grupo estudiado al utilizar los cebadores de anclaje al azar seleccionados se presentan

en la Figura 2. Como puede observarse, los cebadores seleccionados en su mayoría fueron capaces de producir patrones de bandas en todos los grupos. En la generalidad de los casos los patrones obtenidos son específicos para cada localidad analizada, y la presencia o ausencia de los patrones de bandas específicos obtenidos para cada tipo de insecto permitiría la identificación molecular de las abejas en cada localidad.

Con excepción del primer OPB01, todos los demás fueron capaces de distinguir al menos tres tipos de patrones diferentes (Cuadro 3). Dado el número de muestras tan bajo, se considera que el poder discriminatorio de los cebadores seleccionados es alto, al permitir poder identificar los grupos.

El porcentaje que se presenta en el Cuadro 3 se obtuvo al multiplicar por 100 el número de patrones obtenidos y dividirlos entre 5, que representó el total de patrones posibles a generarse, correspondiendo al número total de muestras. En el dendrograma del análisis de conglomerados, utilizando el total de las bandas producidas con todos los cebadores que se muestra en la Figura 3, Se observa el agrupamiento de los genotipos estudiado en un grupo principal, y la muestra

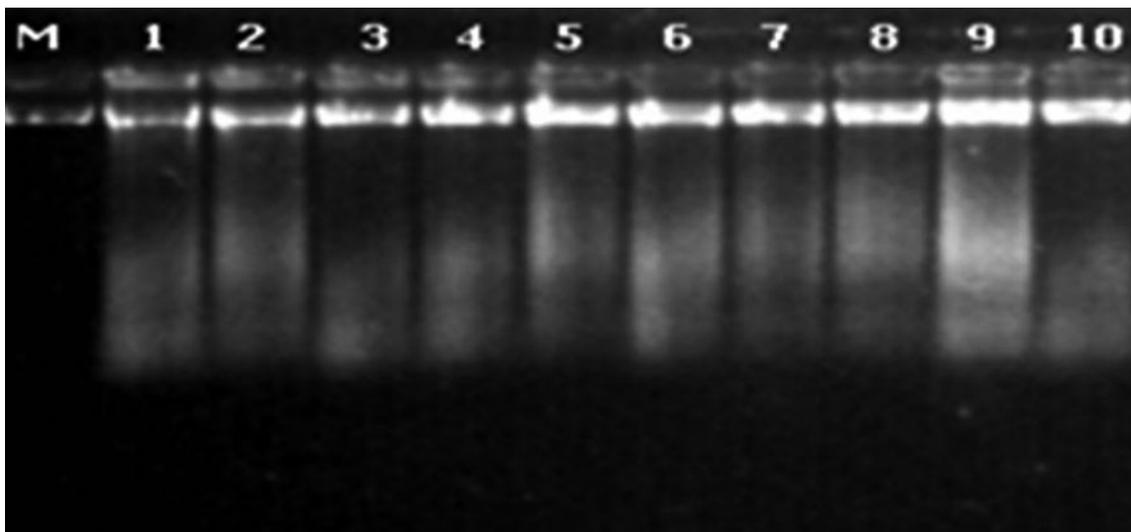


Figura 1. Gel de calidad de ADN genómico aislado a partir de abejas *Tetragonisca angustula*. M= Marcador de concentración (ADN bacteriófago Lambda 100ng/ μ l). 1 y 2= Minera; 3 y 4= San Juan, 5 y 6=Cruz. 7 y 8= Calzadilla. 9 y 10= UNERG.

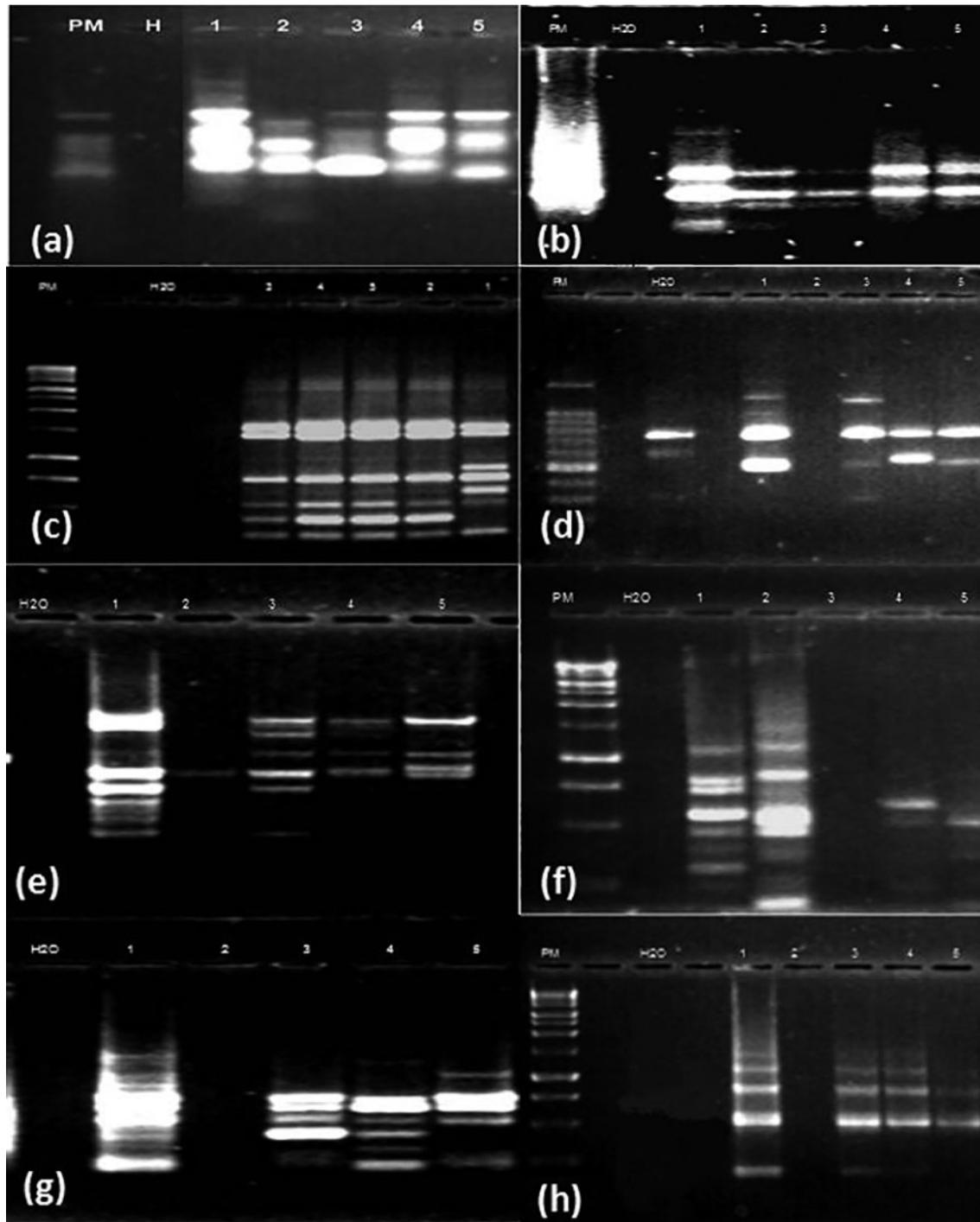


Figura 2. Patrones de bandas RAPD obtenidos para los 5 genotipos de abejas analizados. PM= marcador de tamaño (Kb)Ladder 1 Kb (PROMEGA), H2O=reacción blanco sin ADN. 1= minera, 2= San Juan, 3=Cruz, 4= Calzadilla, 5= UNERG. (a)= primer OPB02, (b)= OPB04, (c)= OPB01, (d)= OPB05. (e)=OPB07, (f)=OPB08, (g)=OPB09 y (h)= OPB10.

Cuadro 3. Número de Patrones de bandas RAPD obtenidos para cada genotipo de abeja estudiado con cada primer seleccionado.

| Primer | # Patrones | Nomenclatura De Los Patrones | % Patrones |
|--------|------------|------------------------------|------------|
| OPB 01 | 2 | 1a, 1b | 40 |
| OPB 02 | 3 | 2a, 2b, 2c | 60 |
| OPB 03 | 3 | 3a, 3b, 3c | 60 |
| OPB 04 | 4 | 4a, 4b, 4c, 4d | 80 |
| OPB 05 | 4 | 5a, 5b, 5c, 5d | 80 |
| OPB 06 | 3 | 6a, 6b, 6c | 60 |
| OPB 07 | 4 | 7a, 7b, 7c, 7d | 80 |
| OPB 08 | 5 | 8a,8b,8c,8d,8e | 100 |
| OPB 09 | 5 | 9a,9b,9c,9d,9e | 100 |
| OPB 10 | 3 | 10a, 10b, 10c | 60 |

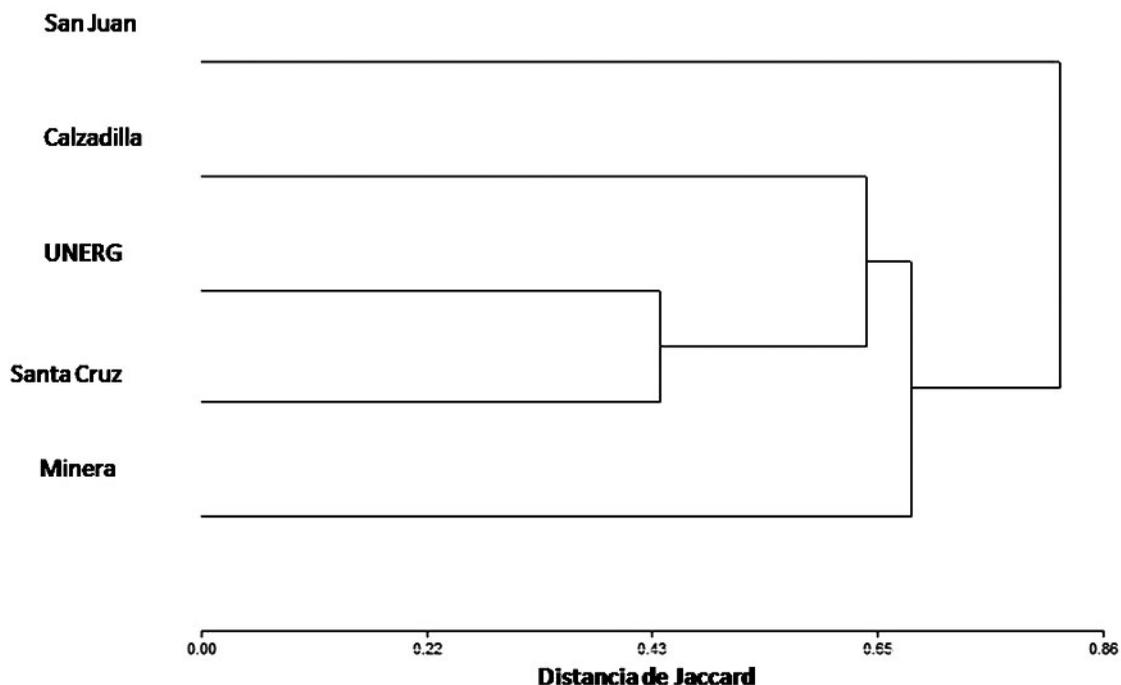


Figura 3. Dendrograma producto del análisis de conglomerado jerárquico utilizando todos las secuencias iniciadoras estudiadas.

2 (San Juan) se ubica totalmente separada del resto, lo que parece indicar que es totalmente diferente a las demás muestras. No obstante, es importante señalar que esta muestra presentó mayor similitud con la muestra 1 (Minera) que con el resto de los materiales estudiados. Las muestras 3 (Cruz), 4 (Calzadilla) y 5 (UNERG) se

agruparon más cercanas genéticamente entre sí, donde las menores distancias se observaron entre las muestras 3 y 5.

La muestra 1 (Minera), a pesar de mostrar similitudes con las muestras 3, 4 y 5, y formar parte de la misma unidad de agrupamiento, presenta

diferencias genéticamente significativas, que la colocan como un genotipo aparte.

Estos resultados sugieren la existencia de variabilidad genética entre los grupos de abejas Angelita colectadas en el estado Guárico, pudiendo estar representadas al menos por tres tipos de abejas desde el punto de vista genético. Es importante señalar, que Nates-Parra y Rosso-Londoño (2013) establecieron que existe una amplia diversidad genética en los grupos de abejas sin aguijón, la mayor parte de las cuales están sin identificar. Para el caso de abejas Angelita, reportaron una amplia distribución geográfica, y altitudinal (100-1900 m.s.n.m.), lo cual indica una amplia capacidad de adaptación de esta especie.

Por otro lado, se ha establecido que la biología reproductiva de la especie favorece la formación de poblaciones aisladas, y una rápida especiación debido al flujo limitado de genes entre las colonias (Brito y Arias, 2010; Quezada-Euán *et al.*, 2012), lo cual pudiera explicar la diversidad encontrada entre sitios de colecta relativamente próximos. La riqueza genética entre los grupos estudiados se estimó baja (Índice de Shannon $H = 0,75$) posiblemente por tratarse de la misma especie. El índice de Margalef ($I = 1,25$) corrobora que existe una baja diversidad genética, a pesar que los datos establecen la separación de las muestras como genotipos diferentes. La distancia de Jaccard osciló entre 0,43 y 0,86, lo cual resultó contradictorio con los valores obtenidos para los índices de diversidad.

CONCLUSIONES

La técnica de RAPD fue estandarizada para esta especie y permitió la amplificación de bandas en casi todas las muestras estudiadas. Los resultados permiten asignarle a cada unidad experimental un patrón de bandas característico para cada uno de los cebadores analizados lo cual se convierte en su identidad genética. Los individuos se separaron en dos grandes grupos de acuerdo a sus características genéticas, donde la muestra 2 (San Juan) se separó completamente del resto de las localidades. Fue detectada una alta variabilidad genética intra grupal en los genotipos estudiados de acuerdo a las distancias obtenidas; sin embargo, la diversidad genética global se estimó baja, por los

valores de los índices de diversidad estudiados y esto quizás se deba al poco número de individuos analizados.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, I., 1.999. El potencial de las abejas nativas sin aguijón (Apidae: meliponinae) en los sistemas agroforestales. Universidad de Heredia. Heredia Costa Rica. Disponible en línea: <http://www.cipav.org.co/redagrofor/memorias99//AguilarI.html> [Abr. 27, 2007].
- Armas, G., E. Solorzano, M. García, y C. Monroy. 2011. Diferenciación genética y fenética de *Melipona beecheii*, *Melipona yucatanica* y *Melipona solani* por medio de RAPD'S-PCR y Morfometría en Guatemala. Memorias del VII Seminario Mesoamericano sobre Abejas Nativas. pp. 37-46.
- Baitala, T. V., C. A. Mangolin, V. A. A. Toledo and M. C. C. Ruvolo-Takasusuki. 2006. RAPD polymorphism in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera; Meliponinae, Trigonini) populations. *Sociobiology* 48: 861-873.
- Brito, R. M. and M. C. Arias. 2010. Genetic structure of *Partamonahelleri* (Apidae, Meliponini) from Neotropical Atlantic rainforest. *Insect. Soc.* 57, 413–419.
- Camargo, J. M. F. and S. R. M. Pedro. 2007. *Meliponini* Lepeletier, 1836. In: Moure JMS, Urban D, Melo GAR (eds) Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba, pp. 273–578.
- Castanheira, E. B. and E. P. Contel. 2005. Geographic variation in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *J. Apicult. Res.* 44, 101–105.
- Chamorro, F. J., G. Nates-Parra and T. Kondo. 2013. Mielato de *Stigmatococcus* (Hemiptera: Stigmatococcidae): recurso melífero de bosques de roble en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 39 (1): 61-70.
- CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1999. Taller integración de fitopatología, mejoramiento y biología molecular para el desarrollo de resistencia

- al añublo del arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Octubre 14-18, Cali, Colombia.
- Dellaporta, S. J., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Rep.* 1:19-21.
- Francisco, F. O., L. R. Santiago, R. M. Brito, B. P. Oldroyd and M. C. Arias. 2014. Hybridization and asymmetric introgression between *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi*. *Apidologie*, Volume 45, Issue 1, pp. 1-9.
- Kearns, C., D. Inouye and N. Waser. 1998. Endangered Mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29: 83 p.
- Koling, D. F. and G. Moretto. 2010. Mitochondrial discrimination of stingless bees *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) from Santa Catarina state, Brazil. *Apidologie* 41, 454–462.
- Margalef, R. 1969. El ecosistema pelágico del Mar Caribe. *Memoria Fund. La Salle Cien. Nat.*, 5-36 pp. Referenciada. 23/0672009. Disponible en línea: [\[Mar. 23, 2015\].](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726221621001&script=scarttext.*)
- Nascimento, W. M., E. M. L. Gomes, E. A. Batista e R. A. Freitas. 2012. Utilização de agentes polinizadores na produção de sementes de cenoura e pimenta doce em cultivo protegido. *Horticultura Brasileira* 30: 494-498.
- Nates-Parra, G. e J. Rosso-Londoño. 2013. Diversidad de abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) utilizadas en meliponi cultura en Colombia. *Acta biol. Colomb.* 18(3):415-426.
- Nogueira-Neto, P. 1997. *Vida e Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão*. São Paulo, Nogueirapis Editora, 445 p.
- Oliveira, R. C., F. M. F. Nunes, A. P. S. Campos, S. M. Vasconcelos, D. Roubik, L. R. Goulart and W. E. Kerr. 2004. Genetic divergence in *Tetragonisca caangustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.* 27, 181–186.
- Pérez, A., N. Martínez, O. Uffo, B. Peteira, J. Demedio y D. Rodríguez. 2013. Estimación de la diversidad genética en *Apis mellifera* L. en el centro de crianza de abejas reinas de la provincia Mayabeque. *Rev. Salud Anim.* Vol. 35 No. 2 (2013): 142.
- Quezada-Euán, J. J. G., W. J. May-Itzá, M. Rincón, P. de la Rúa, P. and R. J. Paxton. 2012. Genetic and phenotypic differentiation in endemic *Scaptotrigona hell wegeri* (Apidae: Meliponini): implications for the conservation of stingless bee populations in contrasting environments. *Insect Conserv. Diver.* 5, pp. 433–443.
- Rodríguez, M., 2000. *Guía de laboratorio de biología molecular*. Universidad Libre Seccional Barranquilla, Colombia. Disponible en línea: <http://www.unilibrebaq.edu.co>. [Mar. 31, 2007].
- Rodríguez-Parilli, S. y M. Velásquez. 2011. Lugares de actividad de las abejas (Hymenoptera:Apoidea) presentes en bosque seco tropical del estado Guárico, Venezuela. *Zootecnia Trop.*, 29(4): 421-433.
- Roldán-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker and M. de Loose. 2000. AFLP Markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium spp.*). *Mol. Breed* 6: 125-134.
- Shapiro, S. S. and M. B. Wilk. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52 (3-4): pp. 591–611.
- Shannon, C. E. and W. Weaver. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press. Urbana, IL, EEUU. 144 p.
- Warburg, O. and W. Christian. 1942. Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z.* 310:384-421.

Variabilidad genética en el microsatélite “A” del extremo 3’UTR del gen *SLC11A1* en un rebaño de cabras Criollas (*Capra hircus*)

Genetic variability in the microsatellite “A” at region 3’UTR of the *SLC11A1* gene in a herd of native goats (*Capra hircus*)

Oscar De La Rosa*¹, Belkys J. Vásquez Marín¹, Alexis F. Márques y Luis Dickson²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP).

²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Lara). Correo electrónico: odelarosa@inia.gov.ve

RESUMEN

El gen *SLC11A1* codifica un transportador catiónico localizado en la membrana del fagolisosoma de los macrófagos, que tiene participación activa en la supresión de infecciones bacterianas y presenta dos microsatélites polimórficos (dinucleótido GT) en el extremo 3’UTR y algunos de sus alelos han sido asociados con resistencia natural a patógenos intracelulares en animales domésticos. A fin de caracterizar la variabilidad genética del microsatélite “A” del extremo 3’UTR del gen *SLC11A1* presentes en un rebaño de cabras Criollas localizado en el estado Lara, se amplificó mediante una PCR un fragmento de 233 pb a partir del ADN aislado de 62 muestras sanguíneas colectadas en el centro de producción de ovinos y caprinos del INIA-Lara. Los amplicones obtenidos fueron sometidos a un análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP) y las muestras fueron agrupadas según la identidad de su patrón SSCP; de esta manera se formaron seis grupos de análisis. Se tomaron muestras representativas de cada grupo para determinar el número de repeticiones GT en el microsatélite “A”, mediante secuenciación de ADN. Las frecuencias genotípicas fueron estimadas a partir de la secuencia nucleotídica correspondiente a cada grupo de análisis (GT12/GT17=0,016; GT12/GT13=0,016; GT13/GT13=0,016; GT13/GT15=0,290; GT13/GT16=0,483; GT16/GT18=0,177) y las frecuencias alélicas obtenidas fueron GT12=0,0161; GT13=0,4113; GT15=0,1452; GT16=0,3306; GT17=0,0081 y GT18=0,0887. El coeficiente de información polimórfica fue 0,6390, la heterocigosidad observada fue 98,39% y la heterocigosidad esperada era 69,79%. El rebaño muestreado no se encuentra en equilibrio genético ($P<0,05$).

Palabras clave: marcador molecular, genotipos, polimorfismo.

Recibido: 19/05/14 Aprobado: 08/10/14

ABSTRACT

The *SLC11A1* gene encodes a cationic transporter located in the membrane of phagolysosome of macrophages, which has active participation in the suppression of bacterial infections and has two polymorphic microsatellite (dinucleotide GT) at the end 3’UTR and some of its alleles have been associated with natural resistance to intracellular pathogens in domestic animals. In order to characterize genetic variability in microsatellite “A” at region 3’UTR of *SLC11A1* gene present in a herd of native goats located in Lara state, was amplified by PCR a fragment of 233 bp from DNA isolated from 62 blood samples collected in the Center of Production of Sheep and Goats of INIA-Lara. The amplicons obtained were subjected to single strand conformational polymorphism analysis (SSCP) and samples were grouped according to the identity of its SSCP pattern; thus six analysis groups formed, representative samples of each group were used to determine the number of repetitions GT in the microsatellite “A”, by DNA sequencing. Genotypic frequencies were estimated on the basis of the nucleotide sequence corresponding to each analysis group. (GT12/GT17=0.016; GT12/GT13=0.016; GT13/GT13=0.016; GT13/GT15=0.290; GT13/GT16=0.483; GT16/GT18=0.177) and the allelic frequencies obtained were GT12=0.0161; GT13=0.4113; GT15=0.1452; GT16=0.3306; GT17=0.0081 and GT18=0.0887. Polymorphic information coefficient was 0.6390, the observed heterozygosity was 98.39% and the expected heterozygosity was 69.79%. The sampled herd is not in genetic equilibrium ($P<0.05$).

Key words: Molecular marker, genotypes, polymorphism.

INTRODUCCIÓN

El gen *SLC11A1* (Solute Carrier Family 11 Member A1) es un miembro de la familia SLC11 (transportadores de iones metálicos divalentes junto a transporte de protones) y codifica una proteína transmembrana que se localiza en los endosomas tardíos y lisosomas de macrófagos y células dendríticas, y gránulos terciarios de neutrófilos (Techau *et al.*, 2007). La proteína funciona como un transportador de metales de transición divalentes (Fe^{++} y Mn^{++}) que intervienen en el metabolismo del hierro y los mecanismos de resistencia del hospedador contra algunos patógenos (Cellier *et al.*, 2007). En el hombre, algunos alelos de este gen se han asociado con la susceptibilidad a enfermedades infecciosas como tuberculosis y lepra, y enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn (O'Brien *et al.*, 2008).

En animales domésticos, el gen *SLC11A1* es considerado como un candidato para el control de la resistencia o susceptibilidad a diversos patógenos intracelulares (Adams y Templeton, 1998; Blackwell *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2005; Pinedo *et al.*, 2009). Desde su identificación inicial por Vidal *et al.* (1993), el gen *SLC11A1o Nramp1* (como fue conocido inicialmente), ha sido objeto de numerosos estudios a fin de determinar su variabilidad genética (Pitel *et al.*, 1994; Matthews y Crawford, 1998; Horín *et al.*, 1999; Ables *et al.*, 2002; Coussens *et al.*, 2004; Borriello *et al.*, 2006; González *et al.*, 2006; Paixão *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2008a; Liandris *et al.*, 2009; Trujillo y Valderrama, 2009; Vacca *et al.*, 2011; Hasenauer *et al.*, 2013) y la asociación de los polimorfismos identificados, con los estados de resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas en especies de interés zootécnico (Barthel *et al.*, 2000; Barthel *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2005; Reddacliff *et al.*, 2005; Capparelli *et al.*, 2007a; Capparelli *et al.*, 2007b; Paixao *et al.*, 2007; Ganguly *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008b; Cerquera *et al.*, 2009; Korou *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2010; Ruiz-Larrañaga *et al.*, 2010; Kadarmideen *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2011; Paixão *et al.*, 2012; Taka *et al.*, 2013; Iacoboni *et al.*, 2014).

Un estudio realizado por Liandris *et al.* (2009), determinó la secuencia del gen *SLC11A1* a partir de una muestra de 50 cabras *Capra hircus*,

GenBank FJ388877, (Benson *et al.*, 2013) y se reportó el hallazgo de dos microsatélites polimórficos en el extremo 3' de la región no traducida (3'UTR), donde ambos microsatélites presentan como motivo de repetición un dinucleótido Guanina-Timina (GT). Los microsatélites denominados en este trabajo "A" y "B" están delimitados en su extremo 5' por una secuencia de 41 nucleótidos y en su extremo 3' por una secuencia de 28 nucleótidos, con alta homología entre los dos microsatélites. Ambas microsatélites y sus respectivas regiones flanqueantes son contiguos (Figura 1).

El microsatélite "A" mostró de 14 a 18 repeticiones GT, mientras que el microsatélite "B" solo presentó dos alelos con 7 y 8 repeticiones GT, y ambos presentan un motivo nucleotídico que los delimita con precisión dentro de la secuencia de la región 3'UTR del gen; $\text{AAGG}(\text{GT})_n\text{GCATGC} \dots \text{AAGG}(\text{GT})_n\text{GCATGC}$.

Vacca *et al.* (2011) evaluaron seis razas caprinas de explotación común en Europa y determinaron mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) que la ubicación cromosómica del gen *SLC11A1* en cabras corresponde a la región pericentromérica del cromosoma 2. En dicho ensayo se realizó un análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) (Orita *et al.*, 1989; Hayashi, 1991) a partir del microsatélite "A", y se obtuvieron 23 patrones electroforéticos, que correspondieron a ocho alelos con repeticiones dinucleotídicas que van desde GT11 hasta GT19, sin presentar la repetición GT13 en ninguna de las muestras analizadas.

En Venezuela se realizó un ensayo preliminar para detectar la presencia de polimorfismos en el extremo 3'UTR del gen *SLC11A1* en una muestra de 20 cabras Criollas y se identificaron cuatro patrones electroforéticos mediante la técnica SSCP (De La Rosa *et al.*, 2014).

El análisis SSCP se basa en el principio de que la movilidad electroforética de una cadena sencilla de ADN en un soporte no desnaturizante es altamente dependiente de su tamaño y estructura (Gasser *et al.*, 2007). Cuando la molécula se encuentra en solución, la cadena sencilla de ADN adopta una conformación secundaria y terciaria particular debida al apareamiento complementario de

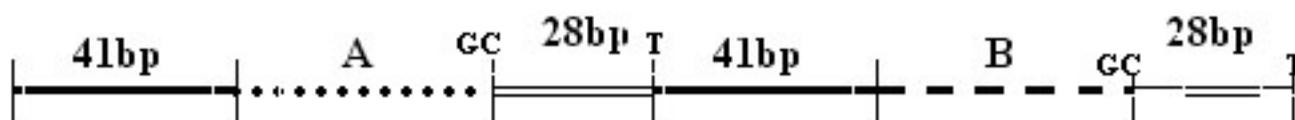


Figura 1. Organización estructural de la región 3'UTR en el gen SLC11A1 en cabras. Adaptado de Liandris *et al.* (2009).

los nucleótidos intracatenarios. Estos arreglos conformacionales dependen de la longitud de la cadena, secuencia nucleotídica, localización y número de regiones de apareamiento (Hayashi, 1991). Por lo tanto, una mutación en una determinada posición nucleotídica en la secuencia principal puede alterar la conformación tridimensional de la molécula (Hayashi, 1991). Cuando las cadenas de ADN son separadas en una matriz no desnaturizante a temperatura constante, las cadenas que difieren por un solo nucleótido pueden discriminarse, tomando en cuenta los cambios en su movilidad como consecuencia de las diferentes conformaciones adoptadas (Gasser *et al.*, 2007).

La interpretación de un análisis SSCP es sencilla. Lo que se busca es una variación de los patrones electroforéticos SSCP entre diferentes muestras. La variación puede ser una banda o algunas bandas adicionales. Las muestras representativas con patrones SSCP distintivos se pueden secuenciar para definir las variaciones de la secuencia. De esta forma, las variaciones inicialmente desconocidas en la secuencia pueden ser identificadas y definidas (Sunnucks *et al.*, 2000). Dada su relativa simplicidad técnica y capacidad de detección de mutaciones, el marcador SSCP proporciona una potente herramienta para identificación de patógenos, evaluación de variación genética dentro y entre muestras o poblaciones y como punto importante, permite identificar mutaciones desconocidas (Bastos *et al.*, 2001; González *et al.*, 2006; Paixão *et al.*, 2006; Cerquera *et al.*, 2009; Pazzola *et al.*, 2010; Ranjan *et al.*, 2011; Estrada-Cuzcano *et al.*, 2013).

Los pequeños rumiantes, tienen gran impacto socio-económico en los países del tercer mundo y en Venezuela la vida de miles de familias

campesinas depende de una u otra manera de la cría del caprino como medio de vida, lo cual da particular relevancia a su aspecto social sobre cualquier otro (Alejua y Rodríguez, 2006; Muñoz *et al.*, 2008). La cabra fue introducida en Venezuela, al igual que en otros países de Latinoamérica, por los colonizadores españoles durante el siglo XV (Mellado, 1997) y ha evolucionado a través de un proceso de selección natural, incrementando la resistencia y sobrevivencia a un medio muy hostil en las zonas áridas y semiáridas ubicadas en los estados Lara y Falcón.

Estas zonas se caracterizan climáticamente por promedios anuales de precipitación de 420 mm, temperatura promedio de 28,3°C, altitud promedio de 280 m.s.n.m, y vegetación de tipo Bosque Seco-Espinoso en terrenos quebrados y rocosos. Estos parámetros ambientales han condicionado el desarrollo del ganado caprino local, lo que ha resultado en alta rusticidad y adaptación al medio, pero también en bajos niveles de producción. Esto determina un marcado predominio de la cría extensiva con una orientación económica de subsistencia, con rebaños que oscilan entre 200 a 600 animales, en los cuales no existe ningún criterio de selección para la permanencia o descarte de los animales (Pariacote *et al.*, 2004; Dickson y Muñoz, 2007).

El bajo nivel de producción de estos sistemas, tiene origen multifactorial y se hace necesaria la identificación y análisis de estos factores limitantes para poder formular planes de desarrollo coherentes y exitosos. Sin embargo, las iniciativas en el aspecto productivo solo se han dirigido hacia la introducción de recursos genéticos exóticos con alta capacidad genética aditiva para características productivas,

subestimando la adaptación y otras posibles ventajas del caprino Criollo (Dickson *et al.*, 2001).

Por tanto, la identificación de polimorfismos del gen *SLC11A1* representa una primera fase exploratoria para detectar variantes alélicas potencialmente favorables para la resistencia a enfermedades infecciosas, dándole un valor agregado a este germoplasma, con miras a desarrollar un programa integral de conservación e incorporarlo en las estrategias de mejoramiento genético de la población caprina local.

En razón de lo arriba expuesto, este trabajo se planteó como objetivo la caracterización de la variabilidad genética del microsatélite "A", presente en el extremo 3'UTR del gen *SLC11A1* en un rebaño de cabra Criollas en el estado Lara.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este ensayo se colectaron 62 muestras de sangre periférica en un rebaño de cabras tipificadas como Criollas, que forman parte de un programa de recuperación y mantenimiento de la raza, fomentado por el Centro de Producción de Ovinos y Caprinos del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) en el estado Lara, Venezuela. Este rebaño es una población pequeña (152 individuos) que tiene una naturaleza experimental con fines de conservación, con lo cual se realizan cruces dirigidos a fin de mantener la diversidad genética.

Las muestras sanguíneas fueron colectadas en tubos Vacutainer® de 5 ml contentivos de K₂EDTA y refrigeradas a 4°C hasta su procesamiento. El ADN genómico fue aislado usando un protocolo de precipitación salina optimizado por De La Rosa *et al.* (2013), en resumen; 400µl de cada muestra se solubilizaron con 1000µl de un tampón (Tris-Cl 20mM; pH 7,6) y se incubaron a temperatura ambiente por diez minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 20.800 RCF (fuerza centrífuga relativa) por 20 segundos y el sobrenadante fue descartado. Las pastillas resultantes fueron incubadas en una solución de lisis (EDTA 1mM, Tris-Cl 10mM, 0,1% SDS; pH 8) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Los residuos proteicos fueron digeridos con proteínasa k (2,5µl, 20 mg.ml⁻¹) durante cuatro horas a 55°C.

Se usó acetato de potasio 5M para precipitar los residuos peptídicos mediante centrifugación a 20800 RCF. El sobrenadante fue mezclado con una solución de etanol absoluto y acetato de sodio 0,12M para provocar la precipitación del ADN. El ADN aislado fue lavado dos veces con etanol al 70% y solubilizado en un tampón de conservación (Tris 10mM, EDTA 1mM; pH 8), la integridad de las cadenas aisladas se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% con SYBR®Safe incorporado (1/50.000) y la concentración total de ADN en las muestras se determinó mediante espectrofotometría óptica.

Amplificación In Vitro del extremo 3'UTR del gen *SLC11A1*

A partir del ADN genómico aislado se amplificó un segmento de 233 pb usando los cebadores: Ex15F: 5'-GTCTGGACCTGTCTCATCACC-3' y 2Ex15R: 5'-ACTCCCTCTCCATCTTGCTG-3' (Vacca *et al.*, 2011), los cuales tienen como diana un segmento de 233 pb que se ubica en la posición 1587-1820 del gen *SLC11A1* caprino, GenBank GU440577.1 (Benson *et al.*, 2013) y contiene la región del microsatélite "A" (Figura 2).

Las mezclas para la PCR fueron preparadas en un volumen final de 25ul, que contenía; tampón 1X; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP's 0,2 mM; cebadores 0,2 mM cada uno; Taq polimerasa 0,7 U; ADN molde 50 ng. La amplificación se desarrolló con un paso de desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 25s a 94°C, 20s a 60,1°C y 15s a 72°C, y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los amplicones se verificaron en geles de agarosa al 2%, con SYBR®Safe incorporado en proporción 1/50.000.

Análisis de Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla

Los productos PCR se mezclaron con una solución desnaturalizante (Formamida 95%; Azul de Bromofenol 0,5%; EDTA 25 mM) en proporción 1:1 y sometidos a desnaturalización a 95°C durante diez minutos e inmediatamente colocados en un recipiente con hielo durante cinco minutos.

Los patrones SSCP se obtuvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (49:1) al 10% con glicerol incorporado en un 4%. La

```
>gi|289707888|gb|GU440577.1| Capra hircus solute carrier family 11
member 1 (Slc11a1) gene, exon 15 and partial cds.
```

```
GTCTGGACCTGTCTCATCACCAGGGAGCCACTCATCTGGCCCCACAGTTCCCACCAACGCTTTCTGTATG
GGCTTCCTGGAGAGGATCAGGAGGAGGGGAGGACCTCGGGATGAACTCCCACCAGGGCCTGGCCACGGGT
GGGATGAGTGACCACAGTGGCCTGCCAGACAAGGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCAT
GCACAGCAAGATGGAGAGGGAGTTCACGGGTGGGATGAGTGGGCACAGTGGCCTGCCAGACAAGGGTGTG
TGTGTGTGTGTGCACGCACAGCAAGATGGACAGGGAATTCTGGAAGCCGGCCAAGCCATAGGGACCTGCT
ATTTCTAGTCTAGATCTCGGTATTCTTTGAGTATTAATGGGGACACCTACCTTGCAATGGTTGTAATA
AGACACTTGAACGCAGAGCCTAGCACTT
```

Figura 2. Secuencia en formato FASTA correspondiente al Exón 15 y un segmento de la secuencia codificante (CDS) del gen del miembro 1 de la familia 11 de transportadores de soluto (SLC11A1) en cabras (*Capra hircus*). Esta versión (1) de la entrada GU440577 fue remitida a GenBank por Vacca *et al.* (2011). En negrita se denota la posición de los cebadores y la región del microsatélite "A" (dinucleótido GT) se resalta en fondo gris.

solución tampón para la corrida fue Tris-Borato-EDTA (TBE)(0,5X) previamente refrigerado a 6°C. La electroforesis se realizó bajo las siguientes condiciones; 12 W constantes durante tres horas y temperatura ambiental de 20°C. Una vez finalizada la electroforesis se realizó la tinción de los geles, por inmersión en una solución de SYBR®Safe y TBE 0,5X en proporción 1/10.000, durante 25 minutos con agitación suave continua.

Genotipado de las muestras

Las muestras fueron agrupadas de acuerdo a la identidad de sus patrones SSCP, generando de esta manera seis grupos de análisis. Se seleccionaron las muestras más representativas y mejor definidas de cada grupo, para proceder a su re-amplificación por una PCR. Los amplicones fueron enviados a MacroGen Sequencing Services (MacroGen Inc.) para su purificación y secuenciación directa, los electroferogramas resultantes fueron editados, analizados y comparados usando la aplicación DNABaser (DNABaser, 2012). A partir de la secuencia obtenida se determinó el genotipo de la muestra, mediante conteo directo de las repeticiones del dinucleótido GT. Los grupos de análisis SSCP fueron tipificados de acuerdo al genotipo asignado a las muestras representativas de cada grupo.

Análisis estadístico

Los archivos de secuencias FASTA fueron revisados con la aplicación TextPad 5.2 (2008)

y mediante la aplicación Bioedit (Hall, 1999) se obtuvieron seis secuencias consenso a partir de los archivos FASTA correspondientes a las muestras secuenciadas dentro de cada uno de los grupos de análisis SSCP. La herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2000) fue usada para alinear y comparar las secuencias consenso con la secuencia de referencia NM_001285694.1 almacenada en NCBI RefSeq (Pruitt *et al.*, 2004), de esta forma se verificó la identidad de los amplicones obtenidos y la calidad del ensayo.

Las matrices de datos genotípicos se construyeron usando TextPad 5.2 (2008) y fueron procesadas mediante la aplicación CONVERT (Glaubitz, 2004) para generar archivos de datos compatibles con el formato de entrada de las aplicaciones POPGEN32 (Yeh y Boyle, 1997), FSTAT (Goudet, 1995) y GENEPOP V4 (Rousset, 2008). Las frecuencias genotípicas se estimaron por conteo directo de los patrones SSCP y su relación con los genotipos del microsatélite "A" obtenidos a partir de los electroferogramas. Las frecuencias alélicas, proporciones de Hardy-Weinberg (HW), contenido de información polimórfica (PIC), heterocigosidad esperada (He), heterocigosidad observada (Ho) y el coeficiente de endogamia (Fis) fueron calculados a partir de las frecuencias genotípicas usando las aplicaciones arriba mencionadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis SSCP del extremo 3'UTR del gen *SLC11A1* puso en evidencia la presencia

Cuadro 1. Patrones SSCP, frecuencias genotípicas y alélicas del dinucleótido GT presente en el microsatélite “A” del extremo 3’UTR del gen *SLC11A1* en cabras Criollas.

| Patrón SSCP (bandas en gel) | Individuos identificados | Genotipo | Frecuencia | Alelo | Frecuencia |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|------------|-------|------------|
| D (3) | 1 | GT12/GT17 | 0,016 | GT12 | 0,0161 |
| B (3) | 1 | GT12/GT13 | 0,016 | GT13 | 0,4113 |
| A (2) | 1 | GT13/GT13 | 0,016 | GT15 | 0,1452 |
| F (4) | 18 | GT13/GT15 | 0,290 | GT16 | 0,3306 |
| E (4) | 30 | GT13/GT16 | 0,483 | GT17 | 0,0081 |
| C (3) | 11 | GT16/GT18 | 0,177 | GT18 | 0,0887 |

En bovinos, el alelo GT13 del extremo 3’UTR del gen *SLC11A1* presenta la mayor frecuencia de aparición y se ha reportado su asociación con resistencia natural a la brucelosis (Barthel *et al.*, 2001). La alta proporción de este alelo en las cabras Criollas representaría una oportunidad para evaluar la asociación de este alelo del gen *SLC11A1* con la resistencia natural a la brucelosis, lo cual pudiera tener un impacto positivo en la salud pública, dando un valor agregado a la raza para lograr su inclusión en los planes de mejoramiento genético sanitario de las razas foráneas comúnmente explotadas en el país.

En el Cuadro 2 se presentan los resultados del análisis genético-estadístico y se observa que la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg indica que el microsatélite “A” se encuentra en desequilibrio, observándose un exceso de heterocigotos ($H_o:98,39\%$), de igual manera, el índice de fijación F_{is} toma un valor negativo (-0,41) debido al exceso de heterocigotos (Allendorf y Luikart, 2007) y esto puede indicar el apareamiento entre individuos no consanguíneos, situación esperada en esta población artificial donde la intervención del hombre tiene como estrategia disminuir la ganancia de endogamia a través del tiempo. El contenido de información polimórfica del microsatélite “A” (0,6390) revela que este marcador es altamente informativo para esta población y puede ser usado en estudios poblacionales y de cartografía genética relacionados con la cabra Criolla venezolana.

CONCLUSIONES

El microsatélite de la región “A” del extremo 3’UTR del gen *SLC11A1* analizado en este trabajo resultó ser altamente polimórfico lo que indica una oportunidad para desarrollar estudios de asociación de los alelos observados en la cabra Criolla venezolana con la resistencia natural a patógenos de interés en esta especie, de acuerdo a los reportes de investigación citados.

Por otra parte, sería conveniente revisar la estructura genética del extremo 3’UTR del gen *SLC11A1* en la población de caprinos de raza Canaria presentes en el país, puesto que esta raza además de contribuir al origen de las cabras Criollas venezolanas, también resulta ser uno de los grupos foráneos con mayor presencia e impacto en la producción caprina de Venezuela.

En lo referente a la variabilidad genética, este estudio muestra que a pesar de ser una población reducida, las cabras Criollas venezolanas muestran un alto grado de heterocigosidad y variabilidad genética, resultado de la colección de individuos provenientes de diversos rebaños tipificados como criollos, como parte del programa de conservación y rescate del recurso genético que se desarrolla en el INIA-Lara.

AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan gratitud a la Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT) y al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas

(INIA) por el apoyo material y financiero para la ejecución de este trabajo experimental.

LITERATURA CITADA

- Ables, G., M. Nishibori, M. Kanemaki and T. Watanabe. 2002. Sequence analysis of the NRAMP1 genes from different bovine and buffalo breeds. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64(11): 1081-1083.
- Adams, G., and J. Templeton. 1998. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 17(1): 200-219.
- Alejua, H., y M. Rodríguez. 2006. Caracterización del circuito caprino en el sector villa Araure (estado Lara, Venezuela). *Agroalimentaria*, 11: 111-121.
- Altschul, S., W. Gish, W. Miller, E. Myers and D. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410. doi: 10.1016/s0022-2836(05)80360-2.
- Allendorf, F. and G. Luikart. 2007. *Conservation and the genetics of populations*. 642 pp. Malden, MA, USA: Blackwell Publishing.
- Barthel, R., J. Feng, J. Piedrahita, D. McMurray, W. Templeton, and G. Adams. 2001. Stable Transfection of the Bovine NRAMP1 Gene into Murine RAW 264.7 Cells: Effect on *Brucella abortus* Survival. *Infection and Immunity*, 69(5): 3110-3119.
- Barthel, R., J. Piedrahita, D. McMurray, J. Payeur, D. Baca, F. Güemes, V. Perumaalla, T. Ficht, J. Templeton and G. Adams. 2000. Pathologic findings and association of *Mycobacterium bovis* infection with the bovine NRAMP1 gene in cattle from herds with naturally occurring tuberculosis. *American Journal of Veterinary Research*, 61(9): 1140-1144.
- Bastos, E., A. Cravador, J. Azevedo and H. Guedes-Pinto. 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in the Portuguese indigenous sheep breed "Churra da Terra Quente". *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 5(1): 7-15.
- Benson, D., M. Cavanaugh, K. Clark, I. Karsch-Mizrachi, D. Lipman, J. Ostell and E. Sayers. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1): D36-D42.
- Blackwell, J., T. Goswami, C. Evans, D. Sibthorpe, N. Papo, J. White, S. Searle, E.N. Miller, C. Peacock, H. Mohammed and M. Ibrahim. 2001. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. *Cellular Microbiology*, 3(12): 773-784.
- Borriello, G., R. Capparelli, M. Bianco, D. Fenizia, F. Alfano, F. Capuano, D. Ercolini, A. Parisi, S. Roperto and D. Lannelli. 2006. Genetic Resistance to *Brucella abortus* in the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infection and Immunity*, 74(4): 2115-2120.
- Capote, J., A. Tejera, M. Amills, A. Argüello, M. Fresno and J. López. 2004. Influencia histórica y actual de los genotipos canarios en la población caprina americana. *Animal Genetic Resources / Ressources génétiques animales / Recursos genéticos animales*, 35: 49-60. doi: doi:10.1017/S1014233900001802.
- Capparelli, R., F. Alfano, M. Amoroso, G. Borriello, D. Fenizia, A. Bianco, S. Roperto, F. Roperto and D. Lannelli. 2007a. Protective Effect of the *Nramp1* BB Genotype against *Brucella abortus* in the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infection and Immunity*, 75(2): 988-996.
- Capparelli, R., G. Borriello, R. Marabelli, S. Roperto, F. Roperto and D. Lannelli. 2007b. The *Nramp1*AA genotype confers susceptibility to *Brucella abortus* in water buffalo. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 18(2): 137-143.
- Cellier, M., P. Courville and C. Champion. 2007. *Nramp1* phagocyte intracellular metal withdrawal defense. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 9(14-15): 1662-1670.
- Cerquera, F., O. Toro y G. Alberto. 2009. Frecuencias alélicas para variantes SNP en el gen *Nramp1* en bovinos infectados

- con *Brucella abortus* o clasificados por resistencia al patógeno. *Revista Corpoica* (Colombia), 10: 43-50.
- Coussens, P., M. Coussens, B. Tooker and W. Nobis. 2004. Structure of the bovine natural resistance associated macrophage protein (NRAMP 1) gene and identification of a novel polymorphism. *Mitochondrial DNA*, 15(1): 15-25.
- De La Rosa, O., A. Márques, B. Vásquez y L. Dickson. 2014. Polimorfismos del gen *Slc11a1* en cabras criollas. Un estudio inicial de la resistencia natural a Paratuberculosis. *Observador del Conocimiento*, 2(1): 189-194.
- De La Rosa, O., A. Márques, B. Vásquez, G. Seijas y L. Dickson. 2013. Optimización de un protocolo para aislamiento de ADN a partir de sangre periférica en bovinos. Paper presented at the 2do Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación. LOCTI - PEII, Caracas.
- Díaz, S., M. Ripoli, P. Peral y G. Giovambattista. 2005. Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. Los loci del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) como genes candidatos. *Analecta Veterinaria*, vol. 25, no. 1.
- Dickson, L. y G. Muñoz (Eds.). 2007. *Manual de Producción de Caprinos y Ovinos* (2 ed.). Barquisimeto. Lara: FUNDACITE LARA.
- Dickson, L., G. Torres, C. Becerril, F. González, R. Rangel y E. García. 2001. Evaluación productiva y reproductiva de dos grupos de cabras triple mestizas bajo condiciones de confinamiento en el trópico seco de Venezuela. *Veterinaria México OA*, 32 (001).
- DNABaser, S.A. 2012. *DNA Baser Sequence Assembler*. Romania: Heracle BioSoft SRL. Retrieved from: <http://www.DnaBaser.com>.
- Estrada-Cuzcano, A., J. Sandoval, M. Guevara-Fujita y R. Fujita. 2013. Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. *Revista peruana de biología*, 12(3): 349-358.
- Ganguly, I., A. Sharma, R. Singh, S. Deb, D. Singh and A. Mitra. 2008. Association of microsatellite (GT)_n polymorphism at 3'UTR of NRAMP1 with the macrophage function following challenge with *Brucella* LPS in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Microbiology*, 129 (1-2): 188-196.
- Gasser, R., M. Hu, N. Chilton, B. Campbell, A. Jex, D. Otranto, C. Cafarchia, I. Beveridge and X. Zhu. 2007. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. [© 2007 Nature Publishing Group]. *Nature Protocols*, 1(6): 3121-3128.
- Glaubitz, J. 2004. Convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, 4(2): 309-310.
- González, J., O. Saldarriaga, A. López-Herrera, N. Bermúdez, W. Zapata, J. Ossa, M. Rugeles y G. Bedoya. 2006. Polymorphism in 1908STR1934 locus of the 3' UTR of the *Nramp1* bovine gene in eight cattle breeds. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(1): 11-17.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, 86(6): 485-486.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* (Nº 41): 95 - 98.
- Hasenauer, F., M. Caffaro, C. Czibener, D. Comerci, M. Poli and C. Rossetti. 2013. Genetic analysis of the 3' untranslated region of the bovine *SLC11A1* gene reveals novel polymorphisms. *Molecular Biology Reports*, 40(1): 545-552.
- Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Genome Research*, 1(1): 34-38.
- Helios Software Solutions. 2008. *TextPad, Version 5.2* [Software].
- Horín, P., I. Rychlík, J. Templeton and G. Adams. 1999. A complex pattern of microsatellite

- polymorphism within the bovine NRAMP1 gene. *European Journal of Immunogenetics*, 26(4): 311-313.
- Iacoboni, P. A., F. C. Hasenauer, M. E. Caffaro, A. Gaido, C. Rossetto, R. D. Neumann, A. Salatin, E. Bertoni, M. A. Poli and C. A. Rossetti. 2014. Polymorphisms at the 3' untranslated region of SLC11A1 gene are associated with protection to *Brucella* infection in goats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 160(3-4): 230-234. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.05.007.
- Kadarmideen, H., A. Ali, P. Thomson, B. Müller and J. Zinsstag. 2011. Polymorphisms of the SLC11A1 gene and resistance to bovine tuberculosis in African Zebu cattle. [© 2011 The Authors, *Animal Genetics* © 2011 Stichting International Foundation for Animal Genetics]. *Animal Genetics*, 42(6): 656-658.
- Korou, L., E. Liandris, M. Gazouli and J. Ikonomopoulos. 2010. Investigation of the association of the SLC11A1 gene with resistance/sensitivity of goats (*Capra hircus*) to paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 144(3-4): 353-358.
- Kumar, N., I. Ganguly, R. Singh, S. Deb, S. Kumar, A. Sharma and A. Mitra. 2011. DNA Polymorphism in SLC11A1 Gene and its Association with Brucellosis Resistance in Indian zebu (*Bos indicus*) and Crossbred (*Bos indicus* X *Bos taurus*) Cattle. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(7): 898-904.
- Kumar, N., A. Mitra, I. Ganguly, R. Singh, S. Deb, S. Srivastava and A. Sharma. 2005. Lack of association of brucellosis resistance with (GT)₁₃ microsatellite allele at 3' UTR of NRAMP1 gene in Indian zebu (*Bos indicus*) and crossbred (*Bos indicus* × *Bos taurus*) cattle. *Veterinary Microbiology*, 111(1): 139-143.
- Liandris, E., M. Gazouli and J. Ikonomopoulos. 2009. Characterization of caprine (*Capra hircus*) SLC11A1 gene: innate resistance to paratuberculosis. *Online Journal of Veterinary Research*, 13(1): 41-52.
- Martínez, R., S. Dunner, G. Barrera and J. Cañón. 2008a. Novel variants within the coding regions of the Slc11A1 gene identified in *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125(1): 57-62.
- Martínez, R., S. Dunner, R. Toro, J. Tobón, J. Gallego and J. Cañón. 2010. Effect of polymorphisms in the Slc11a1 coding region on resistance to brucellosis by macrophages in vitro and after challenge in two *Bos* breeds (Blanco Orejinegro and Zebu). *Genetics and Molecular Biology*, 33(3): 463-470.
- Martínez, R., R. Toro, F. Montoya, M. Burbano, J. Tobón, J. Gallego, S. Dunner and J. Cañón. 2008b. Bovine SLC11A1 3' UTR SSCP genotype evaluated by a macrophage in vitro killing assay employing a *Brucella abortus* strain. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125(4): 271-279.
- Matthews, G., and A. Crawford. 1998. Cloning, sequencing and linkage mapping of the NRAMP1 gene of sheep and deer. *Animal Genetics*, 29(1): 1-6.
- Mellado, M. 1997. La cabra criolla en América Latina. *Veterinaria Mexico*, 28(4): 333-343.
- Muñoz, G., A. Albornoz y C. Araque. 2008. La Cabra Criolla: Su preservacion en áreas comunales. *Revista Agrotécnico* 39-41.
- O'Brien, B., N. Archer, A. Simpson, F. Torpy and N. Nassif. 2008. Association of SLC11A1 promoter polymorphisms with the incidence of autoimmune and inflammatory diseases: a meta-analysis. *Journal of Autoimmunity*, 31(1): 42-51.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(8): 2766-2770.
- Paixão, T., C. Ferreira, A. Borges, D. Oliveira, A. Lage and R. Santos. 2006. Frequency of bovine Nramp1 (Slc11a1) alleles in Holstein

- and Zebu breeds. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109(1-2): 37-42.
- Paixão, T., R. Martinez and R. Santos. 2012. Polymorphisms of the coding region of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene associated to natural resistance against bovine brucellosis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64: 1081-1084.
- Paixao, T., F. Poester, A. Neta, Á. Borges, A. Lage and R. Santos. 2007. *NRAMP1* 3' untranslated region polymorphisms are not associated with natural resistance to *Brucella abortus* in cattle. *Infection and Immunity*, 75(5): 2493-2499.
- Pariacote, F., L. Ruiz, D. D'Ascencao, C. Borges and X. Pimentel. 2004. Morphological traits of venezuelan Creole goat. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal*, 12(4s1): 16-21.
- Pazzola, M., M. Dettori, M. Atzeni, F. Balia and G. Vacca. 2010. Genetic diversity of *NRAMP1* 3'-UTR microsatellite in cattle breeds reared in Sardinia. *Italian Journal of Animal Science*, 8(2s): 126-128.
- Pinedo, P., C. Buergelt, G. Donovan, P. Melendez, L. Morel, R. Wu, T. Langae and D. Rae. 2009. Candidate gene polymorphisms (*BoIFNG*, *TLR4*, *SLC11A1*) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 91(2-4): 189-196.
- Pitel, F., I. Lantier, J. Riquet, I. Lanneluc, K. Tabet-Aoul, N. Saidi-Mehtar, F. Lantier and J. Gellin. 1994. Cloning, sequencing, and localization of an ovine fragment of the *NRAMP* gene, a candidate for the *ITY/LSH/BCG* gene. *Mammalian Genome*, 5(12): 834-835.
- Pruitt, K.D., T. Tatusova and D.R. Maglott. 2004. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Research*, 33(Database issue): D501-D504. doi: 10.1093/nar/gki025
- Ranjan, R., C. Bhong, K. Chavan, S. Parmar and C. Joshi. 2011. DNA polymorphism of 3'UTR of *Nramp1* gene in Malvi breed of cattle. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 1(3): 105-108.
- Reddacliff, L., K. Beh, H. McGregor and R. Whittington. 2005. A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johne's disease. *Australian veterinary journal*, 83(7): 435-441.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1): 103-106.
- Ruiz-Larrañaga, O., J. Garrido, C. Manzano, M. Iriando, E. Molina, A. Gil, A. Koets, V. Rutten, R. Juste and A. Estonba. 2010. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine solute carrier family 11 member 1 (*SLC11A1*) gene and their association with infection by *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Journal of Dairy Science*, 93(4): 1713-1721.
- Sunnucks, P., A. Wilson, L. Beheregaray, K. Zenger, J. French and A. Taylor. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 9(11): 1699-1710.
- Taka, S., E. Liandris, M. Gazouli, K. Sotirakoglou, G. Theodoropoulos, M. Bountouri, M. Andreadou and J. Ikonomopoulos. 2013. In vitro expression of the *SLC11A1* gene in goat monocyte-derived macrophages challenged with *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 17: 8-15.
- Techau, M., J. Valdez-Taubas, J. Popoff, R. Francis, M. Seaman and J. Blackwell. 2007. Evolution of differences in transport function in *Slc11a* family members. *The Journal of biological chemistry*, 282(49): 35646-35656.
- Trujillo, E. y Y. Valderrama. 2009. Genotipificación de la región 3'UTR del gen *Nramp1*, en ganado Holstein y en criollo Hartón del

- Valle. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4): 401-406.
- Vacca, G., M. Pazzola, C. Pisano, V. Carcangiu, M. Diaz, M. Nieddu, R. Robledo, R. Mezzanotte and M.L. Dettori. 2011. Chromosomal localisation and genetic variation of the SLC11A1 gene in goats (*Capra hircus*). *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 190(1): 60-65. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.09.028
- Vázquez, F., R. Alonso, N. Villegas, C. Arriaga, A. Pereira, R. Mancilla and C. Estrada. 2006. A microsatellite study of bovine solute carrier family 11 a1 (Slc11a1) gene diversity in Mexico in relation to bovine tuberculosis. *Genetics and Molecular Biology*, 29(3): 503-507.
- Vidal, S., D. Malo, K. Vogan, E. Skamene and P. Gros. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*, 73(3): 469-485.
- Yeh, F. and T. Boyle. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany(129)*: 157.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*, 7(1-2): 203-214. doi: 10.1089/10665270050081478.

NOTA TÉCNICA

Caracterización Etnológica del ecotipo “Caprino Criollo” de la Microrregión Cauderales, Lara, Venezuela

Ethnological Characterization of the “Creole Goat” ecotype of the Cauderales Microrregion, Lara, Venezuela

Gloria M. Muñoz Milano*, Yasmil Granda y Blanca Rosas

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. INIA-Lara. Venezuela. Apto.postal 592. Correo electrónico: gmunoz@inia.gob.ve*

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar etnológicamente un rebaño de cabras Criollas, perteneciente a la microrregión de Cauderales, municipio Urdaneta del estado Lara; con el propósito de contribuir a identificar y definir un prototipo racial. Fueron evaluados 167 animales con edades a partir de un año de edad, peso promedio de 28,1 y una desviación estándar de 9,0 Kg., con una condición corporal media de 2,5; tomándose las siguientes medidas zoométricas: longitud corporal ($105,7 \pm 12,6$ cm), altura a la cruz ($63,2 \pm 6,9$ cm), perímetro torácico ($65,1 \pm 22,6$ cm), longitud del tronco ($50,6 \pm 7,4$ cm), ancho de pecho ($13,9 \pm 2,2$ cm) y las faneras color de capa, tipo de oreja, ubre, pezón. Los animales presentaron patrones distintos de capa destacando: marrón, negro y blanco (28, 3, 23,5 y 16,3%, respectivamente), tamaño medio en las orejas, con ubres globosas (69,2%) en su mayoría con pezones normales (59%). Se determina que la caracterización etnológica es de un 68% ecotipo caprino Criollo, siendo un animal de capa oscura, eumétrico, de orejas medianas con ubres globosas con bajo pesos corporales. Este estudio contribuirá al fortalecimiento de los trabajos de investigación sobre biodiversidad genética y rescate de los recursos autóctonos caprinos en vías de desaparición, debido al cruzamiento indiscriminado y absorbente con otras razas exóticas.

Palabras clave: Recurso genético caprino, cabra criolla, biodiversidad genética, *Capra hircus*.

ABSTRACT

The objective of this research is to characterize ethnologically a Creole goat herd in the Cauderales microrregion at the Urdaneta municipality in the state of Lara. With the purpose of contributing to identify and define a racial prototype, 167 animals were evaluated with ages over one year and average weight of 28.1 ± 9.0 Kg. with an average body condition of 2.5. The following zoometric measurements were taken: body length (105.7 ± 12.6 cm), height at withers (63.2 ± 6.9 cm), thoracic perimeter (65.1 ± 22.6 cm), length of trunk, (50.6 ± 7.4 cm), width of chest (13.9 ± 2.2 cm) and the appendages colors of skyn, type of ears, udders and nipples. The animals presented different colors of skyn such as brown, black and white (28.3, 23.5 and 16.3 % respectively), middle size ears with globose udders (69.2%) with mostly normal nipples (59%). Determined that the ethnological characterization is of 68% Creole goat ecotype, being an animal with dark skyn, eumetric of middle size ears, globose udders and a low body weights. This study will contribute to the strengthening of research works about genetic biodiversity and the rescue of the local goats lost with the indiscriminated crosses with other exotic breeds of goats.

Key words: Goat genetic resources, creole goat, genetic biodiversity, *Capra hircus*.

INTRODUCCIÓN

Las cabras fueron introducidas en América alrededor del siglo XVI por los españoles y portugueses (Arbiza, 1986); debido a la gran variedad edafoclimática, sistema de explotación y características socio-económicas, aunado al apareamiento racial indiscriminado por el proceso de selección natural, han dado lugar a poblaciones caprinas denominadas “criollas” con caracteres diferenciados y estructurados adaptados a los diferentes ambientes donde se criaron, logrando desarrollar extraordinaria rusticidad y sobrevivencia (Muñoz *et al.*, 2008). Se entiende por ecotipo criollo a la población de caprinos autóctonos de una zona, sin referencia histórica ni evidencia del nivel de mestizaje reciente.

A nivel internacional existen varios trabajos en los que se describen y aplican algunas de las herramientas de la identificación animal sobre caprinos regionales o criollos de diferentes lugares. En general, consisten en la caracterización de fenotipos o genotipos con el objetivo de diferenciarlos y preservarlos como recurso genético, por su variabilidad y sus características de adaptación al medio ambiente.

En Venezuela, el caprino, en la mayoría de las regiones donde se explota como recurso único o complementario, existe un marcado predominio del ecotipo Criollo, tienen en común una elevada rusticidad y adaptación que le ha permitido su supervivencia en las zonas áridas y semiáridas del país, aprovechando esos recursos en donde difícilmente pueden ser sustituidos por otras especies.

No obstante, dado la necesidad de aumentar la productividad en los últimos años se ha venido introduciendo razas importadas y realizando cruzamientos sin control con el ecotipo caprino criollo, generando genotipos nuevos o animales mestizos que no necesariamente son mejorados. El uso indiscriminado de estas razas exóticas podría contribuir a la pérdida de la biodiversidad genética de la cabra criolla, que según la FAO (2007) para proteger los recursos genéticos autóctonos se hace necesario establecer un inventario y una caracterización de los mismos, además de realizar un seguimiento de las tendencias y riesgos para crear un sistema de

alerta y respuesta temprana con base nacional ante cualquier desastre.

Con el objetivo de avanzar en el conocimiento de las características etnológicas de la población de cabras criollas en la región del semiárido Larense, en particular de Cauderales parroquia Siquisique, municipio Urdaneta del estado Lara; se realiza el estudio de características morfoestructurales para contribuir a establecer su identidad dentro de la población heterogénea general.

MATERIALES Y MÉTODOS

En las regiones áridas y semiáridas del país se encuentran áreas con características edafoclimáticas, ecológicas y económicamente distintas que tienen influencia en los sistemas de producción animal caprina y en los genotipos prevaecientes. La microrregión de Cauderales esta ubicada a 10°35'LN 69°35' LO, en la parroquia Siquisique, municipio Urdaneta del estado Lara; es un área con tradición, orientada a la producción de carne, con características agroclimáticas de tipo monte espinoso tropical, presentan graves problemas por los cruzamientos anárquicos y sin control. Se cuenta con una población caprina de 109.212 cabezas en 1.425 unidades de producción (VII Censo Agrícola Nacional, 2007).

Para la caracterización de los animales, se seleccionaron 5 unidades de producción que presentaban altos porcentajes del ecotipo caprino criollo, se tomó una muestra aleatoria de 167 animales (156 hembras y 11 machos), se describieron mediante observación ocular las siguientes variables fanerópticas (estructuras complementarias y visibles sobre la piel o que sobresalen de ella): color del pelaje, tipo de ubre, tipo de pezón, tamaño de la oreja y condición corporal, se pesaron individualmente (peso vivo **PV**) utilizando una balanza tipo reloj de 200 Kg. y se registraron medidas de variables zoométricas utilizando para ello cinta métrica (longitud del cuerpo (**LC**) o distancia que va desde la nariz hasta la base de la cola, perímetro torácico (**PT**) o contorno alrededor del tórax, longitud del tronco (**LT**) o distancia desde la punta de la articulación escápulo-humeral hasta la punta del isquion y ancho de grupa (**AG**) o distancia recta entre los dos íliones), y escuadra ajustable (altura a la cruz

(AC) o distancia de la línea de la cruz al suelo). Los datos fueron recogidos y guardados en una hoja de cálculo de Excel y utilizando estadística descriptiva aplicando solo promedio como medida de tendencia central y un análisis de varianza con un diseño completamente al azar con un modelo lineal para evaluar efecto finca y sexo, en el caso de encontrar un efecto con diferencias significativas se realizó comparación de medias de LSD a las diferentes variables estudiadas, a un nivel de significancia de 0,01, utilizando para ello el paquete de funciones estadísticas computacional Statistix V.8.0. (2007).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

La identificación animal como base para la caracterización etnológica es uno de los pasos iniciales en el proceso de selección, mejora y conservación de una raza. En general, la caracterización fenotípica de los ejemplares para Cauderales se observó que el 68,3% se agruparon como criollos, 26,3% como mestizos de Nubia, 3% mestizo Alpino y 2,4% mestizo de Canarias.

Para las variables cualitativas: no se encontró un dimorfismo sexual para las variables color de pelaje o capa y tamaño de oreja. La capa con mayor porcentaje fue del color marrón con 28,3%, 23,5% negra, 16,3% blanca, 13,3% amarilla, 7,2% zarura, 6,6% pintada y 4,8% crema, se observa un predominio de capa de colores oscuros, posiblemente debido a cruces con razas Alpinas y Nubian que fueron introducidas según los productores de la zona por los años 70, esto es atribuido a la selección que hacen los productores para que los animales se entremezclen con el paisaje y no se puedan ver a simple vista.

Según Agraz (1976) señala que la coloración de capa varía de acuerdo con la raza con que se cruce la cabra criolla, cuando es con la Saanen se torna un poco crema o diferentes tonos de blanco y cuando es con Toggenburg se presenta marrón o pardo o con manchas. Bedotti *et al.* (2004) encontraron en la población de cabras coloradas de Pampeana, un predominio de colores rojizos y tostados, posiblemente por influencias de otras razas como la Nubian y Angora. Al igual, Rosado *et al.* (2000) agrupa

animales eumétricos con aptitud hacia carne-leche con capa variable donde predominan las coloraciones oscuras (negra, parda, castaña y retinta). Gómez *et al.* (2012), señalan que la capa de la cabra apurimeña es mayoritariamente manchada en un 44,5% y de formato eumétrico.

Con referencia al tamaño de oreja se encontró que el 68,1% es mediano, el 24,1% grande y 7,8% pequeño, probablemente por influencia de la raza Nubian. En España, De Gea *et al.* (2008) encontraron que el 63% de los ejemplares criollos tenían orejas grandes y dispuestas horizontalmente similares a las descritas en cabras españolas como la Celtiberica. En la descripción de la cabra Colorada, Bedotti *et al.* (2004) observaron que en la mayoría de los casos los ejemplares tenían orejas de tamaño medio 84,3% con dirección horizontal.

Del total de 156 ubres observadas, el 69,2% correspondieron a la conformación globosa y 29,5% apelonada o piriforme, con el 59% de pezones normales y 31% largos, se evidencia problemas de pezones supernumerarios con 10% de presentación en el rebaño; estos resultados indican que por la disposición globosa permite el pastoreo en zonas con matorrales, que pueden sustentar una adecuada lactancia y que posiblemente las segundas tengan un origen en la cabra de raza Nubian por su ubre alargada y pezón largo. Los estudios de De Gea *et al.* (1997) en cabras criollas de Comechigones y Rosado *et al.* (2000) en cabras Moncaínas, encontraron que las ubres son generalmente recogidas de forma globosa y con pezones bien diferenciados.

Variables cuantitativas: En el Cuadro se presentan los estadísticos descriptivos de las variables zoométricas y el efecto de factor finca de los animales estudiados, se puede apreciar una alta dispersión de los datos, ya que los coeficientes de variación son altos en algunas variables, esto puede ser debido al número de observaciones por sexo, indicando también la heterogeneidad que se encuentra dentro del rebaño bajo estudio.

Se presentó un efecto altamente significativo ($P < 0,01$) de finca sobre casi todas las variables. La Finca 5 se destacó por tener animales con un manejo más tecnificado que el resto de los productores de la zona mostrando, en general,

los mayores valores en las diferentes variables cuantitativas estudiadas (PV: 31,4 Kg; LC: 110,5 cm; LT: 54,9 cm; PT: 74,9 cm; AC: 65,5 cm; AG: 13,7 cm). Los menores valores fueron observados en la finca 4 (PV: 22,7 Kg; LC: 103,3 cm; LT: 49,5 cm; PT: 61,6 cm; AC: 62,3 cm; AG: 12,7 cm)

El valor promedio de peso vivo encontrado fue de $28,1 \pm 9,0$ Kg no encontrándose diferencias significativas entre sexos. En relación al peso vivo, este promedio se encuentra por debajo del rango descrito para otros ecotipos caprinos criollos como los reportados por Prieto *et al.* (2006) en cabras criollas de Formosa con $37,8 \pm 6,8$ Kg y Bedotti *et al.* (2004) encontraron en cabras coloradas pampeanas pesos de $44,0 \pm 6,03$ Kg

Los resultados que arroja el análisis para la variable longitud total, muestra un valor alto (105,7 cm), evidenciando que son animales largos y menos pesados; que está por encima de lo reportado en la literatura de $70,4 \pm 3,8$ cm para cabras criollas del norte de Argentina (Revidatti *et al.*, 2007 y Prieto *et al.*, 2006). De Gea *et al.*, (1997) reporta valores por encima del encontrado en este estudio ($114,5 \pm 2,1$ cm) en cabras criollas pastoreñas de Oaxaca, México encontrados por Sierra *et al.*, 1997. Para las variables zoométricas: alzada a la cruz (63,2 cm) y ancho de grupa (13,9 cm) se encontró valores similares reportados por Santos *et al.* (2011) de 62,2 cm y 13,5 cm respectivamente para cada variable en cabras de Puebla, México.

En Argentina, Prieto *et al.* (2006) y Revidatti *et al.* (2007) encontraron valores de 62,1 cm y 15,3 cm. respectivamente, el valor de la segunda variable mayor que el reportado en este estudio. También en España, Bedotti *et al.* (2004) obtuvieron 64,2 cm para altura de cruz y para ancho de grupa obtuvo un valor mayor (16,3 cm). En las cabras Apurimeñas se describieron como animales grandes de alzadas superior a los 65 cm de perfil ortoide y proporción brevilinea (Gómez *et al.*, 2012). Agraz (1976) encontró valores superiores a los reportados en este estudio para alzada de cruz en distintas regiones en Argentina (70, 76, 71 cm).

El valor encontrado para la variable perímetro torácico (65,1 cm) y longitud de tronco (50,6 cm) fue menor que el reportado en la literatura para

otros ecotipo caprino criollos. Santos *et al.* (2011) reportaron medidas de 78,5 cm y 75,3 cm para perímetro; de 61,9 cm y 62,3 cm para longitud de tronco en cabras criollas para diferentes zonas de Puebla. Prieto *et al.* (2006) encontraron mayores valores para perímetro (82,4 cm) en cabras de Formosa. Bedotti *et al.* (2004) obtuvieron mayores valores para perímetro 85,9 cm y para longitud de tronco 70,8 cm en la cabra colorada pampeana que lo reportado en este estudio.

CONCLUSIONES

Este trabajo es un primer aporte para la caracterización etnológica del ecotipo caprino criollo de Cauderales (68%) siendo un animal de capa oscura, eumétrico, de orejas medianas con ubres globosas con bajo pesos corporales, se puede presumir que en la formación del caprino criollo de Cauderales hay un aporte significativo de razas de origen asiático presentes en sus características fenotípicas y esto puede contribuir a establecer su identidad dentro de la población caprina. Se hace necesario programa de rescate genético en zonas con tradición caprinería, ya que estos animales han demostrado su adaptación a ese medio ecológico. En base al coeficiente de variación hallado en el análisis de las variables zoométricas se determina que es un población muy heterogénea, y actualmente se esta evidenciando cruces anárquicos con razas europeas.

LITERATURA CITADA

- Agraz, A. 1976. Desarrollo de la ganadería caprina Argentina. FAO. Roma.
- Arbiza, S. 1986. Producción de caprinos. AGT editor S.A. México.
- Bedotti, D., A. Gómez, M. Sánchez, y J. Martos. 2004. Caracterización morfológica y faneróptica de la cabra colorada Pampeana. Archivos de Zootecnia 53:203. Universidad de Córdoba, España. pp. 226-271.
- Censo Agrícola Nacional VII. 2007. MPPAT. Disponible en línea: <http://www.mat.gob.ve/CensoAgricola/>[Abr. 15, 2014].

- De Gea, G., A. Mellano, A. Petryna, A. Bonvillani y P. Turillo. 2008. Caracterización zoométrica de la cabra criolla de las sierras de los comechingones, Córdoba, Argentina. IX Simposio Iberoamericano sobre conservación y utilización de recursos zoogenéticos. Red CONBIAND, CYTED. Disponible en línea: [http://: www.producción-animal.com.ar](http://www.producción-animal.com.ar). [Abr. 23, 2014].
- De Gea, G., A. Petryna y A. Mellano. 1997. La cabra tipo criollo regional de las sierras de los comechingones: tipos y frecuencias de presentación. *Veterinaria Argentina*. 14(132):101-103.
- FAO. 2007. Plan de acción mundial sobre recursos zoogenéticos y la declaración de Interlaken. Editado por la comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. Roma.
- Gómez, C., R. Bustinza, M. Revidatti, A. Ferrando y J. Jordana. 2012. Caracterización morfológica y faneróptica de la cabra Apurimeña Peruana. *Actas Iberoamericanas de conservación animal* 2: 57-60.
- Muñoz, G., A. Albornoz y C. Araque. 2008. La cabra Criolla: Su preservación en áreas comunales. *Agrotécnico*. 24: 39-41.
- Prieto, P., M. Revidatti, A. Capellari y M. Ribeiro. 2006. Estudio de recursos genéticos: identificación de variables morfoestructurales en la caracterización de los caprinos nativos de Formosa. *Comunicaciones científicas y tecnológicas* 2006. Universidad Nacional del Nordeste. V-012. (Resúmenes).
- Revidatti, M., P. Prieto, S. De la Rosa, M. Ribeiro y A. Capellari. 2007. Cabras criollas de la región norte Argentina. *Estudios de variables e índices zoométricos*. *Archivos de zootecnia*. 56 (1): 479-482.
- Rosado, V., R. Laborday y R. Berges. 2000. La raza Moncaína, estudio de sus características morfológicas. XXV Jornadas científicas y IV internacionales de la Sociedad Española Ovinotecnia y Caprinotecnia. SEOC. Comunicación 2. Disponible en línea: www.seoc.eu/docs/jornadas/25_jornadas_seoc.pdf. [May. 30, 2014].
- Santos, J., I. Hernández, R. Reséndiz, R. Pérez y S. Silva. 2011. Utilidad de variables zoométricas en la adscripción de caprinos criollos a distintas poblaciones. *Actas Iberoamericanas de conservación Animal*. 1:78-81-
- Sierra, A, A. Molina, J. Delgado, J. Hernández y M. Rivera. 1997. Zootechnical description of the creole goat of the Oaxaca region (Mexico). *Animal Genetic Resources Information*, 21: 61-70
- Statistix. 2007. *Statistic User's Manual*, Release 8.0 Analytical Software, Tallahassee, FL.

NOTA TÉCNICA

Optimización del análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple. Caso gen del receptor de hormona Luteinizante bovino

Optimization of single-strand conformational polymorphisms analysis. Bovine luteinizing hormone receptor gene case

Belkys J. Vásquez Marín^{1*}, Oscar De La Rosa¹, Alexis F. Márques Urdaneta¹, Geomar Seijas Pedroza², y José A. Aranguren Mendez³

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Aragua, Venezuela. Correo electrónico: belkysvasquez68@gmail.com. ²Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias Veterinarias. Mérida. ³Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Zulia, Venezuela.

RESUMEN

Con el objeto de optimizar el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP) para la detección y genotipado de los polimorfismos nucleotídicos simples (SNP) presentes en una región del gen receptor de hormona Luteinizante (LHR) bovino, se realizó un experimento en dos fases. En la primera se realizó un tamizaje molecular de 173 individuos mediante un análisis SSCP exploratorio. Las muestras que presentaron patrones electroforéticos diferenciales fueron secuenciadas y aquellas con variaciones nucleotídicas identificadas fueron utilizadas en la segunda fase para la optimización de la metodología SSCP. Se evaluaron las condiciones de la electroforesis variando la relación acrilamida/bis-acrilamida, porcentaje de la mezcla, intensidad de corriente, porcentaje de glicerol y duración de la electroforesis. Los geles fueron teñidos en una solución de SYBER@safe, 0,7%, durante 25 minutos en agitación suave y los patrones electroforéticos fueron visualizados mediante un transiluminador UV. La optimización de la técnica fue asumida basada en la separación, nitidez y perceptibilidad de las bandas así como la detección de las mutaciones. Se consideró como optimizado el sistema electroforético I. Se confirmó la presencia del SNP rs41256848, además de la detección de una variante ubicada en la posición 1337 de la secuencia de referencia NM_174381.1. En esta investigación se optimizó un procedimiento práctico para la detección y genotipado de los polimorfismos presentes en el fragmento de LHR bovino estudiado.

Palabras clave: Polimorfismos, ADN, SNP, SSCP, receptor, Luteinizante, bovino.

ABSTRACT

In order to optimize the single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis, for detection and genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNP) present in the bovine luteinizing hormone receptor gene (LHR), an experiment was conducted in two phases. First, a molecular screening was performed by exploratory SSCP on 173 individuals. Samples showing differential electrophoretic patterns were sequenced and those with identified nucleotide variations were used in the second stage for optimizing the SSCP method. Electrophoresis conditions were evaluated by varying the acrylamide/bis-acrylamide relationship, percentage mix, current, glycerol percentage and duration electrophoresis. Gels were stained in a solution of SYBER@safe, 0.7%, for 25 minutes under gentle stirring and electrophoretic patterns were visualized through an UV transilluminator. Optimization was assumed based on separation, sharpness and perceptibility of the bands and mutations detection. Was regarded as optimized the electrophoretic system I. The SNP rs41256848 was confirmed, also a variant located at position 1337 of the reference sequence NM_174381.1. In this research a practical method for detection and genotyping of polymorphisms present in the bovine LHR gene was optimized.

Keywords: Polymorphism, DNA, SNP, SSCP, receptor, luteinizing, bovine.

Recibido: 01/04/14 Aprobado: 20/02/15

INTRODUCCIÓN

La detección y el estudio de la variación genética son primordiales para dilucidar la relación existente entre el genoma y el fenotipo de los individuos; esto permitiría mejorar la comprensión de la variación fenotípica en las especies ganaderas (FAO, 2007).

En estas especies, el conocimiento de la variación nucleotídica a través del genoma permitiría un desarrollo más efectivo de herramientas útiles para mejorar el diagnóstico de enfermedades genéticas, así como de las estrategias de selección y mejoramiento genético animal para rasgos productivos y reproductivos.

En el caso de los rasgos reproductivos, se han descrito varios genes como candidatos posicionales y biológicos para el control de estos rasgos, tales como *IGF1* factor de crecimiento insulínico 1; *LEP* Leptina; *FSHR* receptor de hormona folículo estimulante; *PR* receptor de progesterona; *GnRHR* receptor de hormona liberadora de gonadotropinas y *LHR* receptor de hormona Luteinizante, (Kim *et al.*, 2009; Liefers *et al.*, 2005; Milazzotto *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011).

En cuanto al gen *LHR* (receptor de hormona Luteinizante), se conoce que codifica a la proteína LHR; esta proteína pertenece a la superfamilia de receptores acoplados al nucleótido Guanina o proteína G (Ascoli *et al.*, 2002). Tiene un rol fundamental en la regulación de la actividad reproductiva, ya que la acción de la hormona luteinizante (*LH*) se produce por la unión a este receptor (Davis, 1994). Así mismo, interviene en la esteroidogénesis ovárica y ovulación en la hembra, además de la producción de testosterona en las células de Leydig del testículo (Ascoli *et al.*, 2002).

De acuerdo a un reporte previo (Huhtaniemi, 2000), se ha detectado la presencia de mutaciones naturales en el dominio transmembrana de *LHR*; donde algunas de ellas promueven alteraciones de la función reproductiva en humanos. En ganado bovino se han detectado polimorfismos tanto en las regiones intrónicas como codificantes (Hastings *et al.*, 2006). Algunos de los que han sido detectados en el exón 11 han sido asociados a rasgos de fertilidad (Yu *et al.*, 2012). Con base a lo anterior, el conocimiento

de la variación nucleotídica de este exón podría permitir el desarrollo de estrategias para la clasificación en grupos genéticos o predicción del desempeño reproductivo en ganado bovino.

Además, es importante destacar que la mayoría de la variación nucleotídica se encuentra en la forma de polimorfismo nucleotídico simple *SNP*, (Iniesta *et al.*, 2005), siendo su densidad muy alta en los genomas de diversos organismos (Vignal *et al.*, 2002), por lo que se requiere de tecnologías adecuadas a fin de catalogar la diversidad nucleotídica en las poblaciones bovinas. La técnica de elección para evaluar esta diversidad sería la secuenciación de ADN. Sin embargo, en Venezuela todavía constituye una metodología costosa cuando se trata de evaluar un gran número de individuos.

Existen una amplia variedad de métodos que son utilizados para la detección de *SNPs* y que pueden minimizar el impacto del alto costo de la secuenciación de ADN, incluyendo las técnicas *PCR-RFLP*, *Ecotilling*, *análisis de heteroduplex* y *DGGE* (Kakavas *et al.*, 2008; Marson *et al.*, 2008; Till *et al.*, 2006). No obstante, un solo método no es aplicable a todos los problemas de investigación; debe seleccionarse el más adecuado para el estudio que se esté realizando. En el caso de la detección de nuevos polimorfismos, existen herramientas tecnológicas de alto rendimiento y baja relación costo-beneficio, como el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple (*SSCP*; Orita *et al.*, 1989).

La ejecución de la técnica *PCR-SSCP* involucra la amplificación por PCR de un segmento de interés, después la desnaturalización del ADN bicatenario (ADNbc) del fragmento amplificado, utilizando una combinación de calor y formamida, seguido de un enfriamiento rápido de la muestra para impedir el apareamiento complementario del ADN monocatenario (ADNmc); finalmente se procede a la separación electroforética en un soporte no desnaturalizante (Teschauer *et al.*, 1996).

Si los fragmentos de ADNmc difieren en un nucleótido simple, se promoverá la adopción de conformaciones tridimensionales diferentes en las cadenas simples (Nataraj *et al.*, 1999). En consecuencia, los cambios conformacionales promoverán que las cadenas simples exhiban movi­lidades electroforéticas diferentes entre sí,

e incluso con el ADN de doble cadena (Nataraj *et al.*, 1999; Dong y Zhu, 2005; Gasser *et al.*, 2007; Kakavas *et al.*, 2008). Una vez realizada la electroforesis, los fragmentos de ADN pueden ser visualizados mediante técnicas diversas como la auto radiografía de los segmentos marcados, tinción con plata o con bromuro de etidio y por fluorescencia a través del uso de cebadores fluorescentes (Kakavas *et al.*, 2008).

El análisis *SSCP* proporciona una potente herramienta para la identificación de patógenos, evaluación de la variación genética dentro y entre muestras o poblaciones y como punto importante, permite identificar mutaciones desconocidas por lo que ha sido utilizado para descubrir y genotipar *SNPs* en diversos genomas (Cerquera *et al.*, 2009; Sunnucks *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2001; González *et al.*, 2006; Dong y Zhu, 2005; Paixão *et al.*, 2006; Kakavas *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010; Pazzola *et al.*, 2010; Estrada-Cuzcano, 2013). Adicionalmente, esta técnica tiene ventaja sobre otras metodologías basadas en PCR para la detección de mutaciones, debido a su simplicidad técnica (Kakavas *et al.*, 2008; Hayashi, 1991).

Basado en lo anterior, el análisis *SSCP* constituye una técnica útil para identificar y genotipar polimorfismos en los genes que intervienen en el proceso reproductivo del ganado bovino, específicamente *LHR*. No obstante, es conocido el hecho de que la tasa de detección de *SNPs* por la técnica *SSCP* varía en función de diversos factores como el tamaño del producto PCR evaluado, la temperatura a la cual se realiza la electroforesis, composición de la matriz (relación acrilamida/bis-acrilamida), naturaleza del tampón y la adición de glicerol (Kalvatchev y Draganov, 2005).

En Venezuela no existen reportes previos de la aplicación de este análisis para la identificación y genotipado de polimorfismos en la especie bovina. Los resultados reportados en estudios realizados en otros países están referidos a fragmentos de PCR específicos, y las condiciones *SSCP* utilizadas no pueden aplicarse al fragmento del gen *LHR* objeto de este estudio.

Por esta razón, el objetivo planteado en la presente investigación fue el de optimizar el

análisis *PCR-SSCP* a fin de detectar y genotipar las variaciones nucleotídicas presentes en el exón 11 del gen receptor de hormona Luteinizante bovina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este experimento se realizó en dos fases; en la primera fase se realizó un tamizaje molecular de 173 individuos mediante un análisis *SSCP* exploratorio. Las muestras que presentaron patrones electroforéticos diferenciales fueron secuenciadas y aquellas con variaciones nucleotídicas identificadas, fueron utilizadas en la segunda fase para la optimización de la metodología *SSCP*.

Fase 1. Obtención y amplificación de ADN

Se utilizaron 173 muestras pertenecientes al banco de ADN del Laboratorio de Biotecnología Agrícola del INIA-ESAT, provenientes de rebaños bovinos Carora (98) y Criollo Limonero (75) ubicados en los estados Lara, Zulia y Aragua. El ADN genómico fue aislado a partir de sangre periférica refrigerada y conservada con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

Se utilizó una metodología de precipitación salina reportada por De La Rosa *et al.* (2013), la cual se describe brevemente; 400µl de cada muestra se solubilizaron con 1000µl de un tampón (Tris-Cl 20mM; pH 7,6) y se incubaron a temperatura ambiente por diez minutos. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 20.800 RCF (fuerza centrífuga relativa) por 20s y el sobrenadante fue descartado.

Se incubaron las pastillas resultantes en una solución de lisis (EDTA 1mM, Tris-Cl 10mM, 0,1% SDS; pH 8) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Los residuos proteicos fueron digeridos con proteínasa K (2,5µl, 20 mg.ml⁻¹) durante cuatro horas a 55°C. Para precipitar los residuos peptídicos se utilizó acetato de potasio 5M y centrifugación a 20.800 RCF. El sobrenadante se mezcló con una solución de etanol absoluto y acetato de sodio 0,12M a fin de promover la precipitación del ADN. Una vez aislado, el ADN fue lavado dos veces con etanol al 70% y solubilizado en un tampón de conservación (Tris 10mM, EDTA 1mM; pH 8), la integridad del ADN fue verificado por electroforesis en

geles de agarosa al 0,8% con SYBR®Safe incorporado (1/50.000) y la concentración total de ADN en las muestras se determinó mediante espectrofotometría óptica. Una vez realizado esto, el ADN se mantuvo congelado a -56°C hasta la realización de los análisis.

Se utilizó el par de cebadores (F- CAAACTGACAGTCCCCCGCTTT; R- CCTCCGAGCATGACTGGAATGGC) descritos por Milazzotto *et al.* (2008), para amplificar mediante PCR un fragmento de 303pb correspondiente a la región de interés del exón 11 del gen *LHR*. Se utilizó el estuche comercial GoTaq® Flexi (Promega) para las reacciones de amplificación. La mezcla de PCR tuvo un volumen total de reacción de 15 μL , con las proporciones siguientes: buffer 1X, MgCl_2 2,1 mM, dNTPs 0,2 mM, cada oligo 0,2 μM , Taq 1 U y 50 ng de ADN genómico. Se utilizó un termociclador GenePro™ (Bioer Technology) y un programa Touchdown (Korbie y Mattick, 2008), tal y como se especifica en el Cuadro 1.

Técnica de SSCP exploratoria

Una vez realizada la PCR, se adicionó a cada amplicón una solución desnaturizante (formamida 95%: azul de bromofenol 0,5%: EDTA 25 mM) en una proporción 2:1 (ADN: solución). La mezcla se desnaturizó a 95°C durante 10 minutos, seguido de un enfriamiento rápido. Luego, se colocaron a -20°C durante

10 minutos; pasado este tiempo se procedió a realizar las electroforesis en geles de poliacrilamida.

Para la obtención de los patrones SSCP, el fragmento de *LHR* fue resuelto en geles de poliacrilamida no desnaturizante (37,5:1 acrilamida/bisacrilamida, desgasificada por 30 min en una bomba de vacío, BIORAD Hydrotech™), al 6%, en buffer Tris Borato EDTA 0,5 x (TBE), 2% de glicerol, durante 3:00 horas, a 30 mA constantes. Se utilizaron cámaras de electroforesis vertical duales ajustables (C.B.S Cientific, SG-400-20, EUA), con vidrios de 20cm x 22cm, peines y separadores plásticos de 2 mm de espesor. Todas las electroforesis se realizaron a una temperatura ambiental controlada entre 17°C y 19°C . Posterior a la electroforesis, los geles fueron teñidos en una solución de TBE (0,5X) y SYBER®safe, al 0,7%, durante 25 minutos en agitación suave y los patrones electroforéticos fueron visualizados a través de un transiluminador UV UVITEC (Uviprochemi).

Secuenciación de ADN a partir de las muestras con patrones electroforéticos diferenciales

Las muestras representativas de cada patrón electroforético diferencial se amplificaron nuevamente mediante PCR y los amplicones obtenidos fueron sometidos a un protocolo de secuenciación capilar estándar (Macrogen Inc.,

Cuadro 1. Programa touchdown para la reacción de PCR del fragmento estudiado del exón 11 de *LHR*.

| Fase PCR | | Temperatura | Tiempo |
|--|--------------|----------------------|--------|
| Desnaturalización Inicial | | 95°C | 5min |
| Desnaturalización | | 95°C | 30seg |
| Hibridación ($-1^{\circ}\text{C}/\text{c}$)* | Ciclos 10 | 61°C | 30seg |
| Extensión | | 72°C | 45seg |
| Desnaturalización | | 95°C | 30seg |
| Hibridación | Ciclos 20 | 51°C | 30seg |
| Extensión | | 72°C | 45seg |
| Extensión final | | 72°C | 10min |

*Disminución de 1°C en cada ciclo de la primera ronda de amplificación.

Corea), en ambos sentidos. Las secuencias fueron editadas y alineadas entre sí utilizando los programas DNABaser (Romania: Heracle BioSoft SRL) y CodonCodeAligner (CodonCodeCorporation, EUA). La secuencia consenso fue comparada con la referencia NM_174381.1 (Pruitt *et al.*, 2013). Se compararon los *SNPs* detectados con aquellos existentes en la base de datos del Centro Nacional de Investigación Biotecnológica NCBI (Sherry *et al.*, 2001). A partir de las secuencias obtenidas, se determinaron los genotipos de cada muestra.

Fase 2. Amplificación de ADN

Las muestras que presentaron *SNPs* fueron reamplificadas siguiendo la metodología de la fase 1.

Optimización de la técnica de SSCP

Para optimizar las condiciones de la electroforesis se varió la relación de acrilamida/bis-acrilamida, porcentaje de la mezcla, intensidad de corriente, porcentaje de glicerol y duración de la electroforesis (Cuadro 2), definiéndose siete sistemas. Todas las electroforesis se realizaron a temperatura ambiental entre 17°C y 19°C.

Los criterios tomados para seleccionar un sistema fueron separación, nitidez y perceptibilidad de las bandas así como la discriminación de las variantes genotípicas de los *SNPs* en función de los patrones *SSCP*. En el caso en que dos condiciones electroforéticas permitieran la detección de los *SNPs*, se utilizó el criterio de

tipo económico para la selección de la condición electroforética.

Correspondencia de los *SNPs* identificados con los patrones *SSCP* obtenidos

Se determinó visualmente la correspondencia de los *SNPs* detectados por secuenciación con cada patrón *SSCP* obtenido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase 1. Análisis *SSCP* exploratorio

En el fragmento de *LHR* analizado en la fase 1, se detectaron cuatro patrones electroforéticos (definidos como A, B, C, D) y cinco tamaños moleculares de acuerdo a su movilidad electroforética (Cuadro 3). Este número de patrones obtenidos no coincide con la cantidad de patrones observados por Milazzotto *et al.* (2008) al analizar un fragmento similar.

Durante el desarrollo de la fase 1 del ensayo, se obtuvieron dos patrones de dos bandas (A y B), un patrón de cuatro bandas (C) y un patrón de tres bandas (D), cada uno con una banda adicional correspondiente al ADN bicatenario (Figura 1).

Según Humphries *et al.* (1997), un producto de PCR representa la amplificación de dos alelos, uno de cada par autosómico; de manera que al evaluar secuencias provenientes de individuos homocigotos y heterocigotos, los patrones de bandas que deberían obtenerse son dos y cuatro

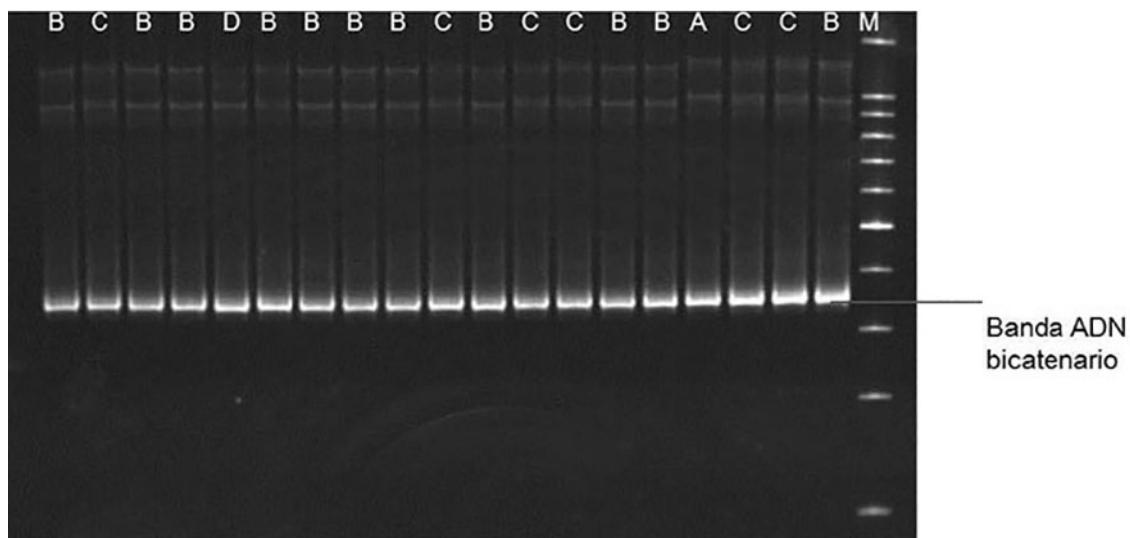
Cuadro 2. Condiciones de la electroforesis utilizadas en el experimento B.

| Sistema | Relación Acrilamida/Bis-acrilamida | Porcentaje de la mezcla | Glicerol | Amp/Watts | Tiempo corrida (h) |
|---------|------------------------------------|-------------------------|----------|-----------|--------------------|
| I | 37,5:1 | 6% | 5% | 30 mA | 3:30 |
| II | 49:1 | 10% | 4% | 12 W | 5 |
| III | 49:1 | 10% | 4% | 15 W | 6 |
| IV | 49:1 | 10% | 7% | 12 W | 6:45 |
| V | 49:1 | 10% | 4% | 15 W | 7 |
| VI | 100:1 | 10% | 4% | 15 W | 4:30 |
| VII | 100:1 | 12% | 4% | 12 W | 6 |

Cuadro 3. Tamaños moleculares de los patrones SSCP obtenidos a partir de la movilidad electroforética del fragmento estudiado de *LHR* bovino durante la fase 1.

| Producto PCR de <i>LHR</i> | Patrones SSCP | | | |
|---|---------------|-----------|--------------------|---------------|
| | A | B | C | D |
| Fragmento de 303 pb ubicado entre 1182 y 1484 | 900/1300 | 1000/1350 | 900/1000/1300/1350 | 900/1250/1300 |

Patrón SSCP (pb): Tamaño molecular de las bandas obtenidas
Modificado de Vásquez *et al.* (2014).



Letras A, B, C y D identifican los patrones electroforéticos.
M = Marcador de peso molecular (100 pb).

Figura 1. Imagen de las bandas de ADN monocatenario y bicatenario obtenidas.

bandas simples respectivamente, además de una banda adicional por el ADN de doble cadena, ubicado en una posición adelantada en el gel comparado con las cadenas simples de ADN. De acuerdo a lo reportado por este autor, los dos patrones de dos bandas (A y B), podrían corresponder a los dos homocigotos, el patrón de cuatro bandas (C) al heterocigoto, y el patrón de tres bandas (D), correspondería a un patrón atípico.

Por otra parte, se pudo constatar que los patrones A, B y C son similares, en cuanto al número de bandas obtenido, a los patrones reportados por Yu *et al.* (2012). Estos investigadores analizaron la misma región de *LHR* bovino evaluada en el

presente ensayo, en un fragmento de menor tamaño, A pesar de que la separación y nitidez de las bandas obtenidas por estos investigadores es mayor, discriminándose rápidamente la diferencia entre los patrones electroforéticos.

El contraste entre ambos resultados en cuanto a nitidez y separación de las bandas, podría deberse a que las condiciones de electroforesis utilizadas por estos autores difieren a las utilizadas en la Fase 1 del presente ensayo en cuanto a tamaño del fragmento, relación acrilamida/bisacrilamida (39:1), porcentaje de la mezcla (13%) y tiempo de corrida (8-10 h). Teschauer *et al.* (1996), reportó que un aumento

en el porcentaje de la mezcla del gel, incrementa la nitidez de las bandas.

Polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) detectados mediante secuenciación

Mediante el alineamiento de secuencias generadas de individuos con diferentes patrones electroforéticos se pudo detectar la presencia de dos polimorfismos o SNPs con respecto a la secuencia de referencia NM_174381.1 (Cuadro 4). De éstos, la variación rs41256848 ubicada en la posición g.1410G>T había sido reportada previamente en la base de datos dbSNP (Database of Single Nucleotide Polymorphisms, 2015; Hastings *et al.*, 2006; Jansen *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2012); mientras que la ubicada en g.1337C>T constituye una variante que no había sido reportada en la base de datos de SNP del NCBI (Sherry *et al.*, 2001). A esta secuencia variante se le asignó el número de entrada ss974751668 (Vásquez *et al.*, 2014), y recientemente se le asignó el número de referencia rs523043472 (Database of Single Nucleotide Polymorphisms, 2015). El SNP rs41256848 representa una transversión, mientras que rs523043472 representa una transición.

De acuerdo a los resultados de la secuenciación de ADN, se observaron dos genotipos del SNP rs523043472 y tres genotipos del SNP rs41256848 (Cuadro 5).

Fase 2. Optimización de la técnica SSCP

Las condiciones utilizadas en los sistemas I, II y IV permitieron detectar los cuatro patrones electroforéticos (Figura 2); los sistemas III, V y

VII permitieron la detección de los patrones de dos y tres bandas; sin embargo ninguno de los tres sistemas permitió la detección del patrón de cuatro bandas (Figura 2). En el caso del sistema VI, se obtienen bandas difusas, en las que no se logra distinguir un patrón definido (Figura 2).

Así mismo, el sistema I presentó la mejor separación y definición de bandas comparado con los sistemas II y IV. Según Teshauer *et al.* (1996), la adición de glicerol al gel de poli(acrilamida) puede mejorar la separación de las bandas; por lo cual, el incremento de la cantidad de glicerol hasta 5% en el sistema I, así como el aumento del tiempo de electroforesis podría haber permitido mejorar la separación de las bandas al compararlas con los resultados obtenidos en la fase 1, en los que se utilizaron las mismas proporciones de acrilamida/bisacrilamida, igual porcentaje de mezcla y potencia.

En el caso de los sistemas II y IV, específicamente en los patrones de dos y tres bandas, se observa mayor separación entre las cadenas simples complementarias, mientras que las bandas no complementarias más cercanas en el patrón C casi no se separan; igualmente se observa en esos dos sistemas, mayor nitidez de las bandas. Según Teshauer *et al.* (1996), el incremento en el porcentaje de la mezcla del gel, mejora la resolución de las bandas pero disminuye la separación entre bandas muy cercanas. En el caso del sistema II probablemente se requería un mayor tiempo de electroforesis, lo cual fue corroborado con el sistema IV. Pese a que los sistemas II y IV tienen como desventaja la mayor

Cuadro 4. Polimorfismos nucleotídicos simples (SNP) identificados en el fragmento estudiado del exón 11 del gen *LHR*.

| Ubicación en la referencia NM_174381.1 | Polimorfismos detectados | | | |
|--|--------------------------|---------------------|------------------|-------------|
| | Cambio nucleotídico | Cambio aminoacídico | Tipo de mutación | Variante |
| 1337 | 1337C>T | Ala120Val | Transición | rs523043472 |
| 1410 | 1410G>T | Trip144Cys | Transversión | rs41256848 |

Modificado de Vásquez *et al.* (2014).

Cuadro 5. Genotipos de los *SNPs* 1337C>T Y 1410G>T detectados por secuenciación de ADN en los productos de PCR.

| Fragmento | <i>SNPs</i> detectados | |
|------------|------------------------|----------|
| <i>LHR</i> | 1337C>T | 1410G>T |
| | CT CC | GG GT TT |

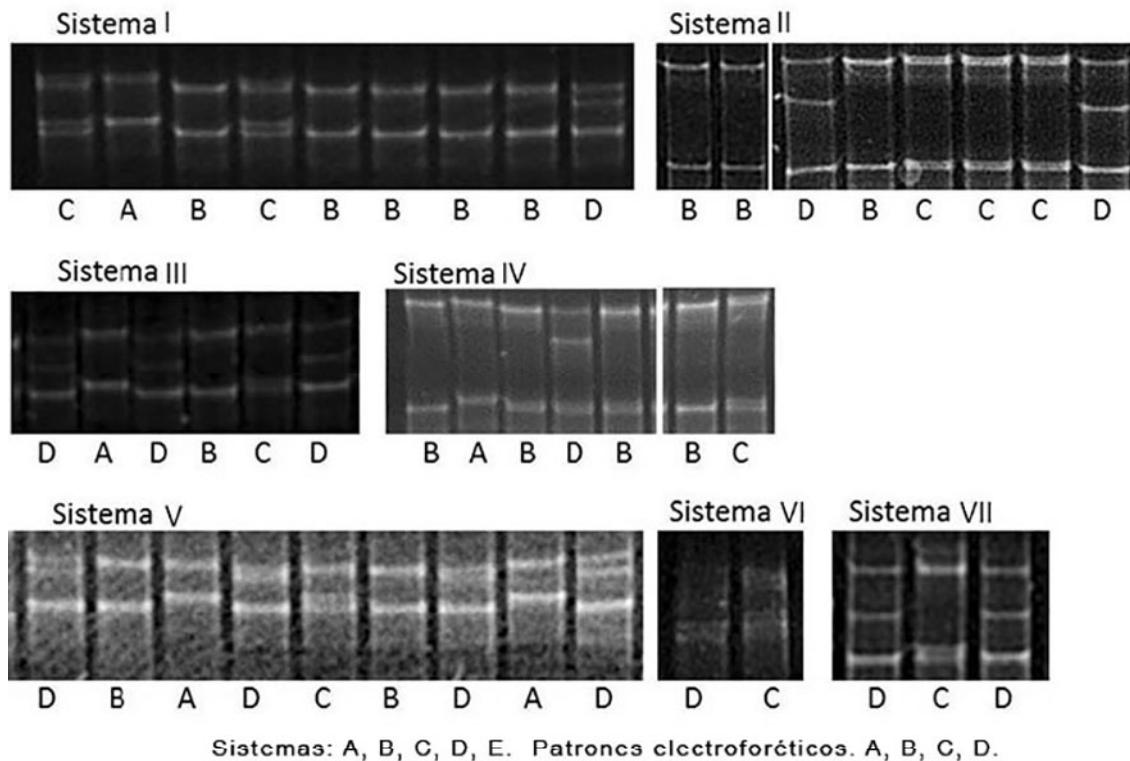


Figura 2. Imágenes de las resoluciones obtenidas con los diferentes sistemas electroforéticos ensayados durante la fase 2.

cantidad de poliacrilamida requerida y el largo tiempo para la electroforesis.

Las condiciones de electroforesis evaluadas en los sistemas I, II y IV permitieron la discriminación de los cuatro patrones electroforéticos. Pero, la calidad de la imagen obtenida varió con cada condición electroforética (Figura 2), y difieren en cuanto a la separación y nitidez de las bandas.

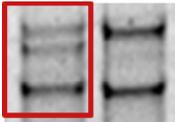
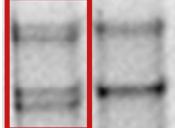
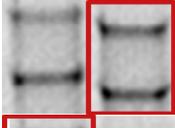
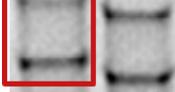
Es importante resaltar que el factor temperatura fue determinante durante la ejecución de los ensayos; el incremento de la temperatura ambiental por encima de los 19°C, promovió bandas de deficiente resolución.

Correspondencia de los *SNPs* detectados con los patrones *SSCP* obtenidos

La determinación de la correspondencia de cada patrón *SSCP* con las variantes alélicas de los *SNPs* detectados por secuenciación fue complicada debido a la presencia de dos *SNPs* en el fragmento amplificado del exón 11, por lo que los patrones electroforéticos son el resultado de las cuatro combinaciones alélicas presentes en la muestra poblacional estudiada (Cuadro 6).

Los patrones A y B corresponden a los individuos homocigotos para ambos *SNPs*; la diferencia en el desplazamiento de las bandas la produce la variación rs41256848, es decir tienen el

Cuadro 6. Correspondencia de los patrones electroforéticos en el fragmento estudiado del exón 11 del gen *LHR* con los SNPs1337C>T Y 1410G>T.

| Fragmento | Patrón SSCP | 1337C>T | 1410G>T | |
|------------|-------------|---|---------|----|
| <i>LHR</i> | D |  | CT | GG |
| | C |  | CC | GT |
| | B |  | CC | GG |
| | A |  | CC | TT |

Modificado de Vásquez *et al.* (2014). El recuadro rojo indica el patrón SSCP correspondiente a la combinación genotípica de ambos SNPs. La imagen que no tiene recuadro rojo es con fines comparativos.

mismo genotipo para el *SNP* rs523043472, pero difieren en el segundo *SNP*. En cuanto al patrón C, se puede observar que es homocigoto para la variación rs523043472 y heterocigoto para el *SNP* rs41256848.

En cuanto a la aparición del patrón D, los hallazgos de la secuenciación de ADN permiten discernir que este patrón SSCP es consecuencia de la combinación de ambos SNPs (rs523043472 en heterocigosis y rs41256848 en homocigosis), ya que al estudiar los resultados reportados por Yu *et al.* (2012), podemos observar que estos investigadores detectan el *SNP* rs41256848, pero no la variante rs523043472.

Así mismo, debido a que en este ensayo, los patrones A, B y C observados y los genotipos de rs41256848 detectados por secuenciación, coinciden con los patrones y genotipos observados por Yu *et al.* (2012), se asume que la presencia de la variante rs523043472 en homocigosis CC no enmascara los patrones A, B y C; sin embargo, sí este *SNP* se presenta en heterocigosis CT, se promueve la aparición de un patrón SSCP diferente (D).

CONCLUSIONES

Se destaca la optimización de la técnica *PCR-SSCP* mediante el desarrollo de condiciones adecuadas y repetibles que permiten con una eficiencia alta, la detección y discriminación de las variantes genotípicas de los *SNP* srs523043472 y rs41256848 ubicados en las posiciones 1337 y 1410 de la secuencia de referencia NM_174381.1 del gen *LHR* bovino.

Igualmente, se determina que las condiciones óptimas para la detección de los *SNP* son las descritas en el sistema I. Estas condiciones incluyen relación acrilamida/bis-acrilamida, porcentaje de la mezcla, potencia, porcentaje de glicerol, tiempo de electroforesis y temperatura ambiental (Cuadro 2).

Así mismo, el incremento del porcentaje de glicerol y el tiempo de electroforesis a 5% y 3:30 horas respectivamente, mejoró la nitidez y separación de las bandas.

AGRADECIMIENTO

Es importante destacar, que los autores de esta investigación reconocen y agradecen el apoyo del

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) y de la Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT) por el apoyo financiero para la ejecución del trabajo experimental.

LITERATURA CITADA

- Ascoli, M., F. Fanelli and D. L. Segaloff. 2002. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocrine Reviews*, 23(2), 141-174.
- Bastos, E., A. Cravador, J. Azevedo and H. Guedes-Pinto. 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in the Portuguese indigenous sheep breed "Churra da Terra Quente". *Biotechnology, agronomy, society and environment*. 5(1), 7-15.
- Cerquera, F., O. Toro y G. Alberto. 2009. Frecuencias alélicas para variantes SNP en el gen Nramp1 en bovinos infectados con *Brucella abortus* o clasificados por resistencia al patógeno. *Revista Corpoica (Colombia)*, 10, 43-50.
- Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). 2015. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. dbSNP accession: {rs41256848 – rs523043472}, (dbSNP Build ID: {126/143 – 142/143}). Available on line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/24/03/15>. [Mar. 24, 2015].
- Davis, J. 1994. Mechanisms of hormone action: luteinizing hormone receptors and second-messenger pathways. *Current opinion in obstetrics gynecology*. 6:254- 261.
- De La Rosa, O., A. Márques, B. Vásquez, G. Seijas y L. Dickson. 2013. Optimización de un protocolo para aislamiento de ADN a partir de sangre periférica en bovinos. Paper presented at the 2do Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación. LOCTI - PEII, Caracas.)
- Dong, Y. and H. Zhu. 2005. Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods in molecular medicine*, 108, 149-157.
- Estrada-Cuzcano, A., J. Sandoval, M. Guevara-Fujita y R. Fujita. 2013. Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. *Revista peruana de biología*, 12(3), 349-358.
- FAO. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. 2007. Rome.
- Gasser, R., M. Hu, N. Chilton, B. Campbell, A. Jex, D. Otranto, C. Cafarchia, I. Beveridge and X. Zhu. 2007. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature Protocols*, 1(6), 3121-3128.
- González, J., O. Saldarriaga, A. López-Herrera, N. Bermúdez, W. Zapata, J. Ossa, M. Rugeles and G. Bedoya. 2006. Polymorphism in 1908STR1934 locus of the 3' UTR of the Nramp1 bovine gene in eight cattle breeds. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(1), 11-17.
- Hastings, N., S. Donn, K. Derecka, A. Flint and J. Woolliams. 2006. Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. *Animal Genetics*. 37(6): 583-585.
- Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Application Aug*; 1(1):34-8.
- Huhtaniemi, I. 2000. The Parkes lecture. Mutations of gonadotrophin and gonadotrophin receptor genes: what do they teach us about reproductive physiology? *Journal of reproduction and fertility*. 119(2): 173-186.
- Humphries, S., S. Gudnason, V., N. Whittalland and M. Ian. 1997. Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clinical Chemistry* 43:3, 427-435.
- Iniesta, R., E. Guino y V. Moreno. 2005. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *GacSanit*, 19(4): 333-341.

- Kakavas, V. K., P. Plageras, T. A. Vlachos and A. Papaioannou Noulas. 2008. PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. *Molecular biotechnology*, 38(2), 155-163.
- Kalvatchev, Z. and P. Draganov. 2005. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis: a rapid and sensitive method for detection of genetic diversity among virus population. *Biotechnology & biotechnology equipment*. 19/2005/3.
- Kim, E. S., X. Shi, O. Cobanoglu, K. Weigel, P. J. Bergerand and B. W. Kirkpatrick. 2009. Refined mapping of twinning-rate quantitative trait loci on bovine chromosome 5 and analysis of insulin-like growth factor-1 as a positional candidate gene. *Journal of animal science*, 87(3), 835-843.
- Korbie, D. and J. Mattick. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols*, 3(9): 1452 – 1456.
- Liefers, S., R. Veerkamp, M. te Pas, C. Delavaud, Y. Chilliard, M. Platjeand and T. Lende. 2005. Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance traits in dairy cows. *Animal genetics*, 36(2), 111-118.
- Marson, E., J. Ferraz, J. Meirelles, J. Balieiro and J. Eler. 2008. Effects of polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a *Bos taurus* x *Bos indicus* beef composite population.
- Martínez, R., S. Dunner, R. Toro, J. Tobón, J. Gallego and J. Cañón. 2010. Effect of polymorphisms in the *Slc11a1* coding region on resistance to brucellosis by macrophages in vitro and after challenge in two *Bos* breeds (Blanco Orejinegro and Zebu). *Genetics and Molecular Biology*, 33(3), 463-470.
- Martínez, R., R. Toro, F. Montoya, M. Burbano, J. Tobón, J. Gallego, S. Dunner and J. Cañón. 2008. Bovine *SLC11A1* 3' UTR SSCP genotype evaluated by a macrophage in vitro killing assay employing a *Brucella abortus* strain. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125(4), 271-279.
- Milazzotto, M. P., P. Rahal, M. Nichi, T. Miranda-Neto, L. A. Teixeira, J. B. S. Ferraz and J. F. Garcia. 2008. New molecular variants of hypothalamus–pituitary–gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in *Bos taurus indicus* (Nellore). *Livestock Science*, 114(2), 274-279.
- Nataraj, A., I. Olivos-Glander, N. Kusukawa and W. Highsmith Jr. 1999. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*, 20(6), 1177-1185.
- Till, B. J., T. Zerr, L. Coma and S. Henikoff. 2006. A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals. *Nature Protocols* 1, 2465 - 2477.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(8), 2766-2770.
- Paixão, T., C. Ferreira, A. Borges, D. Oliveira, A. Lage and R. Santos. 2006. Frequency of bovine *Nramp1* (*Slc11a1*) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109(1-2), 37-42.
- Pazzola, M., M. Dettori, M. Atzeni, F. Balia and G. Vacca. 2010. Genetic diversity of *NRAMP1* 3'-UTR microsatellite in cattle breeds reared in Sardinia. *Italian Journal of Animal Science*, 8(2s), 126-128.
- Pruitt, K., G. Brown, S. Hiatt, F. Thibaud-Nissen, A. Astashyn, O. Ermolaeva, C. Farrell, J. Hart, M. Landrum, K. Mcgarvey, M. Murphy, N. O'Leary, S. Pujar, B. Rajput, S. Rangwala, L. Riddick, A. Shkeda, H. Sun, P. Tamez, R. Tully, C. Wallin, D. Webb, J. Weber, W. Wu, M. Dicuccio, P. Kitts, D. Maglott, T. Murphy and J. Ostell. 2013. RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic acids research*. 42: D756-D763. Available on line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24259432>. [Ene. 01, 2014].

- Sherry, S., M. Ward, M. Kholodov, J. Baker, L. Phan, E. Smigielski and K. Sirotkin. 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*, 29(1):308-311.
- Sunnucks, P., A. Wilson, L. Beheregaray, K. Zenger, J. French and A. Taylor. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 9(11), 1699–1710.
- Teschauer, W., T. Mussack, A. Braun, H. Waldner, and E. Fink. 1996. Conditions for single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis with broad applicability: a study on the effects of acrylamide, buffer and glycerol concentrations in SSCP analysis of exons of the p53 gene). *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry: journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, 34(2), 125-131.
- Walker, J., y R. Rapley. 2008. *Molecular biomethods handbook* (2nd ed ed.). Totowa, NJ: Humana Press.
- Vásquez, B., A. Márques, G. Seijas, O. De La Rosa y J. Aranguren, J. 2014. Detección de polimorfismos en la región codificante del gen receptor de hormona luteinizante mediante análisis de polimorfismo conformacional de cadena simple y secuenciación en bovinos Carora. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXIV, N° 5, 428 - 435, 2014*
- Vignal, A., D. Milan, M. San Cristobal, and A. Eggen. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetic Selection Evol.* 34: 275-305.
- Yang, W. K. Tang, S. Li and L. Yang. 2011. Association analysis between variants in bovine progesterone receptor gene and superovulation traits in Chinese Holstein cows. *Reproduction in domestic animals*, 46(6), 1029-1034.
- Yu, Y., Y. Pang, H. Zhao, X. Xu, Z. Wu, L. An and J. Tian. 2012. Association of a missense mutation in the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) with superovulation traits in Chinese Holstein heifers. *Journal of animal science and biotechnology*, 3(1), 35.

NORMAS DE PUBLICACIÓN (Instrucción a los Autores)

Zootecnia Tropical publica cuatro categorías de trabajos: Artículos Científicos, Notas Técnicas, Trabajos Especiales y Revisiones Bibliográficas.

- a) **Artículo Científico:** es un texto de carácter académico-científico que muestra el cumplimiento de normas específicas tanto en su estructura general como en su contenido. Cubre una extensa variedad de temas relacionados con la investigación e innovación tecnológica en las diversas disciplinas del conocimiento agrícola, bajo los paradigmas de investigación cuantitativo y cualitativo. Se redactan en vocabulario especializado y formal. Estos deberán ser de carácter innovadores y constituir un aporte al conocimiento científico, tecnológico o metodológico en el área de la producción agropecuaria sustentable y temas afines. La extensión del trabajo no debe exceder de 25 páginas a doble espacio, incluyendo cuadros, figuras y literatura citada. El trabajo debe incluir las siguientes secciones:

| Estudios con enfoque cuantitativo: | Estudios con enfoque cualitativo: |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Introducción: Problema, justificación y objetivos. - Materiales y Métodos - Resultados y Discusión - Conclusiones - Agradecimientos (opcional) - Literatura citada. | <ul style="list-style-type: none"> - Introducción: Objeto de estudio, justificación y propósitos. - Metodología - Resultados y Hallazgos - Conclusiones y/o aproximaciones - Agradecimientos (opcional) - Literatura citada. |

- b) **Nota Técnica:** Son textos cortos que describen técnicas experimentales, equipos, fenómenos naturales, especies nuevas, resultados parciales o detalle de un trabajo que pueden tener algún interés en sí, aún desligados del conjunto de trabajo que se está realizando. Se usa también para adelantar información sobre resultados obtenidos u observaciones efectuadas, acerca de las cuales se informara después detalladamente en artículos, boletines o

informes técnicos; también se aceptan reseñas de libros recientemente publicados. El mismo no deberá exceder de 12 páginas.

- c) **Revisiones Bibliográficas:** son artículos acerca de temas que por los avances científicos, tecnológicos o metodológicos logrados en los mismos, requieren de una visión más completa, con el fin de facilitar la comprensión de los alcances de dichos adelantos. La información debe ser tratada en forma de disertación, análisis analítico o descriptivo, confrontación o comparación. Estos serán solicitados a especialistas de reconocida trayectoria profesional que hayan realizado aportes en los temas requeridos. El texto se presentará de forma libre y no deberá exceder de 8 páginas.
- d) **Trabajos Especiales:** son trabajos de un área temática actualizada, de orden científico o técnico, así como de eventos científicos de relevancia nacional e internacional, donde entra a discusión temas de aspecto social, académico, científico, de interés de la sociedad. Los temas serán solicitados a especialistas de reconocida trayectoria profesional y que hayan realizado aportes importantes en los temas sugeridos. El texto se presentará de forma libre y no deberá exceder de 8 páginas.

Para publicar trabajos en las revistas científicas del INIA, los usuarios deben cumplir con los siguientes aspectos:

- a) **Idioma:** Los trabajos pueden escribirse en español, inglés o portugués.
- b) **Formato:** Deben ser escritos utilizando preferiblemente los procesadores de palabras *Open Office Writer*® o en su defecto *Microsoft Office Word*® en cualquiera de sus versiones recientes, fuente Arial tamaño 12 a doble espacio para el texto; para las tablas y referencias Arial tamaño 11.
- c) **Título:** El título será en el idioma correspondiente, con su respectiva traducción en el resumen. Se escribe en letras mayúsculas y minúsculas, debe ser claro y conciso. No debe exceder de

- 20 palabras. Debe identificar y describir concretamente el contenido del trabajo, sin abreviaturas. Sólo deben incluirse los nombres comunes de plantas, insectos u otras especies cuando se requiere, dejando como palabra clave el nombre científico de los mismos. No debe exceder de dos líneas sin puntos, exceptuando cuando exista alguna subdivisión del mismo.
- d) **Autor (es) y Afiliación:** Primer nombre completo, inicial del segundo y apellidos completos. Después de los nombres se usarán números en subíndices para identificar la información del autor o autores tal como: cargo, institución, correo electrónico, dirección postal donde trabajan. Debe usar el nombre completo de la institución con la abreviatura o siglas entre paréntesis. Igualmente, identificar con un asterisco al autor (es) que fungirá como autor de correspondencia. De manera opcional podrá indicarse alguna aclaratoria sobre la fuente de financiamiento de la investigación y proyecto al cual pertenece.
- e) **Resumen, Abstract o Resumem:** Cada trabajo debe tener un resumen de un párrafo no mayor de 250 palabras, que sea claro y comprensible, en los idiomas correspondientes. Para el caso de estudios con enfoque cuantitativo, se debe indicar de manera sucinta: objetivo (s), el problema, los métodos experimentales, resultados y conclusiones, sin sobrecargarlos con valores numéricos; para estudios con enfoque cualitativo se deben indicar: el propósito, objeto de estudio, la metodología, resultados y aproximaciones. Las referencias a cuadros, figuras y las abreviaturas no definidas, no son aceptables. Los entes biológicos y los suelos deben ser identificados por sus nombres científicos cuando son mencionados por primera vez en el resumen y la primera vez que aparezcan en el cuerpo del trabajo, sin repetirse en el cuerpo del artículo. El idioma del resumen será como se indica a continuación:
-Trabajo en español: resumen en español e inglés (*Abstract*).
-Trabajo en inglés: resumen en inglés (*Abstract*) y español (Resumen).
- Trabajo en portugués: resumen en portugués (Resumem) y español (Resumen).
- f) **Palabras clave:** Son aquellas que permiten identificar el tópico que se discute en el texto, tratando de no repetir las que se usen en el título. Debe incluir los nombres científicos de los entes biológicos. Las palabras clave deben permitir localizar el trabajo en los índices y bases de datos agrícolas como el Sistema Agris de la FAO. Máximo seis (6) palabras.
- g) **Introducción:** Su contenido debe expresar además de la importancia del tema a tratar, una breve referencia de los antecedentes que motivaron a la realización del trabajo; puede incluirse la revisión de literatura con las investigaciones más recientes que aporten ideas fundamentales para la realización del trabajo. Para estudios de tipo cuantitativo debe presentar claramente el problema, justificación y los objetivos, un objetivo general y máximo tres objetivos específicos. En el enfoque cualitativo, debe presentar el objeto de estudio, justificación y propósitos. Las referencias en la introducción deben ser limitadas.
- h) **Materiales y Métodos** (Enfoque cuantitativo) **o Metodología** (Enfoque cualitativo): Deben ser lo suficientemente claros y precisos para que otra persona especialista en la materia pueda repetir el experimento o metodología. Para estudios con enfoque cuantitativo, debe ser clara y concreta, siguiendo un ordenamiento lógico de las técnicas empleadas en la investigación y los materiales utilizados. Los procedimientos analíticos y estadísticos usados deberán ser descritos claramente o citados como referencias bibliográficas. En investigaciones de campo deberán incluir además una breve descripción agroclimática de la localidad donde se efectuó el trabajo. Cuando las investigaciones se realicen bajo el paradigma cualitativo, se indica el marco o contexto teórico que describe brevemente conceptos, modelos o enfoques que orientan la investigación y los referentes teóricos relacionados con los discursos de los actores sociales y se indica la naturaleza y tipo de la investigación, los informantes

clave, métodos, técnicas y procedimientos de acopio de la información y las técnicas de interpretación de la información y categorización.

- i) **Resultados y Discusión** (Enfoque cuantitativo) o **Resultados y Hallazgos** (Enfoque cualitativo): Esta sección debe satisfacer los objetivos que señalaron en la introducción, manejando la información cuantitativa a través de cuadros y figuras a fin de transmitir en forma clara la interpretación de los resultados obtenidos. La discusión de los datos deberá hacerse basada en los soportes disponibles en la literatura citada del trabajo. En el enfoque cuantitativo, es necesario el uso de la estadística para verificar la validez de los resultados, cuando así se requiera. En el enfoque cualitativo, se presentan de modo organizado y coherente los resultados de la investigación a partir del procedimiento de triangulación.
- j) **Cuadros:** Cada cuadro se presentará en archivo separado del texto, haciendo alusión a él por primera vez y seguirán la paginación del texto. El contenido de los cuadros no debe ser duplicado en las figuras. En general, las variables están en filas y los tratamientos en columnas. Sólo la primera letra de la primera palabra en mayúsculas. Todos los cuadros deben ser citados consecutivamente en el texto. El encabezado de columnas debe ser conciso e indicar claramente las unidades que utilizan abreviaturas estándar. Los asteriscos se usarán para mostrar el nivel de significancia estadística de 0,05 (*), 0,01 (**) y 0,001 (***) y deben ir acompañados del nombre de la prueba estadística realizada. Para otras llamadas deberán utilizarse otros símbolos. El título del cuadro debe ser concreto y expresar el contenido del mismo. Notas al pie deben utilizarse con moderación y ser concretas. Los cuadros deben ser elaborados utilizando la tabla del programa *Microsoft Office Word®* o *Microsoft Office Excel®* y no deben ser escaneados.
- k) **Figuras:** Se entiende por figura cualquier ilustración que se incluya en el trabajo como: gráficos, dibujos, fotografías, esquemas, dibujos o mapas u otra representación. Estas no deben ser una duplicación de la información de los cuadros. Todas las figuras deben ser citadas consecutivamente en el texto. El título debe colocarse en la parte inferior de la figura. Para las fotografías y otros dibujos digitalizados, los mismos deberán procesarse en formato JPG o TIFF. En cuanto a los gráficos (líneas, barras, circular, entre otros) se recomienda que sean modificables, adjuntando la información con la cual se elabora la figura, de tal manera que cuando se requiere pueda ser mejorada en la diagramación de la revista.
- l) **Conclusiones** (Estudios cuantitativos) **y/o Aproximaciones** (Estudios cualitativos). Deben ser concisas y concretas, basadas en los objetivos del trabajo. En el enfoque cualitativo, las aproximaciones no se limitan a exponer resultados aislados de la investigación como tal, sino que también ilustra el proceso por medio del cual se llegó a las estructuras particulares de los objetos de estudios y a la estructura general o estructuras generales, que los integran
- m) **Agradecimientos** (opcional): Se utilizarán para reconocer a aquellas personas que han hecho contribuciones sustanciales al trabajo o han prestado asistencia técnica. Igualmente para reconocer a las instituciones que han brindado apoyo financiero a la investigación. El párrafo de esta sección debe ser breve, máximo 10 líneas.
- n) **Literatura citada:** Es responsabilidad del autor asegurarse de que todas las referencias sean correctas. Estas deben ser relevantes para el contenido y todos deben estar citados en el texto. Los elementos que componen la cita bibliográfica son básicamente los siguientes: Autor(es)/Año de publicación/ Título:/subtítulo/(Tipo de medio)/Edición/ Ciudad y país de publicación/Casa editora / Fecha en que se consultó el material para los documentos en línea/ Descripción física/ Disponibilidad y acceso para los documentos en línea/(Nota de serie).
- o) Se debe presentar en orden alfabético. En caso de un mismo autor en años diferentes, se ordenará de acuerdo al año y en caso de ser igual, según la primera letra del título del trabajo. Se deberá colocar todos los autores integrantes del trabajo citado. Los trabajos

que no han sido publicados no deben referirse en la bibliografía, sino en el texto, colocando inmediatamente después del apellido y entre paréntesis el tipo de fuente donde provino la información (comunicación personal, datos inéditos) y el año en el cual se efectuó la consulta, separado por una coma. Si en el texto, dado el ordenamiento de la frase, se cita el apellido del autor, inmediatamente deberá ser colocado el año correspondiente entre paréntesis. En caso de dos autores se deberán colocar los dos apellidos, separados por una y para el caso de tres o más autores, bastará citar el apellido del primero, seguido de la abreviatura latina *et al.* y el año correspondiente entre paréntesis.

- p) Las referencias deberán contener todos los elementos que permitan su fácil localización, cuya variación está regulada por el tipo de publicación citada. Se seguirán las Normas Técnicas del IICA y CATIE y los ejemplos que se dan a continuación:

- *Revista (ya publicada)*

Sanabria D., J. G. Fariñas, U. Manrique, Z. Flores e Y. Reina. 1995. Adaptabilidad de gramíneas y leguminosas forrajeras en un paisaje de Mesa del estado Bolívar. *Zootecnia Trop.*, 13(1):63-76.

- *Revista (aceptado, pero no publicado)*

Carrillo, V., M. Rodríguez, U. Manrique, D. Vásquez, E. Rivas y J. Fariñas. 2000. Efecto de la fertilización nitrogenada, edad y época de corte sobre el valor nutritivo del pasto *Andropogon gayanus*. *Zootecnia Trop.* (En prensa).

- *Suplemento de revista*

Leng R. A. 1993. Overcoming low productivity of ruminants in tropical developing countries. *J. Anim. Sci.*, 71(Suppl. 1):284. (Abstracts).

- *Libros*

Maynard L. A., J. K. Loosli, H. F. Hintz y R. G. Warner. 1989. *Nutrición animal*. Ed. McGraw-Hill, S. A., México. 7ma Ed.

- *Capítulos de libros*

Toledo J.M. y R. Schultze-Kraft. 1985. Metodología para la Evaluación Agronómica

de Pastos Tropicales. *En: Toledo J.M. (Ed.). Manual para la Evaluación Agronómica*. R.I.E.P.T. CIAT, Cali, Colombia, pp. 91-110.

- *Congresos, Simposia, Reuniones y/o Memorias*

Bracho M., O. Abreu F. y A. Del Villar. 1992. Influencia del peso al parto sobre la producción de leche en vacas doble propósito. I Jornadas Técnicas FONAIAP, Maracaibo, Venezuela. 612 p. (Resúmenes).

Espinoza F., Y. Díaz, P. Argenti, E. Perdomo y L. León. 1998. Estudios preliminares del género *Pachyrhizus* DC. En Venezuela. *En: Sørensen M., J. Estrella, O. Hamann y S. A. Ríos (Eds.). Proceedings of 2nd International Symposium on Tuberous Legumes*. Celaya, Guanajuato, México, pp. 139-154.

- *Tesis y Trabajos de Ascenso*

Noguera E. 1985. Evaluación del comportamiento productivo y reproductivo mediante análisis de registros del rebaño de una estación experimental dedicada a la producción de leche. Tesis de M.Sc. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, Maracay, Venezuela. 93 p.

García A. 1991. Evaluación del comportamiento productivo y reproductivo del rebaño de vacas inscritas en el ROPL en el período 1986 1990. Trabajo de Ascenso. Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Maracaibo, Venezuela. 33 p.

- *Revistas y otras fuentes electrónicas:*

Los documentos electrónicos se tratan como una variante de la publicación impresa tradicional. En forma electrónica se encuentran actualmente monografías, publicaciones periódicas, mensajes, conferencias, reuniones, bases de datos, programas de computadora u otros. Por tanto se seguirán las normas establecidas para cada uno de ellos y además se incluirán otros elementos que permitan identificar el medio en que están disponibles: en línea, disco compacto, disquetes, mensajes electrónicos, cintas magnéticas. La fuente de información para el documento electrónico es el documento mismo. Si éste

carece de información, puede ser tomada del recipiente (caja, sobre, otro), sitio web, o material impreso complementario.

Venezian, E. y E. Muchnik. 1994. Structural adjustments and agricultural research in Chile. ISNAR Briefing paper N° 9. Disponible en línea: <http://www.cgiar.org/isnar> [Fecha de consulta].

- *Publicaciones Misceláneas*

Argenti P. y F. Espinoza. 1993. *Leucaena* (*Leucaena leucocephala*). Pub. FONAIAP (Serie B), Maracay, Venezuela. 20 p.

Para publicar los artículos en las revistas científicas se debe cumplir con las siguientes convenciones tipográficas y estilo:

- a) Título del trabajo en negrilla con la primera letra en mayúscula. Nombres de los autores en minúsculas con mayúsculas las iniciales y sus procedencia en cursiva.
 - b) Los títulos principales de sección (Resumen, Introducción, Materiales y Métodos o Metodología, Resultados, Discusión, Agradecimientos y Literatura Citada se indican en negrita y colocado en el margen izquierdo. Interlineado en 1.5 y primera letra en mayúscula.
 - c) Los subtítulos en cursiva y sólo la letra inicial en mayúscula. Las dos clases son: (i) cursiva secundarios un puntuado, partidas hombro; (ii) cursiva, texto y puntuado run-on (títulos secundarios).
 - d) La secuencia es siempre (i) a (ii).
 - e) Los Cuadros y Figuras se escriben con las letras C y F en mayúscula.
- f) Abreviaturas: cuando las abreviaturas se definen en el texto, deben ser escritas en mayúscula y negrilla en la primera aparición.
 - g) Los entes biológicos deben ser identificados por sus nombres científicos completos (binomial) en el título así como en el resumen, abstract o resumem y la primera vez que se mencionan en el cuerpo de trabajo.
 - h) Los nombres de productos comerciales deben evitarse, prefiriéndose el nombre genérico. Cuando ello sea posible utilice seguido del símbolo®.
 - i) Los nombres de las variedades, cultivares e híbridos deberán acompañarse de virgulillas o comillas simples sólo cuando se mencionen por primera vez en el resumen, en el abstract o resumem y en el cuerpo del artículo.
 - j) Los suelos deben ser identificados taxonómicamente; si el nombre de la serie no es muy conocido deberá señalarse la familia.
 - k) Los símbolos no tienen plural ni llevan punto (.) después de ellos, y sólo se escriben en mayúsculas aquellos derivados de nombre propios Celsius, Kelvin, Joule.
 - l) Los decimales deben separarse con coma (,) y no con punto (.). Las unidades de mil o millón se indicarán con un espacio en blanco.
 - m) La abreviatura correspondiente a Agronomía Tropical es Agronomía Trop. y de Zootecnia Tropical es Zootecnia Trop.
 - n) Los símbolos a usar son:

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

| | | | |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------------|---------------------|
| Ácido Graso Volátil | AGV | Índice de Conversión | IC |
| <i>Ad libitum</i> | Ad lib. | Kilocalorías | Kcal |
| Aminoácido | aa | Kilogramo | Kg |
| Bar | bar | Kilogramo/Hectárea | Kg ha ⁻¹ |
| Bloques Multinutricionales | BM | Kilometro | Km |
| Centímetro | cm | Litro | l |
| Consumo de Materia Seca | CMS | Materia Orgánica | MO |
| Coeficientes de Variación | CV | Materia Seca | MS |
| Coeficiente de Correlación | r | Metro | m |
| Coeficiente de Determinación | R ² | Metro Cuadrado | m ² |
| Decímetro | dm | Metro Cúbico | m ³ |
| Desviación Estándar | DE | Metros Sobre el Nivel del Mar | m.s.n.m. |
| Diferencia Predicha | DP | Micra | μ |
| Digestibilidad <i>in vivo</i> | DIV | Micromilímetro | microm |
| Digestibilidad <i>in vitro</i> | DIV | Miliequivalentes | Meq por 100g |
| Energía Digestible | ED | Miligramo | mg |
| Energía Metabolizable | EM | Mililitros | ml |
| Error Estándar | EE | Mililitros por Litros | ml/l |
| Extracto Libre de Nitrógeno | ELN | Milímetro | mm |
| Fibra Ácido Detergente | FAD | Minuto | min |
| Fibra de Detergente Neutra | FDN | Número de la Población | N |
| Ganancia Diaria de Peso | GDP | Nitrógeno No Proteico | NNO |
| Grado Absoluto | °abs | Partes por Millón | ppm |
| Grados Centígrados | °C | Peso al Nacer | PN |
| Grados Fahrenheit | °F | Peso al Destete | PD |
| Grados de Libertad | gl | Porcentaje | % |
| Grado Kelvin | °K | Por Mil | ‰ |
| Gramo | g | Probabilidad | P |
| Gramo por Kilogramo | g kg ⁻¹ | Proteína Cruda | PC |
| Gramos por Litros | g/l - g.l | Segundo | s |
| Gramo Joule | J | Tonelada | t |
| Hectárea (s) | ha | Tonelada/Hectárea | t ha ⁻¹ |
| Heredabilidad | h ² | Tonelada Métrica | Tm |

Zoo|ecnia
ropical

ecnia
ropical

Zoo|ecnia
ropical

ecnia
ropical

Zoo|ecnia
ropical

Zoo|ecnia
ropical

Zoo|ecnia
ropical

Zoo|ecnia
ropical

Zoo|ecnia
ropical

Zoo|ecnia
ropical