

PANEL REDUCIDO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE PARA ESTUDIOS DE BIODIVERSIDAD EN BOVINOS¹

Axel Villalobos-Cortés²; Rita González³; Manuel Murillo⁴; Hilda Castillo⁵

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar un panel reducido de 200 marcadores de polimorfismo de nucleótido simple recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal y el Comité Internacional de Registro de Animales, mediante secuenciación de siguiente generación. Se utilizaron parámetros como número de *loci* utilizables, polimorfismo de *loci*, heterocigosis observada (Hob) y esperada (He), diversidad molecular media por *loci* (DML), distancia entre poblaciones, índice de fijación que estima el coeficiente de endogamia (Fis) y valor de diferenciación genética entre poblaciones (Fst). Del total de *loci* utilizados, se observó un promedio de 186 alelos utilizables; máximo de 187 en la raza Guabalá y un mínimo de 183 en la Brahman. Una media de 174 *loci* polimórficos con un máximo de 184 en genotipos cruzados y un mínimo de 149 en la raza Guabalá. Los valores de Hob, He y DML fueron 0,378, 0,439 y 0,438, respectivamente. El Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) mostró un porcentaje de variación entre poblaciones de 19,25 e índice Fst de 0,19. El porcentaje de variación y Fst entre las razas criollas panameñas y cebuinas fueron de 5,22% y 0,22, respectivamente y el porcentaje de variación entre razas criollas y taurinas fue 1,82 con índice de diferenciación genética Fst de 0,163, respectivamente. Los valores de endogamia (Fis) oscilaron entre 0,00302 (Guaymí) a 0,04333 (Holstein); valores negativos de Fis se observaron en la raza Senepol y Guabalá por lo que se presume un efecto Wahlund. El árbol de distancias circulares mostró un comportamiento similar a los reportados en trabajos realizados con microsatélites al igual que lo observado en el AMOVA y Fst en las poblaciones. Los resultados preliminares apuntan a que los marcadores de polimorfismo de nucleótido simple utilizados tienen potencial para estudios de diversidad genética y se recomienda ampliar el estudio a más razas y números de animales.

Palabras claves: Bioinformática, biotecnología, marcadores moleculares, ganadería.

¹Recepción: 5 de junio de 2020. Aceptación: 23 de julio de 2020. Trabajo realizado en el Proyecto: Conservación y Uso de Bovino Criollo Panameño, con financiamiento del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), al igual que al Sistema Nacional de Investigación (SNI).

²IDIAP. Laboratorio de Análisis y Biología Molecular Aplicada (LABMA), Ciudad del Saber. Ph.D. Conservación y Mejora Animal. e-mail: villalobos.axel@gmail.com

³IDIAP. LABMA, Ciudad del Saber. Lic. en Biotecnología.

⁴Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses (IMELCF), Los Llanos de Curundu. Lic. en Biotecnología Laboratorio Biomolecular.

⁵IDIAP. LABMA, Ciudad del Saber. M.Sc. Fitomejoramiento.



REDUCED PANEL OF SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS FOR BIODIVERSITY STUDIES IN BOVINES

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate a reduced panel of 200 single-nucleotide polymorphisms markers recommended by International Society of Animal Genetics and the International Committee for Animal Recording, using Next Gen Sequencing sequencing. Parameters such as number of usable *loci*, *loci* polymorphism, observed heterozygosity (Hob) and expected (He), average molecular diversity per *loci* (DML), distance between populations, fixation index that estimates the coefficient of inbreeding (Fis) and genetic differentiation value between populations (Fst). Of the total *loci* used, an average of 186 usable alleles were observed: maximum of 187 in the Guabala breed and a minimum of 183 in the Brahman. An average of 174 polymorphic *loci* with a maximum of 184 in crossed genotypes and a minimum of 149 in the Guabala breed. The values of Hob, He and DML were 0,378, 0,439 and 0,438, respectively. The molecular Analysis of Variance (AMOVA) showed a percentage of variation between populations of 19,25 and Fst index of 0,19. The percentage of variation and Fst between the Panamanian Creole and Zebu breeds were 5,22% and 0,22, respectively and the percentage of variation between Creole and Taurine breeds was 1,82% with genetic differentiation value (Fst) of 0,163, respectively. The Fis values ranged from 0,00302 (Guaymi) to 0,04333 (Holstein); negative values of Fis were observed for Senepol and Guabala breeds, so a Wahlund effect is presumed. The tree of circular distances showed a similar behavior to those reported in a previous work carried out with microsatellites, as was observed in the AMOVA and Fst in the populations. Preliminary results suggest that the single nucleotide polymorphism markers used have potential for genetic diversity studies and it is recommended to extend the study to more breeds and numbers of animals.

Key words: Bioinformatics, biotechnology, molecular markers, livestock.

INTRODUCCIÓN

La identificación, registro y monitoreo del movimiento del ganado es una parte esencial de la política agrícola para los gobiernos nacionales. Dichos esquemas apuntan hacia el control de enfermedades, la garantía de higiene, seguridad de los alimentos y facilitan el retiro de un producto si es necesario (Allen et al., 2010). Muchos países del mundo desarrollado han adoptado bases de datos nacionales, mediante etiquetas numeradas, para registrar la identidad y movimiento del ganado (Houston, 2001; Buick, 2004). La globalización ha fortalecido los procesos para mejorar la trazabilidad de los



©2020 Ciencia Agropecuaria es desarrollada en el Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, bajo una licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional. Para más información escribir a cienciaagropecuaria@idiap.gob.pa

animales y los consumidores modernos que se enfrentan a una mayor diversidad de fuentes de alimentos, también pueden enfrentar riesgos elevados como resultado de una mayor probabilidad de contaminación química o patogénica en los alimentos (Caporale et al., 2001; MacKean, 2001).

Los microsátélites o las repeticiones cortas en tándem (SSR o STR por sus acrónimos en inglés para *simple sequence repeat* y *short tandem repeat*) han sido los marcadores genéticos de elección para estudios de biodiversidad durante más de dos décadas. Presentan alto polimorfismo, son informativos y se encuentran intercalados a lo largo del genoma (Baumung et al., 2004; Tian et al., 2008), sin embargo, existen variaciones en los resultados con los STR por diferentes laboratorios y no siempre son comparables debido a las inconsistencias y errores en el cálculo del tamaño de alelo.

Los avances recientes en la secuenciación de ADN de alto rendimiento y la bioinformática ha hecho que sea popular el uso del polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*, pronunciado *snip*) (Heaton et al., 2002).

El polimorfismo de un solo nucleótido o SNP es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base de una secuencia del genoma (Brookes, 1999; Vignal et al., 2002). Se encuentran distribuidos por todo el genoma y pueden localizarse tanto en regiones codificantes como no codificantes (Sachidanandam et al., 2001).

En términos de información, un marcador bialélico podría considerarse como un retroceso, sin embargo, los SNP tienen algunas ventajas donde se incluye una mayor abundancia (Heaton et al., 2005), estabilidad genética en mamíferos (Markovtsova et al., 2000; Nielsen, 2000; Thomson et al., 2000), nomenclatura más sencilla, capacidad para el análisis automatizado y la interpretación de datos (Wang et al., 1998; Lindblad-Toh et al., 2000). En varias especies domésticas, incluido el bovino, están disponibles decenas de miles de marcadores SNP ubicados en todo el ADN (Matukumalli et al., 2009). La disponibilidad de genotipos de estos SNP permite estimar la composición de la raza de animales individuales utilizando datos genómicos (Frkonja et al., 2012; Hulsege et al., 2013). En la práctica la mayoría de los SNP presentan solamente dos variantes, la secuencia original y la versión mutada. Esto se debe a la vía en que estos aparecen y se



distribuyen en una población, aunque no se descarta la posterior aparición de nuevos alelos (Terry, 2008). Para instaurar una metodología práctica y sencilla de análisis de ADN, se necesita un método rápido y confiable para la caracterización genética de una población de animales, distinguiendo a los animales cruzados de las razas puras y para determinar la composición de la raza o proporción de mezcla (Hulsegge et al., 2019). El objetivo de este trabajo fue validar un panel reducido de 200 marcadores SNP recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) y el Comité Internacional de Registro de Animales (ICAR) mediante un panel de secuenciación de siguiente generación (NGS) para realizar estudios de diversidad genética bovina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó el polimorfismo de 200 marcadores SNP recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) y Comité Internacional de Registro de Animales (ICAR), mediante secuenciación de siguiente generación NGS (ISAG, 2013; Strucken et al., 2013). Se tomaron muestras aleatorias de 73 animales de diversos genotipos puros, (Brahman; Holstein; Senepol; Guaymí y Guabalá) y europeo x cebú, EXC e Indefinidos, SRD. Se tomaron muestras de sangre en finca de productores colaboradores y en fincas ganaderas del IDIAP utilizando tubos con anticoagulante EDTA de 5 ml. La extracción de ADN se llevó a cabo mediante mini columnas por centrifugación utilizando un kit comercial; el rendimiento de ADN obtenido fue de 50 ng, medido a través de un cuantificador fluorométrico. La preparación de librerías se realizó siguiendo el flujo de trabajo para kit de parentesco bovino. Una vez amplificadas y normalizadas las librerías, se verificó la calidad mediante un analizador de fragmentos, observándose un tamaño entre 200 y 300 bp. Luego se procedió a secuenciar, utilizando la metodología de amplificación en puente y secuenciación por síntesis. Los datos fueron exportados al programa análisis de secuenciación de genotipos para su procesamiento y posterior análisis. Se calculó las frecuencia alélica y genotípica global y de cada población. Para evaluar la variabilidad genética dentro de cada genotipo, se calcularon los siguientes parámetros: número de *loci* utilizables (NLU), polimorfismo de *loci* empleados (PLE), heterocigosis observada (Hob) y esperada (He), diversidad molecular media por *loci* (DML), índice de fijación que estima el coeficiente de endogamia (Fis) entre individuos de una población, utilizando el programa Genetix v. 4.02 y Genalex 6.5 (Belkhir et al., 2004; Peakall y Smouse, 2012). Se practicó un análisis factorial de correspondencias (AFC), mediante el programa Genetix v. 4.02



(Belkhir et al., 2004). Para estimar el valor de diferenciación genética entre las poblaciones o F_{st} se practicó un análisis de varianza molecular (AMOVA mediante el paquete Arlequin 3.01 (Excoffier, et al., 1992; Weir, 1996; Excoffier et al., 2005) y la distancia entre poblaciones mediante la estimación de árboles de distancias circulares (Bryant and Moulton, 2004; Huson and Bryant, 2006).

Se utilizó la versión 2.2.3 del programa Structure (Pritchard et al., 2000), para identificar la estructura de las K poblaciones utilizadas y, al mismo tiempo, calcular las proporciones de mezcla. Se evaluó la estructura de cada población utilizando todo el conjunto de las muestras ($n = 73$), y suponiendo que estos pertenecen a un número desconocido de K grupos de individuos genéticamente distintos. Este programa consiste en un modelo de convergencia bayesiano fundamentado en el método de Monte Carlo Cadena de Markov (MCMC), que utiliza modelos basados en agrupamientos de individuos. Los criterios de agrupación fueron el de reducir al mínimo el equilibrio Hardy-Weinberg y la fase de desequilibrio entre *loci*, dentro de los grupos. Se asignó el valor de probabilidad posterior de K (log likelihood; $\ln L$) desde 2 hasta 7, con un periodo inicial (burn-in period) de 50000 mil iteraciones, sin información previa, y 100000 iteraciones. Sin embargo, un estudio de Evanno et al. (2005) mostró que la longitud del burn-in y MCMC de 10000 cada uno era suficiente para el análisis, y un mayor burn-in o MCMC no cambia significativamente los resultados. Sin embargo, se realizaron tres simulaciones independientes para K de 2 hasta 7 y, con las matrices obtenidas, se obtuvo el alineamiento óptimo de cada una de las tres réplicas mediante el programa CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg, 2007). Se identificó la K más probable a través de la determinación de la distribución modal de ΔK (Evanno et al., 2005). También fue estimada la proporción de membresía individual (q) en las poblaciones pre-definidas de cada grupo. Se obtuvo una representación gráfica de los coeficientes de pertenencia individuales, en cada población ancestral con la mayor probabilidad posterior de los datos en cada valor de K . El análisis también permitió la estimación de individuos puros ($Q \geq 0,80$) de los grupos formados, así como el de individuos mezclados ($Q < 0,80$), entre los diferentes K (Li et al., 2005). El programa DISTRUCT® (Rosenberg, 2004) también fue empleado en la representación gráfica de la estructura de la población, por tener una mayor variedad de colores disponibles.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de 200 *loci* utilizados, se observó una media de 186 NLU; un máximo de 187 en la raza Guabalá y un mínimo de 183 en la Brahman. Se obtuvo una media de 171,6 *loci* polimórficos con un máximo de 184 en genotipos cruzados y un mínimo de 149 en la raza Guabalá (Cuadro 1).

Cuadro 1. Valores de Loci y de genotipos de razas Brahman, Holstein, Senepol, Guaymí y Guabalá, mediante el uso de 200 marcadores del polimorfismo de un solo nucleótido.

	BRAH	HO	SEN	GUY	GUA	Media	DE
NL	200	200	200	200	200	200	
NLU	183	186	186	186	187	185,6	1,6
PLE	167	183	181	178	149	171,6	14,0

BRAH – Brahman; HO - Holstein; SEN - Senepol; GUY – Guaymí; GUA – Guabalá; DE – Desviación Estándar; NL - Número de *loci*; NLU - Número de *loci* utilizables; PLE - polimorfismo de *loci* empleados.

Los valores de heterocigosis observada (Hob) y esperada (He), diversidad molecular media por *loci* (DML) fueron 0,378; 0,439 y 0,438, respectivamente. Los valores altos de heterocigosis observada fueron observados en la raza Senepol con 0,462 y los bajos en la raza Brahman con 0,349, los valores de heterocigosis esperada fueron altos en Holstein con 0,471 y los bajos en Brahman con 0,361. Estos valores son mayores a los encontrados por Gautier et al. (2007) en razas europeas y africanas, quienes reportan valores de heterocigosis esperada entre 0,188 en la raza Lagune y 0,279 en la Borgou. La raza Criolla Coreña de Nayarit mostró valores similares a los reportados en este estudio, con respecto a la heterocigosis esperada y la observada con 0,326 y 0,322, respectivamente (Martínez, 2015). Resultados menores encontraron Makina et al. (2014) estudiando seis razas en el sur África observando valores de heterocigosis esperada que oscilaron entre 0,24 y 0,30. Además, los valores de heterocigosis esperada (0,31) en Holstein reportados por estos autores heterocigosis esperada (0,31) en Holstein fueron menores a los obtenidos en este trabajo (0,47).

Los valores bajos de diversidad genética en la Guabalá pueden ser atribuido a la baja población y pocos sementales disponibles, ya que la raza está amenazada con extinguirse, a diferencia del Brahman que puede ser atribuido a la presión de selección a la que son



sometidos estas poblaciones, muchas veces importados de fincas con una base genética estrecha por el uso de el mismo semental o sementales.

En cuanto a diversidad molecular media por *loci* (DML) los valores altos se encontraron en Holstein con 0,464 y bajos en Guabalá con 0,304. Los valores de Fis oscilaron entre 0,003 (Guaymí) y 0,043 (Holstein); valores negativos de Fis se observaron en la raza Senepol y Guabalá, lo que presume que existe un efecto Wahlund (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores de diversidad dentro de población de Brahman, Holstein, Senepol, Guaymí y Guabalá, mediante el uso de 200 marcadores del polimorfismo de un solo nucleótido.

Genotipo	Hob	He	DML	Fis
BRAH	0,349	0,361	0,329	0,029
HO	0,454	0,471	0,464	0,043
SEN	0,462	0,453	0,440	-0,022
GUY	0,409	0,410	0,392	0,003
GUA	0,393	0,381	0,304	-0,034

BRAH – Brahman; HO - Holstein; SEN - Senepol; GUY – Guaymí; GUA – Guabalá.

Hob - Heterocigosis observada; He - Heterocigosis esperada; DML - diversidad molecular media por loci; Fis –índice de fijación.

El análisis factorial de correspondencias logró discriminar las proporciones de varianza los cinco agrupamientos que corresponden a los cinco genotipos genéticamente homogéneos Brahman, Holstein, Senepol, Guaymí y Guabalá. El eje 1 logró explicar el 51,11%, el eje 2 el 25,99% y el eje 3 explicó el 14,53% de la varianza total (Figura 1).

El análisis de varianza molecular ilustra que la variación dentro de individuos representó el 80,75% para todos los genotipos y un porcentaje de variación entre poblaciones de 19%. Estos valores son similares a los reportados por Edea et al. (2013) en un estudio realizado con razas de Ethiopia y Korea, quienes reportan una variación genética dentro de individuos de 81,51%. El porcentaje de variación entre las razas criollas panameñas y Brahman fue de 5,22% con un índice de diferenciación genética de 0,22. El porcentaje de variación entre las razas criollas y las *Bos taurus* fue de 1,82% con índice de diferenciación genética de 0,163. Las diferencias en el porcentaje de variación de razas



Criollas y *Bos taurus* y Criollas vs Brahman son similares a las reportadas por diversos autores utilizando marcadores microsatélites y SNP (Delgado et al., 2011; Edea et al., 2013). La diferenciación genética entre razas Criollas y *Bos taurus* fueron similares a los observados entre razas locales africanas con europeas como la Afrikaner y Holstein (0,15) y las razas Nguni y Angus (0,11); sin embargo, al igual que el presente trabajo se observó gran variabilidad entre las diversas razas que oscilan entre 0,04 y 0,15 (Makina et al., 2014).

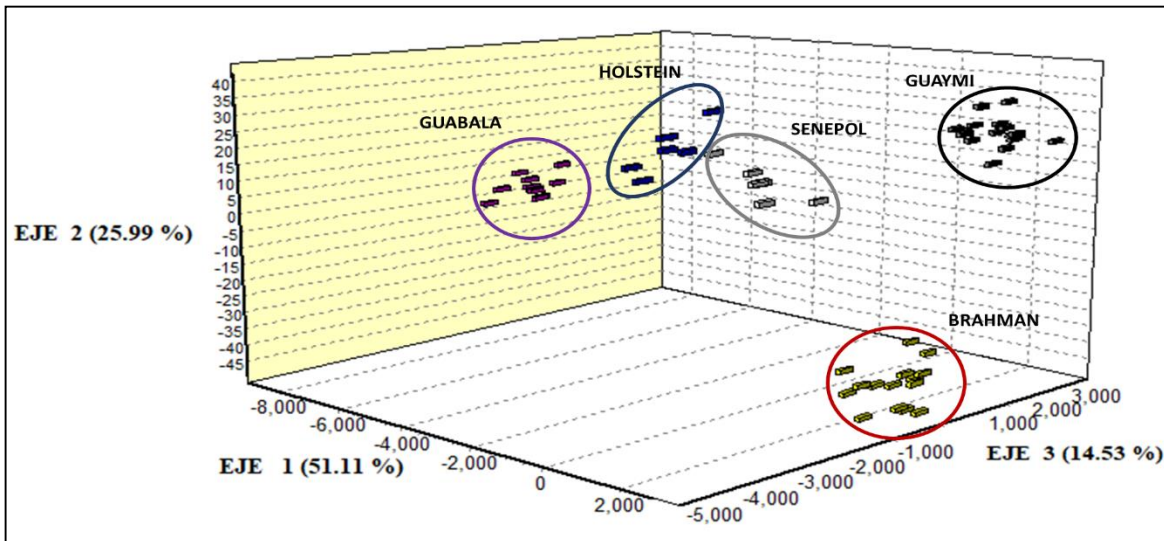


Figura 1. Análisis factorial de correspondencias de cinco genotipos genéticamente homogéneos en Panamá mediante 200 SNP.

Se muestra el árbol tipo *split graph* (Figura 2) donde cada población es tratada como unidad taxonómica, resultado similar al encontrado en los análisis de microsatélites de las relaciones entre estas poblaciones; explica las diferencias entre Guaymí y Guabalá como poblaciones genéticamente homogéneas y su relación con los otros genotipos dentro de análisis (Delgado et al., 2011; Martínez et al., 2012). Igualmente, los resultados mostrados en el análisis AFC, AMOVA y F_{st} , apoyan que los SNP son útiles en el análisis de poblaciones donde se desean establecer diferencias o determinar grupos genéticos uniformes. Sin embargo, en razas con proporciones de mezcla tanto para microsatélites y los SNP, aplican otros modelos de análisis como el tipo bayesiano (Pritchard et al., 2000).



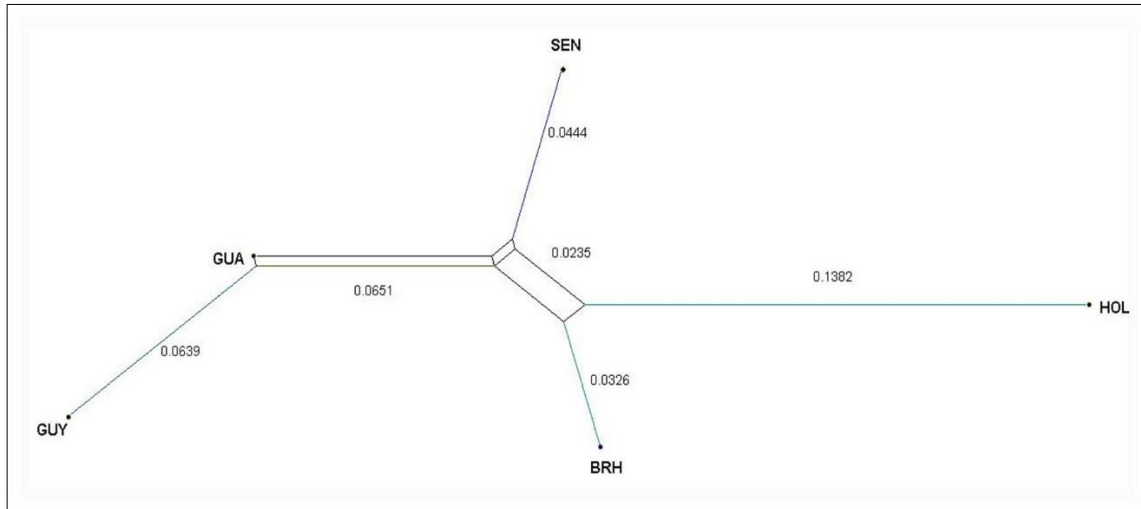


Figura 2. Árbol de distancias circulares con el método de NeighborNet de diversas poblaciones en Panamá de cinco razas en Panamá mediante 200 SNP.

Se muestran los valores q de cada genotipo en los distintos valores de K , desde $K=2$ hasta $K=7$ (Figura 3). Cuando $K=2$, se muestran los valores de q representados mediante un sistema de colores separando los grupos genéticos, *Bos taurus* (naranja) y *Bos indicus* (azul) y se aprecia la proporción de mezcla entre el componente cebú con las poblaciones Senepol, europeos x cebú e indefinidos. Cuando $K=3$ se observa la partición de colores, de los genotipos Brahman (azul), Guabalá (verde) y Guaymí (naranja). Cuando $K=4$ y $K=5$ se observan las particiones de las poblaciones Holstein (rojo) y Senepol (morado) y se mantiene esta estructura hasta $K=7$. Dentro de estas particiones se observa que dentro el grupo asignado como Senepol, este no se encuentra en el clúster correspondiente, sino que se ubica dentro de la raza Holstein, por lo que probablemente se ha asignado erróneamente durante su registro al momento del muestreo.

Al incrementar el valor de K desde $K=6$ hasta $K=7$ se observa la aparición de una partición de colores celeste y rosado dentro de los genotipos EXC (europeos x cebú) y SRD (indefinidos), lo que se puede interpretar, que son genotipos distintos y no identificados dentro de las poblaciones puras presentes en este trabajo. Existe la probabilidad que, al incrementar los datos con nuevos genotipos se pueda identificar a cuál raza o genotipo está relacionado. Estos resultados son similares a los obtenidos en los análisis con microsatélites por Delgado et al. (2011) quienes trabajaron con 26 razas bovinas de



América Latina y Martínez et al. (2012) con 86 razas de Iberoamérica y que ha permitido la identificación de nuevas poblaciones de animales domésticos no solo de bovinos como el presente trabajo, sino de otras especies domésticas como cabras y ovejas, entre otras especies (Manunza et al., 2016; El Motchou et al., 2018).

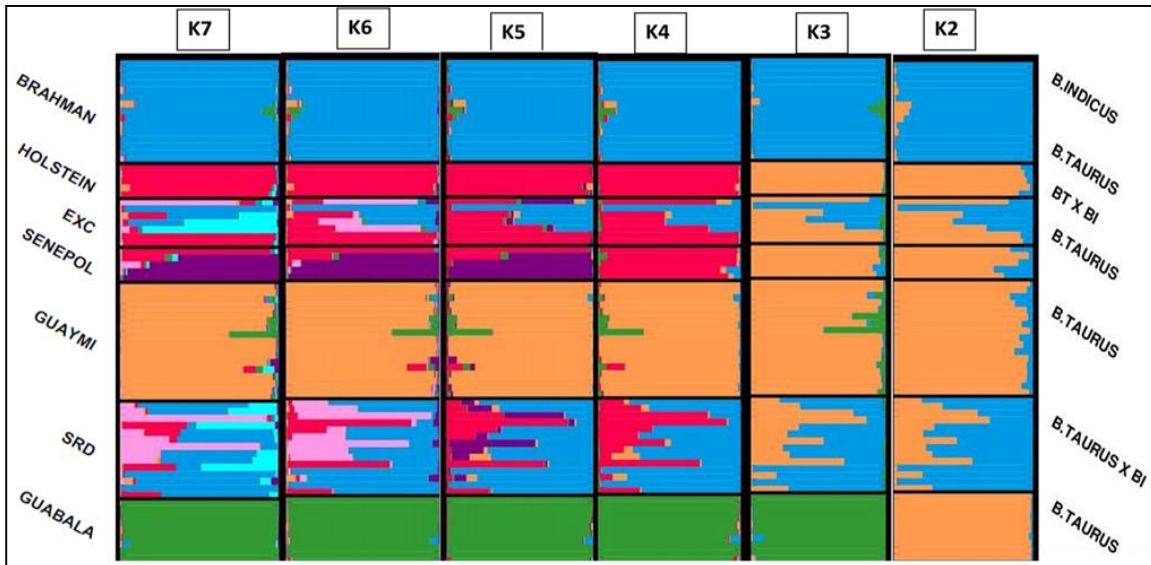


Figura 3. Proporción de mezclas sobre siete poblaciones cuando K=2 hasta K=7.

Se presenta la matriz de proporción de mezcla (Q) para todas las poblaciones evaluadas donde K=6 (Cuadro 3). Se observa que las poblaciones que mostraron poblaciones genéticamente homogéneas en el K=6 ($Q > 0,90$) fueron la Brahman, Holstein, Guaymí y Guabalá. La Senepol mostró una menor proporción de homogeneidad $Q = 0,70$, sin embargo, cuando se evalúa a nivel individual se encontró que uno de los animales asignado como Senepol, realmente se agrupó con el clúster de Holstein con $q = 0,9570$ y un segundo animal presentó una proporción de mezcla de $q = 0,6570$ para el clúster de Senepol y $q = 0,2880$ para el clúster de Holstein. El resto de los ejemplares de Senepol tuvieron valores que oscilaron entre $q = 0,9000$ y $q = 0,9840$, considerados como representantes puros de la raza.



Cuadro 3. Matriz de proporción de mezcla Q, para K=6.

	1	2	3	4	5	6
BRAH	0,006	0,962	0,011	0,006	0,005	0,010
HO	0,011	0,003	0,006	0,006	0,959	0,015
EXC	0,026	0,290	0,013	0,219	0,436	0,016
SEN	0,702	0,006	0,013	0,016	0,256	0,006
GUAY	0,012	0,007	0,034	0,007	0,012	0,928
SRD	0,021	0,538	0,004	0,264	0,160	0,012
GUAB	0,005	0,008	0,974	0,004	0,004	0,005

BRAH – Brahman; HO - Holstein; SEN - Senepol; GUY – Guaymí; GUA – Guabalá-; EXC- europeos x cebú; SRD- indefinidos.

La capacidad de establecer la proporción de mezcla entre razas es de gran utilidad como herramienta para identificar y caracterizar nuevas poblaciones, al igual que en el control de filiación, casos de hurto pecuario y en los últimos años como herramienta para la identificación de productos comerciales protegidos con garantías de certificación de origen, lo que representa una ventaja sobresaliente y un avance científico importante como una estrategia de identificar individuos dentro de programas de trazabilidad genética. Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados por Gorbach et al. (2010), sin embargo, el número de marcadores utilizados fueron mucho mayores a los empleados en este trabajo. Por el contrario, los del presente trabajo, fueron mayores a los utilizados por Fresno et al. (2017) en Las Islas Canarias, al validar exitosamente un panel reducido de 150 marcadores SNP para estimar sub-productos autóctonos con denominación de origen, mostrando una alta capacidad de discriminación (>99%) para asignación individual y pruebas de paternidad y una capacidad de asignación racial superior al >80%. Igualmente, Hulsegge et al. (2019) utilizaron un panel reducido de 133 marcadores SNP con la finalidad de evaluar la pureza racial de seis razas locales en Holanda. En todos los casos previamente mencionados la capacidad de discriminación de razas puras y mezcladas fue significativa. Incluso en el presente trabajo se logró determinar valores altos de pureza racial, similares a los observados en otros trabajos, incluyendo la proporción de mezcla de los genotipos empleados en el presente estudio.



CONCLUSIÓN

Los resultados apuntan a que los marcadores SNP tienen potencial para realizar estudios de diversidad genética, estimación de pureza racial y proporción de mezclas de genotipos cruzados, particularmente con la utilización de modelos bayesianos. Se sugiere continuar ampliando el estudio a mayor cantidad de razas y números de animales.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen, A.R., M. Taylor, B. McKeown, A.L. Curry, J.F. Lavery, A. Mitchell, D. Hartshorne, R. Fries, and R.A. Skuce. 2010. Compilation of a panel of informative single nucleotide polymorphisms for bovine identification in the Northern Irish cattle population. *BioMed Central Genetics* 11: e5. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-5> (consultado 20 jul. 2019).
- Baumung, R., H. Simianer, and I. Hoffmann. 2004. Genetic diversity studies in farm animals—a survey. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 121(6): 361-373. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2004.00479.x>
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, and F. Bonhomme. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier. <https://kimura.univ-montp2.fr/genetix/> (consultado 20 jul. 2019).
- Brookes, A.J. 1999. The essence of SNPs. *Gene*, 234(2): 177-186. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00219-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00219-x)
- Bryant, D., and V. Moulton. 2004. Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology Evolution*. 21: 255-265. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh018>
- Buick, W., 2004. Animal Passports and Identification. *Defra Veterinary Journal* 15: 20–26. <http://www.defra.gov.uk/animalh/svj/vol1501/chap4.pdf> (consultado 21 sept. 2018).



- Caporale, V., A. Giovannini, C. Di Francesco, and P. Calistri. 2001. Importance of the traceability of animal products in epidemiology. *Revue Scientifique et Technique*. 20: 372-378. <https://doi.org/10.20506/rst.20.2.1279>
- Delgado, J.V., A.M. Martinez, A. Acosta, L.A. Alvarez, E. Armstrong, E. Camacho, J. Canon, O. Cortes, S. Dunner, V. Landi, J.R. Marques, I. Martín-Burriel, O.R. Martínez, R.D. Martínez, L. Melucci, J.E. Muñoz, M.C. Penedo, A. Postiglioni, J. Quiróz, C. Rodellar, P. Sponenberg, O. Uffo, R. Ulloa-Arvizu, J.L. Vega-Pla, A. Villalobos, D. Zambrano, P. Zaragoza, L.T. Gama, and C. Ginja. 2011. Genetic characterization of Latin-American Creole cattle using microsatellite markers. *Animal Genetics*. 43:2–10 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02207.x>
- Edea, Z., H. Dadi, S.W. Kim, T. Dessie, T. Lee, H. Kim, J.J. Kim, and K.S. Kim. 2013. Genetic diversity, population structure and relationships in indigenous cattle populations of Ethiopia and Korean Hanwoo breeds using SNP markers. *Frontier Genetics*. 4:35. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00035>.
- El Moutchou, N., A. González, M. Chentouf, K. Lairini, M.E. Muñoz-Mejías, and E. Rodero. 2018. Exploring the genetic diversity and relationships between Spanish and Moroccan goats using microsatellite markers. *Small Ruminant Research*, 165, 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.04.003>.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14:2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2005.02553.x>
- Excoffier, L., P.E. Smouse, J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479 - 491. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1205020/pdf/ge1312479.pdf> (consultado 15 mayo 2017).



- Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* 1:47-50.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1, 117693430500100. <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>
- Frkonja, A., B. Gredler, U. Schnyder, I. Curik, and J. Sölkner. 2012. Prediction of breed composition in an admixed cattle population. *Animal Genetics*. 43:696–703. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2012.02345.x>
- Fresno, M.R., V. Landi, A.M. Martínez, M.M. Gómez, J.A. Bouzada, M.E. Camacho, J.Capote, and J.V. Delgado. 2017. Validación de marcadores SNP como herramienta para la identificación de productos en caprinos autóctonos españoles. En: XX Simposio Iberoamericano sobre conservación y utilización de recursos zoogenéticos. Validación de marcadores SNP´s como herramienta para la identificación de productos en caprinos autóctonos españoles. Red Conbiand. Chiquimula, Guatemala. p.16 http://www.uco.es/conbiand/pdf/acta_guatemala2017.pdf [10.1111/j.1365-2052.2012.02345.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2012.02345.x) (consultado 20 ago. 2019).
- Gautier, M., T. Faraut, K. Moazami-Goudarzi, V. Navratil, M. Foglio, C. Grohs, A. Boland, J.G. Garnier, D. Boichard, G.M. Lathrop, I.G. Gut, and A. Eggen, A. 2007. Genetic and haplotypic structure in 14 European and African cattle breeds *Genetics* 177:1059–1070. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.075804>
- Gorbach, D. M., M.L. Makgahlela, J.M. Reecy, S.J. Kemp, I. Baltenweck, R. Ouma, O. Mwai, K. Marshall, B. Murdoch, S. Moore, and M.F. Rothschild. 2010. Use of SNP genotyping to determine pedigree and breed composition of dairy cattle in Kenya. *Journal of animal breeding and genetics = Zeitschrift fur Tierzucht und Zuchtungsbiologie*, 127(5), 348–351. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2010.00864.x>
- Heaton, M.P., G.P. Harhay, G.L. Bennett, R.T. Stone, W.M. Grosse, E. Casas, J.W. Keele, T.P. Smith, C.G. Chitko-McKown, and W.W. Laegreid. 2002. Selection and use of SNP



markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mammalian Genome* 13:272-281. <https://doi.org/10.1007/s00335-001-2146-3>

Heaton, M.P., J.E. Keen, M.L. Clawson, G.P. Harhay, N. Bauer, C. Shultz, B.T. Green, L. Durso, C.G. Chitko-McKown, and W.W. Laegreid. 2005. Use of bovine single nucleotide polymorphism markers to verify sample tracking in beef processing. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226(8): 1311-1314. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.1311>

Houston, R. 2001. A computerised database system for bovine traceability. *Revue Scientifique et Technique*. 20:652-661. <https://doi.org/10.20506/rst.20.2.1293>.

Hulsegge, B., M.P.L. Calus, J.J. Windig, A.H. Hoving-Bolink, M.H.T. Maurice-van Eijndhoven, and S.J. Hiemstra. 2013. Selection of SNP from 50 K and 777 K arrays to predict breed of origin in cattle. *Journal of Animal Science*. 91:5128–5134. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6678>

Hulsegge, I., M. Schoon, J. Windig, M. Neuteboom, S.J. Hiemstra, & A. Schurink. 2019. Development of a genetic tool for determining breed purity of cattle. *Livestock Science*, 223, 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.03.002>

Huson, D.H., and D. Bryant. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology Evolution*. 23:254-267. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>

ISAG (International Society of Animal Genetics). 2013. ISAG cattle core and additional SNP panel. <http://www.isag.us/committees.asp?autotry=true&ULnotkn=true>

Jakobsson, M., and N.A. Rosenberg. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801–1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>



- Li, M.H., K. Sternbauer, P. Haahr, and L. Kantanen. 2005. Genetic components in contemporary Faroe Islands Cattle as revealed by microsatellite analysis. *Journal Animal Breeding and Genetics* 122:309-317. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2005.00534.x>
- Lindblad-Toh, K., E. Winchester, M.J. Daly, D.G. Wang, J.N. Hirschhorn, J.P. Lavolette, K. Ardlie, D.E. Reich, E. Robinson, and P. Sklar. 2000. Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse. *Nature genetics* 24(4): 381-386. <https://doi.org/10.1038/74215>
- Markovtsova, L., P. Marjoram, and S. Tavaré. 2000. The age of a unique event polymorphism. *Genetics* 156(1): 401. <https://www.genetics.org/content/genetics/156/1/401.full.pdf> (consultada 18 mar. 2018).
- McKean, J.D. 2001. The importance of traceability for public health and consumer protection. *Revue Scientifique et Technique*. 20:363-371. <https://doi.org/10.20506/rst.20.2.1280>
- Makina, S.O., F.C. Muchadeyi, E. van Marle-Köster, M.D. MacNeil, and A. Maiwashe. 2014. Genetic diversity and population structure among six cattle breeds in South Africa using a whole genome SNP panel. *Frontiers in Genetics*, 5: 333. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00333>
- Manunza, A., T. Cardoso, A. Noce, A. Martínez, A. Pons, L.A. Bermejo, V. Landi, A. Sánchez, J. Jordana, J.V. Delgado, S. Adán, J. Capote, O. Vidal, E. Ugarte, J.J. Arranz, J.H. Calvo, J. Casellas, and M. Amills. 2016. Population structure of eleven Spanish ovine breeds and detection of selective sweeps with BayeScan and hapFLK. *Scientific Report* 6, 27296 <https://doi.org/10.1038/srep27296>
- Martínez, AM., L.T. Gama, J. Canon, C. Ginja, J.V. Delgado, S. Dunner, V. Landi, I. Martín-Burriel, I., M.C.T. Penedo, C. Rodellar, J.L. Vega-Pla, A. Acosta, L.A. Alvarez, E. Camacho, O. Cortés, J.R. Marques, R. Martínez, R.D. Martínez, L. Melucci, G. Martínez-Velázquez, J.E. Muñoz, A. Postiglioni, J. Quiroz, P. Sponenberg, O. Uffo, A.



- Villalobos, D. Zambrano, and P. Zaragoza. 2012. Genetic footprints of Iberian cattle in America 500 years after the arrival of Columbus. PLoS One. 7: e49066 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02207.x>
- Martínez, C.P. 2015. Estimación de la diversidad genética mediante marcadores SNP en bovino Criollo Coreño (*Bos taurus*). Tesis Licenciatura. Universidad de Guadalajara http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5982/Martinez_Ruiz_Claudia_Patricia.pdf?sequence=1&isAllowed=y (consulta 10 mar. 2020)
- Matukumalli, L.K., C.T. Lawley, R.D. Schnabel, J.F. Taylor, M.F. Allan, M.P. Heaton, J. O'Connell, S.S. Moore, T.P.L. Smith, T.S. Sonstegard, and C.P. Van Tassell. 2009. Development and characterization of a high-density SNP genotyping assay for cattle. PLoS ONE 4 (4), e5350. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1758>
- Nielsen, R. 2000. Estimation of population parameters and recombination rates from single nucleotide polymorphisms. Genetics 154(2): 931. <https://www.genetics.org/content/154/2/931.long> (consultado 10 jul. 2018).
- Pritchard, J.K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945-959. <https://www.genetics.org/content/155/2/945> (consultado 21 sept. 2018).
- Peakall, R., and P.E. Smouse. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics 28:2537-2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Rosenberg, N.A. 2004. Distruct: a program for the graphical display of population structure. Mol. Ecol. Notes 4: 137–138. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x>
- Sachidanandam, R., D. Weissman, S.C. Schmidt, J.M. Kakol, L.D. Stein, G. Marth, S. Sherry, J.C. Mullikin, B.J. Mortimore, and D.L. Willey. 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature 409 (6822): 928-933. <https://doi.org/10.1038/35057149>



- Strucken, EM; B. Gudex, M.H. Ferdosi, H.K. Lee, K.D. Song, J.P. Gibson, M. Kelly, E.K. Piper, L.R. Porto-Neto, S.H. Lee, and C. Gondro. 2013. Performance of different SNP panels for parentage testing in two East Asian cattle breeds. *Anim Genet.* 45: 572–5. <https://doi.org/10.1111/age.12154>
- Terry, B. 2008. *Genomas*. 3a Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 760 p.
- Tian, F., D. Sun, and Y. Zhang. 2008. Establishment of paternity testing system using microsatellite markers in Chinese Holstein. *Journal of Genetics and Genomics*, 35(5), 279-284. [https://doi.org/10.1016/s1673-8527\(08\)60040-5](https://doi.org/10.1016/s1673-8527(08)60040-5)
- Thomson, R., J.K. Pritchard, P. Shen, P.J. Oefner, and M.W. Feldman. 2000. Recent common ancestry of human Y chromosomes: evidence from DNA sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(13): 7360. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.13.7360>
- Vignal, A., D. Milan, M. San Cristobal, and A. Eggen. 2002. A review on SNP and other molecular markers and their use in animal genetics. *Genetic Selection Evolution* 43:275-305. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-3-275>
- Wang, D.G., J.B. Fan, C.J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, and J. Spencer. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280(5366): 1077. <https://doi.org/10.1126/science.280.5366.1077>
- Weir, B.S. 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Assoc., Inc; Sunderland, MA, USA: 1996. <https://archive.org/details/geneticdataanaly00weir/page/n9/mode/2up> (consultado 18 mar. 2019).

