

DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA DEL EXÓN XII DEL GEN DOPAMINA β -HIDROXILASA EN TRES RAZAS BOVINAS

J. V. Arredondo¹, G. D. Saavedra¹, D. Y. Hernández^{2*}

Artículo recibido: 24 de mayo de 2016 • Aprobado: 19 de febrero de 2017

RESUMEN

Los polimorfismos en el gen dopamina β -hidroxilasa (DBH) se asocian con el temperamento en los bovinos. En 16 animales de la raza criolla colombiana Blanco Orejinegro (BON), 20 Brahman (BRA) y 16 de Ganado de lidia (GLI), se evaluaron los polimorfismos del exón XII del gen DBH mediante secuenciación. Se encontraron 13 haplotipos, 6 en BON, 9 en BRA y 2 en GLI. El haplotipo H2 fue el más frecuente (0,615) y se encontró en las tres razas, mientras los haplotipos H6 y H9 fueron compartidos entre BON-BRA y BRA-GLI, respectivamente. La mayor diversidad genética (DG: $0,915 \pm 0,04$) y nucleotídica (DN: $0,011 \pm 0,006$) se encontró en la raza BRA, seguida por BON (DG: $0,700 \pm 0,12$; DN: $0,008 \pm 0,004$) y GLI (DG: $0,350 \pm 0,14$; DN: $0,0011 \pm 0,001$). Si bien el test de D-Tajima fue mayor que cero, no fue significativo ($P > 0,05$) en BON y BRA, pero en la raza GLI presentó un valor de $-1,92$ ($P < 0,05$). El análisis de varianza molecular mostró una variación entre las razas de 23,9% y una estructura poblacional (F_{ST}) de 0,23 ($P < 0,001$). Los mayores valores del coeficiente de coancestría se presentaron entre GLI y BRA (0,52) y entre GLI y BON (0,22). Se concluye que la raza GLI tiene baja diversidad en el gen DBH en comparación con las razas BON y BRA, que hay efectos de la selección natural en BON y BRA mientras que en la raza GLI se evidencia un barrido selectivo reciente y no a favor del temperamento.

Palabras clave: comportamiento animal, diversidad genética, ganado criollo colombiano, mejoramiento animal.

HAPLOTHIC DIVERSITY OF EXON XII OF THE DOPAMINE β -HYDROXYLASE GENE IN THREE CATTLE BREEDS

ABSTRACT

Polymorphisms in the dopamine β -hydroxylase gene (DBH) have been associated with temperament in cattle. In 16 animals of Colombian creole breed Blanco Orejinegro (BON), 20 Brahman (BRA) and 16 fighting bulls (GLI), polymorphisms of exon XII of the DBH gene were evaluated by sequencing. 13 haplotypes were found, 6 in BON,

¹ Facultad de Ciencias Pecuarias, Grupo de Investigación en Reproducción y Mejoramiento Genético, Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal. Kilómetro 4 Vía Santa Rosa de Cabal – Chinchiná (Colombia).

² Grupo de Investigación en Reproducción y Mejoramiento Genético Animal, Departamento de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Sucre. Campus Ciencias Agropecuarias, Kilómetro 7 vía Sincelejo – Sumpués (Colombia).

* Autor para correspondencia: darwin.hernandez@unisucre.edu.co.

9 and 2 in BRA and GLI respectively. Haplotype H2 was the most frequent in the whole population (0,615) and it was found in all breeds. Haplotypes H6 and H9 were shared between BON-BRA and BRA-GLI, respectively. The greatest value of genetic (DG: 0.915 ± 0.04) and nucleotide (DN: 0.011 ± 0.006) diversity, was found in BRA, followed by BON (DG: 0.700 ± 0.12 ; DN: 0.008 ± 0.004) and GLI (DG: 0.350 ± 0.14 ; DN: 0.0011 ± 0.001). The D-Tajima test was greater than zero, but not significant ($P > 0.05$) in BON and BRA, GLI presented a value of -1.92 ($P < 0.05$). The analysis of molecular variance showed a variation between the breeds of 23.9% and a poblacional structure (F_{ST}) of 0.23 ($P < 0.001$). The highest values of the coancestry coefficient were presented between GLI and BRA (0.52) and between GLI and BON (0.22). It is concluded that the GLI race has low diversity in the DBH gene compared to BON and BRA, that there are effects of neutral selection in BON and BRA breeds, whereas, in the GLI and not in favor of temperament.

Key words: Animal behavior, genetic diversity, Colombian creole cattle, animal breeding.

INTRODUCCIÓN

En su mayoría las razas bovinas se encuentran genéticamente aisladas en virtud de la selección que ha realizado el hombre buscando rasgos de interés económico (Lourenco 2013). Los programas de mejoramiento genético en el país son pocos y por lo general se enfocan en características de crecimiento, como el peso a distintas edades y las ganancias de peso, ya que son fáciles de medir y presentan heredabilidades medias-altas (Jiménez *et al.* 2010). Sin embargo, características como la tolerancia o resistencia a enfermedades, a condiciones ambientales extremas, la buena calidad de los productos derivados o la mansedumbre no se han considerado en dichos programas. Dentro de estas características, la mansedumbre o temperamento del animal es fundamental en la regulación biológica y manifiesta del bienestar animal, lo que afecta directamente la productividad del animal (Mormède 2005). La disminución en la producción relacionada con el temperamento se ha estimado que ocasiona pérdidas anuales de 120 y de 31 millones de USD\$ en Estados Unidos y México, respectivamente (Hall *et al.* 2011; Sutherland *et al.* 2012).

Se han estudiado variaciones del comportamiento y sus causas genéticas en ratones (Brodtkin *et al.* 2002), perros (Topál *et al.* 2009), lobos (Hejjas *et al.* 2007), caballos (Momozawa *et al.* 2005), gallinas (Sugiyama *et al.* 2004), monos (Bailey *et al.* 2007) y bovinos (Lourenco 2013; Arredondo y Saavedra 2016); en estos últimos se ha demostrado que existen diferencias significativas en el temperamento de razas de fondo genético *Bos taurus* y *Bos indicus* y, por tanto, diferentes eficiencias reproductivas (Burdick *et al.* 2009) y productivas (Hiendleder *et al.* 2003).

Se han analizado diversos polimorfismos en genes que codifican enzimas biosintéticas, receptores o enzimas del metabolismo de los neurotransmisores de las rutas, tanto dopaminérgica, como serotoninérgica (Tochigi *et al.* 2006), que explican el temperamento del animal. Entre ellos, se destaca el gen que codifica para la dopamina β -hidroxilasa (DBH), enzima indispensable para la síntesis de la noradrenalina a partir de la hidroxilación de la dopamina en los gránulos cromafines (Lourenco 2013). La DBH también es un modulador fisiológico que actúa en el desarrollo fetal y en el sistema inmune

mediado por células T. La noradrenalina es el mayor neurotransmisor posganglionar del sistema nervioso simpático, liberándose desde la médula suprarrenal como respuesta a situaciones de estrés, fuga o defensa; su liberación masiva genera cambios en todo el organismo, como la liberación de glucosa, el mantenimiento de la homeotermia y el aumento de la respuesta cardíaca y respiratoria, control del comportamiento alimenticio y control de aspectos sensomotores (Romero *et al.* 2011). En humanos la DBH se ha asociado con diversos comportamientos como la respuesta a las drogas, el comportamiento materno, el comportamiento impulsivo, la motivación y el aprendizaje (Luksys *et al.* 2009).

El gen DBH en los bovinos se localiza en el cromosoma 11, entre los nucleótidos 104554824 y 104572619 (NM_180995.2) y está formado por 12 exones y 11 intrones; su producto es una proteína de 597 aminoácidos y 66 kda. En este gen se han reportado 62 polimorfismos, de los cuales ocho son no sinónimos (Lourenco-Jaramillo *et al.* 2012) y se localizan en los exones I, III y XII, formando parte del dominio funcional de la enzima y siendo el último exón el más polimórfico. El análisis de los polimorfismos genéticos existentes en el exón XII del gen DBH puede servir como estrategia para determinar si existen diferencias genéticas importantes que determinen el temperamento de las razas y su correlación con los rasgos productivos.

Por tanto, el objetivo de la presente investigación fue caracterizar los haplotipos genéticos del exón XII del gen DBH en las razas bovinas Blanco Orejinegro, Ganado de lidia y Brahman, mediante secuenciación directa bidireccional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y muestras

Se colectaron muestras de sangre mediante punción de la vena coccígea con el sistema Vacutainer® en tubos con anticoagulante (K₂EDTA 7,2 mg) en 52 animales de tres grupos raciales distribuidos así: 16 muestras de la raza criolla Colombiana Blanco Orejinegro (BON), 20 de la raza Brahman (BRA) y 16 de Ganado de lidia (GLI), provenientes de ganaderías ubicadas en La Virginia (Risaralda) y en Obando, La Victoria y El Cerrito (Valle del Cauca). Las muestras fueron transportadas a 4°C hasta el laboratorio y almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

Extracción del ADN

El ADN se extrajo mediante el método de precipitación salina; a 500 µl de sangre se añadieron 1 ml de solución de lisis I (0,32 M de sacarosa, 10 mM de Tris HCl pH 7,5, MgCl₂ 5 mM y 1% de Triton X100) y se mezclaron por inversión a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifugó a 14.000 rpm durante un 1 minuto y se descartó el sobrenadante; se realizaron sucesivos lavados con la solución de lisis I hasta obtener una pastilla limpia de glóbulos blancos. Se agregaron 400 µl de solución de lisis II (10 mM de Tris HCl pH 7,5, EDTA 10 mM pH 8,0, NaCl 50 mM y 0,2% de SDS) y 20 µl de proteinasa K (10 mg/µl) y se incubó a 56°C durante 1 hora. Se añadieron 400 µl de NaCl 5 M, se hizo vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a 14.000 rpm durante 14 minutos. 350 µl del sobrenadante se mezclaron por inversión con 900 µl de etanol absoluto frío, se centrifugó a 14.000 rpm durante 12 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de etanol

al 70%, se mezcló por inversión durante 2 minutos y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos. Se dejó secar el pellet de ADN durante 20 minutos a 37°C y luego se resuspendió en TE 1X (1 mM de Tris HCl pH 7,5, y 0,1 mM de EDTA pH 8,0) (Hernández *et al.* 2015).

La calidad y concentración del ADN se evaluó usando geles de agarosa al 0,8% en una cámara Sub-Cell® GT; (BIO-RAD, USA) teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta; la concentración se determinó mediante la comparación de las muestras con concentraciones conocidas del bacteriófago lambda.

Amplificación y secuenciación del gen DBH

Se amplificó el exón XII del gen DBH usando los cebadores: sentido 5' TTTGGTTTGGGAGAAGG 3' y antisentido 5' TGCACCCGTCACACTCAA 3' (Lourenco-Jaramillo *et al.* 2012) a una concentración final de 0,2 µM, 20 ng de ADN, 2 mM MgCl₂, 25 µM dNTPs, 1X de tampón de PCR y 0,1 U Taq DNA polimerasa.

El perfil térmico de la PCR incluyó una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min; 5 ciclos de 95°C por 45 segundos, 62°C por 45 segundos, disminución de 2°C cada ciclo, 72°C por 45 segundos; 30 ciclos de 95°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos para finalizar con una incubación final a 72°C por 10 minutos. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador PTC-100® Teltier Thermal Cycler (BIO-RAD, USA).

Los amplificados se observaron en geles de agarosa al 1,2% teñidos con bromuro de etidio en una cámara Sub-Cell® GT; (BIO-RAD, USA) y visualizados con luz ultravioleta. El producto de la PCR fue un

fragmento de aproximadamente 702 pb, y la concentración mínima de los amplificadas fue 20 ng/µl. El secuenciamiento de las muestras se realizó en MacroGen Sequenciation Service, Maryland, USA.

Análisis estadístico

Las secuencias y sus electroferogramas fueron editados usando el programa Geneious 6.1 (Kearse *et al.* 2012) y alineadas usando el programa Mega 6 (Tamura *et al.* 2013), tomando como referencia la secuencia con el número de accesoión NCBI NM_180995.2 perteneciente a *Bos taurus*.

En cada raza calculó el número de haplotipos y sus frecuencias, la diversidad genética, la diversidad nucleotídica, el número promedio de diferencias por pares de secuencias (MNPd), se realizó el test de neutralidad de Tajima (D-Tajima), el test exacto de Ewens-Watterson-Slatkin (EWS) y se estimó el coeficiente de coancestría, mediante el programa Arlequin versión 3.5 (Excoffier y Lischer 2010). La relación entre los haplotipos se diagramó mediante una red con el programa Network 5.0 usando el algoritmo *median-joining*. Mediante el programa Mega 6 se determinó que el modelo evolutivo Tamura con 3 parámetros se ajustaba mejor a los datos; con este modelo evolutivo se estimaron las distancias utilizadas en los análisis de varianza molecular (AMOVA) con el fin de estimar la estructura y la diferenciación genética (F_{ST}) entre las poblaciones usando el programa Genalex versión 6.5 (Peakall y Smouse 2012).

RESULTADOS

En la comparación con la secuencia consenso se identificaron 13 haplotipos diferentes en toda la población analizada

(Tabla 1) definidos por 22 sitios variables de un amplificado con un tamaño de 702 pares de bases, con 10 transiciones y una transversión observada. Los haplotipos más frecuentes fueron el H2 (0,6155), el H9 (0,0769) y el H12 (0,0577), mientras los restantes 10 haplotipos tuvieron una frecuencia acumulada de 0,2499.

En la raza BON se encontraron seis haplotipos (H1 al H6), de los cuales el H2 fue el más frecuente (0,624), seguido por el H5 (0,124); los restantes cuatro haplotipos presentaron frecuencias de 0,062. En la raza BRA se encontraron nueve haplotipos (H2, H6 al H13) y los más frecuentes en esta raza fueron H2, H9 y H13 con frecuencias de 0,350 y 0,150 para los dos últimos, respectivamente. De otro lado, en el GLI solo se encontraron los haplotipos H2 y H9 con frecuencias de 0,936 y 0,064. En las razas BON y BRA se encontraron cuatro y seis haplotipos únicos y compartieron los haplotipos H2 y H6; la raza GLI no presentó haplotipos únicos y el H2 en esta raza se compartió con las razas BON y BRA, mientras que el H9 solo lo compartió con la raza BRA.

El algoritmo *median-joining* determinó que el dorso de la red de haplotipos está conformada por los haplotipos H3, H10 y H11 (Figura 1) todos con frecuencia de 0,0192, y que es necesario la aparición de tres haplotipos extintos (*mv*) para explicar las relaciones observadas.

Otros parámetros de diversidad en el exón XII del gen DBH se presentan en la Tabla 2. La diversidad genética promedio fue de $0,728 \pm 0,06$, el mayor valor se encontró en la raza BRA seguido por BON y GLI. La diversidad nucleotídica total fue de $0,009 \pm 0,004$, por razas, el GLI presentó el menor valor y la BRA el mayor. El número promedio de diferencias por pares de secuencias presentó los valores más altos en las razas BRA y GLI, el valor MNPD en el BON fue de $4,291 \pm 2,24$ y en total fue de $4,742 \pm 2,35$. El test de neutralidad (D-Tajima) presentó valores positivos en las razas BON (1,58) y BRA (3,55) aunque no fueron significativos ($P > 0,05$), en GLI, este valor fue negativo y significativo ($-1,92, P < 0,05$). El valor de D-Tajima para toda la población no fue significativo. De otro lado el test de

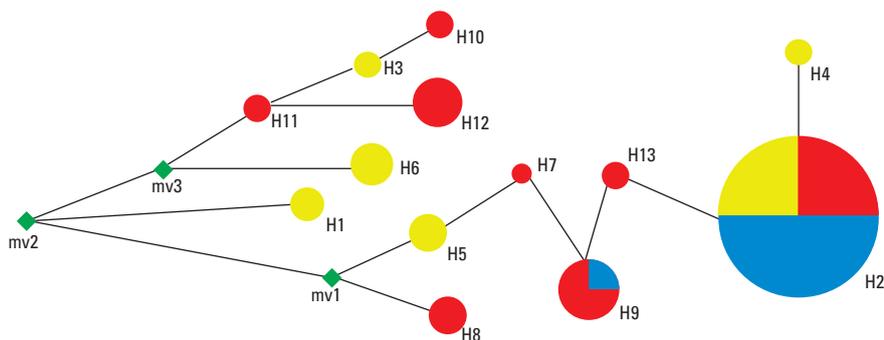


FIGURA 1. Red de haplotipos (H) para el exón XII del gen DBH construido con el programa Network 5.0 usando el algoritmo *median-joining*. Los rombos mv representan los haplotipos extintos o no muestreados. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo en la población. El color amarillo representa a la raza BON, el color rojo a la raza BRA y el color azul a la raza GLI.

TABLA 1. Definición de haplotipos y sus frecuencias en las razas estudiadas.

Haplotipo	Posición relativa en el exón XII													Frecuencia haplotípica												
	158	191	192	204	225	234	242	244	277	279	364	413	471	492	496	498	499	505	523	524	533	636	BON	BRA	GLI	TOTAL
NM_180995.2	G	C	C	C	G	C	A	G	C	C	A	T	C	G	C	T	T	C	G	A	C	T	-	-	-	-
H1	A	A	G	C	G	.	R	C	T	K	C	G	R	A	R	C	A	A	Y	C	G	G	0,062	-	-	0,0192
H2	.	.	G	C	G	.	.	T	T	G	A	A	A	.	A	.	G	G	C	T	G	G	0,624	0,35	0,936	0,6155
H3	A	A	G	C	G	.	A	C	.	K	A	G	A	R	R	C	A	G	C	Y	G	G	0,062	-	-	0,0192
H4	.	A	G	C	G	R	.	C	Y	G	A	A	A	.	A	Y	R	G	C	Y	G	G	0,062	-	-	0,0192
H5	A	A	G	C	G	.	R	C	.	K	A	G	K	R	A	Y	G	A	T	C	G	G	0,124	-	-	0,0385
H6	A	A	G	C	G	.	A	C	.	K	A	R	G	A	G	C	A	G	C	C	G	G	0,062	0,05	-	0,0385
H7	A	A	G	C	G	.	A	C	T	K	A	G	R	R	R	C	G	A	Y	C	G	G	-	0,05	-	0,0192
H8	A	A	G	C	G	.	A	C	.	K	A	G	G	A	G	C	R	A	Y	C	G	G	-	0,1	-	0,0385
H9	.	.	G	C	G	.	.	C	T	G	A	G	A	.	A	.	G	A	T	C	G	G	-	0,15	0,064	0,0769
H10	A	A	G	C	G	.	A	C	.	T	A	G	R	A	R	C	A	A	C	C	G	G	-	0,05	-	0,0192
H11	A	A	G	C	G	.	R	Y	.	T	A	G	G	A	G	C	R	G	C	C	G	G	-	0,05	-	0,0192
H12	A	A	G	C	G	A	C	.	T	A	G	G	A	G	C	A	G	C	C	C	G	G	-	0,15	-	0,0577
H13	.	.	G	C	G	.	.	T	T	G	A	A	A	.	A	.	G	A	T	Y	G	G	-	0,05	-	0,0192

BON: Blanco Orejinegro; BRA: Brahaman; GLI: Ganado de lidia.

A: nucleótido adenina; G: nucleótido guanina; C: nucleótido timina; T: nucleótido timina; R: sitio polimórfico por A/G; K: sitio polimórfico por G/T; Y: sitio polimórfico por C/T.

EWS no fue significativo en ninguna de las razas, ni para toda la población.

El análisis de varianza molecular mostró mayor variación entre los individuos dentro de raza (76,07%) que entre razas para este gen (23,93%), sin embargo, el valor del F_{ST} fue de 0,239 ($P < 0,001$)

(Tabla 3). Los valores de F_{ST} y los valores del coeficiente de coancestría por pares de razas se presentan en la Tabla 4. En ambos estadísticos los mayores valores se presentaron entre el par de razas GLI y BRA, seguido por GLI y BON y, el menor valor estuvo entre BON y BRA.

TABLA 2. Número de haplotipos, índices de diversidad, número promedio de diferencias por pares de secuencias (MNPd), test de neutralidad (D-Tajima) y test exacto de Ewens-Watterson-Slatkin (EWS) en las tres razas estudiadas.

Índice	BON	BRA	GLI	TOTAL
Número de haplotipos	6	9	2	13
Diversidad genética	0,700 ± 0,12	0,915 ± 0,04	0,350 ± 0,14	0,728 ± 0,06
Diversidad nucleotídica	0,008 ± 0,004	0,011 ± 0,006	0,001 ± 0,0001	0,009 ± 0,004
MNPd	4,291 ± 2,24	6,205 ± 3,07	0,625 ± 0,51	4,742 ± 2,35
D-Tajima	1,58 ^{ns}	3,55 ^{ns}	-1,92*	2,742 ^{ns}
EWS (Valor P)	P < 0,990	P < 0,467	P = 1.0	P < 0,966

ns = no significativo; * P < 0,05.

BON: Blanco Orejinegro; BRA: Brahaman; GLI: Ganado de lidia.

TABLA 3. Análisis de varianza molecular y valor de estructura poblacional (F_{ST}) en las razas estudiadas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de variación, %	F_{ST}
Entre razas	2	23,93	
Individuos dentro de razas	49	76,07	0,239**
Total	51	100	

** P < 0,01.

TABLA 4. Valor de estructura poblacional (F_{ST}) por pares de razas por debajo de la diagonal, coeficiente de coancestría entre pares de razas por encima de la diagonal en las tres razas estudiadas.

Raza	BON	BRA	GLI
BON	—	0,064	0,228
BRA	0,062 ^{ns}	—	0,525
GLI	0,204*	0,408**	—

ns = no significativo; * P < 0,05; ** P < 0,01.

BON: Blanco Orejinegro; BRA: Brahaman; GLI: Ganado de lidia.

DISCUSIÓN

Existen pocos trabajos en bovinos dirigidos a describir los polimorfismos del gen DBH. En un estudio realizado en Colombia, Arredono y Saavedra (2016) reportan cuatro haplotipos en bovinos de lidia, ocho en el ganado Blanco Orejinegro y 13 en el ganado Brahaman. En México, Lourenco-Jaramillo *et al.* (2012) en las razas Charolais (n = 50), Brahman (n = 50), Holstein (n = 21) y de lidia (n = 19), reportan tres, siete, tres y un haplotipos, respectivamente. El presente trabajo, con un número menor de animales para BRA y GLI, reporta dos y un haplotipo más, respectivamente. De otro lado, Lourenco (2013) en 330 animales de ganaderías mexicanas, reporta un total de 21 haplotipos, 13 en Charolais y 16 en Brahman, con ocho haplotipos compartidos entre las dos razas. Las diferencias encontradas en el número de haplotipos entre los reportes citados y el presente trabajo se deben seguramente al tamaño de muestra utilizado.

De los siete haplotipos que Lourenco-Jaramillo *et al.* (2012) reportan en Brahman, dos tienen una frecuencia acumulada del 87,5%. En un estudio posterior, de 16 haplotipos descritos en este mismo grupo racial, los dos más frecuentes suman 73,1% (Lourenco 2013). Por su parte, Arredono y Saavedra (2016), también en Brahman, hallaron tres haplotipos que suman el 50% de las frecuencias, mientras que los tres haplotipos más frecuentes en el presente trabajo para la raza BRA tienen una frecuencia acumulada del 65%. Lo anterior evidencia una mayor diversidad genética para este *locus* en la raza colombiana, lo cual se fundamenta en que fue el grupo racial, de los tres evaluados, con mayor valor de diversidad genética y nucleotídica.

La red de haplotipos revelada con el método de *median-joining* determinó que los haplotipos H3, H10 y H11 son los ancestrales (ver Figura 1): el primero de ellos solo se encontró en el BON y los últimos dos en el BRA; este hecho, junto con los haplotipos exclusivos de raza, las frecuencias haplotípicas, valores de diversidad genética y nucleotídica, permiten proponer un basamento genético para explicar las diferencias de temperamento entre las razas y justifican la realización de investigaciones encaminadas a determinar la asociación entre dichos polimorfismos y el temperamento de las razas con fondo genético *B. taurus* y *B. indicus*, y de esta manera ampliar los marcadores genéticos para esta característica (Mormède 2005; Core *et al.* 2009)

Con respecto a los índices de diversidad genética y nucleotídica, los mayores valores se presentaron en los ganados BRA y BON, y el menor en la raza GLI. Arredono y Saavedra (2016) reportan valores de DN similares en los tres grupos genéticos (0,012 en Brahaman, 0,008 en Blanco Orejinegro y 0,001 en el ganado de lidia). Las variaciones en estos parámetros pueden explicarse por varias razones; una de ellas es el origen y la formación de las razas. Para el caso del BON, que es una raza criolla colombiana, se dio a partir de los ganados traídos por los conquistadores españoles y es producto de aproximadamente 500 años selección natural en nuestro medio (Martínez 1992); por su parte, la raza BRA fue introducida al país en 1915 a través de ejemplares traídos desde Estados Unidos y en 1927 con animales importados de Brasil (Asocebú 2016); de otro lado, el GLI que fue introducido a Colombia en 1923 y son animales que provienen de las razas bravas criadas en España (Fedegan 2016).

Otra razón que puede explicar la baja diversidad en la raza GLI es la consanguinidad; Calero (2008) analizó la genealogía en dos ganaderías de lidia en Colombia y reporta que en dos de ellas hay valores de consanguinidad del 45,98% y 63,82%. Por su parte, Domínguez *et al.* (2010) reportan 43,2% de animales consanguíneos en cuatro ganaderías de lidia en México, mientras que, usando marcadores moleculares tipo microsatélites en 77 ganaderías de lidia mexicanas ($n = 1.640$ animales), se reporta un valor de endogamia de 47% (Cañón *et al.* 2007). Por su parte en la raza BON, Pedraza (2010) estimó un valor promedio de endogamia de 15% mediante 14 marcadores microsatélites y en la raza BRA, Álvarez (2008) usó 15 marcadores microsatélites y halló un valor promedio de endogamia del 22%. Por último, el número observado de transiciones nucleotídicas encontradas en BRA (10), BON (9) y GLI (5), junto con el alto valor de parecido entre los pares de secuencias (MNPD) en la última raza, explicarían la baja diversidad para el *locus* en estudio.

Los valores de diversidad genética y nucleotídica determinados en el gen DBH, pueden ser inferiores a aquellos medidos en regiones hipervariables del genoma, en las cuales haya mayor tasa de mutación (Sharma *et al.* 2015).

Con el fin de determinar la existencia de efectos de la selección neutral para el gen DBH en la población estudiada, se realizó el test de D-Tajima; éste mostró valores mayores que cero, aunque no significativos ($P > 0,05$) en las razas BON y BRA, indicando que en estas dos razas este *locus* ha evolucionado por equilibrio entre mutación y deriva genética, indicando selección neutral. Por otro lado, en la raza GLI el valor fue negativo y significativo ($P < 0,05$) lo que sugiere un barrido se-

lectivo reciente después de un cuello de botella (Tajima 1989). De igual manera, el test de EWS, que permite evidenciar los efectos de la selección balanceadora, no fue significativo, lo que indica que en el *locus* en mención no han ocurrido eventos de selección positiva o negativa contra algún alelo (Hernández *et al.* 2015); ello sugiere que el temperamento o comportamiento de los animales ha sido tenido en cuenta en los planes de mejoramiento genético o de selección de reproductores de forma empírica y no con bases genéticas. Lo anterior lo corroboran Arredondo y Saavedra (2016), quienes no encontraron asociaciones significativas entre entre SNPs y/o haplotipos en este gen con el temperamento de los animales evaluado como comportamiento en brete y velocidad de salida del brete.

El coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) para el *locus* y la población analizada fue más alto que el reportado por Arredondo y Saavedra (2016), ya sea en la población total o al analizar por razas. Sin embargo, en ambos reportes el valor de F_{ST} indica una separación genética de las razas y un flujo genético nulo entre ellas (Wright 1950), valor que se sustenta en la gran variación encontrada entre razas con el análisis de varianza molecular (ver Tabla 3). Así mismo, no se encontraron similitudes genéticas entre las razas BON y GLI a pesar que comparten el mismo fondo genético (*B. taurus*). Sin embargo, los valores de coancestría, indican que la probabilidad de que dos alelos tomados al azar en dos individuos sean idénticos por descendencia es alta, sobre todo cuando se analiza la raza GLI, lo que puede ser interpretado como una huella de selección para el gen al igual que un aumento de la homocigosis en la población (Qanbari *et al.* 2010).

CONCLUSIONES

Se encontraron haplotipos compartidos entre las razas, así como haplotipos únicos en BON y BRA, con mayor diversidad en BRA, seguido por BON y GLI, lo que se explica por el origen y formación de las razas, así como posibles valores diferenciales de endogamia. Las secuencias analizadas sugieren que no se ha realizado selección a favor del temperamento en función del gen DBH, aunque las razas están bien diferenciadas.

AGRADECIMIENTOS

A Fernando Morales Vallecilla (Zootecnista, Especialista, candidato a Ph.D.) y a los productores Darío Sanint, Jaime Escobar y Juan Camilo Palomino. Al laboratorio de biología molecular de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal. A los estudiantes Yency Neira, Guillermo Castro, Nathaly Valencia, Marcela Santamaría y Claudia Restrepo.

REFERENCIAS

- Álvarez L. 2008. Diversidad genética del ganado Hartón del Valle y sus relaciones con Holstein y Brahman, mediante el uso de marcadores moleculares [tesis de doctorado]. [Cali (CO)]: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad del Valle.
- Arredondo J, Saavedra G. 2016. Polymorphisms of the Dopamine beta-hydroxylase gene and its association with bovine temperament. *Rev CES Med Vet Zoot.* 11(1): 51-61.
- [Asocebú]. Asociación Colombiana de Criadores de Ganado Cebú. 2016. Brahman [Internet]. Bogotá (CO): Asocebú; [citado 2016 may 18]. Disponible en: <http://www.asocebu.com/index.php/el-cebu/razas/brahman>.
- Bailey N, Brehidental S, Jorgensen M, McCracken J, Fairbanks L. 2007. The association of DRD4 and novelty seeking is a found in a nonhuman primate model. *Psychiatr Genet.* 17(1): 23-27. Doi: 10.1097/YPG.0b013e32801140f2.
- Brodtkin E, Goforth S, Keene A, Fossella J, Silver L. 2002. Identification of quantitative trait loci that affect aggressive behavior in mice. *J Neurosci.* 22(3): 1165-1170.
- Burdick NC, Banta JP, Neuendorff DA, White J, Vann RC, Laurenz JC, Welsh TH, Randel R. 2009. Interrelationships among growth, endocrine, immune, and temperament variables in neonatal Brhman calves. *J Anim Sci.* 87(10): 3202-3210. Doi: 10.2527/jas.2009-1931.
- Calero D. 2008. Estimación de parámetros genéticos y valores de cría de variables etológicas expresadas durante las faenas de tiente y de lidia en dos ganaderías de reses bravas del suroccidente Colombiano [tesis de maestría]. [Palmira (CO)]: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira.
- Cañón J, Cortés O, García D, García-Atance MA, Tupac-Yupanqui I, Dunner S. 2007. Distribución de la variabilidad genética en la raza de lidia. *Arch Zootec.* 56(Supl. 1): 391-396.
- Core S, Widowski T, Manson G, Miller S. 2009. Eye white percentage as a predictor of temperament in beef cattle. *J Anim Sci.* 87(6): 2168-2174. Doi: 10.2527/jas.2008-1554.
- Domínguez J, Rodríguez A, Núñez R, Ramírez R, Ortega JA, Ruiz A. 2010. Análisis del pedigrí y efectos de la consanguinidad en el comportamiento del ganado de lidia mexicano. *Arch Zootec.* 59(225): 63-72.
- Excoffier L, Lischer H. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 10(3): 564-567. Doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- [Fedegan]. Federación Colombiana de Ganaderos. 2016. Cámara gremial del toro de lidia [Internet]. Bogotá (CO): Fedegan; [citado 2016 may 18]. Disponible en: <http://www.fedegan.org.co/programas/camara-gremial-del-toro-de-lidia>.
- Hall N, Buchanan D, Anderson V, Ilse V, Carlin K, Berg E. 2011. Working chute behavior of feedlot cattle can be an indication on cattle temperament and beef carcass composition and quality. *Meat Sci.* 89(1): 52-57. Doi: 10.1016/j.meatsci.2011.03.020.

- Hernández D, Muñoz J, Álvarez, L. 2015. Diversidad genética del gen BoLA-DRB3 en el ganado criollo colombiano Hartón del Valle. *Resv CES Med Vet Zoot.* 10(1): 18-30.
- Hejjas K, Vas J, Kubinyi E, Sasvari-Szekely M, Miklosi A, Ronai Z. 2007. Novel repeat polymorphisms of the dopaminergic neurotransmitter genes among dog and wolves. *Mamm. Genome.* 18(12): 871-879. Doi: 10.1007/s00335-007-9070-0.
- Hiendleder S, Thomsen H, Reinsch N, Bennewitz J, Leye-Horn B, Looft C, Xu N, Medjugorac I, Russ I, Kühn C, *et al.* 2003. Mapping of QTL for body conformation and behavior in cattle. *J Hered.* 94(6): 496-506.
- Jiménez A, Manrique C, Martínez CA. 2010. Parámetros y valores genéticos para características de composición corporal, área de ojo del lomo y grasa dorsal medidos mediante ultrasonido en la raza brahman. *Rev Fac Med Vet Zoot [Internet]. [Citado 2016 abr. 13]; 57(3): 159-167.* Disponible en: <http://revistas.unal.edu.co/index.php/remezv/article/view/18236/19837>.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, *et al.* 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 28(12): 1647-1649. Doi: 10.1093/bioinformatics/bts199.
- Lourenco-Jaramillo D, Sifuentes-Rincon A, Parra-Bracamonte G, de la Rosa-Reina X, Segura-Cabrera A, Arellano-Vera W. 2012. Genety diversity of tyrosina hidroxilase (TH) and dopamine beta-hydroxylase (DBH) genes in cattle breeds. *Genet Mol Biol.* 35(2): 435-440. Doi: 10.1590/S1415-47572012000300009.
- Lourenco L. 2013. Análisis funcional del Gen Dopamina Beta Hidroxilasa (DBH) y su asociación a Temperamento en Bovinos [tesis de doctorado]. [Tamaulipas (MX)]: Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional.
- Luksys G, Gerstner W, Sandi C. 2009. Stress genotype and norepinephrine in the prediction of mouse behavior using reinforcement learning. *Nat Neurosci.* 12(9): 1180-1186. Doi: 10.1038/nn.2374.
- Martínez C. 1992. El ganado criollo colombiano Blanco Orejinegro (BON). *Ani Gen Res Inf.* 9: 33-44.
- Momozawa Y, Takeuchi Y, Kusonose R, Kikusui T, Mori Y. 2005. Association between equine temperament and polymorphisms in dopamine D4 receptor gene. *Mamm Genome.* 16(7): 538-544. Doi: 10.1007/s00335-005-0021-3.
- Mormède, P. 2005. Molecular genetics of behavior: Research strategies and perspectives for animal production. *Livest Prod. Sci.* 93(1): 15-21. Doi: 10.1016/j.livprodsci.2004.11.002.
- Peakall R, Smouse P. 2012. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics.* 28(19): 2537-2539. Doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Pedraza A. 2010. Variabilidad genética en poblaciones de ganado criollo de la raza Blanco Orejinegro mediante marcadores moleculares tipo microsatélites [tesis de grado]. [Bogotá, (CO)]: Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales-UDCA.
- Qanbari S, Pimentel E, Tetens J, Thaller G, Lichtner P, Sharifi R, Simianer H. 2010. A genome-wide scan for signatures of recent selection in Holstein cattle. *Anim Genetics.* 41(4): 377-389. Doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.02016.x.
- Romero M, Uribe L, Sánchez J. 2011. Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. *Biosalud.* 10(1): 71-87.
- Sharma R, Kishore A, Mukes M, Ahlawat S, Maitra A, Pandey A, Tantiya M. 2015. Genetic diversity and relationship of Indian cattle inferred from microsatellite and mitochondrial DNA markers. *BMC Genetics.* 16(73): 1-12.
- Sugiyama A, Inoue-Muruyama M, Miwa M, Ohashi R, Kayan B, Mizutani M, Nirasawa K, Odai M, Minezawa M, Watanabe S, Ito S. 2004. Polymorphisms of dopamine receptor D4 exon I corresponding region in chicken. *Zool Sci.* 21(9): 941-946.
- Sutherland M, Rogers A, Verkerk G. 2012. The effect of temperament and responsiveness towards human son the behavior, physiology and milk production of multiparous dairy cows in a familiar and novel milking environment. *Physiol Behav.* 107(3): 329-337.

- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123(3): 585-595.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*. 30(12): 2725-2729.
- Tochigi M, Otowa T, Hibino H, Kato C, Otani T, Umekage T, Utsumi T, Kato N, Sasaki T. 2006. Combined analysis of association between personality traits and three functional polymorphisms in the tyrosine hydroxylase, monoamine oxidase A, and catechol-O-methyltransferase genes. *Neurosci Res*. 54(3): 180-185.
- Topál J, Miklósi A, Gácsi M, Dóka A, Pongrácz P, Kubinyi E, Virányi Z, Csányi V. 2009. The dog as a model for understanding human social behavior. In: Brockmann H, Roper T, Naguib M, Wynne-Edwards E, Mitani J, Simmons L (eds.). *Advances in the Study of Behavior*, Vol. 39, Burlington: Academic Press, Elsevier Inc. p. 71-116.
- Wright S. 1950. Genetical structure of population. *Nature*. 166(4215): 247-249.

Article citation:

Arredondo JV, Saavedra GD, Hernández DY. 2017. Diversidad haplotípica del exón XII del gen dopamina β -hidroxilasa en tres razas bovinas. [Haplotypic diversity of exon XII of the dopamine β -hydroxylase gene in three cattle breeds]. *Rev Med Vet Zoot*. 64(1): 32-43. Doi: 10.15446/rfmvz.v64n1.65816.