

EVALUACION DE LA VARIABILIDAD DE GENES DE KAPPA CASEINA EN POBLACIONES DE BOVINOS CRIOLLOS DE TICLLOS Y HUASHCAO, REGIÓN ANCASH

Eudosio Veli, Emma Rivas, Victoria Rivas, Milusqui Verastegui, Santiago Pastor
Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA)
dnirrgg@inia.gob.pe

RESUMEN. Para evaluar la variabilidad de los genes de κ -caseína (CASK) en las poblaciones de vacunos criollos, se colectaron muestras de sangre de 53 bovinos de las comunidades campesinas de Huashcao y Ticllos (región Ancash). Se encontraron tres genotipos de CASK: AA, AB y BB; con frecuencias de 0,50, 0,27 y 0,23; de 0,23, 0,55 y 0,23, en Huashcao y Ticllos, respectivamente. Las frecuencias alélicas para A y B fueron de 0,64 y 0,36; de 0,50 y 0,50, en Huashcao y Ticllos, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las frecuencias alélicas de Huashcao y Ticllos. Los marcadores moleculares de KCAS pueden ser empleados para proveer información genotípica directa y útil que ayude a los criadores de bovinos criollos en la selección de animales para aplicarlos en un programa de mejoramiento de producción de leche y queso en donde esta selección no puede realizarse de forma convencional. De esta forma se asegura el mantenimiento de la variabilidad alélica de estas poblaciones amenazadas por la cruce indiscriminada con razas exóticas para mejorar el volumen de producción de leche en desmedro de su composición proteica.

Palabras claves: bovinos criollos, frecuencia genotípica, κ -caseína (CASK), PCR-RFLP.

INTRODUCCIÓN

El Perú es poseedor de una diversidad de especies animales domésticas nativas, naturalizadas y recientemente introducidas, asociadas a poblaciones humanas con bajos niveles de desarrollo y calidad de vida. Estas especies son portadoras de genes determinantes de resistencia a enfermedades y a condiciones climáticas y medioambientales adversas. No obstante, se observa una pérdida de diversidad (ecotipos) y variabilidad (genotipos) provocada por la disminución de ciertas poblaciones de estas especies, debido a la falta de toma de conciencia en el establecimiento de programas de conservación.

El bovino criollo americano descende de los animales que llegaron en 1493 en el segundo viaje de Colon, y Lima fue el foco principal de su dispersión hacia todos los países de América del Sur (Primo, 1992). En el Perú el bovino criollo representa el 85.8% de la población de bovinos; de ahí su gran importancia por ser pie de cría o población base de nuestra ganadería (Rosemberg, 2002). Esta especie se caracteriza por su rusticidad, adaptación a la altura, y sirve como fuente de alimentación, ahorro y recreación para las familias rurales (fig. 1; INIA, en prensa).

El INIA a través de la Dirección Nacional de Investigación en Recursos Genéticos en el año 2003 inició el proyecto "Caracterización de Recursos Zoogenéticos en función a caracteres utilitarios"; dentro del cual se viene desarrollando el sub-proyecto "Evaluación de la biodiversidad asociada a rendimiento quesero en bovinos criollos" que busca analizar la variabilidad para los genes de κ -caseína (CASK) y β -lactoglobulina (LGB) en poblaciones de bovinos criollos de la sierra. Las actividades

se realizan con colaboración del Instituto de Biotecnología (IBT), la Facultad de Zootecnia de la UNALM y CARITAS-Huaraz.

El genotipado de las proteínas lácteas puede realizarse directamente con muestras de leche por electroforesis, con el inconveniente de efectuarlo solo durante la fase de lactancia. Con la técnica de PCR-RFLP (Medrano y Córdova, 1990) es posible genotipar las CASK sin importar sexo, edad o estado fisiológico. Este procedimiento es preciso y económico y la visualización de los alelos en geles de agarosa resulta ventajosa en tiempo y costo frente al uso de geles de acrilamida. Además, el uso de esta técnica en programas de mejoramiento es ampliamente recomendada para la selección de toros con el genotipo favorable e incrementar la frecuencia del alelo B (Schlieben *et al.*, 1991; Felmer y Butendieck, 1998).

El objetivo de este trabajo es determinar las frecuencias génicas de CASK en bovinos criollos de las poblaciones de Ticllos y Huashcao (región Ancash); estos resultados podrán utilizarse por los criadores en programas de mejoramiento de leche y queso en donde esta selección no puede usarse de forma convencional, dado que requerirían de pruebas de progenie muy extensas de entre 6 y 7 años (Medrano y Córdova, 1990). Además, se sensibilizará a los criadores en el sentido que el mejoramiento del ganado criollo no debe pasar por simples cruza con ganado exótico de difícil adaptación y susceptible a enfermedades en las zonas altoandinas; sino por conocer primero las características de nuestro ganado criollo y sacar provecho de ellas mejorando los aspectos desfavorables dentro de la misma raza.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Se colectaron muestras de sangre de la vena caudal de 22 y 31 animales de las comunidades campesinas de Huashcao y Ticllos. La sangre (7-10 ml/animal) se deposita en tubos conteniendo EDTA disódico (pH 8.0) al 2,5%. Se aislaron los linfocitos (lavados con Buffer Tris EDTA 20:5 v/v, pH 8,0) y se conservaron a -20 °C. La extracción de ADN se llevó a cabo con un protocolo del Laboratorio de Genética Humana de la UNMSM modificado en el Laboratorio de Biología Molecular del INIA; que incluye lisis de glóbulos blancos con SDS 10% e incubación con Proteinasa K (20mg/ul) a 55 °C, precipitación de impurezas con acetato de K 3M y del ADN con isopropanol y etanol absoluto para resuspender en Buffer Tris EDTA 20:5 v/v pH 8.0. Posteriormente, se realiza la purificación de las muestras de ADN con lavados en soluciones cloroformo:isomilalcohol 24:1 v/v , acetato de K 3M y NaCl 5M, y finalmente precipitar con etanol absoluto y resuspender en Buffer Tris EDTA 20:1 v/v pH 8.0.

Las pruebas de PCR RFLP realizadas se basan en el protocolo de Poli y Medrano (1997) utilizando los primers JK5 y JK3 (Biosíntesis ®) y la enzima de restricción Hinf I (Promega®) para el diagnóstico de los alelos A y B del gen de la CASK. La reacción estándar de PCR de volumen final 25 µL en tubos 0,2 mL contenía: 1 µL de ADN (50-100 ng) y master mix (2,5 µL buffer 10X, 1,5 µL MgCl₂ 25mM, 0,125 µL Taq polimerasa 5U/µL (Promega®); 2,5 µL dNTPs 1mM (Applied Biosystems®); 0,25 µL de cada primer 10 pmol) y H₂O libre de nucleasas (NFW-Gibco®). Las condiciones de PCR fueron: una fase de desnaturalización de 94 °C por 3 minutos; seguido por 35 ciclos de 94 °C por 45", 60 °C por 60" y 72 °C por 60" (termociclador Perkin Elmer, modelo GeneAmp PCR System 2400). La digestión del producto amplificado con Hinf I utiliza 15 µL del volumen de la reacción de PCR, al cual se le adiciona 6 U

de la enzima, 2,25 μL de Buffer B y 4,65 μL de H_2O NFW- Gibco® que se incubó por 2 horas a 37 °C.

Los fragmentos digeridos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3% en buffer TBE 1X, adicionando 0,0025% de Bromuro de Etidio al gel. Las condiciones de electroforesis fueron de 2 horas a 95 V. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV y se fotografiaron con una cámara Polaroid (EagleEye®). La lectura de geles se realizó calculando el tamaño de alelos tomando como referencia la migración de fragmentos de un marcador de 50pb (Fermentas®).

Para el análisis estadístico de la variabilidad genética se calcularon frecuencias alélicas y genotípicas y el equilibrio de Hardy Weinberg con la prueba de χ^2 (Chi cuadrado). Se utilizó la prueba Z (Normal Standard) para establecer si existe diferencia entre las frecuencias alélicas y genotípicas de las poblaciones estudiadas.

RESULTADOS:

En la tabla 1 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas y esperadas para las poblaciones de bovinos de Huaschao y Ticllos. Asimismo se observa la heterocigosidad media de ambas poblaciones.

Las dos poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg con un valor de $\chi^2=0,1751$ con 1 grado de libertad ($p=0,6755$) en Huaschao y con $\chi^2=0,0082$ con 1 grado de libertad ($p=0,9959$) en Ticllos. Al analizar los genotipos entre poblaciones mediante la prueba Z se observa que las frecuencias genotípicas para los genotipos AA y AB son significativamente diferentes ($P<0,05$) entre las poblaciones de Huaschao y Ticllos; y las frecuencias alélicas no difieren entre si. La heterocigosidad media encontrada en la población de Ticllos es significativamente diferente que la de Huaschao. En la fig. 2 se observan los patrones de las bandas alélicas de algunos individuos genotipados y se señalan los respectivos genotipos asociados.

DISCUSIÓN:

Las variantes alélicas del gen de CASK están asociadas al porcentaje de proteína total de la leche (López, 1998) y su contenido, e influyen significativamente sobre el tiempo de coagulación del cuajo, la firmeza y rendimiento quesero, mostrando valores superiores en la leche de vacas con el genotipo BB en relación con las de genotipo AA (Schlieben *et al.*, 1991; Van Eenennaam y Medrano, 1991). El contenido de la proteína CASK puede llegar a tener una diferencia de 3% entre la leche de vacas del genotipo BB y AA (Bobe, 2004).

Se ha reportado el análisis de la variabilidad genética de los genes de la CASK (Medrano *et al.*, 1990; Schlieben *et al.*, 1991; Lara, 2002; Kemenes *et al.*, 1999; Viana *et al.*, 2001; Felmer y Butendieck, 1998; Giovambattista *et al.*, 2001; Ripoli *et al.*, 2003) en poblaciones de diferentes razas de bovinos. Recientes investigaciones en hatos de Holstein Friesian de la Universidad de Iowa, confirman que los genotipos de CASK y LGB afectan la composición proteica de la leche y que ambos contribuyen con más del 50% de la heredabilidad y más del 25% de la repetibilidad de la proporción de las caseínas alfa s1 y kappa de la proteína total de la leche. Del mismo modo, el genotipo CASK explica el 25,4% la variancia fenotípica total de la concentración de proteína de la leche, siendo el factor más importante entre otros parámetros tales como número de parto, mes de lactación y efectos ambientales (dieta, mastitis, etc.) (Bobe, 2004).

Las variantes alélicas de CASK genotipadas en este trabajo difieren en dos mutaciones puntuales en la posición 136 y 148 del gen que pueden ser identificadas por análisis de fragmentos de restricción (Schlieben *et al.*, 1991). En la fig. 2 se muestra un fragmento de 84 pb y dos de 134 y 132 pb que representan al alelo A; y, un fragmento de 84 pb y otro de 266 pb que representan al alelo B, respectivamente, coincidente con lo reportado por Felmer y Butendieck (1998).

En la tabla 1 se observa una diferencia en la distribución de los alelos; en el caso de la comunidad de Huashcao resultó mayor la frecuencia del alelo A (0,64) con respecto a la comunidad de Ticllos (0,50). La diferencia entre poblaciones es más notoria al observar las frecuencias genotípicas. Varios factores ambientales pueden explicar estos resultados. La localidad de Huashcao se encuentra relativamente cercana a la ciudad de Yungay, en el Callejón de Huaylas, mientras que la localidad de Ticllos está ubicada en la provincia de Bolognesi cercana al Callejón de los Conchucos. Estas diferencias de acceso al mercado y a otras localidades de menor altitud, ofrecen la oportunidad a los pobladores de Huashcao de comercializar no solo sus productos, sino de intercambiar reproductores criollos, cruzados y razas exóticas como la Holstein; en ésta el alelo A es más frecuente (Viana *et al.*, 2001; Poli y Antonioni, 1991; Bonvillani *et al.*, 2000) y su crianza predomina en la ciudad de Caraz. Asimismo, las condiciones de manejo de pastos y altitud son favorables para la localidad de Huashcao (3500 msnm) a diferencia de Ticllos (4000 msnm). En Huashcao se viene mejorando la calidad de pastos con la participación de CARITAS-Huaraz. Esto propicia que los criadores efectúen el mal denominado mejoramiento de su ganado a través de cruces entre ganado criollo con razas exóticas Brown Swiss o Holstein, los cuales se adaptan mejor a pisos altitudinales bajos y con pasto mejorado.

En la tabla 2 se comparan las frecuencias alélicas obtenidas en este estudio con otras razas de bovinos. Se puede observar que las frecuencias encontradas en las poblaciones de Huashcao y Ticllos están en niveles intermedios con respecto a las otras razas de bovinos de climas templados. Sin embargo, la frecuencia del alelo B se acerca más al de razas lecheras o de doble propósito como la Normanda (0,56); cuya leche es de alta calidad para producción de queso y mantequilla. Además, con relación al criollo Argentino, las frecuencias alélicas para A y B son muy similares a las de los criollos de la comunidad de Huashcao, no siendo así en los bovinos de Ticllos por ubicarse en una zona más aislada.

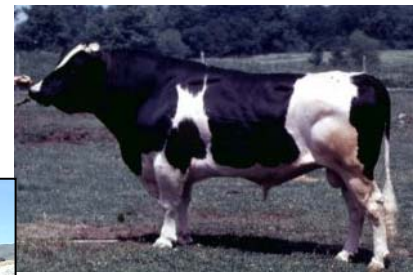
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Bobe, G. 2004. Milk protein genotypes explain variation of milk protein composition. A.S. Leaflet R 1901. Iowa State University Animal Industry Report.
- Bonvillani, A.G.; Di Renzo, M.A.; Tiranti, I.N. 2000. Genetic polymorphism of milk protein loci in Argentinian Holstein cattle. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4, 819-823.
- Felmer, R.; Butendieck, N. 1998. Frecuencia alélica del gen de la k-caseína bovina en un rebaño Frisón Negro Chileno. *Arch. Med. Vet.* Vol. 30. N° 2, p. 145-150.
- Giovambattista, G.; Ripoli, M.V.; Peral-García, P. and Bouzat, J. L. 2001. Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: the Argentinian Creole cattle. *Animal Genetics*, 32:240-247.

- Golijow, C. D., Giovambattista G., Ripoli M.V., Dulout F.N. Lojo M.M. 1999. Genetic variability and population structure in loci related to milk production traits in native Argentine Creole and commercial Argentine Holstein cattle. *Braz. J. Genet*, 22: 395-398
- Grosclaude, F. 1988. Le polymorphisme genetique des principales lactoproteins bovines. *INRA Prod. Anim.*, 1:5-17.
- Kemenes, P.A.; de Almeida Regitano, L.C.; de Magalhaes Rosa, A.J.; Packer, I.U.; Razook, A.G.; de Figueredo, L.A; Silva, N.A.; Etchegaray, M.A.L.; Coutinho, L.L. 1999. κ -casein; β -lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distance in Nelore, Gyr, Guzera, Caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis Cattle. *Genetics and Molecular Biology*, 22, 4, 539-541.
- Lara, M.A.C.; Gama, L.T.; Bufarah, G.; Sereno, J.R.B.; Celegato, E.M.L.; de Abreu, U.P. 2002. Genetic Polymorphism at the K-Casein Locus in Pantaneiro Cattle. *Arch. Zootec.* 51:99-105.
- López Benavides, M. 1998. Correlación entre la constitución genética kappa-caseína y características de producción en vacas Holstein de primer parto en la sabana Bogota. Primer Simposio de Investigación en la Universidad de la Salle. Noviembre, 1998. Colombia.
- Mc Lean, D. M.; Graham, E. R. B.; Ponzoni, R. W. and McKenzie, H. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J. Dairy Res.* 51:531-546.
- Medrano, J.F. y Cordova, E.A. 1990. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Biotechnology.* 8:144-146.
- Instituto Nacional de Investigación Agraria (en prensa). Primer Informe Nacional sobre la Situación de los Recursos Zoogenéticos-PINRZ. Dirección Nacional Investigación de Recursos Genéticas –INIA-Perú
- Poli, M. A. y Antonioni, G. 1991. Genetic structure of milk proteins in Argentinian Holstein and Argentinian Creole cattle. *Hereditas* 115:177-182.
- Poli, M. y Medrano, J. F. 1997. Informe final del Proyecto Desarrollo de un rodeo AA y otro BB para capa-caseína y b-lactoglobulina de vacas lecheras, para mejorar la calidad de la leche para la producción de quesos. Department of Animal Science. University of California, Davis. USA.
- Primo, A. T. 1992. El Ganado bovino Iberico en las Américas: 500 años después. *Arch. Zootec.* 41 (extra): 421-432
- Ripoli, M. V.; Corva, P. M.; Antonini, A.; de Luca, J.C.; Rojas, F.; Dulout, F.N. ; Giovambattista, G. 2003. Asociación entre cinco genes candidatos y producción de leche en la raza criolla Saavedreña. *Arch. Zootec.* 52: 89-92
- Rosemberg, M. 2002. Variabilidad genética de los vacunos criollos y de doble proposito. I Congreso peruano de genética animal. Lima-Perú
- Schlieben, S.; Erhardt, G. y Senft, B. 1991. Genotyping of bovine kappa-caseine following DNA sequence amplification and direct sequencing of kappa-caseine-E PCR product. *Animal Genetics.* 22: 333-342.
- Van Eenennaan, A. and Medrano, J. 1991. Genetic polymorphism in milk protein loci: Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74:1730-1742.
- Viana, J. L.; Fernández, A.; Iglesias, A.; Sánchez, L.; Becerra, J. 2001. Análisis de los genotipos mas frecuentes de la kappa caseína en la raza vacuna rubia gallega mediante PCR/RFLPs. *Archivos de Zootecnia* 50:91-96.



Rubia Gallega



Holstein



Criollo Peruano



Normanda



Jersey

Fig. 1 Algunas razas bobinas y su comparación genotípica con el bovino criollo peruano

Se observa que el bovino criollo posee fenotipo de ganado lechero, con poca masa muscular, de tamaño mediano, buenos aplomos y características que le han permitido adaptarse a condiciones extremas del clima, topografía accidentada, resistencia a enfermedades y una alimentación en base a pastizales altoandinos.

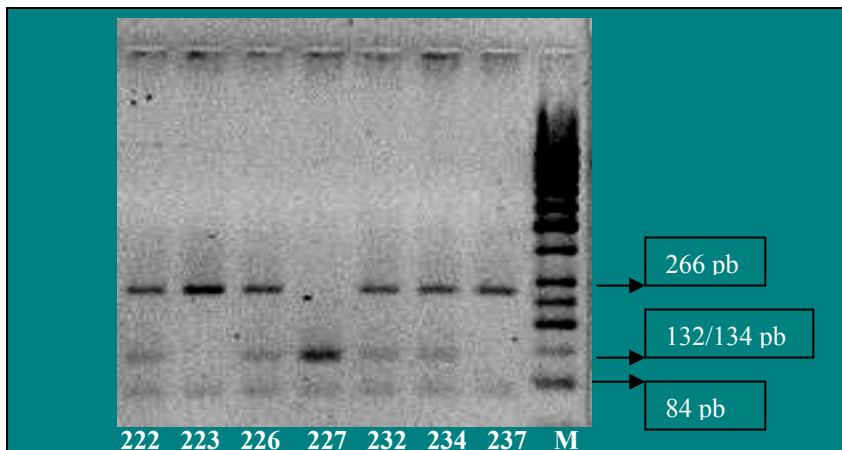


Fig. 2. Gel de agarosa 3% mostrando los genotipos de κ -caseínas: carril 227 = CASK^{AA}; 222,232 y 234 = CASK^{AB}; 223 y 237 = CASK^{BB}. Carril M = marcador de peso molecular.

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas en bovinos criollos muestreados

Genotipo	Huashcao				Ticlos			
	Observ.		Esperad.		Observ.		Esperad.	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
AA	11	0,50 (*)	9	0,41	7	0,23 (*)	8	0,25
AB	6	0,27 (*)	10	0,46	17	0,55 (*)	16	0,50
BB	5	0,23 (ns)	3	0,13	7	0,23 (ns)	8	0,25
Alelos	%				%			
A	0,64 (ns)				0,50 (ns)			
B	0,36 (ns)				0,50 (ns)			
Heterocigosidad	27,27% (*)				54,83% (*)			

Tabla 2. Frecuencias alélicas de k-caseínas (CASK) de razas de bovinos

Raza	Frecuencia alélica		Referencia
	CASK ^A	CASK ^B	
Criollo Huashcao	0,64	0,36	
Criollo Ticlos	0,5	0,5	
Criollo Argentino	0,647	0,353	Golijow <i>et al.</i> , 1999
Rubia Gallega	0,47	0,53	Viana <i>et al.</i> , 2001
Holstein	0,9	0,1	Viana <i>et al.</i> , 2001
Jersey	0,23	0,77	McLean <i>et al.</i> , 1984; Van Eenennaan y Medrano, 1991; Grosclaude, 1998
Normanda	0,44	0,56	McLean <i>et al.</i> , 1984; Van Eenennaan y Medrano, 1991; Grosclaude, 1998
Gyr	0,93	0,07	Kemenes <i>et al.</i> , 1999
Pantaneiro	0,782	0,218	Lara <i>et al.</i> , 2002
Santa Gertrudis	0,85	0,15	Kemenes <i>et al.</i> , 1999