

CORRELACIÓN ENTRE HAPLOTIPOS PARA LA K-CASEÍNA Y CARACTERÍSTICAS DE PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS HOLSTEIN

CORRELATION BETWEEN HAPLOTYPES FOR K - CASEINE AND LACTIC PRODUCTION CHARACTERISTICS IN HOLSTEIN CATTLE

López M, Hernández V¹, Estrada L².

RESUMEN

Los niveles de proteínas y específicamente de caseínas de interés en los procesos industriales de la leche especialmente en la coagulación y cantidad de cuajo. La caracterización molecular y establecimiento de las frecuencias genotípicas, que determinan cualidades de la leche, son por lo tanto importantes en predefinir el valor genético de los animales. Este experimento se realizó con el fin de determinar la frecuencia genotípica y establecer las posibles correlaciones entre los genotipos y algunos fenotipos de producción de leche. Se tomaron muestras de sangre y leche de 54 novillas Holstein de primer parto fueron recolectadas en diferentes fincas de la Sabana de Bogotá (2000 - 3000 msnm; 12 - 18°C). Las muestras de leche fueron analizadas para porcentaje de proteína, caseína total, grasa y lactosa, mientras que la sangre fue usada para genotipificar los haplotipos de la k-caseína (AA, AB y BB). También se colectaron datos del programa de Mejoramiento Lechero Holstein de la Asociación Holstein de Colombia para proyectar la producción de leche a 305 días 2X. Con base en estos datos se determinaron las frecuencias genotípica y alélica para la k-caseína y su correlación con proteína total (%), caseína total (%) y proyección de producción de leche (kg) a 305 días 2X. La frecuencia genotípica fue de 57.41% para el haplotipo AA, 37.04% para el haplotipo AB y 5.55% para el haplotipo BB. La frecuencia génica fue de 75.93% para el alelo A y 24.07% para el alelo B. Hubo una correlación altamente significativa entre los haplotipos y el porcentaje de proteína en la leche ($P > .975$), con el haplotipo BB superior al AB y al AA. De otro lado, aunque no hubo una correlación estadísticamente significativa entre estos haplotipos y los parámetros contenido de caseína total y proyección de producción de leche (kg) a 305 días 2X, el haplotipo BB siempre demostró mayores valores que los otros haplotipos.

Palabras clave: alelo, haplotipos, PCR, RFLP, frecuencia génica

ABSTRACT

Protein levels and specifically casein are important in the industrial processes of milk, especially in clotting and clot formation.

Characterization of genotype frequencies is important to determine the genetic value of the animals. This experiment was carried out to determine the genotype frequencies and to establish the correlation between haplotypes and production phenotypes.

Milk and blood samples were taken from 54 first parity Holstein heifers from farms in the Sabana de Bogotá (2000-3000 meters above sea level; 12-18°C). Milk samples were analyzed for protein, casein, fat and lactose percent, whereas the blood was used to genotype the animals for the k-casein gene (AA, AB and BB). Also, data was taken from the Dairy Herd Improvement Program of the Holstein Association of Colombia for the 305 day 2X milk production. The data were used to determine the allelic and genotypic frequency of the k-casein gene and the correlation between the haplotypes and protein content, casein percent and 305 day 2X milk production projection. The genotype frequency was 57.41% for haplotype AA, 37.04% for haplotype AB and 5.55% for haplotype BB. The allelic frequency was 75.93% for allele A and 24.07% for allele B. There was a high significant correlation between the haplotypes and the protein percent in the milk ($R > .975$) being the BB haplotype superior to the AB and AA haplotypes. On the other hand, there was no significant correlation between the haplotypes and the casein percent nor the 305 day 2x milk production projection, even though the BB haplotype always showed higher values than the others.

Keywords: allele, haplotypes, PCR, RFLP, gene frequency

INTRODUCCIÓN

El uso de técnicas moleculares para la selección de animales con características productivas superiores ha sido preocupación de centros de investigación animal en los últimos años. En cuanto a producción de leche, se ha aplicado la selección genética con el fin de obtener un producto con características

¹Bact., M.Sc. Unidad de Genética Molecular - Asociación Holstein de Colombia.

² M.V., M.Sc., Ph.D. Profesor Asociado Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia.

nutricionales superiores tanto para el consumo humano directo como para la elaboración de productos lácteos.

El valor de la leche como materia prima para la elaboración de queso depende principalmente del contenido de grasa y proteína, constituyendo la caseína casi el 80% de las proteínas, y su componente, la kappa-caseína, responsable de coagulabilidad y formación del cuajo (Alais, 1985).

La mayoría de los alelos del gene de la caseína han sido identificados a nivel molecular, diferenciándose no mas que por la sustitución de algunas bases en su secuencia, lo que conlleva a la expresión final de una proteína con características físicas y químicas diferentes (Schaar, 1981). El gene bovino de la k-caseína ha sido caracterizado a nivel de secuencia de nucleótidos (Alexander et al, 1988), este codifica una proteína de 169 aminoácidos con diferencias entre los alelos más comunes: A y B. En el residuo 136, la proteína del alelo A tiene el aminoácido TRP (ACC), mientras que la del alelo B tiene el aminoácido ILE (ATC). Igualmente, existe una mutación en el residuo 148 donde el ASP (GAT) en el alelo A es sustituido por ALA (GCT) en el alelo B. Estas diferencias pueden ser detectadas por técnicas moleculares (Denicourt et al, 1990; Medrano y Aguilar, 1990) que se basan en el uso de PCR-RFLP's.

Muchos trabajos se han centrado en la búsqueda de relaciones existentes entre los haplotipos (genotipo) del gen de la k-caseína y características de producción de leche, encontrando resultados variables con respecto a producción de leche en una o varias lactancias, composición de la leche y propiedades de procesamiento de la leche (Jakob, 1994; Shaar et al, 1985).

La relación entre estas variables podría usarse en la selección de animales para los hatos comerciales, ofreciendo una herramienta útil para mejorar las características de la leche, siempre y cuando exista la posibilidad en el mercado de premiar con mejor precio a los productores que brinden leche de mejores cualidades.

Con base en lo anterior, se diseñó este estudio para determinar la frecuencia genotípica y génica de los alelos de la k-caseína y establecer posibles correlaciones entre los haplotipos de la k-caseína y características de producción de leche en vacas Holstein de primer parto en la Sabana de Bogotá.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de sangre y leche

Para el estudio fueron seleccionados 54 animales Holstein de primer parto en la Sabana de Bogotá, los cuales estaban debidamente registrados y se encontraban en el programa de control lechero de la Asociación Holstein de Colombia (AsoHolstein).

(k-CN) en la Unidad de Genética Molecular (UGM) de la AsoHolstein (Medrano y Aguilar, 1990).

La leche se tomó del ordeño de la tarde, se agitó la cantina durante varios minutos y se recogió una muestra representativa de 150 cm³ para ser mantenida a 4°C hasta su posterior análisis en el laboratorio físico-químico de Alpina Productos Alimenticios S.A.

Análisis de los componentes de la leche

Sobre la leche recolectada se determinaron, el porcentaje de proteína (P), el porcentaje de caseína (C), el porcentaje de grasa (G), el contenido de lactosa (L), los sólidos no grasos (SNG) y los sólidos totales (ST).

Los componentes P, G, L, SNG y ST se analizaron con el Milkoscan (Foss Electric), y la C se analizó por el método de Kjeldahl, según el protocolo elaborado por Alpina Productos Alimenticios S.A. (Alpina, 1997)

Proyección de leche a 305 días 2X

Este valor se calculó teniendo en cuenta la producción proyectada a 305 días 2X del programa de Mejoramiento Lechero Holstein de la AsoHolstein.

Genotipificación de los animales

La extracción del ADN se hizo a partir de linfocitos, mediante el protocolo estandarizado por la UGM de la AsoHolstein. Al ADN purificado se le probó su concentración y calidad en geles de agarosa con tinción de bromuro de etidio, por medio del protocolo estandarizado por la UGM de la AsoHolstein (Asociación Holstein, 1997).

Se siguió el protocolo de genotipificación para la k-CN por PCR-RFLP elaborado por el Saskatchewan Research Council de Canadá y estandarizado en la UGM de la AsoHolstein (Asociación Holstein, 1997), amplificando un producto de 530 bp ubicado entre las posiciones 10565 a 11095 del gen de la k-CN, donde existe la mutación A/C en la posición 380.

La reacción de PCR se hizo en un microtubo de 0.5 ml en un termociclador (PTC-100, Perkin Elmer) con los siguientes reactivos: ADN (50 ng): 1.5 µl; los primers (6) K1 y K2, 2.5 µl de cada uno; dNTPs (10 mM): 2.0 µl de cada uno; 5.0 µl de buffer 10X; 6.0 µl de MgCl₂; 0.2 µl de Taq Pol I (Perkin Elmer) y 24.3 µl de agua calidad HPLC, para un volumen total de 50.0 µl. Los pasos que constituyeron un ciclo fueron: 94°C/30s, 51°C/30s y 72°C/40s, repitiéndose 30 veces el ciclo, con un período de extensión final de 5 minutos.

La restricción enzimática se hizo a 37°C/2h usando 10 µl del producto de PCR, 1 µl de Hind III (Promega), 1.6 µl de buffer de restricción y 5.0 µl de agua calidad HPLC.

El producto obtenido se sembró en un gel de agarosa al 2% con TBE1X, junto a marcadores de peso molecular conocido

La muestra de sangre y de leche se hizo el día 150 de la lactancia. La sangre se colectó de la vena caudal o mamaria, en un tubo con EDTA al 13% y se mantuvo a 4°C hasta su posterior genotipificación para la k-caseína (DNA ladder: Promega); se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz UV. Los haplotipos se interpretaron de la siguiente manera: una banda clara de ADN: haplotipo AA (530 bp), dos bandas claras: haplotipo BB (150 y 380 bp) y tres bandas claras: haplotipo AB (530,380 y 150 bp).

Diseño experimental

Los datos sobre proteína, caseína y proyección de producción de leche a 305 días fueron correlacionados con los haplotipos resultantes. Los promedios obtenidos para las diferentes variables se compararon mediante la prueba *t* de Student. La frecuencia genotípica fue sometida a la prueba de *chi cuadrado* para comprobar su equilibrio Hardy-Weinberg.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Animales en estudio

Los animales en estudio tuvieron una edad promedio de 974 días (32.5 meses) al rimer parto, con una desviación estándar de 168 días. La muestra de leche y sangre fue recolectada en promedio a los 150.5 ± 3.7 días de lactancia.

Análisis bromatológico

Los resultados del análisis de las muestras de leche se encuentran en la Tabla 1. Los datos obtenidos en este trabajo están de acuerdo con lo reportado por Alpina Productos Alimenticios S.A. para animales de la raza Holstein en la Sabana de Bogotá, bajo condiciones de pastoreo para el año de 1996.

COMPONENTE	%
Proteína	2.94 ± 0.22
Caseína	2.15 ± 0.22
Grasa	3.44 ± 0.53
Lactosa	4.94 ± 0.18
Sólidos no-grasos	8.40 ± 0.33
Sólidos totales	11.84 ± 0.64

Tabla 1. Contenido promedio de componentes de la leche de la población en estudio.

Frecuencia génica y genotípica

La frecuencia genotípica observada fue de 57.41 % para el haplotipo AA, 37.04% para el haplotipo AB y de 5.55% para el haplotipo BB (Figura 1 y 2). Estas frecuencias son similares a las reportadas anteriormente (Famula y Medrano, 1994; Lin et al, 1988; Medrano y Aguilar, 1990; Ng-Kwai-Hang et al, 1986) para la raza Holstein en otros países. La prueba de *chi cuadrado* mostró que la población está en equilibrio Hardy-Weinberg.

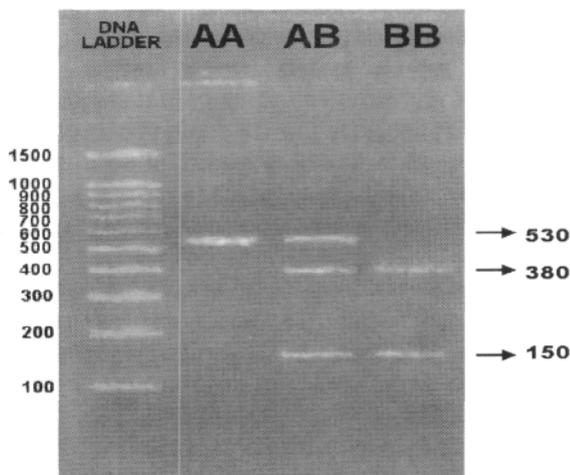


Figura 1. Gel de agarosa con los haplotipos de la k-caseína

La frecuencia génica fue de 75.93% para el alelo A y de 24.07% para el alelo B (Figura 2). Estos datos se encuentran dentro de lo esperado para la raza Holstein a nivel mundial (Un et al, 1988; McLean et al, 1984; Sabour et al, 1993; Schaar, 1981), aunque se observa una mayor frecuencia del haplotipo BB, si se compara con los estudios realizados en otros países. Esto tal vez puede ser el resultado del uso de semen de toros provenientes de varios países o el favoritismo hacia toros de cierta constitución genética sin tener conocimiento del genotipo de este.

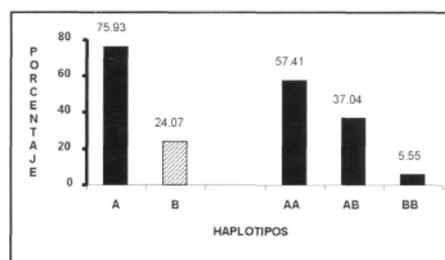


Figura 2. Frecuencia génica y genotípica de la k-caseína en la población Holstein en la Sabana de Bogotá

Correlación entre el porcentaje de proteína y los haplotipos de la k-CN

Los resultados de la Tabla 3 muestran que entre los haplotipos y el porcentaje de proteína en la leche existe una alta correlación (0.99) con alta significancia estadística ($P > .975$). Estos resultados están de acuerdo con los reportados por varios autores (Aleandri et al, 1990; Mariani et al, 1976; NG-Kwai-Hang et al, 1990; Sacchi et al, 1993), quienes han encontrado un mayor aporte del alelo B frente al alelo A (BB>AB>AA) para este parámetro. El haplotipo BB tuvo un aumento de +0.28 sobre la media poblacional, mientras que el del AB fue de +0.05 y el del AA fue de -0.06 (Figura 3), demostrando que el alelo B sería un buen indicador de los niveles de proteína en leche que puede producir una vaca Holstein en la Sabana de Bogotá.

Tabla 2. Haplotipos, frecuencia genotípica y características de producción en la población Holstein de la Sabana de Bogotá

Haplotipo	Número de animales	Frecuencia observada	Proteína (%)	Caseína (%)	Proyección a 305 días 2X (Kg)
AA	31	0.5741	2.79	2.15	5377
AB	20	0.3704	2.92	2.12	5016
BB	3	0.0555	3.13	2.29	5670
Media			2.85	2.15	5262
Suma	54	1.0000			
r =			0.99	0.77	0.45
P >			0.975	0.850	0.650

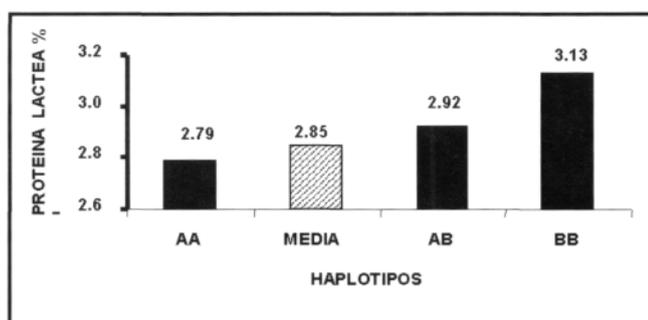


Figura 3. Porcentaje de proteína en leche y su relación con los haplotipos de la k- caseína

Correlación entre el porcentaje de caseína y los haplotipos de la k-CN

Aunque no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los haplotipos y el porcentaje de caseína en la leche; se notó un aumento considerable del haplotipo BB con +0.14 sobre la media poblacional (Tabla 2). También se encontró una disminución del haplotipo AB con -0.02 sobre la media poblacional y el haplotipo AA. Estos resultados coinciden con otro reporte (21), aunque no con otros estudios en los que se ha demostrado la influencia que tiene el alelo B sobre esta característica (11,13,16,17). Esto puede ser debido a que el porcentaje de caseína en la leche es tal vez debido a una acción poligénica o tiene una influencia medio ambiental.

Correlación entre los haplotipos de la k-CN y la producción total de leche proyectada a 305 días 2X

Para este parámetro tampoco se encontró una correlación estadísticamente significativa con los haplotipos de la k-CN, aunque se notó una gran diferencia entre el haplotipo BB con +408 sobre la media poblacional y los demás haplotipos: AA con +115 y AB con -242. Resultados similares reportados anteriormente (9, 22), indican que aunque este gene puede estar ligado a la producción de leche, son muchos los genes y factores que están relacionados con este parámetro de producción.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los estudios genéticos de las variantes de la k-CN han demostrado la influencia que estas tienen sobre las características de producción de leche como el porcentaje de proteína y caseína principalmente. El haplotipo BB de la k-CN ha demostrado ser un indicador que puede anticipar el rendimiento proteico de la leche.

La frecuencia genotípica y génica del alelo B de la k-CN en la población Holstein de la Sabana de Bogotá ha demostrado ser ligeramente superior a las obtenidas en otros países. Esto puede ser el resultado de la diversidad genética que tiene el ganado Holstein colombiano en nuestro país, donde se congrega gran cantidad de material genético proveniente de diversos países.

Aunque no se encontró una correlación significativa entre los haplotipos de la k-CN y el porcentaje de caseína total, si se observa una tendencia a mayores concentraciones de caseína con el haplotipo BB.

Dado que ya existe gran variedad de marcadores moleculares comercialmente disponibles, tanto para la producción como para sanidad animal, se debe propender por la utilización de estos en programas de selección hacia animales con constituciones genéticas que se adapten a las condiciones actuales del mercado.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo se pudo llevar a cabo gracias a la colaboración de la Asociación Holstein de Colombia y la Unidad de Genética Molecular, Alpina Productos alimenticios S.A., Bovine Blood Lab del Saskatchewan Research Council de Canadá y Programa de Biotecnología Animal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Alais, C.** 1985. La ciencia de la leche. Reverte. Barcelona, España. 103-204.
- Aleandri, R., L.Q. Buttazzoni, J.C. Schnelder, A. Caroli & R. Davoli.** 1990. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese producing ability. *J. Dairy Sci.* 73. 241-55.
- Atexander, L.J., A.F. Stewart, A.G. Me KJnlly, T.V. Kapelinilcya, T.M. Tkach & S.I. Gorodetsky.** 1988. Isolation and characterization of the bovine k-casein gene. *European Journal of Bkxhemistry.* 178.395-401.
- Alpina Productos Alimenticios S.A.** 1997. Laboratorio Físico-químico. Protocolos de Laboratorio.
- Asociación Holstein de Colombia.** 1997. Unidad de Genética Molecular. Protocolos de Laboratorio.
- Denicourt, D., P. Sabour & A.J. Me Allster.** 1990. Detection of bovine k-casein genomic variants by the polymerase chain reaction method. *Animal Genetics.* 21.215-6.
- Fámula, T. & J.F. Medrano.** 1994. Estimation of genotype effects for milk proteins with animal and sire transmitting ability models. *J. Dairy Sci.* 77.3153-62.
- Jakob, E.** 1994. Genetic polymorphisms of milk proteins. *Bulletin of the International Dairy Federation.* 298.17-27.
- Lin, C.Y., A.J. Me Allster, K.F. NG-Kwai-Hang ft J.F. Mayes.** 1988. Effects of milk protein loci on first lactation production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 69.704-12.
- Mariani, P., G. Los!, V. Russo, G.B. Castagnetti, L. Grazia, D. Morini & E. Fossa.** 1976. Prove di caseifiqazione con latte caratterizzato dalle varianti A e B della k-casekia nella produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* 27. 208-27.
- Mariani, P., D. Morini, G.B. Castagnetti ft G. Los!.** 1983. Composizione azotata e minerale del latte in rapporto al genotipo delle vacche nel locus k-caseina. *Atti del 5 Congresso nazionale. Associazione Scientifica di Produzione Aniamle (Italian).* 187-94.
- Me Lean, D., B. Graham & R. Ponzoni.** 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J. Dairy Res.* 51. 531-46.
- Medrano, J.F. & E. Aguilar-Cordova.** 1990. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Btotechnology.* 8. 144-6.
- NG-Kwai-Hang, K.F., J.F. Mayes, J.E. Moxley & H.G. Monardes.** 1986. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 69. 22-6.
- NG-Kwai-Hang, K.F., H.G. Monardes & J.F. Hayes.** 1990. Association between genetic polymorphisms of milk proteins and production traits during three lactations. *J. Dairy Sci.* 73. 3414-20.
- Rahali, V. & J.L. Menard.** 1991. Influence des variants génétiques de la lactoglobuline et la caséine sur la composition du lait et son aptitude fromagere. *Lait.* 71. 275-97.
- Ramplli, M., A. Caroli, P. Bolla & G. Pirlo.** 1988. Relazioni tra genotipi lattoproteici, composizione caseinica e attitudine alia coagulazione del latte nel corso della lattazione. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* 39. 262-79.
- Sabour, C., C.Y. Lin, S.M. Keough, S.M. Mechanda & A.J. Lee.** 1993. Effects of selection practiced on the frequencies of genetic k-casein and b-lactoglobulin genotypes in canadian artificial insemination bulls. *J. Dairy Sci.* 76. 274-80.
- Sacchi, P., E. Cauvin & R.M. Tur!.** 1993. Relazione tra genotipi lattoproteici e caratteristiche produttive nel corso di due lattazioni in bovine FrisoneaJtevatteinprovtaadiTorini. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* 44. 20-32.
- Schaar, J.** 1981. Casein stability and cheesemaking properties of milk effects of handHng mastitis and genetic variation. Department of Animal Breeding and Genetics. Swedish University of Agricultural Sciences. Report52.
- Schaar, J., B. Hanson & H.E. Petterson.** 1985. Effects of genetic variants of k-casein and b-lactoglobulin on cheesemaking. *J. Dairy Res.* 52. 429-37.
- Van Eenennaam, A. & J.F. Medrano.** 1991. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74. 1730-42.