

## **Análisis genético de cinco polimorfismos de nucleótido simple de caseínas lácteas obtenidos con chips genómicos en ganado Holstein de Antioquia, Colombia**

*J. Padilla-Doval<sup>1\*</sup>, J. C. Zambrano-Arteaga<sup>2</sup>, J. J. Echeverri-Zuluaga<sup>3</sup>,  
A. López-Herrera<sup>4</sup>*

*Artículo recibido: 2 de septiembre de 2020 - Aprobado: 14 de enero de 2021*

### **RESUMEN**

Los polimorfismos genéticos asociados con las caseínas de la leche son de gran importancia, ya que pueden ser usados como marcadores genéticos para mejorar el rendimiento productivo en los hatos lecheros. El objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad y estructura genética de 5 SNP de caseínas de la leche, obtenidos con chips genómicos en vacas y toros de raza Holstein en Antioquia (Colombia). Fueron muestreados 113 animales de raza Holstein en 3 regiones del departamento de Antioquia (norte, centro y oriente) y un cuarto grupo de sementales comerciales. Los animales fueron genotipificados con chips genómicos de alta densidad (*Illumina BovineHD* e *Illumina SNP50 v2*), a partir de los cuales se identificaron 5 SNP (ARS-BFGL-NGS-8140, BTA-77380-no-rs, BTA-32346-no-rs, BTB-00821654 y ARS-BFGL-NGS-15809). Para cada SNP se realizó un análisis genético mediante un análisis de varianza molecular (amova) usando el *software* GenAIEx 6.501. Los SNP con mayor heterocigosidad total ( $H_T$ ) fueron ARS-BFGL-NGS-8140 y BTA-32346-no-rs, con resultados cercanos al 45%; sin embargo, la  $H_T$  para ARS-BFGL-NGS-15809, BTA-77380-no-rs y BTB-00821654 estuvo por debajo del 15%. El SNP con mayor diversidad genética fue BTA-32346-no-rs ( $H_o-H_e = 0,06$ ;  $p < 0,05$ ). En esta investigación se evaluó una subpoblación de toros comerciales extranjeros, en la cual se obtuvieron frecuencias alélicas y genotípicas similares a las obtenidas para las subpoblaciones locales, sugiriendo que los alelos de los toros muy posiblemente están fijados en dichas subpoblaciones, por lo que la estructura y diversidad genética tienden a ser bajas en la muestra de estudio.

**Palabras claves:** beta-caseína, kappa-caseína, producción de leche, marcador genético.

<sup>1</sup> Grupo de Investigación Navarra Medicina. Facultad de Ciencias de la Salud. Fundación Universitaria Navarra (Uninavarra). Calle 10 N.º 6-41, Neiva, Colombia. [j.padilla@uninavarra.edu.co](mailto:j.padilla@uninavarra.edu.co).

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Bioquímica-Estudios Genéticos (Biogen). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Nariño (Udenar). Calle 18, carrera 50-02, Ciudadela Universitaria Torobajo, San Juan de Pasto, Colombia.

<sup>3</sup> Grupo de Investigación en Biodiversidad y Genética Molecular (Biogen). Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (Unalmed). Calle 59A N.º 63-20, Núcleo El Volador, bloque 50, oficina 310, Medellín, Colombia.

<sup>4</sup> Grupo de Investigación en Biodiversidad y Genética Molecular (Biogen). Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (Unalmed). Calle 59A N.º 63-20, Núcleo El Volador, bloque 50, oficina 310, Medellín, Colombia.

## Genetic analysis of five single nucleotide polymorphisms of dairy caseins obtained with genomic chips in Holstein cattle from Antioquia, Colombia

### ABSTRACT

Genetic polymorphisms associated with milk caseins have a great importance since they can be used as genetic markers to improve productive performance in dairy herds. The main goal of the present study was to evaluate the diversity and genetic structure of 5 SNPs of milk caseins, obtained with genomic chip in Holstein cows and bulls from Antioquia (Colombia). 113 Holstein animals were sampled in 3 regions of Antioquia (north, center, and east), and a fourth group of commercial sires. Animals were genotyped with high-density SNP chips (Illumina BovineHD and Illumina SNP50 v2), from which 5 SNPs were identified (ARS-BFGL-NGS-8140, BTA-77380-no-rs, BTA-32346-no-rs, BTB-00821654 and ARS-BFGL-NGS-15809). For each SNP, a genetic analysis was performed by means of an analysis of molecular variance (AMOVA) using the GenAIEx 6.501 software. The SNPs with the highest total heterozygosity ( $H_T$ ) were ARS-BFGL-NGS-8140 and BTA-32346-no-rs, with results close to 45%; however, the  $H_T$  for ARS-BFGL-NGS-15809, BTA-77380-no-rs, and BTB-00821654 were below 15%. The SNP with the highest genetic diversity was BTA-32346-no-rs ( $H_o-H_e = 0,06$ ;  $p < 0,05$ ). In this research a subpopulation of foreign commercial bulls was evaluated, in which similar allelic and genotypic frequencies to those for local subpopulations were obtained, suggesting that the alleles of the bulls are very possibly fixed in these subpopulations, so that the structure and genetic diversity tend to be low in the study sample.

**Keywords:** Beta-casein, Kappa-casein, Milk yield, Genetic marker.

### INTRODUCCIÓN

Las caseínas son las proteínas más abundantes de la leche y representan el 80% de las proteínas lácteas (Kaskous 2020; Martien *et al.* 1994). Estas se agrupan en  $\alpha_{s1}$ -caseína ( $\alpha_{s1}$ -CN),  $\alpha_{s2}$ -caseína ( $\alpha_{s2}$ -CN),  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN) y  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -CN) (Broyard y Gautheron 2015; Rehan *et al.* 2019). El perfil de caseínas de las razas bovinas especializadas en producción de leche ha sido mejorado genéticamente, lo que ha aumentado los rendimientos en productos como queso y leches ácidas. Así, la industria alimentaria obtiene el máximo beneficio cuando emplea como materia prima leche de buena calidad con valores elevados de proteína (Solarte *et al.* 2011; Wedholm *et al.* 2006).

Sin embargo, es importante considerar que el consumo de leche de vaca está

asociado con una mayor incidencia de enfermedades en humanos (Aune *et al.* 2015; Clarke y Trivedi 2014; Miluchová *et al.* 2013). Al final de la década de 1990, algunas investigaciones sugirieron que el consumo de la variante A1 de la  $\beta$ -caseína, presente en la leche de vaca, es un factor de riesgo de diabetes mellitus tipo 1, cardiopatía isquémica, síndrome de muerte súbita del lactante (Sids), aterosclerosis, autismo, esquizofrenia y alteraciones del funcionamiento neurológico (Bekuma y Galmessa 2019; Jaiswal *et al.* 2014; McLachlan 2001; Sun *et al.* 2003). Se ha determinado que la variante A1 de la  $\beta$ -caseína produce el péptido bioactivo beta-casomorfina-7 (BCM-7) mediante el proceso de digestión. Este heptapéptido atraviesa las microvellosidades intestinales

y sistémicamente conduce al desarrollo de las enfermedades mencionadas (Jaiswal *et al.* 2014; Jianqin *et al.* 2016).

En virtud de lo anterior, se resalta la importancia de realizar investigaciones encaminadas a conocer la genética de los hatos bovinos y su relación directa con la composición de las proteínas lácteas, tanto para mejorar la producción de quesos y leches ácidas, como para mejorar la calidad sanitaria de la leche que conduzca al consumo de productos lácteos inocuos para la salud humana.

Diversos estudios realizados en ganado bovino lechero demuestran la utilidad de usar marcadores genéticos para mejorar características productivas de importancia económica como una forma de ayudar en la selección de caracteres cualitativos y cuantitativos de animales de alto desempeño. Estos marcadores aportan información sobre la identificación, distinción y estimación de distancias genéticas entre poblaciones, líneas puras e híbridos (Dias *et al.* 2009).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la diversidad y estructura genética de 5 SNP de caseínas de la leche, obtenidos con chips genómicos en vacas y toros de raza Holstein en Antioquia (Colombia).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación fue realizada en la región lechera del departamento de Antioquia, que cubre zonas de bosque muy húmedo montano bajo (bmh-mb), con una temperatura que oscila entre 12 y 18°C y un promedio anual de lluvias entre 2000 y 4000 mm/año, en una faja altimétrica de 1800 a 2800 m s. n. m. Esta investigación fue avalada por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, considerando

que cumple con los estándares para este tipo de investigación (número de la carta de aprobación: cemed-015, 2012).

## Extracción de ADN

La muestra incluyó 113 animales de la raza Holstein: 86 muestras de sangre provenientes de vacas y 27 muestras provenientes de semen de toros comerciales. Para el primer grupo se colectaron 5 ml de sangre periférica en tubos al vacío con Edta como anticoagulante y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN mediante el método DNeasy Blood & Tissue Kit. Para la extracción de ADN, a partir de semen, se compraron pajillas comerciales de 250 y 400 µl y se empleó el método QIAamp® DNA Mini Kit, Protocol 1, para la obtención del material genómico.

## Genotipificación de animales con chips de alta densidad

Las pruebas de genotipificación fueron realizadas en un laboratorio especializado de la Universidad de Milán (Italia). Para la genotipificación se usaron 2 *beadchips* de Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA) de diferente densidad: el *beadchip* BovineHD, que contiene 777.962 marcadores, y el chip BovineSNP50 v2, con 54.609 marcadores. Con el chip SNP50 v2 fueron genotipificados 65 animales y, con el *beadchip* HD, 48. Después de aplicar el control de calidad (*call rate* > 0,90), fueron seleccionados 5 SNP comunes en los 2 *beadchips* para la realización de este estudio. La edición de los genotipos fue realizada con los programas SAS v9.1 y PLINK 1.9. Los animales genotipificados fueron muestreados en 8 municipios de 3 zonas diferentes del departamento de Antioquia (norte, centro y oriente) y

un grupo denominado extranjero, que corresponde a los toros élite provenientes de diferentes países del mundo y que son ampliamente usados en el departamento de Antioquia (tabla 1).

**TABLA 1.** Distribución de los animales genotipificados con chips de alta densidad por municipios y regiones del departamento de Antioquia

Región	Número de animales/ región	Municipio	Número de animales/municipio
Norte	32	Belmira	9
		Entrerriós	13
		San Pedro	10
Centro	27	Bello	9
		Medellín	18
		La Unión	9
Oriente	27	Marinilla	6
		Rionegro	12
Extranjero	27	Extranjero	27

Fuente: elaboración propia.

## Selección de marcadores

Los 5 SNP seleccionados para realizar el presente estudio fueron asociados con las proteínas mayoritarias de la leche ( $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína), de acuerdo con los resultados obtenidos por Schopen *et al.* (2011) y Fang *et al.* (2019) (tabla 2).

## Análisis genético

La frecuencia de los diferentes alelos  $f(A)$  y  $f(B)$  se realizó determinando la proporción de cada forma del gen entre el número de copias totales de la población en estudio. Se identificaron los homocigóticos (2 copias del mismo alelo) y los heterocigóticos (1 copia de cada alelo) y se calculó la frecuencia  $F$  de cada alelo contando los homocigóticos y añadiendo la mitad de los heterocigóticos, según el método descrito por Hartl (2000).

A partir de las frecuencias alélicas  $f(A)$  y  $f(B)$  y genotípicas  $f(AA)$ ,  $f(AB)$  y  $f(BB)$  de los 5 SNP, se determinó la deficiencia o exceso de heterocigotos para el locus en cada población y para la población total con la prueba exacta de Hardy Weinberg (HW), según Guo y Thompson (1992). La diversidad genética se determinó mediante la comparación de la heterocigosidad

**TABLA 2.** SNP seleccionados para el análisis genético en el presente estudio

SNP	Cromosoma	Posición/ cromosoma	Proteína asociada	Variación	Ensamble	Referencia
ARS-BFGL-NGS-8140	1	149.189.841	$\alpha_{s2}$ -CN	[A/G]	BTAU4.0	Fang <i>et al.</i> (2019);
BTA-32346-no-rs	13	38.193.375	$\alpha_{s1}$ -CN	[T/G]	BTAU4.0	Liu <i>et al.</i> (2009);
BTA-77380-no-rs	6	95.988.438	$\beta$ -CN	[A/G]	BTAU4.0	Schopen <i>et al.</i> (2011)
BTB-00821654	21	47.056.558	$\kappa$ -CN	[A/G]	BTAU4.0	
ARS-BFGL-NGS-15809	22	52.343.527	$\alpha_{s1}$ -CN	[T/C]	BTAU4.0	

Fuente: elaboración propia con base en las fuentes mencionadas en la tabla.

observada ( $H_O$ ) y la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) entre las poblaciones para los 5 SNP seleccionados (Guo y Thompson 1992). La estructura genética se calculó mediante los estadísticos F de Wright:  $F_{IT}$ , que corresponde a la endogamia global;  $F_{IS}$ , que mide la subdivisión intrapoblacional; y el  $F_{ST}$ , que mide la subdivisión poblacional (Wright 1969). Esta se calculó tanto para la población global como para las subpoblaciones, utilizando para esto, el análisis de varianza molecular (amova), que permite analizar la variación entre, y dentro de, poblaciones con su respectiva significancia estadística, bajo la hipótesis nula de que los alelos o genotipos tienen la misma distribución en todas las subpoblaciones. También se determinó el flujo génico ( $Nm$ ) como lo describe Provine (2001).

Todos los análisis de frecuencias alélicas y genotípicas, estructura genética y diversidad genética fueron realizados usando el programa GenAIEx 6.501 (Peakall y Smouse 2012).

**RESULTADOS**

Los alelos A y B para los SNP BTA-32346-no-rs y ARS-BFGL-NGS-15809 presentan una frecuencia alélica muy diferente en cuanto a la población global y las subpoblaciones (tabla 3). Para los alelos A y B del SNP BTA-77380-no-rs en la población global, las frecuencias fueron 0,08 y 0,92, respectivamente; mientras que para el SNP BTB-00821654 en la población global para los alelos A y B fueron 0,05 y 0,95.

Las frecuencias genotípicas mostraron que el genotipo de mayor ocurrencia en

**TABLA 3.** Frecuencias alélicas de 5 SNP en 3 subpoblaciones del departamento de Antioquia y 1 subpoblación de toros extranjeros

SNP	Alelo	Centro	Extranjero	Norte	Oriente	Población global
ARS-BFGL-NGS-8140	N	25	20	31	27	103
	A	0,60	0,55	0,68	0,69	0,63
	B	0,40	0,45	0,32	0,32	0,37
BTA-32346-no-rs	N	27	27	32	27	113
	A	0,56	0,70	0,67	0,70	0,66
	B	0,44	0,29	0,33	0,29	0,34
ARS-BFGL-NGS-15809	N	27	27	32	27	113
	A	0,02	0,09	0,14	0,02	0,07
	B	0,98	0,91	0,86	0,98	0,93
BTA-77380-no-rs	N	25	27	31	27	110
	A	0,08	0,07	0,11	0,04	0,08
	B	0,92	0,93	0,89	0,96	0,92
BTB-00821654	N	27	27	32	27	113
	A	0,04	0,04	0,05	0,07	0,05
	B	0,96	0,96	0,95	0,93	0,95

N: tamaño de la muestra.  
Fuente: elaboración propia.

la población global es el BB y el de menor frecuencia es el AA en los SNP ARS-BFGL-NGS-15809, BTA-77380-no-rs y BTB-00821654, mientras que el genotipo más frecuente en los SNP ARS-BFGL-NGS-8140 y BTA-32346-no-rs es el AB. La frecuencia del genotipo AB para el SNP ARS-BFGL-NGS-8140 en la población global fue 0,48, que corresponde a una mayor cantidad de animales heterocigotos en la población. Por último, para el SNP

BTB-00821654, el genotipo predominante en la población global fue el BB, con una frecuencia genotípica de 0,91 (tabla 4).

En el análisis genético para los 5 SNP, se determinó que la mayoría de las subpoblaciones se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg ( $p > 0,05$ ), a excepción de las subpoblaciones norte y oriente, específicamente para las regiones BTA-32346-no-rs y BTB-00821654, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ) (tabla 5).

**TABLA 4.** Frecuencias genotípicas de 5 SNP de 3 subpoblaciones del departamento de Antioquia y una subpoblación de toros extranjeros

SNP	Genotipo	N	Centro	N	Extranjero	N	Norte	N	Oriente	N Total	Población global
ARS-BFGL-NGS-8140	AA	11	0,44	6	0,30	13	0,42	11	0,41	103	0,40
	AB	8	0,32	10	0,50	16	0,52	15	0,56		0,48
	BB	6	0,24	4	0,20	2	0,06	1	0,04		0,13
BTA-32346-no-rs	AA	8	0,30	13	0,48	12	0,38	13	0,48	113	0,41
	AB	14	0,52	12	0,44	19	0,59	12	0,44		0,50
	BB	5	0,19	2	0,07	1	0,03	2	0,07		0,09
ARS-BFGL-NGS-15809	AA	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	113	0,00
	AB	1	0,04	5	0,19	9	0,28	1	0,04		0,14
	BB	26	0,96	22	0,81	23	0,72	26	0,96		0,86
BTA-77380-no-rs	AA	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	110	0,00
	AB	4	0,16	4	0,15	7	0,23	2	0,07		0,15
	BB	21	0,84	23	0,85	24	0,77	25	0,93		0,85
BTB-00821654	AA	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,04	113	0,01
	AB	2	0,07	2	0,07	3	0,09	2	0,07		0,08
	BB	25	0,93	25	0,93	29	0,91	24	0,89		0,91

N: tamaño de la muestra.

Fuente: elaboración propia.

**TABLA 5.** Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg para 5 SNP de 3 subpoblaciones del departamento de Antioquia y 1 subpoblación de toros extranjeros

SNP	Subpoblaciones	$\chi^2$	p-valor
ARS-BFGL-NGS-8140	Centro	2,78	0,09
	Extranjero	0,00	0,96
	Norte	1,02	0,31
	Oriente	2,24	0,14
BTA-32346-no-rs	Centro	0,07	0,79
	Extranjero	0,12	0,73
	Norte*	3,85	0,05
	Oriente	0,12	0,73
ARS-BFGL-NGS-15809	Centro	0,01	0,92
	Extranjero	0,28	0,59
	Norte	0,86	0,36
	Oriente	0,01	0,92
BTA-77380-no-rs	Centro	0,18	0,66
	Extranjero	0,17	0,68
	Norte	0,50	0,48
	Oriente	0,04	0,84
BTB-00821654	Centro	0,04	0,84
	Extranjero	0,04	0,84
	Norte	0,08	0,78
	Oriente*	5,71	0,02

Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) tabulado para 1 grado de libertad = 3,8415. \*Significativo:  $p \leq 0,05$ .

Fuente: elaboración propia.

La heterocigosidad observada ( $H_O$ ) y esperada ( $H_e$ ) mostraron valores similares para cada SNP, excepto para BTA-32346-no-rs, en el que los valores de  $H_O$  y  $H_e$  fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) (tabla 6). En cuanto a la heterocigosidad total ( $H_T$ ), se tiene que es alta para los SNP ARS-BFGL-NGS-8140 y BTA-32346-no-rs, con valores de 0,47 y 0,45, respectivamente. Esto indica que

el número de individuos heterocigotos en las subpoblaciones estudiadas es alto. Además, estos 2 SNP presentan un número efectivo alto de alelos (1,86 y 1,79, respectivamente). Para los 3 SNP restantes ARS-BFGL-NGS-15809, BTA-77380-no-rs y BTB-00821654, las heterocigosidades son bajas (0,13, 0,14 y 0,09 respectivamente, al igual que el número efectivo de alelos (1,15, 1,17 y 1,10, respectivamente).

**TABLA 6.** Heterocigosidades para 5 SNP de 3 subpoblaciones del departamento de Antioquia y una subpoblación de toros extranjeros

SNP	N	Ne	H <sub>o</sub>	He	H <sub>T</sub>
ARS-BFGL-NGS-8140	103	1,86	0,47	0,46	0,47
BTA-32346-no-rs	113	1,79	0,50	0,44*	0,45
ARS-BFGL-NGS-15809	113	1,15	0,14	0,12	0,13
BTA-77380-no-rs	110	1,17	0,15	0,14	0,14
BTB-00821654	113	1,10	0,08	0,09	0,09

N: tamaño de la muestra, Ne: número efectivo de alelos, H<sub>o</sub>: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada, H<sub>T</sub>: heterocigosidad total. \*Significancia estadística:  $p \leq 0,05$ .

Fuente: elaboración propia.

**Tabla 7.** Estadísticos F de Wright para 5 SNP de 3 subpoblaciones del departamento de Antioquia y una subpoblación de toros extranjeros

SNP	N	Nm	F <sub>IS</sub>	F <sub>IT</sub>	F <sub>ST</sub>	%VAR
ARS-BFGL-NGS-8140	103	124,80	-0,021	-0,023	-0,002	0,0%
BTA-32346-no-rs	113	41,40	-0,123	-0,117	0,006	0,1%
ARS-BFGL-NGS-15809	113	5,80	-0,106	-0,061	0,041*	4,0%
BTA-77380-no-rs	110	83,10	-0,077	-0,080	-0,003	0,0%
BTB-00821654	113	17,60	0,153	0,141	-0,014	0,0%

N: tamaño de la muestra, Nm: flujo génico, %VAR: porcentaje de variación entre poblaciones. \*Significativo:  $p \leq 0,05$ .

Fuente: elaboración propia.

Finalmente, según el estadístico F<sub>ST</sub>, la población global posee una baja estructura genética, como se puede observar en la tabla 7, con valores que oscilan entre -0,002 y 0,041, a pesar de que se evaluó una subpoblación de toros extranjeros.

## DISCUSIÓN

En la selección genética, muchas frecuencias alélicas y genotípicas cambian significativamente, alterando la estructura genética de las poblaciones, hasta el punto de que algunas variantes se fijan en la población, mientras que otras desaparecen en un tiempo menor al que lo harían en condiciones naturales (Melka y Schenkel 2012). Entre los genes que más han mos-

trado cambios en sus frecuencias alélicas en las razas bovinas se encuentran los que expresan las caseínas de la leche (CSN1S1, CSN1S2, CSN3 y CSN2), los cuales codifican para  $\alpha_{S1}$ -caseína,  $\alpha_{S2}$ -caseína,  $\kappa$ -caseína y  $\beta$ -caseína, respectivamente. La  $\beta$ -caseína forma parte del *pool* de caseínas de la leche y se conocen 13 variantes proteicas codificadas por el gen CSN2; por ello, es el más polimórfico entre los genes que codifican proteínas lácteas. Las variantes más comunes en ganado Holstein para la  $\beta$ -caseína son A1 y A2. La frecuencia del alelo A1 en diferentes razas varía entre 0,06, en la raza Guernsey; 0,3-0,4, en la raza Holstein; y 0,72, en Danish Red (Kamiński *et al.* 2007). Solarte *et al.* (2011) encontraron un valor de 0,12 en



un hato colombiano de raza Holstein para el alelo A1. En un estudio realizado por Ramesha *et al.* (2016), se encontró una frecuencia para el alelo A1 de 0,169 en la raza Holstein, también más baja que la reportada por Kamiński *et al.* (2007). Esto se debe muy posiblemente a que los toros sementales usados en la actualidad son genotificados para este gen, por lo que se conocen sus formas alélicas; los toros seleccionados son aquellos con la forma alélica tipo A2 (Ramesha *et al.* 2016). En la presente investigación se analizó el SNP BTA-77380-no-rs asociado a  $\beta$ -caseína como lo reportan Schopen *et al.* (2011) y se determinó una frecuencia alélica, para el alelo A, de 0,08 y una de 0,92 para el alelo B. Este SNP está igualmente ubicado en el cromosoma 6, cercano al gen CSN2 que codifica para  $\beta$ -caseína (BTA6, posición 85449173-85457867), por lo que se sugiere que presenta frecuencias alélicas para los alelos A/B, cercanas a las variantes alélicas A1/A2 del gen CSN2 y se asume desequilibrio de ligamiento.

Es importante tener en cuenta que el consumo de leche tipo A1 (con presencia de  $\beta$ -caseína A1) está asociado a varias enfermedades en humanos (Jianqin *et al.* 2016; Kaskous 2020; Küllenberg *et al.* 2019; Laugesen y Elliott 2003). Por su parte, la forma A2 de la  $\beta$ -caseína ha sido asociada a disminución de colesterol total y disminución de la concentración de cLDL, las cuales forman un rol importante en la prevención de un amplio rango de enfermedades vasculares en humanos (Hanusová *et al.* 2010; Kamiński *et al.* 2007). Por lo anterior, es beneficioso que la frecuencia de la  $\beta$ -caseína A2 se incremente en la población (Kaskous 2020).

La  $\kappa$ -caseína, por otro lado, juega un papel clave en la formación, estabilización y agregación de las micelas de caseínas

de la leche, un aspecto importante en la industria quesera. En este sentido, los polimorfismos del gen CSN3 han sido usados en la selección asistida por marcadores moleculares para mejorar las características de la leche requerida en la producción de queso (Alipanah *et al.* 2007). Por ejemplo, el alelo B del gen CSN3 (cromosoma 6, posición 85645780-85658911), se asocia con resistencia térmica, menor tiempo de coagulación, micelas de diferentes tamaños, mejores cuajadas (Azevedo *et al.* 2008), mayor producción de proteínas y mayor producción de quesos (Patel *et al.* 2007). Garcia *et al.* (2009), reportaron una frecuencia de 0,173 para el alelo B, similar a la reportada por Ashraf *et al.* (2016), quienes obtuvieron una frecuencia de 0,20 para el mismo alelo. En este sentido, la frecuencia del alelo A es en promedio 4 veces mayor, considerando que el objetivo de la selección genética en la raza Holstein en muchos países, ha sido aumentar volúmenes de leche, más que mejorar las características composicionales de la misma, contrario a lo que sucede en otras razas como la Jersey (Ren *et al.* 2011; Zepeda *et al.* 2015).

Al evaluar la frecuencia alélica para el SNP BTB-00821654 en esta investigación, se obtuvo una frecuencia baja para el alelo A, de 0,05, por lo que se sugiere que es un alelo con tendencia a desaparecer por deriva genética. Posiblemente, este polimorfismo se asocie a los cambios realizados para mejorar los rendimientos en la composición de las proteínas lácteas, en este caso para  $\kappa$ -caseína, como lo evidenciaron Schopen *et al.* (2011).

Por otro lado, la leche que contiene una mayor proporción de las isoformas  $\alpha_{s1}$ -caseína y  $\alpha_{s2}$ -caseína con menor grado de fosforilación posee mejores propiedades de coagulación para hidrolizar

dichas isoformas más eficientemente por quimosina durante la elaboración de queso (Bijl *et al.* 2014). Además, las concentraciones de las isoformas de  $\alpha_{s1}$ -caseína y  $\alpha_{s2}$ -caseína en la leche varían considerablemente entre las vacas, por lo que es de gran interés evaluar la variación genética de las isoformas de  $\alpha_{s1}$ -caseína y  $\alpha_{s2}$ -caseína (Fang *et al.* 2017).

En una investigación realizada por Solarte *et al.* (2011), se determinó que la frecuencia para el alelo A de  $\alpha_{s2}$ -caseína presentó un valor de 0,99, lo que indica que este alelo está fijado en la población estudiada. En la presente investigación, la frecuencia para el alelo A del SNP ARS-BFGL-NGS-8140, asociado a  $\alpha_{s2}$ -caseína (Fang *et al.* 2017), fue de 0,63, indicando igualmente que está fijado en la población.

Por otra parte, en este estudio fueron determinadas la  $H_o$  y la  $H_e$ . Para el SNP BTA-32346-no-rs, asociado a  $\alpha_{s1}$ -caseína, se determinó un valor de  $H_o$  de 0,50 y de  $H_e$  de 0,44, valores que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Esto indica que hay diversidad genética entre las subpoblaciones para dicho polimorfismo. Además, la frecuencia de genotipos AB es alta y, por lo tanto, el número efectivo de alelos ( $N_e$ ) tiende a ser cercano a 2 ( $N_e = 1,79$ ). En un estudio realizado por Solarte *et al.* (2011), en una población de ganado Holstein colombiano, se determinó un valor de  $H_e$  de 0,40 y de  $H_o$  de 0,38 para el gen  $\alpha_{s1}$ -caseína (cromosoma 6, posición 85411601-85429256), resultado similar al obtenido para la presente investigación para los 2 polimorfismos evaluados. Por otra parte, los valores de  $H_o$  y  $H_e$  para el SNP BTA-77380-no-rs, asociado al gen de  $\beta$ -caseína, fueron 0,15 y 0,14. Estos resultados son similares a los reportados por Solarte *et al.* (2011), quienes determinaron valores de  $H_o$  de 0,21 y de  $H_e$  de 0,16.

Para los SNP ARS-BFGL-NGS-15809, asociado a  $\alpha_{s1}$ -CN; BTA-77380-no-rs, asociado a  $\beta$ -CN; y BTB-00821654, asociado a  $\kappa$ -CN, los valores de  $H_T$  fueron 0,13, 0,14 y 0,09, respectivamente. Se observa que son valores bajos, lo que indica una deficiencia de heterocigotos en la población estudiada para estos 3 polimorfismos, muy posiblemente como consecuencia de realizar procesos de selección animal en los hatos, puesto que los genes de caseínas están asociados directa o indirectamente con características de calidad de la leche (Mir *et al.* 2014; Zambrano *et al.* 2012). Considerando lo anterior, se sugiere que existe una pérdida de la variabilidad genética de la raza para estos polimorfismos, por la concentración de ciertas formas alélicas asociadas a un alto rendimiento en la producción de leche, y la disminución significativa de otras formas alélicas asociadas a la calidad de la proteína láctea.

Los valores de  $F_{ST}$  fueron bajos para todos los polimorfismos evaluados en esta investigación, oscilaron entre  $-0,002$  y  $0,041$ , lo que indica que la estructura genética es baja. Resultados similares fueron reportados por Echeverri *et al.* (2015), quienes determinaron un valor de  $F_{ST}$  de  $0,045$ , para el gen de  $\kappa$ -CN, indicando que la población presenta poca estructura genética para este gen, en subpoblaciones de ganado Holstein evaluadas en el departamento de Antioquia. De igual manera, el  $F_{ST}$  reportado para el gen  $\alpha_{s2}$ -CN también fue bajo ( $-0,0015$ ), lo que indica un ligero desarrollo de estructura genética para las subpoblaciones evaluadas en el departamento de Nariño (Solarte *et al.* 2011). Para todos los SNP evaluados en esta investigación, el coeficiente de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) fue bajo, indicando que la diferenciación genética entre las subpoblaciones evaluadas es mínima,

aun cuando se usó una subpoblación de toros extranjeros.

Es importante tener en cuenta la fuerte selección animal que ha ocurrido en los últimos 50 años en los países desarrollados, que ha mejorado características de producción y calidad de la leche e, indirectamente, ha seleccionado formas alélicas más rentables en términos económicos, tales como el gen de  $\kappa$ -CN, el cual mejora el rendimiento quesero. Incluso se han aumentado las frecuencias alélicas de genes que afectan o, por el contrario, mejoran la salud humana, como las formas A1 o A2 del gen de  $\beta$ -CN. Estos genes han sido y serán seleccionados como herramientas altamente útiles en la selección asistida por marcadores moleculares (Olenski *et al.* 2010).

## CONCLUSIONES

Las frecuencias alélicas y genotípicas de 3 de los SNP evaluados indican que se ha fijado 1 de los alelos en todas las subpoblaciones, lo que lleva a suponer que en la población global existe un alto grado de endogamia que genera una disminución de la heterocigosidad, provocada posiblemente por factores como la selección genética a la que han sido sometidas las subpoblaciones. Esta selección desemboca en la concentración de ciertas formas alélicas, en la disminución significativa de otras y, en general, en la pérdida de la variabilidad genética, la cual ha conducido a la producción de animales más susceptibles a enfermedades infecciosas como mastitis, metritis, cojeras, entre otras, que son potenciadas por la alta demanda fisiológica y energética de las vacas durante la gestación, la lactancia y el corto periodo de recuperación.

Es importante resaltar que en esta investigación se usó una subpoblación de

toros extranjeros con frecuencias alélicas y genotípicas similares con respecto a las subpoblaciones definidas en el departamento de Antioquia. Los resultados indican que los alelos de los toros muy posiblemente están fijados en las subpoblaciones como consecuencia de la selección genética a la que ha sido sometida la raza Holstein a través de los años.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## Fuentes de financiación

Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo financiero del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural del Gobierno de Colombia.

## Agradecimientos

Se expresa un sincero agradecimiento a todos los propietarios de los hatos de cada municipio de la región lechera de Antioquia y a la Cooperativa Colanta por permitir la realización de este estudio.

## REFERENCIAS

- Alipanah M, Klashnikova L, Rodionov G. 2007. K-casein genotypic frequencies in Russian breed Black and Red Pied cattle. *Iran J Biotechnol.* 3:191-194.
- Ashraf A, El Araby I, El-Bayomi K, Zagloul A. 2016. Association of polymorphisms in kappa casein gene with milk traits in Holstein Friesian cattle. *Jpn J Vet Res.* 64(2):39-43.
- Aune D, Navarro DA, Chan DS, Vieira AR, Vieira R, Greenwood DC, Vatten LJ, Norat T. 2015. Dairy products, calcium, and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Am J Clin Nutr.* 101(1):87-117. Doi: 10.3945/ajcn.113.067157.
- Azevedo AL, Nascimento CS, Steinberg RS, Carvalho MR, Peixoto MG, Teodoro RL, Verneque RS, Guimarães SE, Machado MA. 2008. Genetic

- polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Gen Mol Res.* 7(3):623-630.
- Bekuma A, Galmessa U. 2019. A1 Beta casein: Devil in the milk-A short communication. *Appro Poult Dairy & Vet Sci.* 7(1):606-608. Doi: 10.31031/APDV.2019.07.000651
- Bijl E, Valenberg H, Sikkes S, Jumelet S, Sala G, Olieman K, Hooijdonk T, Huppertz T. 2014. Chymosin induced hydrolysis of caseins: Influence of degree of phosphorylation of alpha-S1-casein and genetic variants of beta-casein. *Int Dairy J.* 39(2):215-221.
- Broyard C, Gaucheron F. 2015. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. *Dairy Sci & Technol.* 95:831-862.
- Clarke A, Trivedi M. 2014. Bovine beta casein variants: Implications to human nutrition and health. 67(3):11-17. Doi: 10.7763/IPCBBE
- Dias SA, Polaina FG, Malago W. 2009. Marcadores moleculares na bovinocultura de corte. *Redvet.* 10(2):1-16.
- Echeverri J, Saldamando C, López A. 2015. Genetic structure analysis of a Holstein cow population in Colombia. *Rev Colom Cienc Pec.* 28(1):54-63.
- Fang ZH, Bovenhuis H, van Valenberg HJ, Martin P, Huppertz T, Visker HP. 2017. Genetic parameters for  $\alpha_{s1}$ -casein and  $\alpha_{s2}$ -casein phosphorylation isoforms in Dutch Holstein Friesian. *J. Dairy Sci.* 101:1-11.
- Fang ZH, Bovenhuis H, van Valenberg HJ, Martin P, Duchemin SI, Huppertz T, Wisker MH. 2019. Genome-Wide Association study for  $\alpha_{s1}$  and  $\alpha_{s2}$ -casein phosphorylation in Dutch Holstein Friesian. *J Dairy Sci.* 102(2):1374-1385. Doi: 10.3168/jds.2018-15593
- García B, Real de Lima Y, Simoes C, Prada e Silva L, Palma F, Veiga dos Santos M. 2009. Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. *R Bras Zootec.* 38(12):2447-2454.
- Guo SW, Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics.* 48(2):361-372.
- Hanusová E, Huba J, Oravcová M, Polák P, Vrtková I. 2010. Genetic variants of beta-casein in Holstein dairy cattle in Slovakia. *Slovak J. Anim. Sci.* 43(2):63-66.
- Hartl DL. 2000. A primer of populations Genetics. 3.<sup>a</sup> ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc. 221 p.
- Jaiswal KP, De S, Sarsavan A. 2014. Review on bovine beta-casein (A1, A2) gene polymorphism and their potentially hazardous on human health. *Ijpaes.* 3(1):1-12.
- Jianqin S, Leiming X, Lu X, Yelland G, Ni J, Clarke A. 2016. Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cow's milk. *Nutr J.* 15:35. Doi: 10.1186/s12937-016-0147-z
- Kamiński S, Cieslińska A, Kostyra E. 2007. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J Appl Genet.* 48(3):189-198. Doi: 10.1007/BF03195213.
- Kaskous S. 2020. A1- and A2-Milk and their effect on human health. *J Food Eng Technol.* 9(1):15-21. Doi: 10.32732/jfet.2020.9.1.15.
- Küllenberg D, Lohner S, Schmucker C, Kapp P, Motschall E, Hörrlein S, Röger C, Meerpohl J. 2019. Milk A1  $\beta$ -casein and health-related outcomes in humans: a systematic review. *Nutr Rev.* 0(0):1-29. Doi: 10.1093/nutrit/nuy063
- Laugesen M, Elliott R. 2003. Ischaemic heart disease, type 1 diabetes, and cow milk A1 beta-casein. *N Z Med J.* 116(1168):U295.
- Martien AM, Groenen J, van der Poel J. 1994. Regulation of expression of milk protein genes: A review. *Livest Prod Sci.* 38(2):61-78.
- McLachlan CN. 2001. Beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Med Hypotheses.* 56 (2):262-272. Doi: 10.1054/mehy.2000.1265.
- Melka MG, Schenkel FS. 2012. Analysis of genetic diversity in Brown Swiss, Jersey and Holstein populations using genome-wide single nucleotide polymorphism markers. *BMC Res Notes.* 5(1):161. Doi: 10.1186/1756-0500-5-161.
- Miluchová M, Gábor M, Trakovická A. 2013. Analysis of Slovak spotted breed for bovine beta casein A1 variant as risk factor for human health. *Acta Biochim Pol.* 60(4):799-801.
- Mir S, Ullah O, Sheikh R. 2014. Genetic polymorphism of milk protein variants and their association studies with milk yield in Sahiwal

- cattle. *Afr J Biotechnol.* 13(4):555-565. Doi: 10.5897/AJB2013.13216
- Olenski K, Kamiński S, Szyda J, Cieslinska A. 2010. Polymorphism of the beta-casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holstein–Friesian bulls. *Livest Sci.* 131(1): 137-140. Doi: 10.1016/j.livsci.2010.02.023
- Patel RK, Chauhan JB, Singh KM, Soni KJ. 2007. Allelic Frequency of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin in Indian Crossbred (*Bos taurus* × *Bos indicus*) Dairy Bulls. *Turk J Vet Anim Sci.* 31(6):399-402.
- 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.
- Provine W. 2001. The Origins of Theoretical Population Genetics [Internet]. Chicago. University of Chicago Press. [Citado 2018 mayo 13]. Disponible en: <https://press.uchicago.edu/ucp/books/book/chicago/O/bo3618372.html>.
- Ramesha KP, Akhila R, Basavaraju M, Rani A, Katakataware MA, Jeyakumar S, Varalakshmi S. 2016. Genetic variants of  $\beta$ -casein in cattle and buffalo breeding bulls in Karnataka state of India. *Indian J Biotechnol.* 15(2):178-181.
- Rehan F, Ahemad N, Gupta M. 2019. Casein nanomicelle as an emerging biomaterial-A comprehensive review. *Colloids Surf. B: Bio-interfaces.* 179:80-292. Doi: 10.1016/j.colsurf-b.2019.03.051
- Ren DX, Miao SY, Chen YL, Zou CX, Liang XW, Liu JX. 2011. Genotyping of the k-casein and  $\beta$ -lactoglobulin genes in Chinese Holstein, Jersey and water Buffalo by PCR-RFLP. *J Genet.* 90(1):1-5.
- Schopen GC, Visker MH, Koks PD, Mullaart E, van Arendonk JA, Bovenhuis H. 2011. Whole genome association study for milk protein composition in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 94(6):3148-3158. Doi: 10.3168/jds.2010-4030
- Solarte CE, Rosero CY, Eraso YM, Zambrano GL, Barrera DC, Martínez OA, Guerrón ML, Chavés FP. 2011. Polimorfismo de las fracciones caseínicas de la leche en bovinos Holstein del Trópico Alto de Nariño. *Livestock Res Rural Dev.* 23(6):1-11.
- Sun Z, Zhang Z, Wang X, Cade R, Elmir Z, Fregly M. 2003. Relation of beta-casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides.* 24(6):937-943.
- Wedholm A, Larsen L, Lindmark-Månsson H, Karlsson A, Andrén A. 2006. Effect of protein composition on the cheese making properties of milk from individual dairy cows. *J Dairy Sci.* 89(9):3296-3305.
- Wright S. 1969. Evolution and Genetics of Populations: The theory of gene frequencies [Internet]. Chicago. University of Chicago Press. 2. [Citado 2018 mayo 10]. Disponible en: <https://press.uchicago.edu/ucp/books/book/chicago/E/bo5961634.html>
- Zambrano G, Eraso Y, Solarte C, Rosero C. 2012. Relationship Between Kappa Casein Genes (CSN3) and Industrial Yield in Holstein Cows in Nariño-Colombia. En: Hurley W editor. *Milk Protein.* S. l.: Intech Open. pp. 265-282. Doi: 10.5772/47818
- Zepeda JL, Alarcón B, Ruíz A, Núñez R, Ramírez R. 2015. Polymorphism of three milk protein genes in Mexican Jersey cattle. *Electron J Biotechnol.* 18(1):1-4.

### Forma de citación del artículo:

Padilla-Doval J, Zambrano-Arteaga JC, Echeverri-Zuluaga JJ, López-Herrera A. 2021. Análisis genético de cinco polimorfismos de nucleótido simple de caseínas lácteas obtenidos con chips genómicos en ganado Holstein de Antioquia, Colombia. *Rev Med Vet Zoot.* 68(2):137-149. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v68n2.98026>