

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL GEN DE KAPPA CASEINA EN BOVINOS CRIOLLOS DE LA CC QOCHAPUNCO, AYACUCHO

E.A. Veli Rivera; V.E. Rivas Palma; E.R.G. Rivas Seoane; G. Gutierrez Reynoso; S.H. Pastor Soplín, S. Altamirano Yaros

Dirección Nacional de Investigación de Recursos Genéticos, Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria, Av. La Molina N° 1981, Lima 12. Perú. Email: dnirrgg@inia.gob.pe

A) Área temática 1

RESUMEN

Se evaluó la variabilidad genética del gen de κ -caseína (CASK) en las poblaciones de bovinos criollos de la comunidad campesina Qochapunco, en el distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, Región Ayacucho. Se colectaron muestras de sangre de 99 individuos y se extrajo el ADN. Se encontraron tres genotipos de CASK: AA, AB y BB, con frecuencias de 0,15, 0,43 y 0,41, respectivamente. Las frecuencias alélicas para A y B fueron de 0,37 y 0,63, respectivamente. La población se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg ($p>0,05$). Los marcadores moleculares para el gen de la kappa caseína pueden ser empleados para proveer información directa y útil que ayude a los criadores en la selección de sus animales donde esta selección no puede realizarse de forma convencional. De esta forma se fortalece la conservación *in situ* de estas poblaciones amenazadas por la cruce indiscriminada con razas exóticas que mejoran el volumen de producción de leche en desmedro de su composición proteica, carácter útil en la producción de queso.

PALABRAS CLAVE: proteínas lácteas, rendimiento quesero, PCR-RFLP

PRELIMINAR STUDY OF THE GENETIC VARIABILITY OF KAPPA CASEINA GENE IN CREOLE CATTLE OF QOCHAPUNCO COMMUNITY, AYACUCHO

ABSTRACT

The genetic variability of the κ -casein (CASK) gene in the creole cattle population of Qochapunco peasant community, in the district of Vinchos, province of Huamanga, Ayacucho Region was evaluated. Blood samples of 100 individuals were collected and DNA was extracted. Three genotypes of CASK were found: AA, AB and BB; with genotypic frequencies of 0,15, 0,43 and 0,41, respectively. The allelic frequencies for A and B were 0,37 and 0,63, respectively. The population is in Hardy Weinberg equilibrium ($p>0,05$). The molecular markers for the kappa casein gene can be used to provide direct and useful information to help breeders selecting their own animals, in such cases where conventional selection can not be carried out. In this way, we can strengthen *in situ* conservation of these populations, which are threatened by indiscriminate crosses with exotic breeds that improve milk production volume despite proteic composition.

INTRODUCCIÓN

El bovino criollo americano descende de los animales que llegaron en 1493 en el segundo viaje de Colon; Lima fue el foco principal de su dispersión hacia Bolivia, Paraguay, Chile, Argentina y Uruguay (Primo, 1992). En el Perú el bovino criollo representa el 85.8% de la población de bovinos (Rosemberg, 2002). Esta especie se caracteriza por su rusticidad, adaptación a la altura, y sirve como fuente de alimentación, ahorro y forma parte de las costumbres y tradiciones de las familias rurales.

Con la técnica de PCR–RFLP es posible determinar el genotipo de las kappa caseinas (CASK) sin importar sexo, edad o estado fisiológico. Este procedimiento es preciso y económico. Esta técnica puede ser usada en programas de mejoramiento para la selección de toros con genotipo favorable de CASK (Felmer y Butendieck, 1998).

El objetivo de este trabajo es determinar las frecuencias génicas de CASK en bovinos criollos de la comunidad campesina (CC) de Qochapunco. Estos resultados podrán utilizarse por los criadores en programas de mejoramiento de la producción de leche y queso en donde la realización de pruebas de progenie de entre 6 y 7 años no es factible. Además, se sensibilizará a los criadores sobre la conservación *in situ* del ganado criollo. El mayor conocimiento y aprovechamiento de sus características útiles serán la base para el mejoramiento de los aspectos desfavorables dentro de la misma población.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se colectaron muestras de sangre de la vena caudal de 99 animales de la comunidad campesina de Qochapunco. La sangre (7-10 ml/animal) se depositó 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 el protocolo de Veli *et al.*, 2004, que incluye lisis de linfocitos con SDS 10% e incubación con Proteínasa K (20mg/ul) a 55 °C por 3 hrs., 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 se basaron 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'' en un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400). La digestión del producto amplificado utiliza 15 µL del volumen de la reacción de PCR, 0,6 uL de Hinf I (6U/uL), 2,25 µL de Buffer B y 4,65 µL de H₂O NFW- Gibco® incubado 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).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas y la heterocigosidad encontradas y esperadas para la población de bovinos de Qochapunco. La población se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg con un valor de $\chi^2=0,0044$ con 1 grado de libertad ($p=0,9466$).

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas en bovinos criollos de Qochapunco- Ayacucho.

Genotipo	Observados		Esperados	
	Nº	frecuencia	Nº	Frecuencia
CASK ^{AA}	15	0.15	13	0.14
CASK ^{AB}	43	0.43	46	0.47
CASK ^{BB}	41	0.41	39	0.40
Heterocigosidad	43%		47%	
Alelos				
A	0,37		0,36	
B	0,63		0,64	

En la fig. 1 se observan los patrones de alelos de algunos individuos genotipados y se señalan los respectivos genotipos asociados.

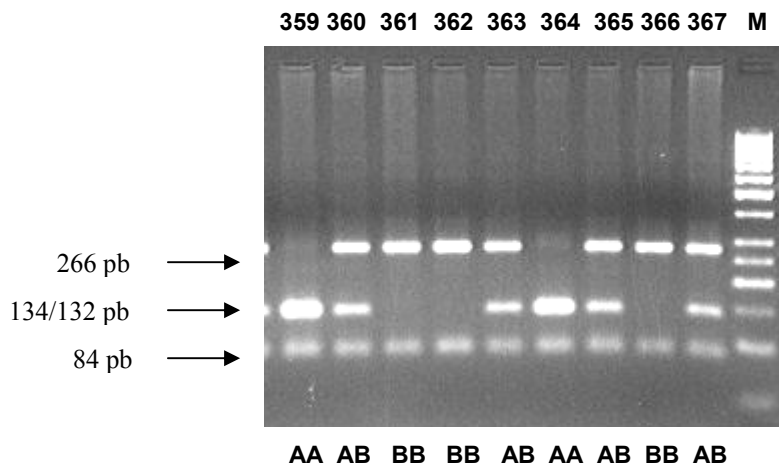


Fig. 1. Gel de agarosa 3% mostrando los genotipos de κ -caseínas; (M) marcador DNA plásmido digerido con *Eco* 147I y *Pvu*I.

Las variantes alélicas del gen CASK están asociadas al porcentaje de proteína total de la leche e influyen significativamente sobre el tiempo de coagulación, firmeza y rendimiento quesero, mostrando valores superiores en la leche de vacas con el genotipo CASK^{BB} (Van Eenennaam y Medrano, 1991). Se ha observado hasta un 3% de diferencia en el contenido de la proteína kappa caseína en la leche de vacas de genotipo CASK^{BB} (Bobe, 2004). 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 (Bobe, 2004).



En la tabla 1 se observan las frecuencias genotípicas y el porcentaje de heterocigosidad. La frecuencia $CASK^{AA}$ es menor respecto de las frecuencias $CASK^{AB}$ y $CASK^{BB}$. No se cuenta con información consistente sobre el origen de estas diferencias. Pueden deberse a una selección inconsciente sobre las reproductoras por parte de las campesinas quienes las pastorean, ordeñan y elaboran el queso y la aplicación de prácticas de manejo tradicionales de la leche (observar su coloración y cremosidad). Las vacas son ordeñadas todas las mañanas para transformar la leche en “cachipa” o quesillos que son almacenados durante la semana para ser vendidos a un nuevo sol cada uno en la feria semanal de Qasanqay.

No obstante, para el campesino no hay criterios de selección propiamente dichos. Los criterios más importantes en la adquisición de un animal son el color y forma de cuernos que les gusta, la productividad de leche “si las hembras producen buena cantidad de leche, las crías también producirán bien”, la selección de descarte casi no se realiza “no hay animal malo”. Esto se explica en que cada animal adicional incrementa el ahorro familiar para asumir gastos importantes futuros.

En la tabla 2 se presentan las frecuencias alélicas obtenidas en este estudio con otras poblaciones de bovinos criollos peruanos y con otras razas. Se puede observar que las frecuencias encontradas en las poblaciones de Huashcao, Mesapampa y Pampas de Lampa difieren de las encontradas en Qochapunco, solo en el caso de Ticllos la frecuencia del alelo B es cercana. Con respecto a las otras razas de bovinos de climas templados, la frecuencia del alelo B se acerca mas al de razas lecheras o de doble propósito como la Jersey (0,77) o la Normanda (0,56), cuya leche es de alta calidad para producción de queso y mantequilla.

CONCLUSIONES.

Se confirma la presencia del alelo B en poblaciones de bovinos criollos peruanos en frecuencias mayores a 0,30. A través de este conocimiento los criadores y los gobiernos locales podrán tomar decisiones, sustentar sus objetivos de producción y adecuar sus programas de fomento ganadero al mejoramiento del bovino criollo. Asimismo, es necesario capacitar a los criadores en la selección de sus animales, promover la formación de asociaciones y el establecimiento de programas de control de productividad. Solo de esta forma se puede dar un paso adelante en la producción de ganado vacuno a nivel de pequeños productores de forma sostenible.

Tabla 2. Frecuencias alélicas del gen CASK de razas de bovinos comparadas con bovinos criollos peruanos

Raza	Frecuencia alélica		Referencia
	CASK ^A	CASK ^B	
Criollo Qochapunco	0,37	0,63	
Criollo Huashcao	0,64	0,36	Veli <i>et al.</i> , 2004. V Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agrícola. REDBIO 2004.
Criollo Tiellos	0,50	0,50	
Criollo Pampas de Lampa	0,70	0,30	
Criollo Mesapampa	0,64	0,36	
Criollo Argentino	0,65	0,35	Golijow <i>et al.</i> , 1999 Braz. J. Genet, 22: 395-398
Rubia Gallega	0,47	0,53	Viana <i>et al.</i> , 2001. Archivos de Zootecnia 50:91-96.
Holstein	0,90	0,10	
Jersey	0,23	0,77	Grosclaude, 1998.. INRA Prod. Anim., 1:5-17.
Normanda	0,44	0,56	
Pantaneiro	0,78	0,22	Lara <i>et al.</i> , 2002. Arch. Zootec. 51:99-105.
Gyr	0,93	0,07	Kemenes <i>et al.</i> , 1999. Genetics and Molecular Biology, 22, 4, 539-541
Santa Gertrudis	0,85	0,15	

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bobe, G. 2004. Milk protein genotypes explain variation of milk protein composition. A.S. Leaflet R 1901. Iowa State University Animal Industry Report.
- 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.
- 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 Ibérico en las Américas: 500 años después. Arch. Zootec. 41 (extra): 421-432
- Rosemberg, M. 2002. Variabilidad genética de los vacunos criollos y de doble propósito. I Congreso peruano de genética animal. Lima-Perú
- Van Eenennaam, A. y Medrano, J. 1991. Genetics polymorphism in milk protein loci: Milk protein polymorphism in California Dairy Cattle. J. Dairy Sci. 74: 1730-1742.