

# **POLIMORFISMOS MÁS FRECUENTES DE LA k-CASEÍNA MEDIANTE PCR/RFLPs EN LOS REPRODUCTORES HOLSTEIN DEL PROGRAMA INTEGRAL DE MEJORA GENÉTICA DE GALICIA (PIMX)**

**VIANA, J.L.\* , A. FERNÁNDEZ\*\*, A. IGLESIAS\* & L. SÁNCHEZ\***

\* Dpto Anatomía y Producción Animal. Fac. de Veterinaria. 27002, Lugo

\*\* Centro de Selección y Reproducción Animal de Fontao-Lugo

## **INTRODUCCIÓN**

La situación actual del sector lácteo, no sólo en Galicia, sino a nivel de toda España, con la imposición del sistema de cuotas tras la entrada en la Comunidad Europea, hace resaltar un interés cada día más creciente por las características tecnológicas de la leche. Por ello, entendemos que la producción no sólo debe orientarse hacia el consumo líquido, sino que se deben de tomar con mayor consideración las características reunidas para la transformación en derivados, principalmente queso y muy particularmente en su producción artesanal. Se sabe que las variantes genéticas de las proteínas lácteas, especialmente de la k-caseína, tienen importantes efectos en la composición de la leche y en las aptitudes tecnológicas de ésta para la fabricación de queso. El análisis e investigación de esta temática será, precisamente, el objetivo del presente estudio.

## **MATERIAL Y METODOS**

En este trabajo, determinamos mediante técnicas de genética molecular (PCR y RFLPs) los genotipos y las frecuencias génicas de la k-caseína bovina en un total de 118 animales de raza Holstein, 10 toros pertenecientes a las principales líneas genéticas de valoración del "Plan Integral de Mejora Genética" (P.I.M.X.) ubicados en el C.E.N.S.Y.R.A. de Fontao (Lugo), perteneciente a la Consellería de Agricultura, Ganadería y Montes de la Xunta de Galicia y 108 hembras, hijas de esos 10 toros, que están incluidas en los Programas de Selección y Planes de Mejora Genética de la "Asociación Provincial de Ganaderos para el Control Lechero Oficial de Lugo" (AFRICOR Lugo).

Para el análisis de los polimorfismos del locus de la k-caseína en los animales muestreados se utilizó el protocolo de PCR descrito por SAIKI *et al.*, (1988); PINDER *et al.*, (1991). El DNA amplificado es el localizado entre los nucleótidos 10592 y 11466 del tercer exón del gen de la k-caseína, es decir un fragmento de 874 bp. Para la detección de los genotipos se realizó la digestión del producto amplificado con la endonucleasa de restricción Hind III, que es específica del alelo k cas B, obteniéndose así los RFLPs (LEVEZIEL *et al.*, 1988). El producto digerido se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,4% en TBE y, previa tinción con bromuro de etidio, se visualizó en un transiluminador ultravioleta.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

Los resultados obtenidos para el genotipo de los toros, así como la distribución de los tipos de la k-caseína obtenidos en sus hijas y las frecuencias génicas de ambos alelos se muestran en la tabla 1. En dicha tabla se observa que hemos podido diferenciar claramente los tres genotipos

esperados según el control dialélico por el que se rige el locus k-caseína (k-cas A, k-cas B y k-cas AB), si bien el genotipo k-cas B solamente lo hemos encontrado en una ocasión y se trató de una supuesta hija del toro M. Ch. LANDMARK (línea genética Chairman x Valiant), cuyo genotipo para el locus k-caseína ha resultado ser AA. Esta observación nos permite afirmar que esa supuesta hija muestreada no lo es, y por tanto, se trata de un error de identificación de su parentesco.

La distribución del tipo de k-caseína de las hijas nos ha permitido establecer las frecuencias génicas parciales para los alelos A y B en cada una de las líneas genéticas investigadas; para el alelo k-cas A las frecuencias génicas variaron desde valores de 0,73 de la línea genética M. Ch. LANDMARK hasta las presentadas por la línea genética MAR-BIL B.B. (Valiant x Elevation) que resultó tener dicho alelo fijado. Para el alelo k-cas B, lo más destacable de los resultados obtenidos fue la alta frecuencia relativa de la línea genética M. Ch. LANDMARK (0,27) y las frecuencias relativamente altas de las líneas A. DEXTER (Chief Mark x Sheik) y M.B. ROCKET (Valiant x Sheik) con valores de 0,14 y 0,11, respectivamente. La línea C. SENSATION (Starbuck x A. Chief), a pesar de ser la única con genotipo k-cas AB presentó frecuencias génicas relativamente bajas para el alelo k-cas B (0,07).

En la tabla 2, se presentan de forma resumida las frecuencias génicas para ambos alelos en el total de los individuos investigados en nuestro trabajo, donde se puede observar que, de los 118 animales muestreados, 97 presentaron homocigosis para el alelo k-cas A, 1 para el alelo k-cas B y un total de 20 fueron heterocigóticos para dicho locus; por lo tanto las frecuencias génicas resultaron ser de 0,90 para el alelo k-cas A y 0,10 para el alelo k-cas B.

Los resultados obtenidos por la mayoría de los investigadores en los estudios realizados con animales de raza Holstein muestran valores de frecuencias génicas ligeramente superiores para el alelo k-cas B que los obtenidos en nuestro estudio, si bien, nuestros resultados están más próximos a los hallados por otros investigadores que, al igual que nosotros, han empleado para la realización de su trabajo un número de animales más reducido en el muestreo, (MEDRANO & AGUILAR CORDOVA, 1990; ZADWORNÝ & KUNNLEIN, 1990; OSTA *et al.*, 1994).

Por otra parte, cuando la comparación la realizamos con otras razas de aptitud lechera o lechero-mantequeras (Ej. Jersey, Normanda, Pardo Alpina, etc.) las diferencias resultan ser mucho mayores, por ser en estas razas mayor la frecuencia del alelo k-cas B, (GROSCLAUDE, 1988).

Esta última observación se puede considerar también válida para lo referente a la comparación de los valores de las frecuencias génicas del locus objeto de estudio en el caso de las razas de aptitud cárnica (ABE *et al.*, 1975; CHIKUNI *et al.*, 1991).

Nuestros resultados vienen a poner de manifiesto la importancia que tiene el conocimiento concreto de los parámetros relacionados con el tipo de k-caseína de la leche en la población bovina Holstein de Galicia, ya que las frecuencias génicas del alelo k-cas B fueron discretas en relación al porcentaje total de proteína, que por el contrario se muestra con unos valores medios similares a los que se observan en otras zonas ganaderas de España o incluso de otros países.

**TABLA 1.- GENOTIPO DE LOS TOROS MUESTREADOS, DISTRIBUCIÓN DE LOS TIPOS DE k-CASEÍNA Y FRECUENCIAS GÉNICAS DE AMBOS ALELOS OBTENIDAS EN SUS HIJAS**

| NOMBRE DEL TORO       | Genotipo | Nº y genotipo de las hijas muestreadas |    |    |    | Frec. alelo A | Frec. alelo B |
|-----------------------|----------|----------------------------------------|----|----|----|---------------|---------------|
|                       |          | Nº de hijas                            | AA | AB | BB |               |               |
| M. Chairman LANDMARK  | AA       | 11                                     | 6  | 4  | 1* | 0,72          | 0,28          |
| Arnell DEXTER         | AA       | 11                                     | 8  | 3  | -  | 0,86          | 0,14          |
| Sunnyfield DINASTY    | AA       | 12                                     | 10 | 2  | -  | 0,92          | 0,08          |
| M. Brigde INSPIRE     | AA       | 12                                     | 11 | 1  | -  | 0,96          | 0,04          |
| Germec H. KINO        | AA       | 12                                     | 10 | 2  | -  | 0,92          | 0,08          |
| MAR-BIL Bes Brad      | AA       | 11                                     | 11 | -  | -  | 1,00          | 0,00          |
| Calbrett PEARSON      | AA       | 11                                     | 9  | 2  | -  | 0,91          | 0,09          |
| M. Brigde ROCKET      | AA       | 9                                      | 7  | 2  | -  | 0,89          | 0,11          |
| Coldsprings SENSATION | AB       | 7                                      | 6  | 12 | -  | 0,93          | 0,07          |
| Kentville TREASURE    | AA       | 12                                     | 10 | 2  | -  | 0,92          | 0,08          |

\* consecuencia de un error en la asignación del parentesco

**TABLA 2.- FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LA k-CASEÍNA EN EL TOTAL DE INDIVIDUOS INVESTIGADOS**

|       | Nº  | Distribución del tipo de k-cas |    |    | Frec.A | Frec.B |
|-------|-----|--------------------------------|----|----|--------|--------|
|       |     | AA                             | AB | BB |        |        |
| Toros | 10  | 9                              | 1  | -  | 0,95   | 0,05   |
| Hijas | 108 | 88                             | 19 | 1  | 0,90   | 0,10   |
| Total | 118 | 97                             | 20 | 1  | 0,90   | 0,10   |

## BIBLIOGRAFÍA

- ABE, T.; M. KOMATSU; T. OISHI & A. KAGEMAYA (1975). Genetic polymorphism of milk proteins in Japanese cattle and european cattle breeds y Japan. *Japan J. zoo. Sci.*, 46: 591-599.
- CHIKUNI, K.; S. KAGEYAMA; T. KOISHIKAWA; S. KATO & K. OZUTSUMI (1991). Identification of bovine k-casein genotypes using Polymerase Chain Reaction Method. *Animal Science and Technology*, 62 (7): 654-658.
- GROSCLAUDE, F. (1988). Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. *INRA Prod. Anim.*, 1 (1): 5-17.
- LEVEZIEL, H.; L. METENIER; M.F. MAHE; J. COPLAIN; J.P. FURET; G. PABOEUF; J.C. MERCIER & F. GROSCLAUDE (1988). Identification of the two common alleles of the bovine k-casein locus by the RFLP technique, using the enzyme Hind III. *Génét. Sé. Evol.*, 20 (2): 247-254.
- MEDRANO, J.F. & AGUILAR-CORDOVA (1990). Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Biotechnology*, 8: 144-146.
- OSTA, R.; P. ZARAGOZA; C. RODELLAR; I. MARTIN; S. SANTOS & I.ZARAZAGA (1994). Tipificación rápida mediante PCR/RFLPs de variantes genéticas de lactoproteínas en siete poblaciones españolas de ganado vacuno. *ITEA*, Vol. 90A (nº 1): 38-57.
- PINDER, S.J.; B.N. PERRY; C.J. SKIDMORE & D. SAVVA (1991). Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of the polymerase chain reaction. *Animal Genetics*, 22: 11-20.
- SAIKI, R.K.; D.H. GELFAND; S.J. SCHARF; R.HIGUCHI; G.T. HORN; K.B. MULLIS & H.A.ERLICH (1988). Primer-directed enzymatic amplificación of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- ZADWORNY, D. & U. KUHNLEIN (1990). The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.*, 80: 631-634.