

FRECUENCIAS ALELICAS Y GENOTIPICAS DE K-CASEÍNA EN BOVINOS DE RAZAS HOLANDO Y NORMANDO DE URUGUAY.

Dario Hirigoyen T. ⁽¹⁾, Heriberto Bruzzoni G. ⁽¹⁾, Carlos Azambuja B. ⁽²⁾ y Mario Stoll R. (DM) ⁽²⁾.

RESUMEN

En el presente estudio se aplicó la técnica de PCR para identificar el gene de Kappa-Caseína (Cas-K) en dos razas bovinas, Holando Uruguayo (HU) y Normando Uruguayo (NU). Se trabajo sobre el ADN de 115 animales de uno y otro sexo, de diferente edad, analizándose frecuencias alélicas y genotípicas prevalentes en cada raza. Para la raza HU los valores de frecuencia alélica fueron: $A=0.817$, $B=0.183$ mientras que para el NU: $A=0.176$ y $B=0.824$. Se discute los programas de cruzamiento realizados en Uruguay e incidencia de los mismos sobre la masa génica en el ganado lechero.

Palabras Claves: Kappa-caseína, Bovinos de leche, PCR.

SUMMARY

Two dairy bovine breeds, Uruguayan Holstein (HU) and Uruguayan Normando (NU) were to emboss to Kappa-casein gene with the PCR technique. The alelic and genotypic frequencies were analyzed over 115 animals DNA, of both sexes and different ages. The HU alelic frequency was $A=0.817$, $B=0.183$ and the NU was $A=0.176$ and $B=0.824$.

The incidence of gene pool of dairy bovines for the Uruguayan breeding programs are discussed.

Key Words: Kappa - caseina, Dairy bovines, PCR Technique

INTRODUCCION

En Uruguay dos razas bovinas lecheras relevantes en cuanto a número son: el Holando Uruguayo (HU) y el Normando Uruguayo (NU). El primer registro de un toro raza Holando, introducido de Holanda se efectuó en 1889, según los libros genealógicos de la Asociación Rural del Uruguay (Soc. de Criadores de Holando del Uruguay, 1973). Desde entonces las importaciones de ganado en pie se han mantenido, hasta que en las últimas 3 décadas los criadores han importado a una escala mayor, semen y embriones fundamentalmente de Canadá y USA. La raza Normando ha sido introducida desde Francia a nuestro país en 1906.

⁽¹⁾Instituto de Investigaciones Biológicas «Clemente Estable». IIBCE. Avda. Italia 3318. CP 11600.

⁽²⁾Unidad de Biotecnología. Estación Exp. «Las Brujas». Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).

En 1991 la ARU, estableció la evaluación genética de 1200 toros, raza Holando, a través de los registros productivos de 18.399 hijas, con el objetivo de establecer un ranking de reproductores (Rev. ARU, 1993). Estos registros basados en las diferencias esperadas en la progenie (DEP), aún no contemplan el elemento proteína en leche.

Dentro de las proteínas lácteas, el 80% son caseínas y el 20% restante, aparece como albúminas y globulinas séricas (Jennes, 1984). Entre las caseínas, base de la fabricación quesera, existen variaciones alélicas (Aschaffenburg and Drewry, 1955; Thompson, et al. 1962; Neelin, 1964), así como evidencias de que determinadas variantes alélicas inciden en el proceso tecnológico y en el valor biológico de los subproductos lácteos obtenidos (Schaar, 1984; Schaar, et al. 1985). La variante alélica B de Kappa-caseína (Cas-K), se asocia a un incremento en el rendimiento de algunos tipos de quesos y a un aumento del valor alimenticio del derivado lácteo (Mariani, et al. 1976; Morini, et al. 1979). Las leches de animales con genotipo BB tienen mayor tenor

de caseínas totales y más cantidad de Cas-K por volumen de leche (Lin, al. 1986; Ny Kwai Hong, and Monarder, 1990; Vanderberg, et al. 1990).

Con técnicas moleculares como la amplificación de ADN *in vitro* «Polimerase Chain Reaction» (PCR)(Mullis, and Falloona 1987), se buscan marcadores genotípicos a nivel de ADN, pudiéndose identificar rápidamente diferentes formas alélicas asociadas a caracteres de interés productivo (Perseu, et al. 1991; Medrano, and Cordova 1990; Hirigoyen, y col. 1991; Azambuja et al. 1993).

Entre los caracteres lácteos se puede con esta herramienta seleccionar en forma precisa y temprana toros dadores de semen y hembras por su genotipo proteico. (Hirigoyen y col. 1992).

Dado que el elemento proteína en leche, y en especial las caseínas, cobran cada vez más significado nutricional y comercial, los autores nos planteamos en el presente trabajo : 1) determinar la presencia de alelos del gen de Cas-K en ganado lechero de las razas NU y HU utilizando PCR; y 2) rastrear las frecuencias alélicas y genotípicas en las dos poblaciones de bovinos estudiadas y comparándolas entre sí.

MATERIALES Y METODOS

OBTENCION DE MUESTRAS

Se trabajó con 74 bovinos NU, provenientes de cabañas mejoradoras, y 41 bovinos HU pertenecientes a 5 establecimientos productores de leche.

La población seleccionada de bovinos fue de ambos sexos (76 machos y 39 hembras) de diferente rango etario (de 1 a 5 años), provenientes de 11 establecimientos ganaderos de diferentes zonas del Uruguay.

A todos ellos se les extrajo 20 mililitros (ml) de sangre entera por

función de la vena yugular, con una jeringa desechable de 20 ml que contenía 1,5 mg de EDTA-Na/ml de sangre. Las muestras colectadas fueron transportadas al laboratorio y conservadas a 4°C hasta su procesamiento.

EXTRACCION DE ADN Y AMPLIFICACION *IN VITRO* (PCR)

La extracción del ADN se realizó de células nucleadas contenidas en la sangre obtenida, siguiendo el método de Davis et. al. 1988.

Luego de obtenido y resuspendido cada ADN en 1 ml de Tris-EDTA (TE) (10 miliMolar (mM) Tris-Cl, pH: 8.0, 1 mM EDTA), se midió concentración con un espectrofotómetro, DMS 200 VARIAN.

Para la técnica de PCR se utilizaron primers del gen de Cas-K, descritos por Medrano and Cordova 1990 y sintetizados por Operón Technologies Inc..

Estos dos oligonucleótidos, que flanquean un fragmento de 350 pares de bases (pb), incluyen 201 pb del exón IV y 149 pb del intrón IV del gen.

La reacción se efectuó en tubos de microcentrifuga de polipropileno conteniendo cada uno: 10 ul del tampón de PCR 10X, (50 mM KCl, 10 mM Tris, pH: 8.4), 1.5 mM MgCl(GeneAmp, Perkin Elmer), 0.4 microgramo/microlitro (ug/ul) de Albúmina sérica bovina (BSA, Gibco BRL), 200 uM de cada dNTPs (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 200 nanoMolar(nM) de cada oligonucleótido, 2,5 Unidades de Enzima Amplitaq ADN-Polimerasa (Perkin-Elmer, Cetus), 100 nanogramo(ng) de ADN correspondientes a cada animal y H₂O estéril hasta un volumen final de 100 ul.

Las muestras se amplificaron en un ciclador termoregurable marca Biometra, modelo Trioblock, siguiendo el siguiente perfil termal: 1 ciclo de

94°/2 min., 35 ciclos de 94°/45 seg., 55°/1 min., 72°/75 seg. y un último ciclo de extensión de 72°/ 300 seg..

Para evidenciar los diferentes alelos 20 ul del producto de amplificación se digirió con 30 Unidades (U) de endonucleasa de restricción HinfI (Gibco BRL) en 3 ul de tampón 2 10X (50 mM Tris (Ph:8.0), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) (Gibco BRL) e incubó por 120 min. a 37°C.

Los fragmentos obtenidos en la digestión se resolvieron en un gel de agarosa al 3% en una corrida electroforetica horizontal submarina con tampón Tris-acetato (TAE), 0.004M, pH= 8, 1 mM EDTA, durante 120 min., con un voltaje de 2.5V/cm de distancia entre los electrodos, utilizando una fuente de poder de 230 V, 0.7 Amp y 50/60 Hz., marca Polisistem.

El ADN se visualizó por tinción del gel con una solución de Bromuro de Etidio (EtBr - Sigma Chem. Company) 0.5 mg/ml durante 15 min., y posterior observación bajo luz ultravioleta en un transiluminador con lámpara de 312 nm, (marca Bioblock Scientific).

ANALISIS ESTADISTICO

Para procesar las frecuencias alélicas y genotípicas correspondientes a las dos razas HU y NU se aplicó el test de diferencia de proporciones, Wayne, W.D. (1985). Se trabajo con un nivel de significación $p = < 0.05$.

RESULTADOS

Los productos de amplificación de los genomas de los animales analizados mostraron pesos moleculares acordes con los esperados. Luego de la digestión con la enzima de restricción HinfI, se obtuvieron 2 o 3 fragmentos según los genotipos. El alelo B del gen originó 2 bandas: una de 266 pb, y otra de 84 pb., en tanto el alelo A mostró

dos bandas: una de 132/134 pb y otra de 84 pb, (para las condiciones de la corrida las bandas de 134/132 pb se visualizaron como una).

El alelo A apareció en los 41 animales de la raza HU estudiados. En 26 de los mismos se constató solo este tipo de banda (Homocigotas para el alelo A); en cambio en otros 15 animales se advirtió también la presencia del alelo B junto al A (Heterocigotas). (Tabla 1).

En los 74 animales de la raza NU se encontró más representado el alelo B el que apareció en 72 animales, de los cuales 50 resultaron homocigotas para este alelo. En 24 de los animales se constató también el alelo A, resultando 22 heterocigotas y solo 2 homocigotas para el alelo A.

El análisis de las frecuencias alélicas para este gene (Cas-K), en las dos poblaciones de bovinos NU y HU, dió valores opuestos para cada alelo evidenciándose diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$). Estos cambios evidenciados en las frecuencias alélicas entre ambas razas también se traduce en una diferencia entre las frecuencias genotípicas.

DISCUSION

La utilización de la técnica de PCR para identificar alelos de K-Cas en forma rápida, económica y fiable (Medrano and Cordoba)(Hirigoyen et al. 1992) fue extendida sobre este universo bovino que incluía dos razas lecheras de bovinos del Uruguay.

El proceso desde la extracción de sangre hasta la tipificación alélica para los bovinos de cualquier sexo y edad insumió muy pocas horas.

La caracterización alélica fue posible en todos los casos en forma inequívoca, permitiendo determinar su prevalencia en las dos poblaciones estudiadas.

En las hembras bovinas la caracterización genotípica se realizó fuera del

período de lactación y a diferentes edades; Con los machos también fue posible efectuar directamente el genotipado.

Los valores de frecuencia alélica y genotípica encontradas en el ganado HU es semejante a reportes de otros autores para la raza Holstein en otras latitudes (Tabla 2).

En el NU los valores de frecuencia alélica y genotípica de la población evaluada también resultaron similares a los reportados por Grosclaude, y col. (1988).

Del análisis de frecuencia alélica encontrada para este gen en las dos razas bovinas HU y NU, se observó diferencias significativas entre sí (Tabla 1).

En Uruguay desde 1991 los toros lecheros se ponderan, con registros basados en diferencias esperadas en su progenie (DEP); apoyando el método «modelo animal» en variables únicas, producciones múltiples de cada animal, efectos fijos, heredabilidad y repetibilidad. Pero a pesar de esta rigurosa evaluación aún el elemento proteína no ha sido calificado.

Pensamos que la posibilidad de determinar la presencia de ciertas proteínas debería ser explotada, y como lo demuestra este trabajo, esta metodología, complementaría la evaluación genética de los bovinos lecheros.

Debido a que cada bovino en el caso del gen de K-Cas, hereda de su progenitor en forma mendeliana simple un alelo A o B, originando genotipos homocigotas AA y BB, así como heterocigotas AB, el método de PCR permite una selección directa de los reproductores en corto tiempo.

CONCLUSIONES

Dado la importancia desde el punto de vista económico y productivo, que tiene el mejorar en calidad la leche y sus componentes, creemos que

la caracterización de proteínas y en especial la Cas-K, con implicancias tecnológicas en la producción quesera (Mariani et al 1976; Morini et al. 1979), debe ser tenida en cuenta en futuros programas de selección.

Creemos que el método de caracterización utilizado en este trabajo en las dos poblaciones de bovinos estudiadas, puede ser un complemento en los programas de evaluación genética como los llevados a cabo en nuestro país. Los resultados obtenidos hacen posible la extensión de la selección a otros marcadores de interés productivo.

Los parámetros de selección llevados a cabo en Uruguay desde principio de siglo con la raza HU, han tendido a ser los mismos que predominaron en el resto del mundo lo cual se traduce en las semejanzas encontradas entre valores de frecuencia alélica y genotípica del ganado HU con los reportes de otros autores.

Sí pensamos que nuestro país no ha sido ajeno al proceso de «Holsteinización» mencionado por Cunningham (1981), muy probablemente, las frecuencias del resto de las proteínas lácteas del HU, también sean semejantes a las observadas en la población Holstein del resto del mundo

BIBLIOGRAFIA

- 1) Aschaffenburg, R. and J. Drewry (1955) Occurrence of different beta-lactoglobulins in cow's milk. *Nature* 176:218-219.
- 2) Azambuja, C.; Hirigoyen, D. J.; Bruzzoni-Giovanelli, H. and Stoll, M. (1993). Abstract-Kappa-Casein tipification: an example of marker assisted selection usefull in embryos transfer programs. Congreso de Transferencia de embriones. Jaboticabal, Riberao Preto. Sao Paulo. Brasil.
- 3) Bovenhuis, H.; VanArendonk, J.A.M.; Vandenberg, G. and A.J.M. Verstege (1990) Abstract: Genetic variants of milk Proteins (III) Gene Frequencies and crossbreeding. 23° Congreso y Exposición Internacional de Lechería y 1° Congreso Internacional de Lechería de Norte América. Montreal, Canadá.
- 4) Cunningham, E.P. (1981) European Friesian- the Canadian and American invasion- In: *Methods*

- and Experiences with «In Situ» Preservation of Farm Animals, 1990 (ed. I. BODO), FAO Animal Production and Health, paper 80, p. 85-102.
- 5) Evaluación genética de toros Holando. Rev. de la Asociación Rural del Uruguay. ARU.(1993) 9: 15-19.
 - 6) Davis, G. L.; Dibner, D.M. and Battey, J.F. Preparation of DNA from Eukaryotic cells: General Method. Section 5-2. In: Methods in Molecular biology (1986) by Elsevier Science Publishers B.V.
 - 7) Grosclaude, F. (1988) Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. INRA. Prod. Anim. 1:5-17
 - 8) Hirigoyen, D. J.; Bruzzoni Giovanelli, H.; Azambuja, C. and M. Stoll.(1991) Aplicaciones del PCR al mejoramiento bovino. VI Jornadas de Sociedad Uruguaya de Biociencias. Piriapolis.
 - 9) Hirigoyen, D. J.; Bruzzoni Giovanelli, H.; Azambuja, C. and M. Stoll. (1992). Análisis de variantes alélicas de Kappa-Caseína en bovinos de leche. X Congreso Latinoamericano de Genética. Río de Janeiro. Brasil.
 - 10) Holando Uruguayo, historia y presente de una raza.(1973) Sociedad de Criadores de Holando del Uruguay.
 - 11) Jenness, R..(1984) Biochemical and nutritional aspects of milk and calostrum. In: Lactation B.L. Larson ed. Iowa State Univ. pp 164-197.
 - 12) Lin, C. Y.; Mc Allister, A. J.; Ny Kwai Hong, K. F. and Hayes J. F. (1986) Effects of milk protein loci on firts lactation production in dairy cattle. J. Dairy Sci. 69:704-712.
 - 13) Mariani, P.; Losi, G.; Russo, V.; Castagnetti, G. B.; Grazia, L.; Morini, D. and E. Fossa. (1976) Prove di caseificazione con latte caratterizzato dalle varianti A e B dell K-caseína nell produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano. Sci. Tecn. Latt. Cas. 27:208.
 - 14) Medrano J. F. and E. A. Cordova (1990). Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. Bio/technology Vol. 8:144-146
 - 15) Morini, D.; Lori, G.; Castagnetti, G. B. and P. Mariani. (1979) Prove di caseificazione con latte caratterizzato dalle varianti A e B dell K-caseína: rilievi sul formaggio stagionato. Sci. Tecn. Latt. Cas. 30:243.
 - 16) Mullis, K. B. and F. Falloona (1987) Specifics synthesis of DNA in vitro via polimerasa catalized chain reaction. In «Methods in Enzimology». (R. Wu, Ed.), Vol. 155. pp 335-350.
 - 17) Neelin, J. M. (1964) Variant of K-casein revealed by improved starch gel electrophoresis. J. Dairy Sci. 47:506-509
 - 18) Ny Kwai Hong, K. F. and H. G. Monarder (1990) Association between genetic polymorphism and milk production and composition. 23° Congreso y Exposición Internacional de Lechería y 1° Congreso Internacional de Lechería de Norte América. Montreal, Canadá.
 - 19) Perseu, J. A. S.; Lopes, R.F.F.; Bruzzoni, H.; Hirigoyen, D.J.; Azambuja, C. J.; Termignoni, C.; Maia, H. and M. Stoll. (1991) PCR Technology applied to the analysis of bovine genome. Abstract. 2nd National Congress of Biotechnology and 1st Latin American Fair and Congress of Biotechnology. Brasil. San Paulo.
 - 20) Pinder, S. J.; Perry, B. N.; Skidmore, C. J. & D. Savva. (1990) Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of the polymerase chain reaction. Animal Genetics 52:397-406.
 - 21) Schaar, J. (1984) Effects of K-casein genetic variants and lactation number on the renneting properties of individual milks. J. Dairy Res. 51:397-406.
 - 22) Schaar, J.; Hamson, B. and Pettersson H.E. (1985). Effects of genetic variants of K-casein and B-lactoglobulin on cheesemaking. J. Dairy Res. 52:429-437
 - 23) Tejedor, T.; Altarriba, J. and Zarazaga, I. (1967) Estructura aptotípica de la población Holstein-Friesian en relación con los loci de proteínas lácteas. Genética Ibérica 39:85-103.
 - 24) Thompson, M. P.; Kiddy, C. A.; Pepper, L. and Zittle, L. A. (1962) Variations in the as-casein of individual cow's milk. Nature. 195:1001-1002.
 - 25) Vandenberg, G.; Escher, J. T. M.; Bovenhuis, H. and P. J. Dekoning (1990) Genetic variants of milk proteins (I) Composition of bulk milk and whey. 23° Congreso y Exposición Internacional de Lechería y 1° Congreso Internacional de Lechería de Norte America. Montreal, Canadá.
 - 26) Wayne, W. D. (1985) En: Bioestadística: base para el análisis de la ciencia de la salud. cap. 6, pp 221-281. 3era. Edición. Editorial Limusa. México.
 - 27) Zadworny, D. and U. Kuhnlein. (1990) Abstract: Alelic frequencies of Kappa-casein A and B in Holstein dairy bulls identify using PCR. 23° Congreso y Exposición Internacional de Lechería y 1° Congreso Internacional de Lechería de Norte America. Montreal, Canadá.

TABLA 1: Frecuencias alélicas y genotípicas del Locus Kappa Caseína.

RAZA	GENOTIPOS No. animales	FRECUENCIA ALELICA	GENOTIPOS
NU	AA= 2 AB= 22 BB= 50	A= .176 B= .824 BB= 67.5	AA= 2.7 AB= 29.7
HU	AA= 26 AB= 15 BB= 00	A= .817 B= .183	AA= 63.4 AB= 36.6 BB= 00.0

NU= NORMANDO URUGUAYO
HU= HOLANDO URUGUAYO

TABLA 2: Comparación de frecuencias alélicas del gene Kappa caseína en ganado Holando.

ALELOS	FRECUENCIA					
	*	**	***	#	##	###
A	.767	.89	.84	.80	.87	.817
B	.233	.11	.155	.20	.13	.183

* - Tejedor, T. y col. 1987. *** - Bovenhuis, H. col. 1990. ## - Zadworny, D. y col. 1990.
** - Medrano, J. F. y col. 1990. # - Pinder, S. J. y col. 1990. ### - Hirigoyen, D. y col.