

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS ALELOS DEL GEN DE LA BETA  
CASEÍNA ( -Cs) MEDIANTE PCR- RFLP Y SU RELACIÓN CON LA  
PRODUCCIÓN DE LECHE, GRASA, PROTEÍNA Y EL RENDIMIENTO EN  
CUAJADA EN HEMBRAS HOLSTEIN DEL TRÓPICO ALTO DE NARIÑO

DIANA CAROLINA BARRERA RIVERA  
OSCAR ANDRÉS MARTÍNEZ ORTEGA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
PROGRAMA DE ZOOTECNIA  
SAN JUAN DE PASTO-COLOMBIA  
2011

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS ALELOS DEL GEN DE LA BETA  
CASEÍNA ( -Cs) MEDIANTE PCR- RFLP Y SU RELACIÓN CON LA  
PRODUCCIÓN DE LECHE, GRASA, PROTEÍNA Y EL RENDIMIENTO EN  
CUAJADA EN HEMBRAS HOLSTEIN DEL TRÓPICO ALTO DE NARIÑO

DIANA CAROLINA BARRERA RIVERA  
OSCAR ANDRÉS MARTÍNEZ ORTEGA

Informe final de trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar  
al título de Zootecnista

Presidente  
CARLOS SOLARTE PORTILLA  
Zoot. M.Sc., Dr. Sc.

Copresidente  
CAROL ROSERO GALINDO  
Biol. M.Sc., Dr. Sc.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
PROGRAMA DE ZOOTECNIA  
SAN JUAN DE PASTO-COLOMBIA  
2011

“las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1° del acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

---

---

---

---

---

---

---

CARLOS SOLARTE PORTILLA Zoot. M. Sc. Dr. Sc.  
Presidente

---

CAROL YOVANA ROSERO GALINDO Biol. M. Sc. Dr. Sc.  
Copresidente

---

LUIS ERNESTO VITERI SARASTY Zootecnista.  
Jurado Delegado

---

EFRÉN GUILLERMO INSUASTY SANTACRUZ Zoot. Esp. M.Sc.  
Jurado

San Juan de Pasto, 5 de Octubre de 2011

## DEDICATORIA

*A mi Familia por el apoyo incondicional, el esfuerzo y el sacrificio durante todas las etapas de mi vida.*

*A mis dos ángeles guardianes.*

**Oscar Andrés Martínez O.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa de Mejoramiento Genético Animal de la Universidad de Nariño, al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y a la Cooperativa de Productos Lácteos de Nariño-COLACTEOS, por financiar esta investigación.

Al profesor Carlos Solarte Portilla, nuestro director de tesis, por su inmenso apoyo, dedicación y compromiso con la realización de este trabajo.

A la profesora Carol Rosero Galindo, nuestra Codirectora de tesis, por brindarnos sus conocimientos en biología molecular y por su constante colaboración en el desarrollo de esta investigación.

A todos los integrantes del Grupo Meg@ que de una u otra forma contribuyeron a llevar a feliz término este trabajo.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	23
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	24
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	27
3. OBJETIVOS	28
3.1. OBJETIVO GENERAL	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. MARCO TEÓRICO	29
4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA RAZA HOLSTEIN	29
4.1.1. Características de conformación	29
4.1.2. Producción de leche	29
4.2. COMPOSICIÓN DE LA LECHE	29
4.2.1. Proteínas	30
4.2.1.1. Caseínas	31
4.3. MICELA DE CASEÍNA	31
4.4. GENERALIDADES DE LA BETA CASEÍNA ( -Cs)	32
4.4.1. Gen de la -Cs	34
4.4.2. Polimorfismo genético de la -Cs	35
4.4.3. Frecuencias y distribución de las variantes genéticas de la -Cs	38
4.5. EFECTO DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE LAS PROTEÍNAS SOBRE LA LECHE	39
4.5.1. Asociación de las variantes genéticas de la -Cs con la producción y composición de la leche	39
4.5.2. Asociación de las variantes genéticas de la -Cs con propiedades tecnológicas de la leche	40
4.6. GENERALIDADES DE LOS MARCADORES GENÉTICOS	42
4.6.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	43
4.6.1.1. Componentes de la reacción de PCR	43
4.6.1.2. Etapas de la PCR	45
4.6.1.3. Contaminación en la PCR	47

4.6.2. Marcador molecular RFLP	47
4.7. MEDIDAS DE DIVERSIDAD GENÉTICA	48
4.7.1. Equilibrio HARDY-WEINBERG (H-W)	49
4.7.2. Heterocigosidad	49
4.7.3. Estadísticos F	50
4.7.3.1. $F_{IS}$ (f) Coeficiente de endogamia	50
4.7.3.2. $F_{ST}$ ( ) índice de fijación	50
4.7.3.3. $F_{IT}$ (F) índice de fijación conjunto	51
4.7.4. Distancia genética	51
4.8. GENERALIDADES EN LA ELABORACIÓN DE CUAJADA	51
4.8.1. Materias primas para la elaboración de cuajada	51
4.8.1.1. Leche	51
4.8.1.2. Enzima coagulante	52
4.8.1.3. Cloruro de calcio	52
4.8.2. Proceso para la elaboración de cuajada	52
4.8.2.1. Recepción de la materia prima	53
4.8.2.2. Filtración	53
4.8.2.3. Estandarización	53
4.8.2.4. Pasteurización	53
4.8.2.5. Adición de cloruro de calcio	53
4.8.2.6. Coagulación	53
4.8.2.7. Corte de la cuajada y sinéresis o desuerado	54
4.8.2.8. Moldeado	55
4.8.2.9. Almacenamiento y empaque	55
4.8.3. Rendimiento en cuajada	55
4.8.4. Factores que influyen sobre el rendimiento	55
5. DISEÑO METODOLÓGICO	57
5.1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS VARIANTES ALÉLICAS DEL GEN DE LA BETA CASEÍNA ( -Cs)	57
5.1.1. Localización y tamaño de la muestra	57
5.1.2. Selección de hembras	58
5.1.3. Materiales y equipos	58



5.1.4. Toma de muestras de sangre	58
5.1.5. Extracción de ADN	59
5.1.6. Determinación de las variantes alélicas	60
5.1.6.1. Amplificación por PCR	61
5.1.6.2. Marcador molecular RFLP	62
5.2. EVALUACIÓN DE RENDIMIENTO EN CUAJADA	65
5.2.1. Localización y tamaño de la muestra	65
5.2.2. Selección de animales	65
5.2.3. Toma de muestras de leche	65
5.2.4. Materiales y equipos	66
5.2.5. Evaluación físico-química de las muestras de leche	66
5.2.6. Rendimiento industrial de cuajada	66
5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
5.3.1. Análisis estadístico de la diversidad genética	68
5.3.2. Relación entre los genotipos de la -Cs con la producción de leche, grasa y proteína medidos en kilogramos por lactancia	68
5.3.3. Relación entre los genotipos de -Cs con el rendimiento industrial en cuajada	72
6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	73
6.1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS VARIANTES ALÉLICAS DEL GEN DE LA BETA CASEÍNA ( -Cs)	73
6.1.1. Extracción de ADN	73
6.1.2. Amplificación por PCR del gen de la -Cs	73
6.1.3. Identificación de las variantes alélicas de la -Cs	74
6.2. CÁLCULO DE FRECUENCIAS ALÉLICAS	76
6.2.1. Frecuencias alélicas totales	76
6.2.2. Frecuencias alélicas por distrito	76
6.3. CÁLCULO DE FRECUENCIAS GENOTÍPICAS	77
6.4. CÁLCULO DE LA HETEROCIGOCIDAD	79
6.5. ESTIMACIÓN DEL EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG (H-W)	80
6.6. ESTIMACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA, ESTADÍSTICOS F	81

6.7. ESTIMACIÓN DE LA DISTANCIA GENÉTICA	82
6.8. RELACIÓN ENTRE LOS GENOTIPOS DE LA -Cs CON LAS VARIABLES PRODUCTIVAS	82
6.8.1. Asociación entre los genotipos de la -Cs con la producción de leche	82
6.8.2. Asociación entre los genotipos de la -Cs con la producción de proteína y grasa, en kilogramos por lactancia	84
6.9. RELACIÓN ENTRE LOS GENOTIPOS DE LA -Cs CON EL RENDIMIENTO INDUSTRIAL EN CUAJADA	86
6.9.1. Estadística descriptiva de las variables analizadas	86
6.9.2. Análisis de varianza	88
6.9.2.1. Análisis de varianza para la variable rendimiento en cuajada	88
6.9.2.2. Análisis de varianza para la variable porcentaje de proteína	92
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	95
BIBLIOGRAFÍA	96

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Composición media de la leche cruda de diferentes razas bovinas	30
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de caseínas en la leche bovina	32
<b>Tabla 3.</b> Variantes alélicas A y B determinadas por el cambio de un nucleótido en la secuencia del gen de la -Cs	35
<b>Tabla 4.</b> Posiciones y diferencias en aminoácidos en las variantes genéticas de la -Cs	38
<b>Tabla 5.</b> Mejores genotipos encontrados según diversos trabajos	41
<b>Tabla 6.</b> Coordenadas geográficas y principales características climáticas de los distritos lecheros Pasto y Pupiales del departamento de Nariño, Colombia	57
<b>Tabla 7.</b> Secuencia de cebadores y fragmento esperado en la amplificación de la -Cs bovina	61
<b>Tabla 8.</b> Mezcla de solución de PCR para la amplificación de la -Cs	61
<b>Tabla 9.</b> Protocolo de digestión de productos amplificados por PCR con el marcador molecular RFLP	64

## LISTA DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Descubrimiento y difusión de las variantes genéticas de la beta caseína bovina ( -Cs)	36
<b>Cuadro 2.</b> Frecuencias alélicas de las variantes A y B del gen de la -Cs en hembras bovinas del trópico alto de Nariño	76
<b>Cuadro 3.</b> Frecuencias alélicas de las variantes A y B del gen de la -Cs en hembras bovinas del trópico alto de Nariño	77
<b>Cuadro 4.</b> Frecuencias genotípicas del gen de la -Cs en hembras holstein del trópico Alto de Nariño	77
<b>Cuadro 5.</b> Valores observados de ( $H_o$ ) y esperados ( $H_e$ ) de Heterocigosidad del gen de la -Cs en el Trópico Alto de Nariño	80
<b>Cuadro 6.</b> Valores observados ( $H_o$ ) y esperados ( $H_e$ ) de Heterocigosidad del gen de la -Cs en los distritos lecheros del Trópico Alto de Nariño	80
<b>Cuadro 7.</b> Equilibrio Hardy - Weinberg para el <i>locus</i> de la -Cs en la población del Trópico Alto de Nariño	80
<b>Cuadro 8.</b> Equilibrio Hardy-Weinberg para el <i>locus</i> de la -Cs en los distritos lecheros del Trópico Alto de Nariño	81
<b>Cuadro 9.</b> Estadística descriptiva de la variable producción de leche ajustada a 305 días y equivalente adulto, en hembras holstein del Trópico Alto de Nariño	83
<b>Cuadro 10.</b> Contrastes entre los genotipos de la -Cs para la producción de leche	84
<b>Cuadro 11.</b> Estadística descriptiva de las variables kilogramos de proteína y grasa en hembras holstein del Trópico Alto de Nariño	85
<b>Cuadro 12.</b> Contrastes entre los genotipos de la -Cs para las variables producción en kilogramos de grasa y proteína	85
<b>Cuadro 13.</b> Estadística descriptiva de la variable rendimiento en cuajada y los porcentajes de grasa y proteína por genotipo de la -Cs	87
<b>Cuadro 14.</b> Estadística descriptiva de la variable rendimiento en cuajada y los porcentajes de grasa y proteína por tercio de lactancia	87

<b>Cuadro 15.</b> Análisis de varianza para la variable rendimiento en cuajada	88
<b>Cuadro 16.</b> Medias mínimas cuadráticas para el rendimiento en cuajada, discriminadas por genotipo	89
<b>Cuadro 17.</b> Contrastes entre los genotipos de la -Cs para variable rendimiento en cuajada	89
<b>Cuadro 18.</b> Medias mínimas cuadráticas para el rendimiento en cuajada, discriminadas por tercio de lactancia	91
<b>Cuadro 19.</b> Contrastes entre los tercios de lactancia para la variable rendimiento en cuajada	91
<b>Cuadro 20.</b> Análisis de varianza para la variable porcentaje de proteína	92
<b>Cuadro 21.</b> Medias mínimas cuadráticas para la variable porcentaje de proteína, discriminadas por genotipo	92
<b>Cuadro 22.</b> Contrastes entre los genotipos de la -Cs para variable porcentaje de proteína	92
<b>Cuadro 23.</b> Medias mínimas cuadráticas para la variable porcentaje de proteína, discriminadas por tercio de lactancia	93
<b>Cuadro 24.</b> Contrastes entre los tercios de lactancia para la variable porcentaje de proteína	94

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Modelo de la micela de caseína	32
<b>Figura 2.</b> Estructura primaria de la $\kappa$ -Cs, correspondiente al alelo A <sup>1</sup>	34
<b>Figura 3.</b> Etapa de denaturación de la PCR	46
<b>Figura 4.</b> Etapa de hibridación de la PCR	46
<b>Figura 5.</b> Etapa de extensión de la PCR	46
<b>Figura 6.</b> Equilibrio Hardy - Weinberg considerando un <i>locus</i> con dos alelos	49
<b>Figura 7.</b> Proceso de coagulación de la leche	54
<b>Figura 8.</b> Etapas en el proceso de elaboración de cuajada	56
<b>Figura 9.</b> Ubicación geográfica de los distritos lecheros del Trópico Alto de Nariño, incluidos en esta investigación	57
<b>Figura 10.</b> Toma de muestra de sangre en un ejemplar holstein del distrito de Pupiales	58
<b>Figura 11.</b> Proceso de extracción de ADN por la técnica Salting Out	60
<b>Figura 12.</b> Condiciones de amplificación por PCR para la $\kappa$ -Cs en un termociclador	62
<b>Figura 13.</b> Termociclador My Cycler (BioRad)	62
<b>Figura 14.</b> Condiciones de digestión del marcador molecular RFLP para la $\kappa$ -Cs en un termociclador	64
<b>Figura 15.</b> Preparación de un gel de agarosa al 4%	65
<b>Figura 16.</b> Planta Procesadora Aranda, Cooperativa de Productos Lácteos de Nariño-Colácteos	65
<b>Figura 17.</b> Muestras de leche individuales debidamente identificadas	65
<b>Figura 18.</b> Proceso de rendimiento en cuajada	67
<b>Figura 19.</b> Evaluación de la calidad y cuantificación de ADN por intensidad lumínica, empleando ADN de Timo	73

<b>Figura 20.</b> Gel de agarosa al 2% en el cual se observa el producto de amplificación por PCR del gen de la <i>-Cs</i> , en presencia de una muestra control para verificar la pureza de la reacción	74
<b>Figura 21.</b> Identificación de los genotipos para la <i>-Cs</i> bovina, mediante PCR-RFLP, con la Enzima <i>MspI</i>	75
<b>Figura 22.</b> Esquema de polimorfismos y genotipos para la <i>-Cs</i> bovina, obtenidos mediante digestión con la Enzima <i>MspI</i>	75
<b>Figura 23.</b> Frecuencias genotípicas de la <i>-Cs</i> en la población total del Trópico Alto de Nariño	78
<b>Figura 24.</b> Frecuencias genotípicas de la <i>-Cs</i> en el distrito de Pasto	78
<b>Figura 25.</b> Frecuencias genotípicas de la <i>-Cs</i> en el distrito de Pupiales	78
<b>Figura 26.</b> Dendograma de distancia genética de Nei (1972), basado en el método UPGMA entre los distritos lecheros Pasto y Pupiales	82
<b>Figura 27.</b> Producción media de leche ajustada a 305 días y EA para los genotipos de la <i>-Cs</i>	84
<b>Figura 28.</b> Producción media en Kilogramos de Proteína y Grasa por Genotipo de la <i>-Cs</i>	85
<b>Figura 29.</b> Rendimiento en cuajada expresado en litros por kilogramo, para los genotipos de la <i>-Cs</i> en hembras holstein del trópico Alto de Nariño	89
<b>Figura 30.</b> Porcentaje medio de proteína por genotipo de la <i>-Cs</i>	92

## GLOSARIO

**ADN:** ácido desoxirribonucleico, ácido nucléico formado por nucleótidos en los que el azúcar es desoxirribosa, y las bases nitrogenadas son adenina, timina, citosina y guanina. Excepto en los retrovirus que tienen ARN, el ADN codifica la información para la reproducción y funcionamiento de las células y para la replicación de la propia molécula de ADN. Representa la copia de seguridad o depósito de la información genética primaria, que en las células eucariotas está confinada en el núcleo.

**ALELOS:** cada uno de los genes presentes en el mismo lugar (locus) del par de cromosomas homólogos. En general, uno de los diferentes estados alternativos del mismo gen.

**AMINOÁCIDO:** molécula orgánica que contiene los grupos amino y carboxilo. Son los monómeros de las proteínas. De su diversidad como del enorme número de combinaciones y longitudes resulta la enorme variedad de proteínas existentes.

**BIOLOGÍA MOLECULAR:** parte de la biología que trata de los fenómenos biológicos a nivel molecular. En sentido restringido comprende la interpretación de dichos fenómenos sobre la base de la participación de las biomoléculas, proteínas y ácidos nucléicos.

**BLUE:** Best Linear Unbiased Estimator, relaciona las estimaciones de las funciones lineales de los efectos fijos que tienen una mínima varianza de muestreo, es insesgado y se basa en las funciones lineales de los datos en un modelo animal.

**CASEÍNA:** del latín *caseus*, “queso”, es una fosfoproteína presente en la leche y en algunos de sus derivados. En la leche, se encuentra en la fase soluble asociada al calcio en un complejo que se ha denominado *caseinógeno*.

**CEBADOR:** iniciador o primer, es una cadena de ácido nucléico o de una molécula que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Es una secuencia corta de ácido nucléico que contienen un grupo 3'hidroxilo libre que forma pares de bases con una hebra molde complementaria y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

**CODOMINANCIA:** es la situación en que un individuo heterocigótico exhibe el fenotipo de ambos alelos de un gen específico.

**CODÓN:** secuencia de tres nucleótidos consecutivos en un gen o molécula de ARNm determinada por sus bases nitrogenadas, que especificará la posición de un aminoácido en una proteína.



**CONTRASTES ORTOGONALES:** es una prueba de comparación de medias o combinaciones lineales. Los contrastes son ortogonales si la suma de los coeficientes de cada hilera es igual a cero, además el producto de dos filas, también debe ser igual a cero.

**CROMOSOMA:** corpúsculo intracelular alargado que consta de ADN, asociado con proteínas, y constituido por una serie lineal de unidades funcionales conocidas como genes.

**CUELLO DE BOTELLA:** breve reducción del tamaño de una población que ocasiona, generalmente, deriva genética aleatoria.

**DELECIÓN:** es una clase especial de mutación en que se pierde parte del ADN de un cromosoma.

**DENDROGRAMA:** todo diagrama ramificado que muestre, mediante líneas en forma de U, una jerarquía de categorías u objetos basada en el grado de semejanza o en número de caracteres compartidos. La longitud de cada rama en U representa, a veces, la distancia que separa los dos objetos conectados.

**EFECTO FIJO:** efecto que no tiene connotación aleatoria. Por ejemplo un efecto fijo puede ser el sexo, la edad, el hato. Un efecto es fijo si los niveles utilizados representan todos los niveles posibles del factor o si estos son los únicos niveles sobre los cuales se desea inferir.

**EFECTO ALEATORIO:** es un componente de los datos el cual tiene un grado de aleatoriedad asociado a los mismos. Un efecto es aleatorio si los niveles elegidos para el experimento constituyen una muestra aleatoria de un grupo mayor de niveles susceptibles de ser utilizados.

**ELECTROFORESIS:** técnica de separación de mezclas de moléculas orgánicas basadas en las distintas velocidades de desplazamientos de las moléculas en un campo eléctrico.

**ENZIMAS DE RESTRICCIÓN:** enzimas bacterianas sintetizadas como reacción defensiva frente a la invasión de ADN extraño, como por ejemplo bacteriófagos ADN, a los que degrada mientras que el propio está protegido por metilaciones específicas. Cada una de estas enzimas escinde el ADN siempre en el mismo sitio, en loci específicos o secuencias diana. Son las tijeras de la ingeniería genética que abrieron las puertas a la manipulación genética.

**EXONES:** secuencias de ADN específicas de genes, que codifican secuencias de aminoácidos en las proteínas.

**FENOTIPO:** conjunto de todos los caracteres manifiesto expresados por un organismo, sean o no hereditarios.

**FRECUENCIA GÉNICA O ALÉLICA:** proporción de copias de un gen en una población determinada.

**GEN:** unidad física y funcional del material hereditario que determina un carácter del individuo y se transmite de generación en generación. Su base material la constituye una porción de cromosoma (locus) que codifica la información mediante secuencias de ADN.

**GENOMA:** conjunto de todos los genes de un organismo, de todo el patrimonio genético almacenado en el conjunto de su ADN o de sus cromosomas.

**GENOTIPO:** constitución genética, de uno o más genes, de un organismo en relación a un rasgo hereditario específico o a un conjunto de ellos.

**HAPLOTIPO:** constitución genética de un individuo con respecto a uno de los miembros de un par de genes alélicos. Un haplotipo puede referirse a un locus o a todo el genoma. A nivel del genoma, un haplotipo comprendería la mitad de un genoma diploide incluyendo un alelo de cada par de alelos en un gen.

**INSERCIÓN:** anomalía cromosómica en la que se inserta una secuencia de ADN en un gen, lo que distorsiona la estructura y la función normales de ese gen.

**INTRONES:** secuencias de ADN que no codifican genes y cuya función es desconocida.

**LOCUS (Pl. LOC):** en genética, punto de un cromosoma ocupado por un gen.

**MATRIZ:** conjunto de números arreglados en filas y columnas.

**MÉRITO GENÉTICO:** o valor de cría, es la sumatoria de los efectos aditivos medios de todos los genes que un individuo recibe de sus padres.

**MODELO ANIMAL:** metodología que incluye un efecto aleatorio por cada mérito genético aditivo, o valor de cría de cada animal, para los animales con registro y los animales que son progenitores, incorporando toda la información de la progenie en el análisis, mediante la matriz genética de covarianzas, lo que incrementa la exactitud y la veracidad de los resultados.

**MOLÉCULAS ANFIPÁTICAS:** son aquellas que poseen un extremo hidrofílico (soluble en agua) y otro hidrófobo (rechaza el agua). A estos compuestos que contiene grupos simultáneos fuertemente no polares y grupos fuertemente polares, el agua los dispersa o los solubiliza formando micelas.

**MTDFREML:** Multiple Trait Derivative-Free Restricted Maximum Likelihood. Conjunto de programas para estimar los componentes de varianza y covarianza usando un modelo animal y libre de derivadas REML.

**MUTACIÓN:** cambio del material genético. Puede afectar a cambios en un par de bases del ADN, en un gen específico o en la estructura cromosómica. La

mutación es la línea germinal o relativa a las células sexuales, puede conducir a patologías genéticas o a cambios substanciales de la evolución biológica.

**NUCLEÓTIDO:** monómero de los ácidos nucleicos, integrado por la combinación de una base nitrogenada (purina o pirimidina), un azúcar (ribosa o desoxirribosa) y un grupo fosfato. Se obtiene como producto de la hidrólisis de ácidos nucleicos por acción de nucleasas.

**NÚMERO CASEÍNICO:** se refiere al porcentaje de nitrógeno (N) que contienen las caseínas, determina fundamentalmente el rendimiento quesero por Kg de leche.

**PALÍNDROMOS:** fragmento de dos cadenas de ADN en que las bases complementarias de la doble hélice están ordenadas según una simetría rotacional. Constituyen el sustrato de las endonucleasas de restricción que rompen la molécula en el entorno del eje de simetría y en ambas cadenas. Son segmentos capícuas que resultan iguales vistos en uno u otro sentido.

**PCR:** de sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa, es una técnica molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original o molde.

**POLIMÓRFICO:** coexistencia de dos o más formas segregantes discontinuas, determinadas genéticamente, en una población en donde la frecuencia del tipo más raro no se mantiene solo por mutación. Son las diferentes formas de un alelo en un locus.

**REML:** Restricted Maximum Likelihood. Método para estimar los componentes de varianza en un modelo lineal.

**RFLP:** de sus siglas en inglés Restriction Fragment Length Polymorphism o Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción, se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción y que varían entre individuos.

**SECUENCIA DE ADN:** orden de encadenamiento de las bases nitrogenadas de los nucleótidos que constituyen el ADN y que cifra toda la información genética. Cuando es codificante (exón), define el orden de los aminoácidos que forman la proteína correspondiente.

**TFPGA:** Tools For Population Genetic Analysis. Software especializado para el cálculo de parámetros genéticos de poblaciones.

**VARIABLE ALEATORIA:** valor real de una función de los resultados de un experimento. Por ejemplo en los modelos de mejoramiento animal, se supone que los animales son el producto de un muestreo aleatorio debido a que los

cromosomas segregan aleatoriamente al producir gametos y los gametos se unen aleatoriamente para producir un cigoto.

VECTOR: arreglo de números que forman una sola columna (vector columna) o una sola fila (vector fila).

VEROSIMILITUD: es una función de los parámetros de un modelo estadístico que permite realizar inferencias acerca de su valor a partir de un conjunto de observaciones.

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar molecularmente los genotipos AA, AB y BB para la Beta Caseína (-Cs) y establecer la relación de estos genotipos con las variables producción de leche, grasa y proteína medidas en Kg por lactancia y el rendimiento industrial en cuajada, en vacas holstein del Trópico Alto de Nariño-Colombia. En total se utilizaron 100 hembras, previamente evaluadas y seleccionadas como donantes de embriones, provenientes de los distritos lecheros de Pasto y Pupiales. El genotipo se determinó mediante la técnica PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) y las relaciones entre las variables productivas y los genotipos se establecieron mediante estimadores de máxima verosimilitud restringida (REML) en un modelo animal univariado, donde los efectos fijos fueron la lactancia, el hato-año-época y el genotipo para la -Cs. Para la evaluación del rendimiento industrial se utilizaron tres vacas por genotipo, y cinco mediciones por vaca, para un total de 45 unidades experimentales. Para el análisis estadístico del rendimiento en cuajada se utilizó un modelo lineal, donde se incluyeron como efectos fijos el tercio de lactancia, el genotipo y la covariable porcentaje de grasa en la leche.

Los resultados del análisis molecular, mostraron una alta frecuencia alélica, superior al 90% para la variante A, asimismo, se calcularon frecuencias genotípicas de 87% para el genotipo AA; 10% para el genotipo AB y 3% para el genotipo BB. La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) fue igual al 10% y no se encontró equilibrio Hardy Weinberg (H-W) ( $P < 0,05$ ). Los bajos niveles de heterocigosidad y el valor de  $F_{IS}$  (0.3272), evidenciaron altos niveles de endogamia, probablemente como resultado de la intensidad de selección practicada en la raza. Los resultados del análisis de las variables productivas, indican que existen diferencias significativas entre los genotipos de la -Cs con la producción de leche por lactancia ( $P < 0.05$ ), en cuanto a los Kg de proteína y grasa por lactancia, el efecto de los genotipos no resultó significativo ( $P > 0.05$ ).

En cuanto al rendimiento industrial en cuajada la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer y los contrastes ortogonales, indicaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en los promedios de rendimiento, siendo los genotipos BB y AB los de mayor rendimiento, respecto al homocigoto AA, lo que sugiere que fueron los tratamientos donde se requirieron menos litros de leche para producir un kilogramo de cuajada. Entre el homocigoto BB y el heterocigoto AB no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

Para la variable porcentaje de proteína, se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) para el tercio de lactancia y los genotipos, concluyendo que el genotipo AB, en promedio, produce mayor cantidad de proteína total en la leche respecto a los homocigotos AA y BB.

## ABSTRACT

The objective of this work was to identify molecularly AA, AB and BB genotypes of Beta casein (-Cs), and to establish the relation of these genotypes with the variables milk production, fat and protein measured in Kg for lactation and the yield industrial curd, in Holstein cows of the High Tropic of Nariño – Colombia. Altogether were used 100 females, previously evaluated and selected as embryo donors, from the dairy districts of Pasto and Pupiales. The genotype was determined by the PCR-RFLP technique (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism), and the relation between productive traits and genotypes were established by Restricted Estimate Maximum Likelihood in a unvaried animal model, where the fixed effects were lactation, herd-year-station and genotype of -Cs. For evaluation industrial curd yield were used three cows per genotype and five measurements by cow for altogether of 45 experimental units. Then it was used a linear model for statistic analysis for curd yield, where the lactation stage, the genotype and the fat percentage were included as fixed effects of covariates.

The results of the molecular analysis showed high allelic frequency higher 90% for the A variant. Also were calculated genotypic frequencies of 87% to AA genotype; 10% to AB genotype and 3% to BB genotype. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) was equal to 10% and not found Hardy Weinberg equilibrium ( $H-W$ ) ( $P < 0.005$ ). The low levels of heterozygosity and the  $F_{IS}$  value (0.3272) showed high level of inbreeding, maybe as result of the intensity of the selection practiced in the breed. The results of the analysis of the productive variables showed significant differences between -Cs genotypes with the milk production for lactation ( $P < 0.005$ ), in respect to fat at protein Kg for lactation, the effect of genotypes was not significant ( $P > 0.05$ ).

With regard to yield industrial curd the test multiple comparison Tukey-Kramer and the orthogonal contrasts, showed significant differences ( $P < 0.05$ ) in the average of yield, being the BB and AB genotypes that showed the most yield, respect to AA homozygous, which suggested that were the treatments where, was required less milk liters to make one kilogram of curd. Between BB homozygous and AB heterozygous was not found significant differences ( $P > 0.05$ ).

Respect to percentage of protein, were detected statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) for the lactation stage and the genotypes, concluding that AB genotype, on average produce more total protein in the milk respect to homozygous AA and BB.

## INTRODUCCIÓN

El propósito del Mejoramiento Genético Animal consiste en obtener, mediante selección, generaciones futuras con desempeño superior a las predecesoras, lo cual suscita un cambio en las frecuencias de los genes deseables, generación tras generación, incrementándose así los genotipos de interés económico. El éxito de los programas de mejoramiento se ha basado en el control de la producción, con el registro permanente y fidedigno de todos los eventos productivos, reproductivos y sanitarios de los hatos, así como de las genealogías. Al disponer de esta información, se ha logrado cuantificar la variabilidad genética e identificar aquellos individuos de mérito genético superior a través de esquemas de mejoramiento clásicos, con modelos matemáticos cada vez más complejos.

Sin embargo, en las últimas décadas, los esquemas clásicos de mejoramiento genético animal, han experimentado notorios avances gracias al desarrollo de las técnicas moleculares. En el caso concreto del ganado bovino, la identificación de marcadores de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) relacionados con características productivas, han contribuido a mejorar la eficiencia y la intensidad de selección y consecuentemente el incremento del progreso genético por generación.

Diversos estudios, realizados en varios países, han probado que los polimorfismos de los genes que determinan la expresión de las fracciones proteínicas de la leche, están asociados estrechamente con los rasgos de producción y calidad composicional de la misma. No obstante, los resultados obtenidos presentan una gran variación, lo que obliga a realizarlos bajo las condiciones propias de cada región.

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar molecularmente los genotipos de la fracción proteica Beta caseína ( -Cs) en vacas holstein mediante la técnica PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) y establecer su relación con las variables producción de leche, grasa, proteína medida en Kg por lactancia y el rendimiento industrial en cuajada, bajo las condiciones del Trópico Alto de Nariño-Colombia.

Este proyecto hace parte del Programa de Mejoramiento Genético, el cual desde el año 2007 adelanta la Universidad de Nariño en convenio con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia y la Cooperativa de Productos Lácteos – Colácteos, con el objeto de obtener por selección el tipo de animal más apropiado para esta zona de Colombia, donde es indispensable enfocar las metas de selección hacia el mejoramiento de la calidad composicional de la leche.

## 1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Durante varias décadas el mejoramiento genético en los *Bos taurus* se orientó fundamentalmente a la selección por volumen de producción de leche, dejando en un segundo plano las características relacionadas con la calidad composicional de la misma. Sin embargo, en las dos últimas décadas se han intentado re direccionar los objetivos de selección, buscando mejorar la calidad composicional de la leche, especialmente en cuanto al contenido de proteína, por su relación con el rendimiento industrial en la elaboración de queso.

En la búsqueda de este objetivo, se vienen utilizando intensivamente las tecnologías moleculares, con el fin de acelerar el progreso genético, ya que estas nuevas herramientas hacen posible la identificación de genotipos superiores en fases tempranas de la vida de los bovinos, lo que facilita la selección y disminuye el intervalo generacional.

En Colombia, con el fin de incentivar la producción de leche de mejor calidad composicional, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, emitió la resolución 000012 de enero de 2007<sup>1</sup>, donde se establecen las disposiciones sobre el precio de venta de la leche y el incremento del mismo, en función del contenido de proteína además de las bonificaciones voluntarias, que por ese concepto paga la industria láctea. Por consiguiente, Solarte *et al*<sup>2</sup>, mencionan que uno de los retos más importantes para la cadena láctea en el Trópico Alto de Nariño, es mejorar la calidad composicional de la leche, para que el ganadero procure aumentar sus ingresos y el consumidor reciba satisfactoriamente un producto de alto valor biológico.

Mejorar la calidad composicional de la leche implica poner en marcha planes integrales, que incluyen aspectos nutricionales y de mejoramiento genético; en los últimos, se ha visto la necesidad de emplear la selección asistida por marcadores moleculares, con el fin de facilitar el estudio del comportamiento genético, respecto a las fracciones proteínicas de la leche. Dichos estudios deben efectuarse bajo las condiciones ambientales propias de cada zona, por la complejidad de la expresión genética, la cual está regulada por factores hereditarios y del entorno.

De acuerdo con Walstra *et al*<sup>3</sup>, "las proteínas lácteas se encuentran divididas en dos grupos: caseínas y proteínas del lactosuero. Las primeras representan el 80% del total de las proteínas lácteas y están constituidas por cuatro

---

<sup>1</sup> Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, Resolución No. 00012 del 12 de Enero de 2007. [En Internet] 2007. Disponible en: [http://www.minagricultura.gov.co/archivos/resolucion\\_012\\_2007.pdf](http://www.minagricultura.gov.co/archivos/resolucion_012_2007.pdf)

<sup>2</sup> SOLARTE, C. *et al*. Mejoramiento Genético y Calidad de Leche. En: Infórmese, Publicación de la Cooperativa de Productos Lácteos de Nariño. Vol. 12, n. 2, (Dic, 2007) p. 24-25.

<sup>3</sup> WALSTRA, P. *et al*. Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos. Zaragoza, España, Ed. Acibia S.A. 2001. p.p. 81



caseínas naturales denominadas Alfa s1 Caseína (  $\alpha$ 1-Cs), Alfa s2 Caseína (  $\alpha$ 2-Cs), Beta Caseína (  $\beta$ -Cs) y Kappa Caseína (K-Cs); las segundas representan el 20% restante y son la Alfa Lacto albúmina (  $\alpha$ -LA) y la Beta Lacto globulina (  $\beta$ -LG)”.

La fracción Beta caseína (  $\beta$ -Cs) es de gran importancia, ya que por su actividad anfipática, interviene en la formación de micelas junto con la fracción Kappa (K-Cs), aspecto crucial para determinar el rendimiento industrial. Según Aschaffenburg<sup>4</sup>, las investigaciones realizadas sobre el gen que codifica la fracción  $\beta$ -Cs, han permitido identificar un alto grado de polimorfismo, lo que sugiere la existencia de alta variabilidad genética y por ende mayores posibilidades de selección. De acuerdo con Ng-Kwai-Hang y Grosclaude<sup>5</sup>, actualmente se tienen descritas once variantes alélicas, denominadas A, A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, B, C, D, E, F, G y H de las cuales, según Formagioni *et al*<sup>6</sup>, las más frecuentes en *Bos taurus* son las variantes A y B.

Ng-Kwai-Hang<sup>7</sup>, afirman que varios estudios, sobre la  $\beta$ -Cs, reportan que las vacas que portan la variante A, alcanzan mayores niveles de producción de leche y por lo tanto más kilogramos de proteína por lactancia, aunque menores contenidos de grasa; en cambio, los individuos que poseen el alelo B, producen menos leche pero con mayores porcentajes de proteína, por lo cual este alelo se relaciona con un mayor rendimiento industrial del queso, por efecto del menor tiempo de coagulación y mayor firmeza de la cuajada.

En el Trópico Alto de Nariño se encuentra en marcha un programa de mejoramiento genético asistido con marcadores moleculares. En su primera fase se estudió la fracción proteica K-Cs en la raza holstein, donde se determinó que el alelo A se encuentra con mayor frecuencia, respecto al alelo B. Igualmente se encontró que este alelo está relacionado con mayor producción de leche, pero con menores contenidos de proteína y grasa, mientras que el alelo B está relacionado con mayores porcentajes de grasa, proteína y mejores rendimientos en la elaboración industrial de cuajada.

En una segunda fase, en este programa se contempla el estudio de las otras fracciones proteicas de la leche, (  $\alpha$ 1-Cs;  $\alpha$ 2-Cs;  $\beta$ -Cs;  $\beta$ -LG y  $\beta$ -La), sobre las

---

<sup>4</sup> ASCHAFFENBURG, R. Inherited Casein Variants in Cow's Milk. Citado por: FORMAGGIONI, P *et al*. Milk Protein Polymorphism: Detection and Diffusion of the Genetic Variants in Bos genus, Instituto di Zootechnica e Nutrizioni, Università degli Studi. [En Internet] 1999. Disponible en <http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/formaggioni/formaggioni.htm>.

<sup>5</sup> NG-KWAI-HANG, K.F y GROSCLAUDE, F. Genetic Polymorphism of Milk Proteins. En: MCNEENEY Advanced Dairy Chemistry, FOX, P.F. y, P.L.H, 2001.

<sup>6</sup> FORMAGGIONI, P *et al*. Milk Protein Polymorphism: Detection and Diffusion of the Genetic Variants in Bos genus, Instituto di Zootechnica e Nutrizioni, Università degli Studi. [En Internet] 1999. Disponible en <http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/formaggioni/formaggioni.htm>.

<sup>7</sup> NG-KWAI-HANG, K. F. Milk Protein Heterogeneity, Fractionation and Isolation. Citado por: ROGINSKI, H., FUQUARY, W., P. F. FOX, Encyclopedia of Dairy Science. Academic Press London, 2001.

cuales aún no se han realizado investigaciones en esta zona. Por lo anterior, esta investigación pretende llenar el vacío en el conocimiento respecto a la fracción  $\beta$ -Cs, lo cual contribuirá a completar la información molecular obtenida en la fase anterior y establecer las posibles asociaciones existentes entre los diversos genotipos para esta fracción proteínica y las variables relacionadas con la producción, calidad composicional y rendimiento industrial de la leche, con el propósito de incluir esta información, como herramienta complementaria de selección en esta región de Colombia.

## **2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿En las hembras holstein, bajo las condiciones del Trópico Alto de Nariño, existe relación entre las variantes alélicas A y B del gen de la  $\beta$ -Cs con la producción de leche, proteína, grasa y el rendimiento industrial en cuajada?

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Establecer las relaciones existentes entre los genotipos de la Beta Caseína (-Cs) con la producción de leche y el rendimiento industrial en cuajada en la raza holstein.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**3.2.1.** Identificar molecularmente los genotipos AA, AB y BB de la -Cs, mediante la técnica molecular PCR-RFLP, en hembras holstein del Trópico Alto de Nariño.

**3.2.2.** Cuantificar las frecuencias alélicas y genotípicas para el gen de la -Cs en la población objeto de estudio.

**3.2.3.** Establecer el equilibrio Hardy Weinberg, la heterocigosidad observada y esperada, en la misma población.

**3.2.4.** Determinar la asociación existente entre los genotipos AA, AB y BB para la -Cs con la producción de leche, grasa y proteína medidas en Kg por lactancia y el rendimiento industrial en la elaboración de cuajada.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA RAZA HOLSTEIN

De acuerdo con la Asociación Holstein de Colombia – Asoholstein<sup>8</sup>, esta raza tiene como sus ancestros más remotos los animales negros de los bávaros y los blancos de los frisios, tribus que hace cerca de 2.000 años se ubicaron en el delta del Rin. Actualmente, esta raza es la más difundida y representativa a nivel mundial por sus características de producción de leche, color y fortaleza.

**4.1.1 Características de Conformación.** Los holstein son animales grandes, elegantes con pelaje de color negro y blanco o rojo y blanco. El peso de una vaca adulta oscila entre 675 - 700 Kg, con una altura a la cruz de 1.50 m. aproximadamente.

**4.1.2 Producción de Leche.** La raza holstein se ha distinguido por su sobresaliente producción de leche, en virtud de la permanente selección para buscar acentuar aquellos rasgos que determinan una mayor producción lechera. Asoholstein<sup>9</sup> reporta una producción media ajustada a 305 días y edad adulta de 6.258 litros para Colombia y más de 10.000 litros para Estados Unidos (Holstein Association USA)<sup>10</sup>.

### 4.2 COMPOSICIÓN DE LA LECHE

La leche es el producto normal de secreción de la glándula mamaria de las hembras mamíferas sanas. Físicamente es un fluido complejo con más de cien sustancias en diferentes estados de dispersión como suspensión, emulsión y solución verdadera. Dichas sustancias son las que determinan su calidad nutricional, además de concederle las propiedades como materia prima para la elaboración de subproductos.

De acuerdo con Walstra *et al*<sup>11</sup>, la variación en los constituyentes de la leche se debe generalmente a diferentes factores que alteran su composición, estructura y propiedades, tales como la especie, la raza, la fase y número de lactancia,

<sup>8</sup> Asociación Holstein de Colombia. [En internet] 2010 [Citado el 23 de marzo de 2010] Disponible en: [www.asoholsteincolombia.com.co](http://www.asoholsteincolombia.com.co)

<sup>9</sup> Asociación Holstein de Colombia. Resumen nacional de desempeño productivo y reproductivo Junio de 2011. [En internet] 2011 [Citado el 17 de junio de 2011] Disponible en: <http://www.holstein.com.co/index.php?doc=raza>

<sup>10</sup> Holstein Association USA. Holstein Breed Characteristics [En internet] 2011 [Citado el 17 de junio de 2011] Disponible en: [http://holsteinusa.com/holstein\\_breed/breedhistory.html](http://holsteinusa.com/holstein_breed/breedhistory.html)

<sup>11</sup> WALSTRA, P. *et al.* Op.Cit. p.p. 15-25

edad de la vaca, estados patológicos como la mastitis, factores ambientales y de manejo como la alimentación, el clima, el sistema de ordeño, entre otros. Al respecto Pollott<sup>12</sup> menciona que “dichas variaciones se dan principalmente en el contenido de grasa y en menor proporción en proteínas, lactosa y cenizas”.

En la Tabla 1 se indica la composición de la leche en las razas bovinas lecheras más representativas.

**Tabla 1. Composición media de la leche cruda de diferentes razas bovinas (g/100g).**

RAZAS	Grasa (%)	Proteína (%)	Lactosa (%)	Ceniza (%)	Sólidos Totales (%)
Holstein	3,4	3,3	4,5	0,75	11,54
Pardo suizo	4,0	3,3	4,7	0,72	12,72
Jersey	5,3	4,0	4,9	0,72	14,92

Adaptado de Walstra, P. *et al*, 2001

Latrille<sup>13</sup> y Requena *et al*<sup>14</sup> mencionan que los principales factores que alteran el contenido de proteína en la leche son la alimentación y la genética, considerando ésta última la más importante, debido a que le da el potencial a la vaca para producir leche de una determinada calidad y el medio ambiente le provee las condiciones para que dicho potencial se exprese.

**4.2.1 Proteínas.** De acuerdo con Walstra *et al*<sup>15</sup> y Fennema<sup>16</sup>, las proteínas de la leche se dividen en dos grandes grupos, dependiendo de su comportamiento por acidificación a pH 4.6 (punto isoeléctrico a temperatura ambiente). Dichos grupos hacen referencia a una fracción insoluble en la que se encuentran las caseínas Alfa s1 ( s1-Cs), Alfa s2 ( s2-Cs), Beta ( -Cs) y Kappa (K-Cs), que representan el 80% del total de las proteínas lácteas. El 20% restante corresponde a las proteínas solubles o del lactosuero el cual se compone por la

<sup>12</sup> POLLOTT, G. Deconstructing Milk Yield and Composition During Lactation Using Biologically Based Lactation Models. En: Journal of Dairy Science [En internet], 2004. Vol. 87, p. 2375–2387. [Citado el 18 de septiembre de 2009] Disponible en <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/87/8/2375>

<sup>13</sup> LATRILLE, L. Calidad de la leche. En: \_\_\_\_\_ Producción Animal. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile, 1999. p. 215 – 236.

<sup>14</sup> REQUENA, F. D. *et al*. Genética de la Caseína de la Leche en el Bovino Frisón. En: REDVET Revista electrónica Veterinaria [En internet], 2007. Vol. VIII, n. 1. [Citado el 1 de octubre de 2009] Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010107.html>

<sup>15</sup> WALSTRA, P. *et al* Op.Cit. p.73

<sup>16</sup> FENNEMA, O. Química de los Alimentos. Zaragoza, España. Editorial Acirbia S.A. 2000. 1258 p.

Alfa-Lactoalbúmina ( -LA), la Beta-Lactoglobulina ( -LG) y en menor concentración la lactoferrina (LFE) y las defensinas (DFS).

**4.2.1.1 Caseínas.** Según Chessa *et al*<sup>17</sup>, las caseínas son un grupo de fosfoproteínas sintetizadas y excretadas por las células epiteliales de la glándula mamaria durante la lactancia y son codificadas por cuatro genes autosomales característicos llamados *CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2* y *CSN3* para la s1-Cs, s2-Cs, -Cs y K-Cs, respectivamente. Estos genes se encuentran ubicados en una región de 250 Kb en el cromosoma 6 en la posición 6q31-33; apareciendo muy próximos entre sí, lo que implica que la unidad de transmisión sea como un grupo de ligamiento.

La s1-Cs, s2-Cs y -Cs se han descrito como sensitivas al calcio (Ca<sup>++</sup>), debido a que precipitan en presencia de bajas concentraciones de este catión; mientras que la K-Cs es la menos sensible a este mineral.

### 4.3 MICELA DE CASEÍNA

Ferrandini *et al*<sup>18</sup> mencionan que, en la leche, las caseínas se encuentran como grandes complejos proteicos de forma esférica que incorporan un 92% de proteínas y un 8% de sales inorgánicas, fundamentalmente fosfato cálcico. Este agregado se denomina micela de caseína, una estructura sólida y esponjosa dispersa en un medio acuoso y que presenta un diámetro medio de 160 nanómetros (nm), cuya función principal es fluidificar las moléculas de caseína y solubilizar el fosfato cálcico.

Según Walstra *et al*<sup>19</sup>, la mayoría de los modelos estructurales de la micela de caseína indican que, la K-Cs se halla localizada mayoritariamente en la superficie de la micela (Figura 1) jugando un papel esencial en la regulación del tamaño micelar y en el mantenimiento de la suspensión de las caseínas en la leche ya que esta fracción es menos sensible a la precipitación por calcio.

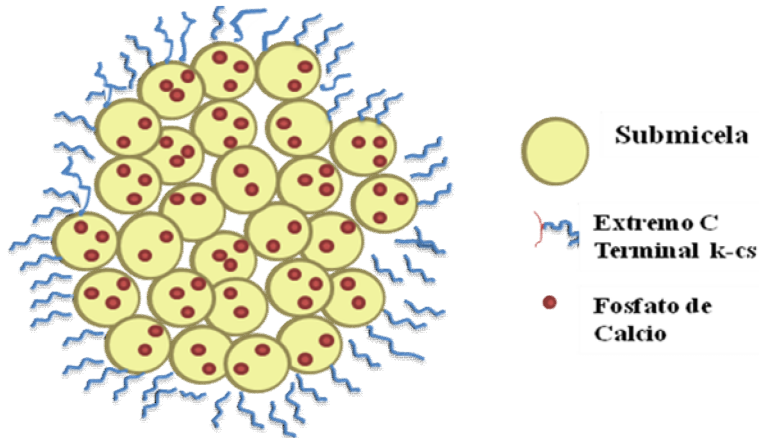
---

<sup>17</sup> CHESSA, S. *et al.* Analysis of 22 Mutations within Milk Protein Genes in Italian Friesian Cattle. En: Italian Journal Animal Science [En internet] 2007. Vol. 6 (suppl. 1). [Citado el 10 de octubre de 2009] Disponible en: <http://ijas.pagepress.org/index.php/ijas/article/view/ijas.2007.1s.76/1310>

<sup>18</sup> FERRANDINI, E. *et al.* Estructura de la Micela de Caseína. En: Anatomía veterinaria [En internet] 2006. Vol. 22 p. 5-18. [Citado el 25 de abril de 2010] Disponible en: <http://revistas.um.es/analesvet/article/viewFile/771/799>

<sup>19</sup> WALSTRA, P. *et al.* Op.Cit. p. 129

**Figura 1. Modelo de la micela de caseína (Walstra, 1999)**



Fuente. Walstra *et al*, 2001

Según Riel<sup>20</sup>, la proporción de K-Cs varía en relación inversa con el tamaño de la micela, mientras que la de -Cs lo hace en forma directa.

En la Tabla 2 se muestra cómo están distribuidas las fracciones caseínicas en la leche bovina.

**Tabla 2. Porcentaje de caseínas en la leche bovina.**

Especie	s1-Cn	s2-Cn	-Cs	K-Cs
Bovina	38	10	40	12

Adaptado de: Farrell *et al*, 2004.

#### 4.4 GENERALIDADES DE LA BETA CASEÍNA ( -Cs)

De acuerdo con Harboe y Budtz<sup>21</sup>, la estructura primaria de la -Cs está formada por una cadena de 209 aminoácidos con 5 grupos fosfato, lo cual le concede la propiedad de ligar fuertemente los iones de calcio. Su peso

<sup>20</sup> RIEL, R. Composición y Estructura Físico-Química de la Leche. En: AMNIOT, J. Ciencia y Tecnología de la Leche, Zaragoza. Acribia S.A. 1991. p. 1-53

<sup>21</sup> HARBOE, M. y BUDTZ, P. Producción, Acción y Aplicación de Cuajo y Coagulantes. Buenos Aires Argentina. CHR HANSEN. 2003.



molecular varía entre 23.983 a 24.000 Dalton, dependiendo de la variante alélica que se presente.

Formaggioni<sup>22</sup> afirma que:

Al igual que la K-Cs, la  $\beta$ -Cs posee una zona polar y otra hidrofóbica en el extremo N-terminal y C-terminal, respectivamente. En el extremo polar se concentran los grupos fosfato unidos a serinas y los aminoácidos más hidrofílicos. Sin embargo la  $\beta$ -Cs es la más hidrofóbica y contiene un mayor número de prolina que cualquier otro tipo de caseínas.

Según Farrell *et al*<sup>23</sup>, la secuencia de aminoácidos de la  $\beta$ -Cs bovina fue establecida en 1972 por Ribadeau-Dumas y más tarde fue revisada por dos grupos de investigadores; Yan y Wold<sup>24</sup> y Carles *et al*<sup>25</sup>, encontrando cuatro diferencias en la secuencia original, donde tres de ellos correspondieron a un cambio de glicina por ácido glutámico en las posiciones 117, 175 y 195 y un cuarto en una inversión de los aminoácidos prolina por leucina en la posición 137 y 138, respectivamente.

En la Figura 2, se presenta la estructura primaria de la  $\beta$ -Cs en la cual se toma como referencia la estructura del alelo A<sup>1</sup>.

---

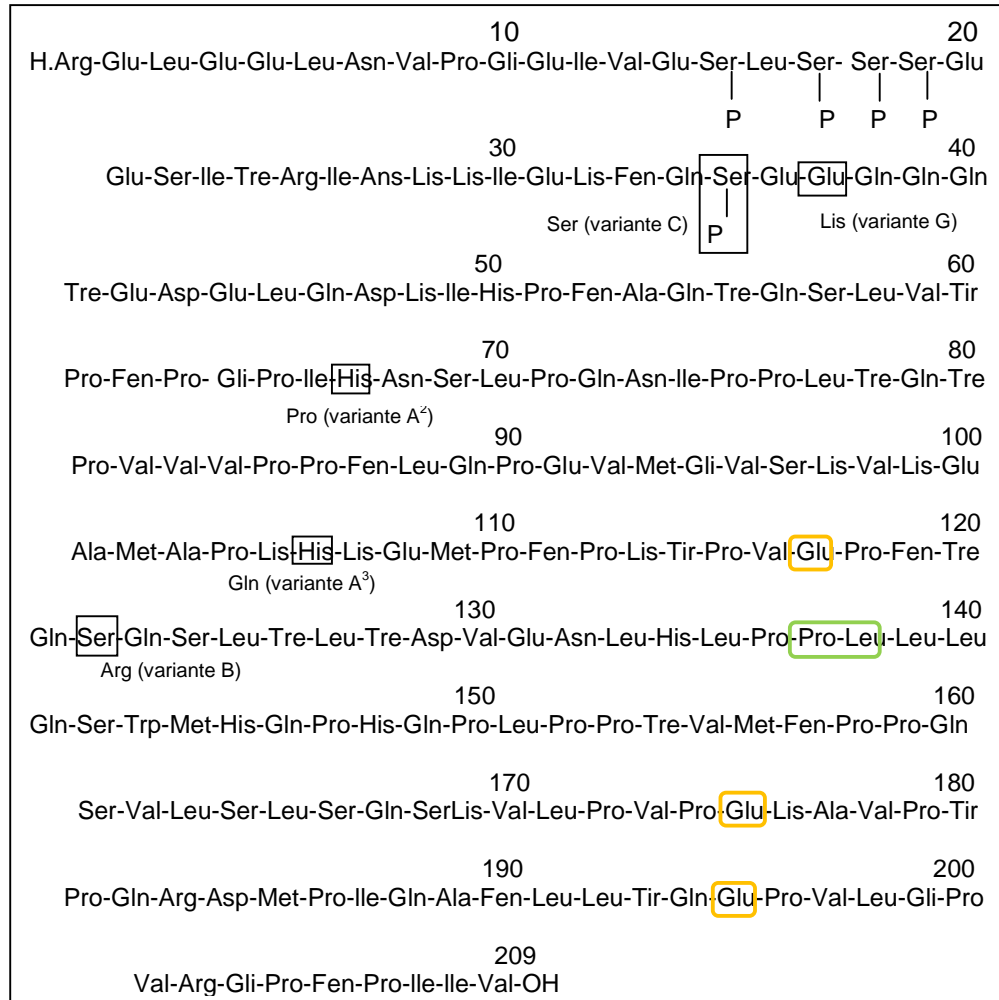
<sup>22</sup> FORMAGGIONI, P., SUMMER, A., MALACARNE, P., MARIANI, P. Op.Cit. 2001

<sup>23</sup> FARRELL, H; JIMENEZ FLOREZ, J; NG-KWAI-HANG K. F. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk Sixth Revision. En: Journal Dairy Science [En internet] 2004. Vol. 87 p.1641-1674 [Citado el 21 de octubre de 2009] Disponible en: [www.americandairyscienceassociation.com](http://www.americandairyscienceassociation.com).

<sup>24</sup> YAN, S. Y WOLD, F. Neoglycoproteins: in vitro introduction of glycosyl units at glutamines in beta-casein using transglutaminase. En: Biochemistry [En internet] 1984. Vol 23 n.16:3759-3765. Citado el 21 de octubre de 2009].

<sup>25</sup> CARLES, C., HUET, J., RIBADEAU-DUMAS, B. A new strategy for primary structure determination of protein: application to bovine  $\beta$ -casein. En: FEBS Lett. [En internet] 1988. Vol 229:265-272. Citado el 21 de octubre de 2009].

**Figura 2. Estructura primaria de la -Cs, correspondiente al alelo A<sup>1</sup>**



Tomado y adaptado de: Farrell *et al*, 2004.

Yan y Wold 1984, Carles *et al* 1988:

Cambio de Gli por Glu →  

Inversión de Pro por Leu →  

**4.4.1. Gen de la -Cs.** De acuerdo con el NCBI (de sus siglas en inglés National Center for Biotechnology Information), el gen de la -Cs se encuentra ubicado en el cromosoma 6, exón VII y comprende los nucleótidos entre las

posiciones 8028 hasta el 8525. Esta secuencia se encuentra disponible en el Genbank<sup>26</sup> y se muestra a continuación:

**Genbank sequence**

Accession number: X14711  
VERSION X14711.1 GI: 120

**Secuencia parcial de nucleótidos:** Gen de la beta caseína bovina

**EXON VII**

```

7981 attataactg gattatggac tcaaagattt gttttccttc tttccaggat gaactccagg
8041 ataaaatcca cccctttgcc cagacacagt ctctagtcta tcccttccct ggacccatcc
8101 ataacagcct cccacaaaac atccctctct ttaactcaaac cctgtggtg gtgccgcctt
8161 tccttcagcc tgaagtaatg ggagtctcca aagtgaagga ggctatggct ctaagcaca
8221 aagaaatgcc cttccctaaa tatccagttg agccctttac tgaaagccag agcctgactc
8281 tcactgatgt tgaaaatctg caccttctct tgcctctgct ccagtcttgg atgcaccagc
8341 ctaccagcc tcttctctca actgtcatgt ttctctctca gtccgtgctg tccctttctc
8401 agtccaaagt cctgcctggt cccagaaag cagtgccta tcccagaga gatatgcca
8461 ttcaggcctt tctgctgtac caggagcctg tactcggtcc tgtccgggga cccttcccta
8521 ttattgtaag tctaaattta ctaactgtgc ctgtttaact tctgatgttt gtatgatatt

```

**4.4.2. Polimorfismo Genético de la -Cs.** Alais<sup>27</sup> menciona que la base molecular del polimorfismo genético de las proteínas de la leche, deriva de modificaciones en la estructura primaria de la proteína por la sustitución, supresión o delección de uno o más aminoácidos. Este fenómeno se debe a los cambios que pueden ocurrir en la secuencia de los nucleótidos de los genes que las codifican, provocando diversas formas alélicas o variantes de una misma proteína.

Como se observa en la Tabla 3, el cambio de una base nitrogenada en la secuencia de nucleótidos que codifica el gen -Cs, permite diferenciar las variantes alélicas A y B.

**Tabla 3. Variantes alélicas A y B determinadas por el cambio de un nucleótido en la secuencia del gen de la -Cs.**

Variante genética	Exón	Posición nucleótido	Cambio	Posición aminoácido	Cambio
-------------------	------	---------------------	--------	---------------------	--------

<sup>26</sup> National Center for Biotechnology Information, Bovine beta-casein Gene, complete cds [En internet] [Citado el 23 de febrero de 2010] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/M55158.1>

<sup>27</sup> ALAIS. C. Science du Lait, Principes des techniques laitières 4ta edición. Paris, 1984. Editions Sepaic. 814p.

A→B	VII	8267	C → G	122	Ser → Arg (AGC) (AGG)
-----	-----	------	-------	-----	--------------------------

Adaptado de: Medrano, J. F. 1991

De acuerdo con Imafidon *et al*<sup>28</sup>, las variantes de las proteínas de la leche pueden tener efecto en su funcionalidad ya que causan un cambio en la conformación de la estructura secundaria de la proteína, afectando sus propiedades físicas, por ejemplo en los patrones de interacción que interfieren en la estabilidad de la micela, en las propiedades de coagulación y en las características de producción de leche, grasa y proteína.

El polimorfismo de la -Cs es muy complejo, debido a su alta variabilidad genética. La primera evidencia de polimorfismo del gen de la -Cs data de 1961 cuando Aschaffenburg, descubrió a través de electroforesis en papel a pH alcalino, tres diferentes bandas a las que llamó A, B y C en orden decreciente de su movilidad en un campo eléctrico, la cual está determinada por la diferencia de carga, masa molecular y punto isoeléctrico de cada variante.

Formaggioni *et al*<sup>29</sup> mencionan que Peterson y Kopfler en 1966, empleando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida a pH ácido, encontraron tres variantes diferentes que derivan de la variante A a las que denominaron A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup> y A<sup>3</sup>.

Hasta el momento se han reportado 11 variantes alélicas totalmente caracterizadas para el gen de la -Cs: A, A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, B, C, D, E, F, G y H. En el Cuadro 1 se observan dichas variantes y otras que aún no han sido caracterizadas en su totalidad.

**Cuadro 1. Descubrimiento y difusión de las variantes genéticas de la beta caseína bovina ( -Cs).**

Variante	Año	Especie (Lugar)	Raza (frecuencia)	Método descubr.	Difusión	Referencias
( <sup>1</sup> ) A	1961 1963	<i>B. taurus</i> (UK)	Jersey, Guernsey, Ayrshire, Shorthorn, Friesian	PE a pH 7,15	-	Aschaffenburg, 1961-1963
( <sup>2</sup> ) A <sup>1</sup>	1966	<i>B. taurus</i> (UK)	Jersey, Guernsey, Ayrshire, Holstein, Pardo suizo	PAGE a pH 3	En la mayoría de razas <i>B. indicus</i>	Peterson y Kopfler, 1966 Kiddy, 1966
( <sup>2</sup> ) A <sup>2</sup>	1966	<i>B. taurus</i> (UK)	Jersey, Guernsey, Ayrshire, Holstein, Pardo suizo	PAGE a pH 3	Todas las razas y especies**	Peterson y Kopfler, 1966 Kiddy <i>et. al.</i> , 1966
A <sup>3</sup>	1966	<i>B. taurus</i> (UK)	Holstein	PAGE a pH 3	No es común En otras razas ( <sup>3</sup> ) <i>B. indicus</i> ( <sup>4</sup> )	Kiddy <i>et. al.</i> , 1966
B	1961	<i>B. taurus</i> (UK)	Jersey, Guernsey	PE a pH 7,15	En la mayoría	Aschaffenburg, 1961-

<sup>28</sup> IMAFIDON, G., Ng-Kwai-Hang, K.F., HANVALKAR, V.R and Ma, C.Y. Effect of genetic polymorphism on the susceptibility of -casein to calcium precipitation and stabilizing effects of K-casein. En: International Dairy Journal [En internet] 1992 Vol. 2:272 -285.

<sup>29</sup> FORMAGGIONI, P. *et al.* Op.Cit.

	1963				de razas <i>B. indicus</i> <sup>(5)</sup>	1963
C	1961 1963	<i>B. taurus</i> (UK)	Guernsey	PE a pH 7,15	Menos común	Aschaffenburg, 1961-1963
D	1968	<i>B. indicus</i> (India y E de África)	Deshi india Boran del este de África	SGE a pH alcalino	Raro	Aschaffenburg <i>et. al.</i> , 1968
E	1972	<i>B. taurus</i> (Italia)	Piemontés	SGE a pH alcalino	Raro	Vogliano, 1972
F	1991	<i>B. taurus</i> (Netherland)	Meuse Rhine-Yssel	RP-HPLC	No es común Otras razas <sup>(6)</sup>	Visser <i>et. al.</i> , 1991-1995
G	1997	<i>B. taurus</i> (Canadá)	Holstein	RP - HPLC, MS	Raro	Chin y Ng-Kway-Hang, 1997; Dong y Ng-Kway-Hang, 1998
H	1983 1996	<i>B. taurus</i> (Korea)	Ganado Koreano (0,08)	SGE a pH ácido	Raro	Han <i>et. al.</i> , 1983; Chung <i>et. al.</i> , 1995 Han y Shin, 1996
<b>Variantes caracterizadas parcialmente</b>						
*A <sup>J</sup>	1993	<i>B. taurus</i> (Noruega)	Ganado noruego	Secuencia de productos por PCR	Raro	Lien y Rogne, 1993
<sup>(7)</sup> *A <sup>1</sup>	1975	<i>B. taurus</i> (Japón)	Pardo Japonés (0,011)	SGE a pH 1,7	Raro	Abe <i>et. al.</i> , 1975
<sup>(8)</sup> *A <sup>3m</sup>	1975	<i>B. taurus</i> (Mongolia)	Ganado mongoliano (0,04)	<sup>(9)</sup>	Raro	Grosclaude, 1975
*B <sup>2</sup>	1975	<i>B. taurus</i> (N Zelanda)	-	SGE a pH 3,5	Raro	Creamer y Richardson, 1975
*A <sup>4</sup>	1981	<i>B. javanicus</i> (Australia)	-	SGE a pH 3	Raro	Bell <i>et. al.</i> , 1981

Tomado de: Formaggioni *et al*, 1999.

\*Variante aún no caracterizada

\*\*Se refiere a las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*

<sup>(1)</sup> A pH alcalino las variantes A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup> y A<sup>3</sup> tiene la misma movilidad durante el primer tiempo apareciendo como una sola variante A.

<sup>(2)</sup> Hace referencia a las variantes más comunes

<sup>(3)</sup> Encontrado con muy baja frecuencia en Friesian italiano y Friesian alemán, Jersey y otras razas alemanas, en simmental y en gris alpino.

<sup>(4)</sup> En Sahival

<sup>(5)</sup> En Ariana y Choa. Estos fueron denominados Bz pero se identifican como variante B.

<sup>(6)</sup> Friesian italiana

<sup>(7)</sup> -Cs A<sup>1</sup> y -Cs H (A<sup>4</sup>) son probablemente la misma variante

<sup>(8)</sup> A<sup>3m</sup> significa A<sup>3</sup> mongoliana.

<sup>(9)</sup> Cromatografía e hidrólisis triptica = La presencia de los péptidos His – Lis indican que A<sup>3m</sup> no es igual a la variante A<sup>3</sup>

PE: Electroforesis en papel

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

SGE: Electroforesis en gel de almidón

RP-HPLC: fase reversa de la cromatografía líquida de alta eficiencia

RP - HPLC, MS: fase reversa de la cromatografía líquida de alta eficiencia, espectrometría de masas

UK: Reino unido (Inglaterra)

En la Tabla 4 se observan las diferencias en las secuencias de aminoácidos para algunas variantes genéticas de la -Cs, tomando como referencia la estructura de la variante A<sup>2</sup>.

**Tabla 4. Posiciones y diferencias en aminoácidos en las variantes genéticas de la  $\beta$ -Cs.**

Posición de los aminoácidos en las variantes alélicas del gen de la $\beta$ -Cs														
Variante	18	25	35	36	37	67	88	106	117	122	137	152	175	195
A <sup>1</sup>						His								
A <sup>2</sup>	SerP	Arg	SerP	Glu	Glu	Pro	Leu	His	Gln	Ser	Pro	Pro	Gln	Glu
A <sup>3</sup>								Gln						
B										Arg				
C			Ser		Lis	His								
D	Lis													
E				Lis										
F						His					Leu			
G						His						Leu		
H		Cis					Ile		Glu				Gln	Glu

Adaptado de: Han *et al*, 2000; Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 2001.

**4.4.3. Frecuencia y Distribución de las Variantes Genéticas de la  $\beta$ -Cs.** Las variantes genéticas de las proteínas no se encuentran universalmente distribuidas en todas las razas bovinas, su distribución y frecuencia varía entre las razas de ganado.

Según Keating y Smith<sup>30</sup> la mayoría de investigaciones concuerdan en que las variantes alélicas A, A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup> y A<sup>3</sup> para la  $\beta$ -Cs, se encuentran distribuidas en la mayoría de las poblaciones de *Bos taurus* y *Bos indicus*. Sin embargo, Zikakis *et al*<sup>31</sup> mencionan que la variante A<sup>2</sup> predomina en las poblaciones cebú, la mayoría de hatos taurinos y en el ganado Guernsey.

De acuerdo con estudios realizados por Roginski<sup>32</sup> y Kaminski *et al*<sup>33</sup>, las variantes alélicas A, A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, B y C se encuentran comúnmente en ganado holstein, siendo las variantes A las que se hallan en mayor frecuencia.

<sup>30</sup> KEATING, A. y SMITH, T. A note on the Evaluation of a beta-casein Variant in Bovine Breeds by Allele-specific PCR and relevance to  $\beta$ -casomorphin. En: Irish Journal of Agricultural and Food Research [En internet] 2008. Vol. 47 p. 99–104. [Citado el 23 de enero de 2010] Disponible en: <http://www.teagasc.ie/research/journalarchives/vol47no1/ijaf1705.pdf>

<sup>31</sup> ZIKAKIS, P. *et al*. Gene Frequencies of Electrophoretically Determined Polymorphisms in Guernsey blood and milk. En: Journal Dairy Science [En internet] 1974. Vol. 57 p.405-410. [Citado el 13 de septiembre de 2010] Disponible en: <http://jds.fass.org/cgi/reprint/57/4/405>

<sup>32</sup> ROGINSKY, H. Encyclopedia of Dairy Sciences. En: Academy Press London. 2003.

<sup>33</sup> KAMI SKI S. *et al*. A note on Frequency of A1 and A2 Variants of Bovine beta-casein Locus in Polish Holstein bulls. [En internet] 2006. Supported by the University of Warmia and Mazury, Project No. 0105-0804 2006. [Citado el 12 de enero de 2010] Disponible en: <http://psjc.icm.edu.pl/psjc/cgi-bin/getdoc.cgi?AAAAA015878>

Por su parte, Formaggioni *et al*<sup>34</sup> afirman que la variante alélica B se encuentra generalmente con una menor frecuencia, cercana al 1% con respecto a la variante A y en general se presenta en combinación con esta. En las razas normando, pardo suizo y jersey, la frecuencia del alelo B es moderada, con valores que oscilan entre 30 a 45% y en las demás razas lecheras la frecuencia es menor al 10%.

#### **4.5 EFECTO DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE LAS PROTEÍNAS SOBRE LA LECHE**

De acuerdo con Ng-Kwai-Hang y Grosclaude<sup>35</sup>, las variantes genéticas de las proteínas de la leche pueden influir significativamente en cuanto al rendimiento quesero, incluso más que la grasa, por lo que, para conseguir una mejora de la calidad de la leche se han tenido en cuenta desde hace algunos años, otras características como el contenido en caseínas, la proporción con que cada fracción caseínica contribuye a la composición proteica total y el polimorfismo bioquímico de las proteínas lácteas.

La influencia de algunas variantes genéticas de las proteínas de la leche sobre características de producción, composición y propiedades tecnológicas, han sido reportadas por varios investigadores, por lo cual este tema ha cobrado mucha importancia en la industria, en especial por su asociación con las propiedades de la leche para la elaboración de queso.

**4.5.1 Asociación de las Variantes Genéticas de la -Cs con la Producción y Composición de la Leche.** Diversos estudios sustentan algún grado de asociación entre las variantes genéticas de la -Cs con caracteres productivos y propiedades industriales de la leche. Sin embargo, existen cifras contradictorias en los resultados obtenidos en dichas investigaciones. Estas divergencias podrían explicarse por diversos factores como las condiciones experimentales, el tamaño de la muestra, la raza, la frecuencia de las variantes genotípicas, los métodos para medir la producción de leche, los efectos ambientales, la edad de las vacas, el estado de lactancia y la salud animal (Ron *et al*<sup>36</sup>).

---

<sup>34</sup> FORMAGGIONI *et al.* Op.Cit.

<sup>35</sup> NG-KWAI-HANG, K.F y GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of milk proteins. En: Advanced Dairy Chemistry. 2001. Vol 1: 740-816.

<sup>36</sup> RON, N. O., YOTFE, E., EZRA. E., MEDRANO, J. F. y WEILER. Determination of Effects of milk protein genotype on production traits of Israeli Holstein. En: Journal Dairy Science [En internet] 1994. Vol. 77 p.1106 [Citado el 14 de septiembre de 2009] Disponible en: <http://jds.fass.org/cgi/reprint/77/4/1106.pdf>

En un estudio en la raza holstein, Ng-Kwai-Hang *et al*<sup>37</sup> observaron que las vacas que portaban el alelo A<sup>3</sup> de la -Cs, fueron superiores para la producción de leche, en comparación con las que portaban el alelo A<sup>2</sup>. Además la combinación de genotipos A<sup>1</sup>A<sup>3</sup> y A<sup>2</sup>A<sup>3</sup>, produjo más de leche por lactancia, respecto al genotipo A<sup>2</sup>B.

Estudios realizados por Çardak<sup>38</sup> en vacas holstein y simmental establecieron, que la composición genotípica del alelo A<sup>2</sup> estaba asociado con una alta producción de leche y proteína, pero con bajos contenidos de grasa respecto a la variante A<sup>1</sup>. El mismo autor, utilizando un modelo para dos *loci*, encontró que las diferentes asociaciones entre los genotipos de -Cs y K-Cs A<sup>2</sup>A<sup>2</sup> AB, A<sup>2</sup>A<sup>2</sup> AA y A<sup>2</sup>A<sup>2</sup> AE, están altamente relacionadas con la producción de leche y proteína; mientras que los genotipos A<sup>1</sup>A<sup>1</sup> BB, A<sup>1</sup>A<sup>1</sup> AB y A<sup>1</sup>A<sup>1</sup> BE se asociaron con altos porcentajes de grasa.

Al respecto, Bovenhuis *et al*<sup>39</sup> determinaron que las vacas que portaban los genotipos AB y BB producían menos leche por lactancia, pero con mayor contenido en sólidos totales en comparación con vacas que portaban el homocigoto AA.

Finalmente Hallen *et al*<sup>40</sup> concluyeron que los más altos niveles de concentración de -Cs total, se encontraban en vacas portadoras de la variante alélica B.

**4.5.2 Asociación de las Variantes Genéticas de la -Cs con Propiedades Tecnológicas de la Leche.** Según Alipanah y Kalashmikova<sup>41</sup>, la habilidad de la leche para la fabricación de queso está asociada con características tales como un mayor contenido de proteína, caseína, número caseínico, grasa, menor tiempo de coagulación, mayor firmeza y alta producción de cuajada. Los

---

<sup>37</sup> Ng-KWAI-HANG *et al.* Association of Genetic Variants of Casein and Milk Serum proteins within Milk, Fat and Protein production by Dairy Cattle. En: Journal Dairy Science [En internet] 1984. Vol. 67 p.835-840 [Citado el 23 de agosto de 2009] Disponible en: <http://jds.fass.org/cgi/reprint/67/4/835.pdf>

<sup>38</sup> ÇARDAK, A.D. Effects of Genetic Variants in Milk Protein on Yield and Composition of Milk from Holstein-Friesian and Simmentaler Cows. Department of Food Science and Technology, Agricultural Faculty of Adnan Menderes University, Aydin Turkey South African. En: Journal of Animal Science [en internet] 2005 Vol. 35 No. 1. [Citado el 14 de febrero de 2010] Disponible en <http://ajol.info/index.php/sajas/article/viewFile/4047/11890>

<sup>39</sup> BOVENHUIS, H. *et al.* Associations Between Milk Protein Polymorphisms and Milk Production Traits. En: Journal Dairy Science [En internet] 1992. Vol. 75 p. 2549-2559 [Citado el 25 de enero de 2010] Disponible en: <http://jds.fass.org/cgi/reprint/75/9/2549>

<sup>40</sup> HALLÉN, E. *et al.* Effect of -casein, K-casein and -lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants. En: Journal Animal Breed GenetiCn [En internet] 2008 Vol. 125 p. 119–129 [Citado el 14 de febrero de 2010] Disponible en: <http://www.wiley.com/bw/journal.asp?ref=0931-2668>

<sup>41</sup> ALIPANAH, M. y KALASHMIKOVA, Influence of kappa casein Genetic Variant on Chesse Making Ability. En: Journal of Animal and Veterinary advance [En internet] 2007. Vol. 6, n.7 p. 855-857 [Citado el 26 de enero de 2010] Disponible en: [www.medwelljournals.com/fulltext/java/2007/855-857.pdf](http://www.medwelljournals.com/fulltext/java/2007/855-857.pdf)



resultados obtenidos en diversas investigaciones, reportan que las variantes genéticas de las proteínas de la leche tienen una marcada influencia sobre la producción de cuajada.

De acuerdo con Marziali y Ng-Kwai-Hang<sup>42</sup>, el locus de la  $\beta$ -Cs que contiene el alelo B, está relacionado con una mejor coagulación comparada con la variante alélica A. En concordancia, Ng-Kwai-Hang<sup>43</sup>; Einspanier<sup>44</sup> y Jakob<sup>45</sup>, reportan que el alelo B está asociado con un menor tiempo en la coagulación de la leche y mejor firmeza en el corte de la cuajada.

Según Grosclaude, citado por Martínez<sup>46</sup>, el mejor genotipo de la  $\beta$ -Cs para la elaboración de queso es el homocigoto BB, porque las vacas que lo portan producen una leche más rica en proteína y grasa.

A manera de resumen, en la Tabla 5 se indican los diversos genotipos de las proteínas lácteas y su efecto sobre algunas características de producción y propiedades tecnológicas de la leche.

**Tabla 5. Mejores genotipos encontrados según diversos trabajos**

CARÁCTER	MEJOR GENOTIPO			
	s <sub>1</sub> -Cn	-Cs	K-Cs	-Lg
Producción de leche	BB	A <sup>2</sup> A <sup>3</sup>	AB	AA
% de Grasa	BC	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>	BB	BB
% de Proteína	BC	A <sup>2</sup> B	BB	AA(PS)*
Kg. de Grasa	-	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>	-	BB
Kg. de Proteína	-	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup>	BB	AA
Menor tiempo de coagulación	BC	BB	BB	-
Consistencia de la cuajada	BC	BB	BB	-
Rendimiento quesero	-	BB	BB	BB

\*Hace referencia a la raza Pardo suizo

<sup>42</sup> MARZIALI, A.S., NG-KWAI-HANG, K.F. Relationships Between Milk Protein Polymorphisms and Cheese Yielding Capacity. En: Journal of Dairy Science [En internet] 1986. Vol. 86 n.5, p.1193-1201, [Citado el 23 de marzo de 2010] Disponible en: <http://jds.fass.org/cgi/reprint/69/5/1193>

<sup>43</sup> Ng-KWAI-HANG, K. F. Milk Protein Heterogeneity, Fractionation and Isolation. En: Encyclopedia of Dairy Science. Londres. F. FOX Academie Press London, 2001.

<sup>44</sup> EINSPANIER, R. *et al.* Fast characterisation of selected beta casein and beta lactoglobulin variant using specific single nucleotide polymorphism derived from milk cell DNA: a novel realtime PCR approach. En: European Food Research Technology. 2001. Vol. 213:356-360.

<sup>45</sup> JAKOB, E. Genetic Polimorphism of Milk Proteins. En: Bulletin of the International Dairy Federation., Bulletin 298, [En internet] 1994. [Citado el 12 de enero de 2010] Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search/display>.

<sup>46</sup> MARTÍNEZ, P. A. Polimorfismos Genéticos de las Proteínas de la Leche en ganado vacuno Frisón, Relación con los Parámetros Productivos, Influencia en el RCN y la Mamitis. Aplicación a la Tecnología de Fabricación de Queso de Nata, "Queso de Cantabria" D.O [En internet] 2002 [Citado el 16 de noviembre de 2009] Disponible en: <http://www.cifacantabria.com>

#### 4.6 GENERALIDADES DE LOS MARCADORES GENÉTICOS

Ferreira y Gratapaglia<sup>47</sup> mencionan que hasta mediados de la década del 60, los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos de fácil identificación visual como color, tamaño o forma. Estos marcadores contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del ligamiento y a la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos. Sin embargo este tipo de marcadores estaban limitados por presentarse en un número reducido, lo cual no permitía encontrar asociaciones significativas entre éstos y los caracteres de importancia económica, además presentaban bajo nivel de polimorfismo, estaban bajo control poligénico, eran de tipo dominante o recesivo y muchos de ellos se expresaban en la etapa adulta, lo cual prolongaba los tiempos de evaluación en los programas de mejoramiento.

En la década de los 70, se inició la revolución molecular con el descubrimiento de los marcadores isoenzimáticos, las enzimas de restricción y los métodos de detección de polimorfismo genético directamente en la molécula de ADN. Pero es a partir de la invención de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis y Faloona<sup>48</sup> y Saiki *et al*<sup>49</sup>), cuando se logra el mayor avance en la detección de polimorfismos, conllevando a la descripción de otras clases de marcadores moleculares (Picca *et al*<sup>50</sup>).

Según Choudhary *et al*<sup>51</sup>, un marcador molecular es una secuencia de ADN detectable mediante diferentes técnicas y que por lo general, se hereda de una generación a otra. En la mayoría de organismos eucariotas, incluidos los mamíferos, estas secuencias se localizan en regiones exónicas (codificantes) e intrónicas (no codificantes) y se distribuyen a lo largo del genoma.

---

<sup>47</sup> FERREIRA, M y GRATAPAGLIA, D. Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Brasilia, Ed. EMBRAPA, 1998 pág. 17

<sup>48</sup> MULLIS, K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposium. [En internet] Quantitative Biology, 1986. Vol. 51: 263-273.

<sup>49</sup> SAIKI, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerases. [En internet]. Science. 1988. Vol. 2(39): 487-491

<sup>50</sup> PICCA, A. *et al.* Marcadores moleculares. En: Echenique, V. et al. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Argentina: Ediciones INTA, 2004. Págs. 61-68

<sup>51</sup> CHOUDHARY, D. Characterization of the biochemical and structural phenotypes of four CYP1B1 mutations observed in individuals with primary congenital glaucoma. [En internet]. Pharmacogenetics and Genomics Journal. 2008. Vol.18:665–676.

De acuerdo con Uffo<sup>52</sup> en la determinación de la variabilidad genética, los marcadores "ideales" son aquellos que cumplen una serie de características entre las que se encuentran el poseer una elevada capacidad de detectar altos niveles de polimorfismo, tener alta heredabilidad, gran capacidad para acceder a todas las regiones del genoma, ser independientes del estado físico y de desarrollo del individuo, facilidad de obtención, detección por métodos económicos, independencia de las condiciones ambientales, ser capaces de detectar mutaciones silenciosas, es decir que no causan cambios de aminoácidos y finalmente, la posibilidad de determinarlos en cualquier tipo de células que contengan núcleo. Éstas constituyen además, algunas de las ventajas de los marcadores moleculares sobre los morfológicos e isoenzimas.

**4.6.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** De acuerdo con Rodríguez y Barrera<sup>53</sup>, la reacción en cadena de la polimerasa más conocida como PCR (por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*), es una técnica para la síntesis in vitro de un segmento particular de ADN, delimitado por un par de cebadores o iniciadores. Su amplificación se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable.

Según Mas *et al*<sup>54</sup> la técnica PCR, fue inventada por Kary Banks Mullis en 1987, por la cual se le adjudicó el Premio Nobel de Química en 1993. Mullis se basó en la replicación del ADN que sucede en forma natural en las células de los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa.

**4.6.1.1 Componentes de la reacción de PCR.** De acuerdo con Mas *et al*<sup>55</sup> el procedimiento general de la PCR se lleva a cabo en una mezcla de reacción que contiene una muestra de ADN de doble hélice, dos primers o cebadores específicos, dNTP's o desoxinucleótidos trifosfato, una ADN polimerasa, un buffer, Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) y agua como se describen a continuación.

- **Muestra de ADN.** En cuanto al ADN molde, este no debe estar fragmentado en trozos más pequeños de los que se quiere amplificar y además la muestra no debe contener agentes quelantes que reducen la concentración de iones de Mg<sup>+2</sup> en la solución, ni tampoco contener fenol o detergentes que inhiben la actividad de la polimerasa y por lo tanto la eficiencia de la técnica. La cantidad

---

<sup>52</sup> UFFO, O. Aplicación de Marcadores Moleculares en Ganadería. [En internet]. Cuba, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, 2006. [Citado el 12 de junio, 2010] Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos37/marcadores-moleculares/marcadores-moleculares3.shtml#refer>

<sup>53</sup> RODRÍGUEZ, I.P y BARRERA, H.A. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos Décadas de su Invención. En: Ciencia UANL [En internet] 2004 Vol. 7 No. 3 julio-septiembre de 2004.

<sup>54</sup> MAS, E. *et al*. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En: Revista AquaTIC. [En internet] 2001. N. 15 [Citado el 13 de enero de 2010]

<sup>55</sup> *Ibíd.*, Online.

de ADN que se necesita generalmente varía de 25 a 50 ng; altas cantidades incrementan la amplificación de secuencias inespecíficas.

- **Oligonucleótidos Sintéticos o Cebadores.** Para que la amplificación se lleve a cabo es necesario seleccionar dos oligonucleótidos sintéticos o cebadores que hibriden con regiones de ADN molde localizados en los extremos de la región de interés. Estos cebadores se deben orientar con los extremos 3'(OH) hacia el cebador opuesto, es decir deben estar encontrados y ser complementarios para las dos cadenas de ADN molde. La longitud de los cebadores es de 15 a 30 nucleótidos y su secuencia debe presentar la mayor similitud posible con la secuencia blanco ya que de ella depende el éxito y la especificidad de la amplificación. Es necesario evitar la presencia de los cebadores de secuencia que favorezca la formación de estructuras secundarias que pueden interferir en el alineamiento correcto. Típicamente el contenido de guaninas-citocinas debe ser alrededor del 40 y 60%, respectivamente, para ambos cebadores. Generalmente se recomienda determinar el valor de la Temperatura de Fusión ( $T_m$ ) de los cebadores, ya que este valor resulta necesario para calcular la temperatura teórica en la que se debe llevar a cabo el alineamiento ( $T_a$ ). El valor de  $T_a$  generalmente oscila entre los 60 a 65°C.

- **Amortiguador o Buffer de reacción.** Esta solución mantiene el pH óptimo para el funcionamiento de la enzima Taq- polimerasa. Generalmente el buffer de PCR contiene sales como KCl,  $MgCl_2$  y Tris HCl. Existen adyuvantes para aumentar la especificidad y fidelidad de la reacción que se agregan al buffer, el más utilizado es el BSA (seroalbúmina bovina), el cual incrementa la eficiencia de la PCR y actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la Taq-polimerasa.

- **Sales.** Es de gran importancia la concentración de los cationes que son añadidos a la reacción. Usualmente es empleado el cloruro de magnesio  $MgCl_2$ , el cual actúa como cofactor de la Taq-polimerasa proporcionándole la fuerza iónica adecuada para su máxima actividad. El  $MgCl_2$  aumenta la temperatura de hibridación del ADN, permitiendo la unión de los dNTPs a la cadena molde. La concentración de este ion resulta fundamental para la optimización de la reacción; insuficientes concentraciones de  $Mg^{+2}$  dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas.

- **Desoxinucleótidos Trifosfato dNTPs.** Los dNTPs son el sustrato para la reacción ya que proveen nucleótidos para la síntesis de la cadena naciente de ADN. Son cuatro, el dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Cuando se lleva a cabo la reacción de síntesis de una cadena complementaria, la ADN polimerasa incorpora dNTPs al formar un enlace fosfodiéster entre el grupo OH libre en el extremo 3' de la cadena naciente y el grupo fosfato 5' del dNTP; la energía para la reacción proviene de la hidrólisis del fosfato de cada dNTP que se incorpora. Es muy importante mantener la concentración equimolar entre los cuatro dNTPs, ya que pueden captar iones de  $Mg^{+2}$  lo que causaría que la Taq-polimerasa incorpore algún dNTP equivocado en determinadas posiciones,

umentando su tasa de error. Altas concentraciones de dNTPs pueden inhibir la actividad de la Taq-polimerasa.

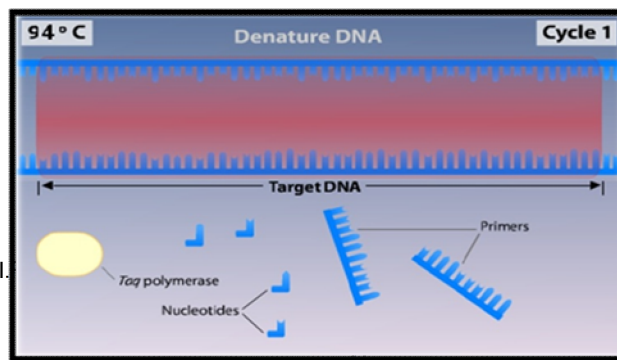
- **ADN polimerasa.** La ADN polimerasa es la encargada de extender los cebadores en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde. Para ello, la ADN polimerasa usa dinucleótidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La ADN polimerasa más empleada en la reacción de PCR es la Taq polimerasa, una enzima termoestable aislada de *Thermus acuaticus*, una bacteria que soporta altas temperaturas. La Taq polimerasa ha simplificado enormemente la técnica de PCR, ya que junto con el diseño de los termocicladores o equipos que son programados para calentar y enfriar rápidamente la reacción en determinados tiempos, han permitido la automatización total del proceso. La temperatura óptima de la enzima, en donde se observa su máxima actividad, es entre los 75 a 80°C y su tasa de incorporación de nucleótidos (Kcat) es de unos 150 nucleótidos/segundo. Como característica importante, la Taq Polimerasa conserva el 50% de su actividad después de 130, 40 y 6 minutos a 92.5, 92 y 97.5°C respectivamente. Ninguna ADN polimerasa es capaz de iniciar la síntesis a partir de dinucleótidos simples libres, todas requieren un oligonucleótido o cebador.

- **Agua.** El agua es el medio en el cual se diluyen los componentes de la reacción de PCR, ésta debe ser libre de nucleasas, desionizada, purificada o de grado molecular.

**4.6.1.2 Etapas de la PCR.** Según Rodríguez y Barrera<sup>56</sup>, la reacción en cadena de la polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas llevadas a cabo en diferentes tiempos y temperaturas. Estas etapas se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces, dependiendo del protocolo empleado.

- **Etapas de Desnaturalización.** Esta primera etapa, consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno de la doble hélice de ADN, separandolo en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas generalmente 93 a 97°C, por uno o dos minutos. Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco (Figura 3).

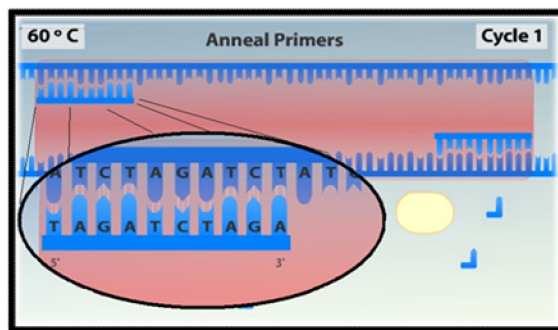
**Figura 3. Etapas de denaturación de la PCR**



Fuente: [www.sumanasinc.com](http://www.sumanasinc.com), 2004

- **Etapas de Hibridación.** Ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas de ADN molde con los cebadores o iniciadores, los cuales se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que deseamos amplificar, a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias. Esta temperatura depende de la  $T_m$  de los cebadores (Figura 4).

**Figura 4. Etapas de hibridación de la PCR**

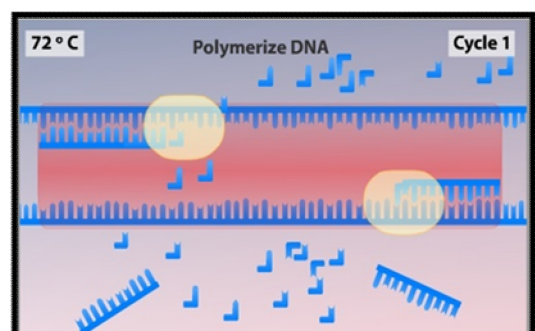


Fuente:  
2004

[www.sumanasinc.com](http://www.sumanasinc.com),

- **Etapas de Elongación.** La ADN polimerasa actúa tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de la nueva hebra. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTPs libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde. La síntesis se lleva a cabo en dirección 5' 3', uniendo el grupo 5'- fosfato de los dNTPs con el grupo 3'- hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende de la ADN polimerasa que usemos. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está entre los 75-80°C pero comúnmente es a 72°C. El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar (Figura 5).

**Figura 5. Etapas de elongación de la PCR**



Fuente: www.sumanasinc.com, 2004

La detección del producto de PCR se realiza normalmente mediante corrido electroforético en geles de agarosa o poliacrilamida a distintas concentraciones, dependiendo del tamaño de la amplificación. La posterior visualización se puede realizar con bromuro de etidio a través de un transiluminador, tinción con nitrato de plata, fluorescencia o radiactividad.

**4.6.1.3 Contaminación en la PCR.** La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica muy sensible, por lo que es de gran importancia evitar contaminaciones, ya que es posible que el ADN no deseado (aunque se encuentre en una cantidad muy pequeña) se amplifique y obtengamos un resultado que no es real. Una de las mayores ventajas de la técnica se convierte a la vez en el principal inconveniente (Kwok y Higuchi<sup>57</sup>). Según Dunning<sup>58</sup> para evitar falsos positivos se debe seguir una serie de normas que ayudan a evitar la contaminación, tales como tener un lugar físico e instrumental exclusivo para realizar la PCR, utilización de reactivos y tubos estériles, uso de guantes y realización de controles negativos, donde se añade agua en lugar de ADN, además no se deben almacenar los reactivos de PCR junto con muestras biológicas que servirán como sustrato y finalmente se recomienda no usar un alto número de ciclos, ya que la tasa de error es proporcional al número de éstos.

**4.6.2 Marcador Molecular RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).** Ferreira y Gratapaglia<sup>59</sup> mencionan que el marcador RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) fue estudiado en los años 70, en un experimento para detectar mutaciones en virus, más tarde fue utilizado ampliamente en el análisis del genoma humano. El polimorfismo observado en los RFLP's se debe a las diferencias en la secuencia del ADN genómico, debidas a duplicaciones, deleciones, inserciones u otros arreglos como translocaciones o inversiones, que modifican la distancia entre pares de sitios de restricción y generan fragmentos polimórficos de diferentes tamaños.

---

<sup>57</sup> KWOK, S. y HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. [En internet] 1989. Nature Vol. 339: 237–238.

<sup>58</sup> DUNNING, A.M et al. Errors in the Polymerase Chain Reaction. Citado por RODRÍGUEZ, I.P y BARRERA, H.A. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos Décadas de su Invención. En: Ciencia UANL [En internet] 2004 Vol. 7 No. 3 julio-septiembre de 2004.

<sup>59</sup> FERREIRA y GRATAPAGLIA. Op.Cit p.p. 23 – 32.

De acuerdo con Valadez y Kahl<sup>60</sup> la tecnología RFLP, involucra endonucleasas de restricción que reconocen y cortan secuencias específicas, siempre y cuando no estén metiladas; dichas secuencias se denominan sitios de reconocimiento o dianas de restricción. Por lo tanto, cualquier ADN que no esté metilado puede ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida y cualquier mutación dentro de esos sitios, podría cambiar el patrón del fragmento, por lo cual se detecta un RFLP al comparar dos o más genomas.

Según Karl *et al*<sup>61</sup> para la identificación de RFLPs, se puede usar el método Southern blot (hibridización) o la PCR, siendo la última la más utilizada, hoy en día, en trabajos de genética molecular. Cuando se realiza la identificación de los RFLPs usando la PCR, los fragmentos amplificados son digeridos con diferentes enzimas de restricción. Dichos fragmentos son entonces separados por electroforesis en geles de agarosa o acrilamida y posteriormente teñidos con bromuro de etidio o nitrato de plata, respectivamente. Este método, hace que los RFLP sean más sencillos, económicos, robustos, de fácil implementación en los laboratorios y no radiactivos. Rodellar *et al*<sup>62</sup> menciona que la combinación de PCR-RFLP se ha utilizado ampliamente en la caracterización de los genes que codifican las proteínas lácteas.

El uso de los RFLP como marcadores para trazar la transmisión de los genes asociados a ellos, es de una utilidad considerable en genética, pues tienen como ventajas el no estar influenciados por el ambiente, no depender del estado ontogénico del animal, permitir un análisis de todo el genoma, poder ser detectados en estadios muy tempranos del desarrollo, independientemente de la expresión del gen y además poseen la característica de ser codominantes en la expresión fenotípica, es decir, permiten discernir entre el individuo homocigótico dominante y el heterocigótico; son muy comunes y cualquier gen debe tener sitios de restricción polimórficos en una vecindad de varios cientos de pares de bases.

#### **4.7 MEDIDAS DE DIVERSIDAD GENÉTICA**

De acuerdo con Ferreira y Gratapaglia<sup>63</sup> los resultados que se obtienen a través del uso de los marcadores moleculares, contienen gran información sobre la diversidad genética y las relaciones filogenéticas de las poblaciones en

---

<sup>60</sup> VALADEZ, E. y KAHL, G. Huellas de ADN en genomas de plantas. Universidad Autónoma de Chapingo, México, 2000.

<sup>61</sup> KARL, S., BOWEN, B. y AVISE, J. Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analysis of anonymous nuclear loci. [En internet] 1992. *Genetics*. Vol.131:163-173.

<sup>62</sup> RODELLAR, C. et al. Identificación de las variantes genéticas de caseína mediante la técnica de PCR/RFLP's en razas bovinas españolas. Jornadas Feria Internacional Ganadera. Zafra, España. 1992.

<sup>63</sup> FERREIRA y GRATAPAGLIA. Op.Cit. p.p. 23-32.

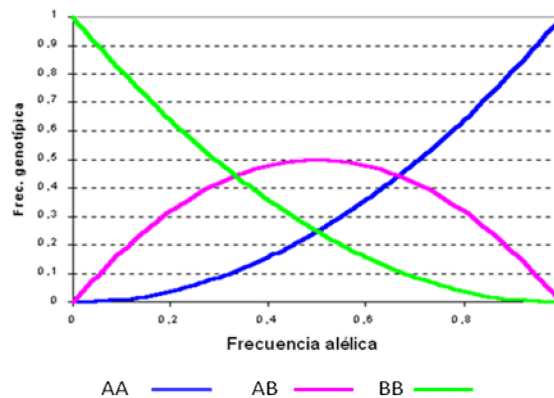


estudio, suministrando así datos útiles para la selección direccionada y para el control de la variabilidad genética.

**4.7.1 Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W).** De acuerdo con Lorenzano<sup>64</sup> la Ley de Equilibrio Hardy Weinberg, establece que si se considera un locus con dos alelos, se puede demostrar matemáticamente que las frecuencias génicas y genotípicas de esos alelos permanecerán constantes, generación tras generación, siempre y cuando se cumplan ciertas condiciones como: ser una población de tamaño grande (infinita), sujeta al régimen de apareamientos al azar y en ausencia de selección, mutación y migración.

En la siguiente gráfica, se puede observar el principio de Hardy-Weinberg para dos alelos, en el eje horizontal se muestran las dos frecuencias alélicas  $p$  y  $q$ , el eje vertical muestra la frecuencia de los tres posibles genotipos representados por las líneas de colores.

**Figura 6. Equilibrio Hardy-Weinberg considerando un locus con dos alelos**



**4.7.2 Heterocigosidad.** Según García<sup>65</sup>, la Heterocigosidad mide la proporción de individuos heterocigotos existentes para un determinado marcador. Un individuo se considera heterocigoto para un locus cuando éste presenta dos variantes alélicas distintas en el genotipo, es decir, si para un locus A se pueden dar los alelos  $\{A_i\} i = 1, \dots, k$ , un individuo  $A_iA_j$  será heterocigoto si  $i \neq j$ , y homocigoto en caso contrario. La heterocigosidad es una buena medida de la diversidad contenida en una población ya que está íntimamente relacionada con la consanguinidad y la viabilidad de la población. Valores altos de

<sup>64</sup> LORENZANO, P. Bas Van Fraassen y la Ley de Hardy-Weinberg: Una Discusión y Desarrollo de su Diagnóstico. En: Universidad Nacional de Quilmes-CONICET [En internet] 2008 Vol.12 n.2, pp. 54-121. [Citado el 10 de octubre de 2010] Disponible en: <http://www.cfh.ufsc.br/~principi/p122-1.pdf>

<sup>65</sup> GARCÍA, D. Diversidad Genética y Establecimiento de Prioridades en Esquemas de Conservación: Ejemplo de Aplicación en la Raza de Lidia. Madrid, 2008. pp. 233. Tesis (Doctorado en Ciencias). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Producción Animal. [Citado el 12 de octubre de 2010].

heterocigosidad indican una alta variabilidad y mayores posibilidades de selección. A medida que disminuye la heterocigosidad, los individuos tienden a ser más parecidos genotípicamente y fenotípicamente, estrechándose la posibilidad de seleccionar los mejores.

De acuerdo con el IPGRI<sup>66</sup> la heterocigosis se puede medir de dos formas distintas, una de ellas es la heterocigosis observada ( $H_o$ ) que no es más que el conteo directo de los genotipos heterocigotos en una población y la esperada ( $H_e$ ) o diversidad génica de Nei<sup>67</sup>, que es la heterocigosis que se esperaría en condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg.

Cuando una población se encuentra en equilibrio H-W, la heterocigosis observada es igual a la heterocigosis esperada,  $H_o = H_e$ . Las diferencias entre la heterocigosis observada y la esperada pueden ser consecuencia de fenómenos poblacionales como la subdivisión y los cuellos de botella.

**4.7.3 Estadísticos F o Índices de Fijación.** Nayilaky<sup>68</sup> menciona que los estadísticos F fueron desarrollados por Sewall Wright en el año de 1951 y se utilizan para cuantificar la diferenciación entre poblaciones a través de la reducción de la heterocigosis. De acuerdo con García<sup>69</sup>, para definir los estadísticos F, en primer lugar se consideran las siguientes cantidades:

**$H_i$ :** heterocigosis *observada* media por individuos dentro de poblaciones

**$H_s$ :** heterocigosis *esperada* media dentro de poblaciones

**$H_T$ :** heterocigosis *esperada* media en la población conjunta (calculada con frecuencias alélicas promediadas entre todas las poblaciones)

Según la denominación de Wright los estadísticos F se denotan como:

**4.7.3.1.  $F_{IS}$  ( $f$ ) Coeficiente de Endogamia.** Mide la reducción media de heterocigosis de un individuo debido a apareamientos no aleatorios, es decir, mide el nivel de endogamia dentro de las subpoblaciones. Varía entre -1 (todos los individuos son heterocigotos) a 1 (ausencia de heterocigotos observados). Un valor de 0 indica igualdad de heterocigotos observados y esperados, y por lo tanto, una situación de equilibrio.

**4.7.3.2.  $F_{ST}$  ( ) Índice de Fijación.** Mide la reducción media de heterocigosis en una sub población con respecto a la población total debida a la deriva

---

<sup>66</sup> IPGRI. Análisis de la Diversidad Genética Utilizando Datos de Marcadores Moleculares: Módulo de Aprendizaje, Medidas de la Diversidad Genética. Cornell University [En internet] 2004. [Citado el 10 de octubre de 2010] Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/50105468/II-Gen-C3-A9tica-20de-20poblaciones>

<sup>67</sup> NEI, M. Genetic distance between populations. En: American Naturalist [En internet] 1972, Vol.106:283-292. [Citado el 12 de octubre de 2010].

<sup>68</sup> NAGYLAKI, T. Fixation Indices in Subdivided Populations. En Genetic Society of America [En internet] 1998. [Citado el 10 de octubre de 2010].

<sup>69</sup> GARCÍA, D. Op.Cit. p. 233

genética entre sub poblaciones. Representa el porcentaje de la variación genética que es atribuible a las diferencias entre y dentro de poblaciones. Varía entre 0 (no existe diferenciación) a 1 (diferenciación completa).

**4.7.3.3.  $F_{IT}$  (F) Índice de Fijación conjunto.** Mide la endogamia total. Representa la reducción media en heterocigosis de un individuo relativa al total poblacional.

**4.7.4 Distancia Genética.** Según Nei<sup>70</sup> el índice de distancia genética, permite valorar la diversidad genética entre dos o más unidades (poblaciones). Cuando una unidad se separa en dos o más, éstas evolucionan a partir de ese momento en forma más o menos independiente. Las fuerzas que actúan sobre cada población (mutación, selección, deriva y migración) irán conformando la composición genética de cada una de ellas.

El índice de la distancia genética varía de cero a uno. Entre mayor sea la distancia entre dos poblaciones, más distintas serán genotípica y fenotípicamente y mayor será la diversidad entre individuos. Si el valor es cero, significa que las poblaciones comparadas son idénticas genéticamente y por lo tanto no existen diferencias entre sus alelos.

## **4.8 GENERALIDADES EN LA ELABORACIÓN DE CUAJADA**

De acuerdo con Madrid<sup>71</sup> la cuajada es el producto blando obtenido de la coagulación de la leche entera, semidesnatada o desnatada, generalmente bajo la acción del cuajo. Desde el punto de vista físico químico, la cuajada se define como un sistema tridimensional tipo gel, formado básicamente por la caseína integrada en un complejo caseinato fosfato cálcico, el cual por coagulación forma una red y retiene glóbulos de grasa, agua, lactosa, albúminas, globulinas, minerales, vitaminas y otras sustancias menores de la leche, las cuales permanecen absorbidas en el sistema o se mantienen retenidas en la fase acuosa.

**4.8.1. Materias Primas para la Elaboración de Cuajada.** Las materias primas utilizadas en la elaboración de cuajada, deben cumplir ciertos requisitos, entre los que se encuentran ser de buena calidad composicional y microbiológica. Las materias primas empleadas se describen a continuación.

**4.8.1.1. Leche.** Hernández<sup>72</sup> menciona que la leche destinada para la elaboración de cuajada, debe cumplir ciertos requisitos entre los cuales prima

---

<sup>70</sup> NEI, M. Op.Cit.

<sup>71</sup> Madrid, A., Tecnología Quesera, Madrid: Editorial Papel Cuché, 1999. Págs. 472

<sup>72</sup> Hernández, A., et al., Microbiología Industrial. Costa Rica: Editorial de la UNED, 2003, Pág. 74

la buena calidad físico química y microbiológica, ya que existen ciertos factores que pueden afectar la coagulación de la leche como la cantidad de proteína soluble, el balance salino, el pH, entre otros, además la leche debe estar libre de sustancias que pueden inhibir la acción enzimática como residuos de detergentes, cloro, antibióticos, etc.

Un aspecto importante, es que la leche que será utilizada para hacer cuajada, no debe ser almacenada por largos periodos en refrigeración y preferiblemente debe ser fresca. El almacenamiento prolongado, produce cambios en el balance salino y reducción del tamaño de la micela de caseína por un aumento en la cantidad de caseína soluble ( $\beta$ -caseína), aumentando el grado de hidratación de la micela, lo que se traduce en problemas para la coagulación enzimática de la leche. Otro efecto y quizá el más perjudicial es el crecimiento de bacterias psicrófilas, las cuales en su mayoría tienen la capacidad de producir enzimas lipolíticas y proteolíticas capaces de soportar temperaturas de pasteurización y que alteran los componentes de la leche causando bajas en el rendimiento y cambios en las características organolépticas de la cuajada.

**4.8.1.2. Enzima coagulante.** El coagulante tradicionalmente empleado es la quimosina o renina, enzima extraída del estómago de los terneros lactantes. Sin embargo hoy en día, debido al aumento de la demanda de cuajos se han desarrollado técnicas para la utilización de enzimas provenientes de microorganismos y vegetales.

Antes de utilizar cualquier enzima coagulante, es necesario conocer el título o fuerza del cuajo, lo cual permite agregar la dosis necesaria y no cometer errores por exceso o bajas cantidades. El título o fuerza del cuajo se define como la cantidad de leche en mililitros, que cuaja a una temperatura de 35°C en 40 minutos, cuando se le adiciona un gramo o mililitro de cuajo.

**4.8.1.3. Cloruro de Calcio.** El cloruro de calcio se utiliza para corregir los problemas de coagulación que se presentan con la leche almacenada por largo tiempo en refrigeración o en la leche pasteurizada. Su principal efecto es disminuir las pérdidas de rendimiento en estos casos y además ayuda a disminuir la variación natural en la aptitud para la coagulación de la leche, además reduce la cantidad de cuajo necesaria, acelera la coagulación y origina una cuajada más firme.

La dosis máxima a utilizar es del 0.02% (1 gramo por cada 5 litros de leche). Una dosis excesiva conduce a producir cuajadas duras y quebradizas con sabor amargo.

**4.8.2. Proceso para la Elaboración de Cuajada.** La elaboración de la cuajada, es un proceso complejo en el que intervienen varias etapas y diversas transformaciones bioquímicas. Todas estas variables influyen sobre el rendimiento, la composición y la calidad del producto final. El procesamiento de la leche para su transformación en cuajada, comprende varios pasos que se mencionan a continuación.

**4.8.2.1. Recepción de la Materia Prima.** El proceso se inicia con la recepción de la leche, la cual pasa por un control para garantizar la calidad de la misma, dicho control comprende la toma de pruebas de plataforma como la calidad físico química y microbiológica, la apariencia y olor, la acidez, el porcentaje de grasa y proteína, recuento de unidades formadoras de colonias, densidad, punto de congelación, pH, impurezas y contaminantes.

**4.8.2.2. Filtración.** Se realiza principalmente para retirar partículas ajenas a los compuestos de la leche, las cuales producen defecto en el producto final. El filtrado se realiza con cedazos o tamices, preferiblemente de acero inoxidable, nylon o plástico.

**4.8.2.3. Estandarización.** Según Wasltra *et al*<sup>73</sup> la estandarización de la leche consiste en ajustar su contenido graso para que el queso que se obtenga reúna las exigencias legales respecto al contenido graso sobre extracto seco (GES).

**4.8.2.4. Pasteurización.** De acuerdo con Hernández<sup>74</sup> este proceso representa el mínimo tratamiento calorífico para la higienización de la leche con la destrucción de agentes patógenos. Sin embargo, la pasteurización puede reducir el poder de coagulación de la leche e inducir la precipitación de las proteínas, lo que puede causar problemas en el desuerado, por lo que es recomendable realizar este procedimiento reduciendo las temperaturas entre 62 – 65 °C por un tiempo de 20 min, con un tiempo de retención de 30 minutos.

**4.8.2.5. Adición de Cloruro de Calcio.** Al someter la leche al tratamiento térmico de pasteurización, el calcio se precipita y se pierde, por ello, es necesario la adición de cloruro de calcio a la leche, cuando se alcanza la temperatura alrededor de 32°C, a razón de 2 gramos por cada 10 Litros de leche (0.2 gramos por Litro de leche). Con la adición del cloruro de calcio, se facilita la coagulación, mejorando el rendimiento y la producción de cuajada de buena consistencia.

**4.8.2.6. Coagulación.** Zavala<sup>75</sup> menciona que la coagulación enzimática de la leche es el resultado de la hidrólisis de la Kappa caseína por la adición de un conjunto de enzimas denominado renina o cuajo común, compuesto por quimosina y pepsina. Según Jiménez<sup>76</sup> la acción primaria de la renina sobre la

---

<sup>73</sup> WALSTRA, P. *et al.*, Op.Cit. p.600

<sup>74</sup> *Ibíd.*, p.p. 74-75.

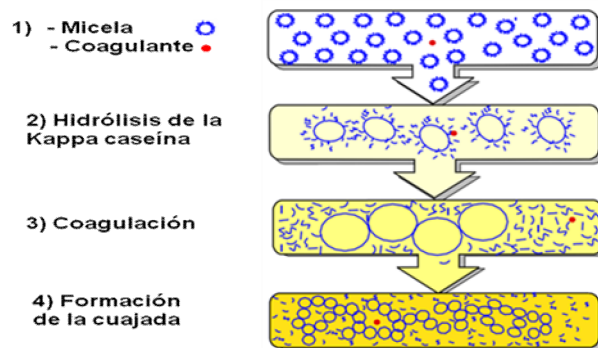
<sup>75</sup> ZAVALA, J. Aspectos nutricionales y Tecnológicos de la Leche. [En internet] Perú, Dirección de Promoción Agraria, 2005. [Citado el 14 de junio de 2010] Disponible en: [http://vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/Material%20II/A%20archivos%20internet/Biologia%20y%20fisiologia%20de%20la%20lactacion/agroin\\_doc2.pdf](http://vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/Material%20II/A%20archivos%20internet/Biologia%20y%20fisiologia%20de%20la%20lactacion/agroin_doc2.pdf)

<sup>76</sup> JIMÉNEZ, M. Coagulantes y coagulación. [En internet] Bogotá, Tecnolácteos, [Citado el 14 de junio de 2010] Disponible en: [www.chr-hansen.com](http://www.chr-hansen.com)

caseína es específica y consiste en romper el enlace peptídico entre la fenilalanina 105 y la metionina 106, separando la región hidrofílica del extremo. El efecto de coagulación convierte la caseína en paracaseína, que precipita en presencia de concentraciones adecuadas del ión calcio. El caseinomacropéptido se libera y queda en solución, mientras que el fragmento mayor de la caseína Kappa conocido como para-kappa-caseína queda asociado a la micela. En la segunda fase de la reacción se da la formación de un gel de caseína insoluble que constituye una red en la que quedan atrapados los glóbulos grasos. La tercera fase implica la acción proteolítica general de la renina sobre los componentes proteicos. En la Figura 7, se presenta gráficamente el proceso de coagulación.

Walstra *et al*<sup>77</sup> y Jiménez<sup>78</sup> mencionan que esta interesante etapa de la fabricación de la cuajada transcurre óptimamente a pH 5 y que a mayor concentración de caseínas en la leche, se dará una coagulación más rápida y que a bajas concentraciones de  $Ca^{+2}$ , el proceso de coagulación será más lento.

**Figura 7. Proceso de coagulación de la leche**



Adaptado de: Jiménez, M., 2007.

**4.8.2.7. Corte de la cuajada y Sinéresis o desuerado.** Walstra *et al*<sup>79</sup> mencionan que una vez formado el gel enzimático éste tiende a contraerse y a exhibir sinéresis, es decir a expulsar el lactosuero. Los poros entre las partículas son suficientemente anchos para permitir la circulación del líquido a través de ellos. La causa de este fenómeno es que en principio, una partícula puede establecer uniones con otras muchas partículas (con la correspondiente ganancia de energía), dando lugar a un empaquetamiento mucho más compacto entre las partículas. Esto es posible porque las partículas tienen

<sup>77</sup> WALSTRA, P. *et al.*, Op.Cit. p. 565

<sup>78</sup> JIMÉNEZ, M. Op.Cit.

<sup>79</sup> WALSTRA, P. *et al.*, Op.Cit. p. 572

puntos reactivos por toda su superficie. Sin embargo prácticamente no pueden ponerse en contacto porque están retenidas en la red del gel. La ruptura local de los enlaces, que hace que se rompan las hebras de la red, facilita la subsecuente formación de nuevos y generalmente, más enlaces induciéndose así la sinéresis.

La sinéresis se favorece con el corte de la cuajada mediante unos instrumentos denominados liras, el calentamiento y la agitación.

**4.8.2.8. Moldeado.** En la mayoría de los casos es deseable convertir la cuajada en una masa uniforme fácil de manipular, de tamaño deseado y que presente una cierta consistencia y una superficie lisa y cerrada. Para ello se le da forma a la cuajada, lo cual se efectúa si los granos se deforman y se fusionan.

**4.8.2.9. Almacenamiento y Empaque.** Se tienen en cuenta factores como la temperatura, la humedad y la velocidad del aire. La temperatura influye sobre la velocidad de crecimiento de la flora específica deseable y sobre la actividad de sus enzimas, la humedad y la velocidad del aire influyen sobre la evaporación del agua, asimismo, la humedad tiene un gran efecto sobre el crecimiento de microorganismos deseables e indeseables en la corteza de la cuajada. En la Figura 8 se describe el proceso de elaboración de la cuajada, empleado en este estudio.

**4.8.3. Rendimiento en Cuajada.** De acuerdo con Inda<sup>80</sup>, el rendimiento quesero puede definirse como la cantidad de cuajada en kilogramos, que se obtiene a partir de cierta cantidad de leche en litros.

**4.8.4. Factores que Influyen Sobre el Rendimiento.** Según Walstra *et al*<sup>81</sup> entre los factores más importantes que influyen en el rendimiento industrial en cuajada se puede citar los siguientes:

- **Consistencia de la cuajada al momento del corte.** Ya que si el gel no es suficientemente consistente durante el cortado, presenta inicialmente una sinéresis ligera, pero que tiende a aumentar rápidamente. La consecuencia más importante es que origina una gran cantidad de finos granos de cuajada con la correspondiente disminución del rendimiento quesero.

- **Área de Superficie de corte de la Cuajada.** El gel suele cortarse en cubos, cuando el tamaño inicial de los granos de la cuajada es muy diferente esta suele ser poco homogénea e influye directamente en el contenido de agua, afectando el rendimiento.

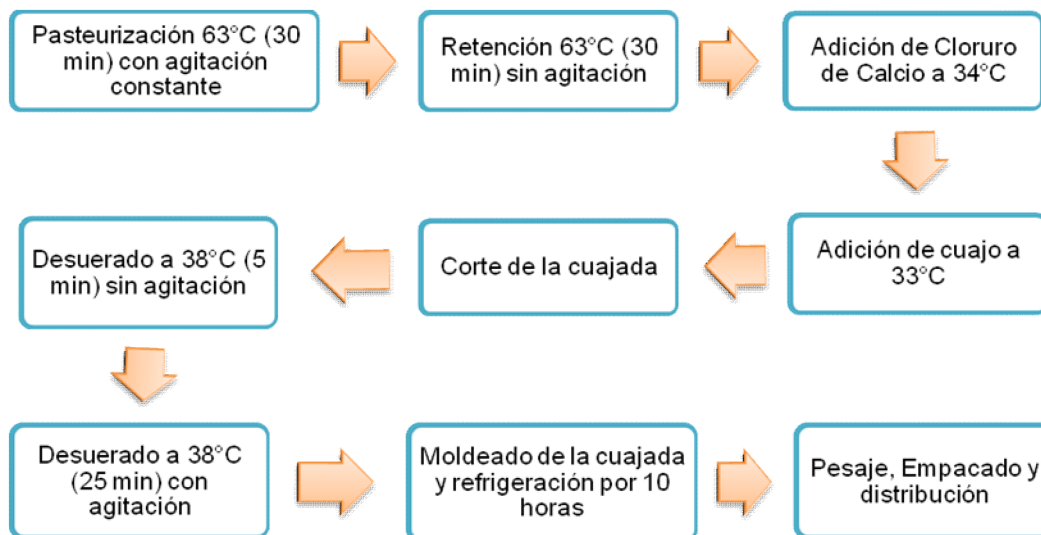
---

<sup>80</sup> INDA, A. Optimización de Rendimiento y Aseguramiento de Inocuidad en la industria de la Quesería. México. 2000.

<sup>81</sup> WALSTRA, P. *et al.*, Op.Cit. p.p. 601-605

- **Mastitis.** Las vacas que padecen mastitis graves producen leche con contenidos de caseína bajos y por ende un menor rendimiento quesero.
- **Pasteurización de la leche.** Una alta temperatura de calentamiento se traduce en un aumento en el rendimiento, debido a que a altas temperaturas las proteínas del lactosuero se insolubilizan y se agregan a la fracción caseínica, aumentando el rendimiento quesero.
- **Tipo de cuajo.** Las diferencias en la proteólisis, además de la hidrólisis de la K-Cs, afecta el rendimiento, pero las modificaciones suelen ser despreciables, excepto cuando se utilizan cuajos microbianos.
- **CaCl<sub>2</sub>.** La adición de esta sal a la leche produce una acumulación de fosfato cálcico coloidal a las micelas, favoreciendo la coagulación y aumentando el rendimiento en un 0.3%.
- **Manufactura de la cuajada.** Como consecuencia del corte y agitación se pierde entre un 5 a 10 % de la grasa con el lactosuero, también se pierden los finos de la cuajada de 0.2 a 1% de la proteína. Esto sucede cuando los procesos no son automatizados y se realizan de forma manual.
- **Variantes genéticas de las proteínas lácteas.** Pueden influir sobre el rendimiento quesero, probablemente porque la composición de la leche está correlacionada con variantes genéticas específicas así como con propiedades tecnológicas de la leche.

**Figura 8. Etapas en el proceso de elaboración de cuajada**





Tomado de: Erazo y Zambrano, 2009.

## 5. DISEÑO METODOLÓGICO

### 5.1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS VARIANTES ALÉLICAS DEL GEN DE LA BETA CASEÍNA ( -Cs)

**5.1.1 Localización y Tamaño de la Muestra.** El presente trabajo se realizó en los distritos lecheros Pasto y Pupiales del Trópico Alto de Nariño, de acuerdo con la zonificación establecida por Colácteos. En total se genotificaron 100 hembras.

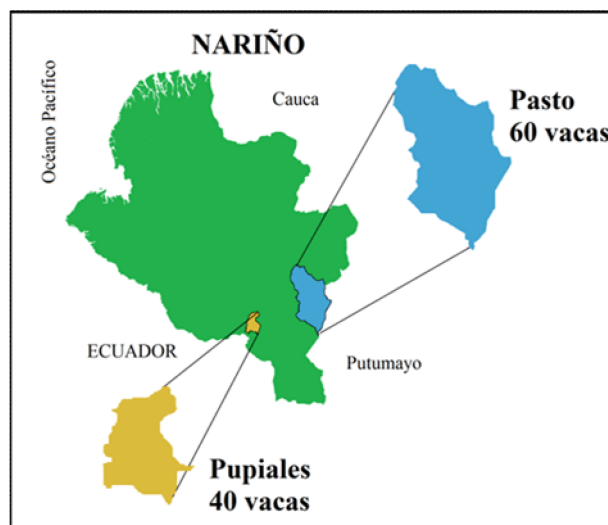
Las características geográficas y climáticas más importantes de las cabeceras de cada distrito se indican en la Tabla 6 y su localización en la Figura 9.

**Tabla 6. Coordenadas geográficas y características climáticas principales de los distritos lecheros Pasto y Pupiales del departamento de Nariño, Colombia**

DISTRITO	COORDENADAS	ALTITUD m.s.n.m.	PRECIPITACION MEDIA mm/año	TEMPERATURA MEDIA °C
Pasto	1°, 12', 41" Latitud norte 77°, 16', 52" Longitud oeste	2527	960	14
Pupiales	0°, 52', 21" Latitud norte 77°, 16', 34" Longitud oeste	2900	960	11

Adaptado de: Solarte, C. *et al.* 2009 p. 23

**Figura 9. Ubicación geográfica de los distritos lecheros del Trópico Alto de Nariño, incluidos en esta investigación**



**5.1.2 Selección de Hembras.** De un total de 5647 hembras holstein registradas en el pedigrí del Programa de Mejoramiento Genético, fueron seleccionadas 290 como donantes de embriones por mayor mérito genético a través de un modelo animal multicarácter en el que se incluyeron variables productivas como volumen de leche por lactancia, porcentajes de grasa y proteína, características de conformación o tipo y de fertilidad como el intervalo entre partos y los servicios por concepción. A partir de estas 290 hembras, fueron escogidas 100 para realizar esta investigación, de las cuales 60 pertenecen al distrito de Pasto y 40 al distrito de Pupiales.

**5.1.3 Materiales y Equipos.** Siguiendo las normas de bioseguridad establecidas en el Laboratorio de Mejoramiento Genético de la Universidad de Nariño, fue necesario utilizar guantes de nitrilo, tapabocas, gafas y bata. Para la genotipación de las muestras, se emplearon los siguientes materiales: jeringas, vacutainer heparinizados con EDTA, algodón, camisas desechables para vacutainer, puntas para micropipetas (azules, blancas, amarillas, blancas con filtro), papel desechable, tubos eppendorf de 1,5 ml y 0.2 ml. Reactivos: agua grado molecular, agua estéril, kit PCR (Taq polimerasa, Buffer PCR y  $MgCl_2$ ), dNTPs, cebadores específicos, Enzima de restricción *MspI*, Buffer de lisis I y II, Buffer TE 1X, Proteinasa K, NaOH, Etanol absoluto, Etanol al 70%, Buffer TAE 1X, Agarosa, Bromuro de etidio, Marcadores de peso de 100 y 50 pb. Equipos: Vortex, Ultracentrífuga, Microcentrífuga, Micropipetas, Termociclador, Neveras, Freezer, Horno Microondas, Transiluminador, Balanza electrónica, Baño María, Cámaras de electroforesis horizontal y Cámara fotográfica.

**5.1.4 Toma de Muestras de Sangre.** Las muestras se obtuvieron de sangre periférica mediante punción en la vena coccígea media (Figura 10) y se almacenaron en tubos Vacutainer™ impregnados con anticoagulante EDTA, los tubos se transportaron en frío hasta el Laboratorio de Mejoramiento Genético Animal, ubicado en la ciudadela universitaria Torobajo de la Universidad de Nariño en la ciudad de Pasto, Colombia.

**Figura 10. Toma de muestra de sangre en un ejemplar holstein del distrito de Pupiales**



**5.1.5 Extracción de ADN.** El ADN se extrajo a partir de 5 c.c. de sangre utilizando el protocolo de extracción por sales denominado Salting Out (Ferreira y Gratapaglia<sup>82</sup>), modificado para microextracción, con el protocolo que se menciona a continuación y como se observa en la Figura 11.

Se tomaron 500 micro litros ( $\mu\text{l}$ ) de sangre conservada en medio EDTA, los cuales fueron mezclados con 500  $\mu\text{l}$  de solución de lisis I que contenía 0.32M de sacarosa, 10mM de Tris-HCl a un pH de 7.5 más 5mM de  $\text{MgCl}_2$  y 1% de Tritón 10X. Una vez adicionado el volumen de solución de lisis I a la sangre total se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente, durante 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a temperatura ambiente a una velocidad de 13500 r.p.m., durante 2 minutos. El sobrenadante se descartó con cuidado, evitando perder el botón formado por centrifugación. Al botón obtenido se le adicionó 1 ml de solución de lisis I y se mezcló por inversión hasta homogenizar completamente, evitando la formación de espuma. Luego de la homogenización se centrifugó nuevamente 2 minutos a 13500 r.p.m. Los pasos de lisis I y centrifugación se repitieron tres veces, hasta lograr un precipitado de color blanco.

Finalizado el proceso de lisis celular se adicionó al precipitado 400  $\mu\text{l}$  de solución de lisis II que contenía 10mM de Tris-HCl a un pH de 7.5, 10mM de EDTA pH 8.0, 50mM de NaCl y 0.2% de SDS. Junto a la adición de la solución de lisis II se adicionaron 20 $\mu\text{l}$  de proteinasa K (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). La solución homogenizada se incubó por 60 minutos a 56°C y se homogenizó por inversión cada 10 minutos; pasado este tiempo se adicionaron 350 $\mu\text{l}$  de solución de NaCl 5M. Para homogeneizar esta solución fue necesario utilizar un equipo vortex durante 60 segundos. Luego se centrifugó por 20 minutos a 13500 r.p.m. y se mezclaron los 350 $\mu\text{l}$  del sobrenadante con 900 $\mu\text{l}$  de etanol absoluto frío, con el fin de capturar el ADN libre de proteínas.

La malla de ADN formada por la adición del etanol se precipitó por 48 horas a -20°C. Pasado este tiempo, el ADN se centrifugó durante 20 minutos a 13500 r.p.m. y se lavó con etanol al 70% y se incubó a temperatura ambiente durante

---

<sup>82</sup> Op.Cit, FERREIRA, M y GRATAPAGLIA, N. 1998

5 minutos. Posteriormente el ADN fue centrifugado a 13.500 r.p.m. durante 20 minutos. Finalmente, el ADN se secó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se re suspendió en 50  $\mu$ l de buffer de conservación TE que contenía 1mM de Tris-HCl pH 7.5 y 0.1mM de EDTA pH 8.0 y se conservó en frío a -20°C.

La calidad del ADN se evaluó en geles de agarosa al 2% en Buffer TAE 1X (0,04 M Tris Base, 0,017 M Acetato 0,001M EDTA) y tinción con bromuro de etidio. Se emplearon 5  $\mu$ l de ADN con 1  $\mu$ l de Buffer de carga (0,05% Azul de Bromofenol, 0,05% Xilenecianol, 60% Glicerol). Los geles fueron corridos a 100V durante 25 minutos, usando electroforesis horizontal (Cámara GEL XL ULTRA V-2 LABNET) y visualizados en luz ultravioleta (Transiluminador Labnet). Los geles se fotografiaron usando una cámara digital. La cuantificación de ADN se realizó por comparación visual de ADN con concentración conocida, en este caso ADN de timo en concentraciones de 100 ng y 10 ng.

**Figura 11. Proceso de extracción de ADN por la técnica Salting Out**



**5.1.6 Determinación de las Variantes Alélicas.** La identificación de las variantes genéticas de la -Cs en las hembras bovinas del Trópico Alto de Nariño, se llevó a cabo mediante el protocolo expuesto por Medrano y

Sharrow<sup>83</sup>, con los ajustes y modificaciones realizados en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Animal de la Universidad de Nariño. En la Tabla 7 se muestran las secuencias específicas de cada cebador (*Integrated DNA Technology*) empleados en la amplificación así como el tamaño del fragmento esperado.

**Tabla 7. Secuencia de cebadores y fragmento esperado en la amplificación de la -Cs bovina.**

Fracción proteica	Cebadores	Fuente	Fragmento esperado
-Cs	BETAKF5'CCAGACACAGTCTCTAGT CTATCCC3' BETAKR5'CAACATCAGTGAGAGTCA GGCTCCG3'	Medrano y Sharrow, 1991	233

**5.1.6.1 Amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).** Para la amplificación del gen de la -Cs, se siguió el protocolo expuesto por Medrano y Sharrow<sup>84</sup> (Tabla 8). El fragmento amplificado tuvo un peso de 233 pb. Como ADN molde se emplearon muestras con una concentración aproximada a 50 ng. El programa de amplificación se puede observar en la Figura 12. Las muestras se sometieron a un ciclo de desnaturalización por 2 minutos a 94°C, después 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una elongación final de 72°C por 10 minutos en un Termociclador *BIORAD* (Figura 13).

**Tabla 8. Mezcla de solución de PCR para el gen de la -Cs.**

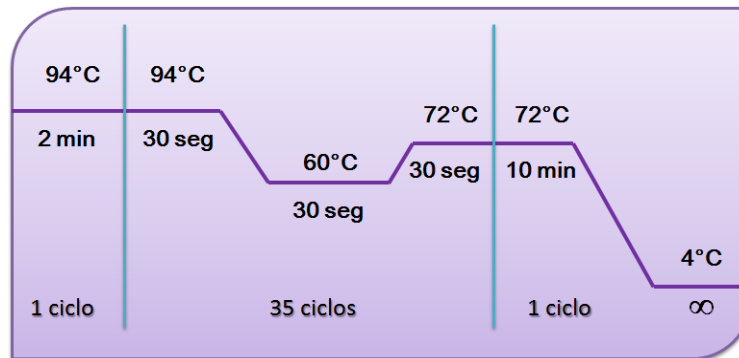
Reactivos	Solución Stock	Concentración de Trabajo	Volumen (µl)
ADN	100 ng	25 ng	1 µl
Buffer PCR	5X	1X	2.5
d'NTPs	20mM	10mM	0.25
Primer Forward	100 mM	10mM	0.15
Primer Reverse	100 mM	10mM	0.15
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	1.5
Taq Polimerasa	500 U/µl	2.5 u/µl	0.125
Agua mili-Q	-	-	19.325

<sup>83</sup> MEDRANO, J.F. y SHARROW, L. Genotyping of bovine beta-casein loci by restriction site modification of polymerase chain reaction (PCR) amplified genomic DNA. En: Journal of Dairy Science [En internet] 1991, Vol.74 N.1: 282

<sup>84</sup> *Ibíd.*, p. 282

Adaptado de: Medrano y Sharrow, 1991

**Figura 12. Condiciones de amplificación por PCR para la -Cs en un termociclador.**



Tomado de: Medrano y Sharrow, 1991

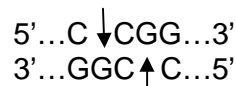
**Figura 13. Termociclador My Cyclor (BIORAD)**



Los fragmentos de la -Cs amplificados por PCR, fueron visualizados en geles de agarosa al 2% en Buffer TAE 1X (0,04 M Tris Base, 0,017 M Acetato 0,001M EDTA) y tinción con bromuro de etidio. Se emplearon 5  $\mu$ l de producto

de PCR con 1 µl de Buffer de carga (0,05% Azul de Bromofenol, 0,05% Xilenecianol, 60% Glicerol). Los geles fueron corridos a 110 voltios durante 40 minutos, usando electroforesis horizontal (Cámara GT MINI SUB-CELL, BIORAD). Los geles se visualizaron en luz ultravioleta (Transiluminador Labnet) y se fotografiaron usando una cámara digital. La identificación del peso del fragmento amplificado, se realizó por comparación de pesos moleculares utilizando como escalera un marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas).

**5.1.6.2 Marcador Molecular RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).** El marcador molecular RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción), emplea una endonucleasa de restricción que corta los fragmentos específicos para los alelos de la -Cs, para este caso se utilizó la enzima *MspI* (Fermentas), que corta en el palíndromo no metilado como se muestra a continuación:



A continuación se observa la secuencia nucleotídica parcial de la -Cs, ordenada en tripletas, donde se aprecia el fragmento amplificado y el sitio de restricción reconocido por la enzima. Una sustitución en las bases nitrogenadas citocina (C) por guanina (G) en la posición nucleotídica 8267, causando la sustitución de los aminoácidos Serina (AGC) por Arginina (AGG) en la posición 122 de la estructura primaria de la proteína, con lo cual se puede diferenciar la variante alélica A de la B.

```


att ata act gga tta tgg act caa aga ttt gtt ttc ctt ctt tcc agg atg
aac tcc agg gat aaa atc cac ccc ttt ggc cag aca cag tct cta gtc tat
ccc ttc cct gga ccc atc cat aac agc ctc cca caa aac atc cct cct ctt
act caa acc cct gtg gtg gtg ccg cct ttc ctt cag cct gaa gta atg gga
gtc tcc aaa gtg aag gag gct atg gct cct aag cac aaa gaa atg ccc ttc
cct aaa tat cca gtt gag ccc ttt act gaa aac cag agc ctg act ctc act
gat gtt gaa aat ctg cac ctt cct ctg cct ctg ctc cag tct tgg atg cac
cag cct cac cag cct ctt cct cca act gtc atg ttt cct cct cag tcc gtg
ctg tcc ctt tct cag tcc aaa gtc ctg cct gtt ccc cag aaa gca gtg ccc
tat ccc cag aga gat atg ccc att cag gcc ttt ctg ctg tac cag gag cct
gta ctc ggt cct gtc cgg gga ccc ttc cct att att gta agt cta aat tta
cta act gtg cct gtt taa ctt ctg atg ttt gta
  
```

Cebadores

BETAKF (Forward) 5'ccagacacagtctctagtctatccc3' 

BETAKR (Reverse) 5'caacatcagtgagagtcaggctccg3' 

En el recuadro: fragmento amplificado por PCR 

Sitio de restricción de la enzima *MspI* 

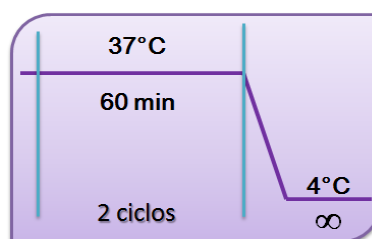
Exón VII 

En la reacción se utilizó buffer Tango (33mM de Tris-Acetato (pH 7.9), 10mM de Magnesio acetato, 66 mM de acetato de Potasio y 0.1 Miligramos (mg) por mililitro (ml) de BSA (Albúmina de Suero Bovino, que actúa como un estabilizante de la enzima), producto PCR, agua grado molecular y la enzima de restricción. En la Tabla 9, se indican las condiciones de digestión para obtener el marcador molecular RFLP y en la Figura 14, las condiciones de digestión en un termociclador.

**Tabla 9. Protocolo Digestión de Productos Amplificados por PCR con el Marcador Molecular RFLP**

Componente	Solución Stock	Concentración de trabajo	Volumen $\mu\text{L}$
Mezcla de reacción PCR	-	-	10
Agua mili-Q	-	-	18
Buffer Tango	10 X	0,625X	2
Enzima <i>MspI</i>	10U/ $\mu\text{L}$	0,625 U/ $\mu\text{L}$	2
Total volumen /reacción			32 $\mu\text{L}$

**Figura 14. Condiciones de digestión del marcador molecular RFLP para la -Cs en un termociclador**



Finalmente, para la identificación de las variantes alélicas, los fragmentos digeridos se corrieron en geles de agarosa al 4% (Figura 15) en Buffer TAE 1X (0,04 M Tris Base, 0,017 M Acetato 0,001M EDTA) y teñidos con bromuro de etidio. Se emplearon 7  $\mu\text{L}$  de producto de digestión con 1  $\mu\text{L}$  de Buffer de carga (0,05% Azul de Bromofenol, 0,05% Xylenecianol, 60% Glicerol). Los geles fueron corridos a 110V durante 55 minutos, usando electroforesis horizontal (Cámara GT MINI SUB-CELL, *BIORAD*). La visualización se realizó mediante rayos ultravioleta y su lectura se realizó con ayuda de un marcador de peso molecular de 50 pb (*Fermentas*) y se fotografiaron usando una cámara digital.

**Figura 15. Preparación de un gel de agarosa al 4%**





## 5.2 EVALUACIÓN DE RENDIMIENTO EN CUAJADA

**5.2.1 Localización y Tamaño de la Muestra.** La evaluación de rendimiento en cuajada se realizó en las plantas procesadoras de leche de la Cooperativa de productos Lácteos de Nariño – Colácteos, ubicadas en la comuna 10 de la ciudad de Pasto (Figura 16) y en el municipio de Pupiales.

**Figura 16. Planta Procesadora Aranda, Cooperativa de Productos Lácteos de Nariño-Colácteos**



**5.2.2 Selección de Animales.** Una vez identificado el genotipo de los animales, se seleccionaron tres vacas por genotipo y cinco mediciones por animal, con el fin de evaluar el rendimiento industrial en cuajada, para un total de 45 unidades experimentales.

**5.2.3 Toma de Muestras de Leche.** De los animales seleccionados para la evaluación de rendimiento en cuajada, se tomaron cuatro litros de leche individuales del ordeño de la mañana y se transportaron en frío hasta las plantas procesadoras de Colácteos, en garrafas debidamente identificadas con el nombre de la vaca, el propietario y la finca, como se observa en la Figura 17.

**Figura 17. Muestras de leche individuales debidamente identificadas**



**5.2.4 Materiales y Equipos.** De acuerdo a las Normas de Bioseguridad establecidas en las Plantas procesadoras de leche de Colácteos, para el ingreso a las mismas, es necesario usar overol, gorro, tapabocas, botas y bata. Además es obligatorio tener uñas cortas sin lesiones visibles, no usar joyas ni olores fuertes que puedan causar contaminación cruzada. Para el caso de los hombres, se exige cabello corto y sin barba, en el caso de las mujeres, llevar cabello recogido, abstenerse de usar maquillaje, cremas, lociones, y no usar esmalte de uñas. Los materiales y equipos empleados fueron: cuajo en polvo, cloruro de calcio, ollas, liras metálicas para corte, termómetros, moldes, bolsas para empaque, medidor de litro, recipientes plásticos, hielo, estufas eléctricas, centrífuga, papel aluminio, buretas, pipetas, densímetro, balanza de precisión, cucharas, cucharillas, garrafas plásticas de 4 litros, agua destilada, coladores, papel filtro, desinfectante y equipo Ekomilk.

**5.2.5 Evaluación físico-química de las muestras de leche.** Los porcentajes de grasa, proteína total, densidad y sólidos totales se determinaron sometiendo un litro de leche al análisis con el equipo EkoMilk Analyzer (Milkama KAM 98-2A, 2000), del laboratorio de plataforma de la planta lechera. Adicionalmente, el porcentaje de grasa se verificó mediante el método butirométrico de Gerber (B.S.I., 1995) y el porcentaje de proteína mediante el método Micro- Kjeldahl (B.S.I., 1996) en la misma planta.

**5.2.6 Rendimiento Industrial de Cuajada.** Inicialmente, se había contemplado la estandarización del porcentaje de grasa y proteína de la leche a ser procesada de acuerdo a los parámetros establecidos en la planta, sin embargo esto no fue posible debido al bajo volumen de muestra.

Para evaluar el rendimiento en cuajada se siguió el protocolo estandarizado en la Planta de Procesamiento de Colácteos como se menciona a continuación: se sometieron a pasteurización lenta durante 30 minutos a una temperatura de 63°C con agitación constante tres litros de leche. Posteriormente, se mantuvo la temperatura alcanzada sin agitar, este proceso se denomina retención. Después se disminuyó la temperatura en tres pasos: 63°C, 34°C y 33°C, con el fin de favorecer el crecimiento de las bacterias ácido lácticas necesarias para beneficiar el proceso.

Alcanzada la temperatura de 34°C, se agregaron 0.45 g de cloruro de calcio para contrarrestar las pérdidas causadas en la pasteurización y 0.06 g de cuajo a 33°C, con el fin de llevar a cabo el proceso de coagulación.

La cuajada formada se cortó con liras metálicas, obteniéndose granos de 1 cm<sup>3</sup>. Los granos obtenidos se calentaron durante 5 minutos incrementando gradualmente la temperatura a 38°C para facilitar el proceso de sinéresis. Pasado este tiempo se agitó durante 25 minutos y los granos de cuajada obtenidos fueron moldeados y llevados al cuarto frío para su posterior pesaje. En la Figura 18 se puede apreciar el proceso de elaboración de cuajada.

**Figura 18. Proceso de rendimiento en cuajada**



El rendimiento en cuajada se calculó teniendo en cuenta el volumen de leche procesada y el peso final de la cuajada después de 10 horas de refrigeración para lo cual se empleó la siguiente fórmula, desarrollada por Eraso y Zambrano<sup>85</sup>:

<sup>85</sup> ERASO, M. y ZAMBRANO, G. Relaciones entre los genotipos de la Kappa caseína, el contenido proteínico total de la leche y el rendimiento en cuajada de los bovinos Holstein en el trópico alto de Nariño. San Juan de Pasto. Pp. 86. Tesis (Pregrado Zootecnia). 2009. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal.

$$RC = \frac{VL}{WC}$$

Donde:

**RC** = rendimiento en cuajada

**VL** = volumen de leche requerido para elaborar un kilogramo de cuajada

**WC** = peso final de la cuajada

### 5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

**5.3.1 Análisis estadístico de la Diversidad Genética.** Para caracterizar genéticamente las poblaciones bovinas de estudio, se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas, heterocigosidad observada y esperada (Nei<sup>86</sup>), equilibrio Hardy Weinberg, Índices de fijación o Estadísticos F (Wright<sup>87</sup>) y distancia genética para lo cual se utilizaron los programas estadísticos TFPGA (Tools For Population Genetics Analysis, Miller<sup>88</sup>) y Arlequín versión 3.01 (Schneider *et al*<sup>89</sup>).

Para el análisis estadístico de las anteriores medidas de diversidad genética, en primer lugar, se consideraron todos los animales incluidos en el muestreo como una sola población y posteriormente esta se subdividió en los distritos lecheros Pasto y Pupiales a los cuales pertenecían los animales del estudio.

**5.3.2 Relación entre los genotipos de la -Cs con la producción de leche, grasa y proteína, medida en kilogramos por lactancia.** En estos análisis se incluyeron animales que tenían disponible la información genealógica, genética y fenotípica.

Los datos de producción de leche, grasa y proteína se recopilaron directamente en los hatos desde el año 2009 hasta el 2011. Los datos de pedigrí se obtuvieron de las bases de datos del Programa de Mejoramiento Genético (PMG) de la Universidad de Nariño y se actualizaron permanentemente hasta

---

<sup>86</sup> NEI, M. Op.Cit.

<sup>87</sup> WRIGHT, S. The genetical structure of populations. [En internet] 1951. Annal Eugen. Vol.15: 323–354.

<sup>88</sup> MILLER, M. TFPGA (Tools for Population Genetics Analysis). Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona. 1997.

<sup>89</sup> EXCOFFIER, L., LAVAL, G. y SCHNEIDER, S Arlequín, Ver. 3.0.1. An Integrated Software Package for Population Genetics. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), 2006. Institute of Zoology, University of Berne, Switzerland.

alcanzar un número total de 7846 animales.

Los análisis estadísticos incluyeron además de la información del pedigrí, los datos de producción de leche por lactancia, grasa y proteína en Kg.

La producción de leche se extendió a 305 días, utilizando el método de Fleischman (Carré *et al*<sup>90</sup>) modificado por Everett y Carter 1968<sup>91</sup>, cuya expresión algebraica se presenta en la siguiente fórmula de cálculo:

$$PL = (P_1 D_1 f_1) + \sum_{i=2}^n \left[ \left( \frac{P_i + P_{(i-1)}}{2} \right) (D_i - D_{i-1}) \right]$$

Donde:

$PL$  = Producción de leche ajustada a 305 en función de la edad de la vaca al parto

$P_1$  = producción en litros en el día uno

$D_1$  = día del primer registro de producción

$f_1$  = función de ajuste por edad de la vaca al parto

$P_i$  = producción en litros del día  $i$

$P_{(i-1)}$  = producción en litros del día  $i - 1$

$D_i$  = día  $i$  de lactancia

$D_{i-1}$  = día  $i - 1$  de lactancia

Adicionalmente los datos se estandarizaron a una edad común con los factores de ajuste determinados para el ganado holstein colombiano por Cerón, *et al*<sup>92</sup>.

Para extender los registros de grasa y proteína a 305 días, se empleó la fórmula del método de intervalos propuesta por Everett y Carter<sup>93</sup> mediante la siguiente fórmula algebraica:

---

<sup>90</sup> CARRÉ, D., POLY et B. VISSAC. Étude des methods de détermination des performances laitières. [En internet] 1958. *Annal Zootechniqué*, III:243-280.

<sup>91</sup> EVERETT, R.W y CARTER, H.W. Accuracy of Test Interval Method of Calculating Dairy Herd Improvement Association Records. *Journal of Dairy Science* Volume 51, Issue 12, December 1968, Pages 1936-1941

<sup>92</sup> CERÓN, M., TONHATI, H., COSTA, C., SOLARTE, C., y BENAVIDES, O. Factores de Ajuste para Producción de Leche en Bovinos Holstein Colombiano. En: *Revista Colombiana de ciencias Pecuarias*. [En internet] 2003 Vol.16 n.1

<sup>93</sup> Op.Cit, EVERETT, R. y CARTER, H. 1968.

$$Kg = \sum_{i=2}^n \left[ \left( \frac{P_i + P_{(i-1)}}{2} \right) (D_i - D_{i-1}) \right]$$

Donde,

$Kg$  = Producción en Kg de proteína o grasa ajustado por lactancia

$P_i$  = producción en kg de proteína y grasa del día  $i$

$P_{(i-1)}$  = producción en kg de proteína y grasa del día  $i-1$

$D_i$  = día  $i$  de lactancia

$D_{i-1}$  = día  $i-1$  de lactancia

Una vez ajustados los datos, con el fin de establecer las relaciones entre las variables productivas y los genotipos se utilizó un modelo animal con repetibilidad para la característica producción de leche ajustada a 305 días y EA (Modelo 1) y un modelo animal para las variables producción de proteína y grasa medidas en Kg por lactancia (Modelo 2) (Henderson<sup>94</sup>), como se describen a continuación:

$$y = X\beta + Z_a + W_p + e \quad (\text{Modelo 1})$$

$$y = X\beta + Z_a + e \quad (\text{Modelo 2})$$

Donde:

$y$  = vector  $n \times 1$  de  $n$  registros observados (producción de leche ajustada a 305 días y equivalente adulto, producción en Kg. de proteína y producción en Kg. de grasa)

$\beta$  = vector  $p \times 1$  de  $p$  niveles de efectos fijos (número de parto, ható-año: hy y genotipo para  $\beta$  -Cs)

$a$  = vector  $q \times 1$  de  $q$  niveles de valores genéticos aditivos, el cual sigue una distribución normal con una media igual a cero y una varianza igual a la varianza genética aditiva del carácter.

$p$  = vector de efectos ambientales permanentes y de efectos genéticos no aditivos

$e$  = vector  $n \times 1$  de efectos aleatorios residuales desconocidos, el cual se asume que sigue una distribución normal con una media igual a cero y una varianza igual a la varianza residual

$X$  = matriz de orden  $n \times p$  conocida como matriz de incidencia que relaciona los registros en  $y$  con los efectos fijos en  $\beta$

$Z$  = matriz de orden  $n \times q$  conocida como matriz de incidencia que relaciona

<sup>94</sup> HENDERSON, C. R. Application of Linear Models in Animal Breeding. [En internet] 1984. Univ. Guelph Press, Ontario, Canada.

los registros en  $\mathbf{y}$  con los efectos aleatorios en  $\mathbf{a}$

$\mathbf{W}$  = matriz de incidencia que relaciona los registros en  $\mathbf{y}$  con el efecto ambiental permanente.

Adicionalmente se asume que los efectos del ambiente permanente y los efectos residuales se distribuyen normal e independientemente con media cero y varianzas  $\sigma_{pe}^2$  y  $\sigma_e^2$  respectivamente. Por lo tanto:

$$\text{var}(pe) = I\sigma_{pe}^2$$

$$\text{var}(e) = I\sigma_e^2 = R$$

$$\text{var}(a) = A\sigma_a^2$$

$$\text{var}(y) = ZAZ'\sigma_a^2 + W I \sigma_{pe}^2 W' + R$$

Dado que  $\text{cov}(a, e) = \text{cov}(e, a) = 0$ , entonces:

$$V = ZGZ' + R$$

$$\text{cov}(y, a) = \text{cov}(Za + e, a)$$

$$= \text{cov}(Za, a) + \text{cov}(e, a)$$

$$= Z \text{cov}(a, a)$$

$$= ZG$$

Además,

$$\text{cov}(y, e) = \text{cov}(Za + e, e)$$

$$= \text{cov}(Za, e) + \text{cov}(e, e)$$

$$= Z \text{cov}(a, e) + \text{cov}(e, e)$$

$$= R$$

Las esperanzas ( $E$ ) de las variables son:  $E(y) = X\beta$ ;  $E(u) = E(e) = 0$

Con base en la información antes indicada el sistema de ecuaciones del modelo mixto (MME), en forma matricial, adopta la siguiente estructura luego de factorizar  $R^{-1}$  en los dos lados del sistema.

$$\begin{bmatrix} \hat{b} \\ \hat{a} \\ \hat{p}e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'W \\ Z'X & Z'Z + A^{-1}\alpha_1 & Z'W \\ W'X & W'Z & W'W + I\alpha_2 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ W'y \end{bmatrix}$$

(Modelo 1)

En este sistema  $A$ = Matriz de parentesco;  $\alpha_1 = \sigma_s^2 / \sigma_a^2$  y  $\alpha_2 = \sigma_p^2 / \sigma_{pe}^2$ .

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z \\ Z'X & Z'Z + A^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{b} \\ \hat{a} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \end{bmatrix}$$

(Modelo 2)

En este modelo  $\alpha = \sigma_e^2 / \sigma_a^2$

Para obtener las soluciones BLUE del efecto fijo de interés (genotipo) se utilizó el programa MTDFREML (por sus siglas en inglés Multi Trait Derived-Free Restriction Estimation Maximum Likelihood) descrito por Boldman *et al*<sup>95</sup>, una vez obtenido dichas soluciones se llevaron a cabo las comparaciones entre genotipos, mediante contrastes de máxima verosimilitud restringida REML

<sup>95</sup> BOLDMAN, K. et al. A manual for use of MTDFREML. A set of programs to obtain estimates of variances and covariances, USDA-ARS, Washington, DC. 1995.



(Patterson y Thompson<sup>96</sup>).

Para estimar los contrastes REML se creó un vector de coeficientes ( $\mathbf{k}$ ), asignándole un coeficiente positivo o negativo  $\mathbf{c}' = [1 \text{ y } -1]$  a cada subclase de este efecto.

La significancia de cada efecto fue determinada comparando el valor de cada contraste mediante el valor de  $t$ , que es el logaritmo de verosimilitud con una distribución de  $J^2$ , un grado de libertad y una significancia del 95%.

En consecuencia, los contrastes fueron: genotipo AA vs AB  $\mathbf{c}' = [1 \text{ y } -1]$ ; AB vs BB  $\mathbf{c}' = [1 \text{ y } -1]$  y AA vs BB  $\mathbf{c}' = [1 \text{ y } -1]$ .

**5.3.3 Relación entre los genotipos de la -Cs con el Rendimiento industrial en cuajada.** En total se utilizaron 45 unidades experimentales y para los análisis se empleó un modelo lineal, en el que se incluyeron los efectos fijos del tercio de lactancia, los genotipos de la  $\beta$ -Cs y el porcentaje de grasa como covariable. El modelo lineal empleado para describir el comportamiento de esta variable, corresponde a la siguiente expresión algebraica:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_j + \alpha_k + \beta(x_i - \bar{x}) + e_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = rendimiento en cuajada, asociado al  $j$ -ésimo genotipo, en el  $k$ -ésimo tercio de lactancia, corregido por el porcentaje de grasa.

$\mu$  = media común a todas las observaciones.

$\tau_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo genotipo.  $j = 1, 2, 3$ .

$\alpha_k$  = Efecto del  $k$ -ésimo tercio de lactancia.  $k = 1, 2, 3$ .

$\beta(x_i - \bar{x})$  = Efecto de la covariable porcentaje de grasa.

$e_{ijk}$  = Error experimental asociado al  $j$ -ésimo genotipo en el  $k$ -ésimo tercio de lactancia.

Para el análisis de la variable porcentaje de proteína se utilizó el mismo modelo.

La significancia estadística ( $p < 0.05$ ) de cada uno de los efectos se determinó con el procedimiento GLM (Modelos Lineales Generalizados) del paquete estadístico SAS versión 9.20 (SAS<sup>97</sup>). La estimación de las diferencias entre los

---

<sup>96</sup> PATTERSON, H. D. y THOMPSON, R. Recovery of interblock information when block sizes are unequal. 1971. Biometrika. Vol.58:545.

<sup>97</sup> SAS Institute, INC versión 9.2 y Enterprise SAS Guide versión 4.2. 2009.

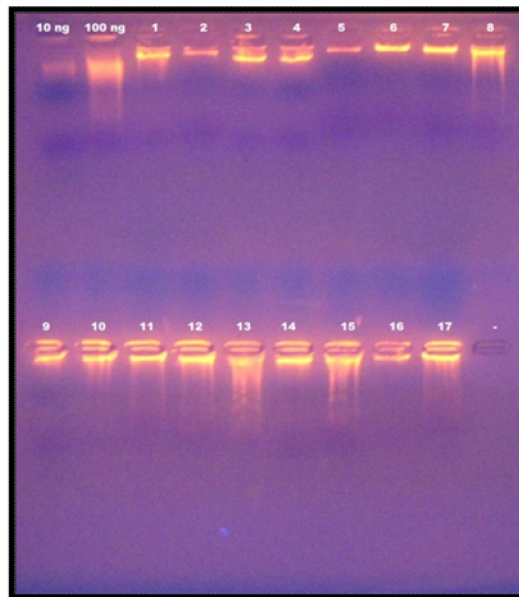
niveles de clase se estableció mediante contrastes ortogonales, que son la combinación lineal de las medias de tratamiento por un coeficiente. Estos coeficientes deben cumplir con la característica de que su sumatoria es igual a cero, de tal manera que algunos niveles de clase toman coeficientes positivos y otros negativos.

## 6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 6.1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS VARIANTES ALÉLICAS DEL GEN DE LA BETA CASEÍNA ( $\beta$ -Cs)

**6.1.1 Extracción de ADN.** El método de extracción por sales denominado Salting Out, citado por Ferreira y Gratapaglia<sup>98</sup> y modificado para microextracción, resultó eficiente ya que como se observa en la Figura 19, se obtuvieron muestras de ADN de muy buena calidad, sin ningún tipo de degradación y con una concentración de aproximadamente 100ng. Lo anterior indica que la técnica de extracción de ácidos nucleicos empleada en esta investigación, es adecuada y útil para la conformación de un banco de ADN bovino en el Trópico Alto de Nariño.

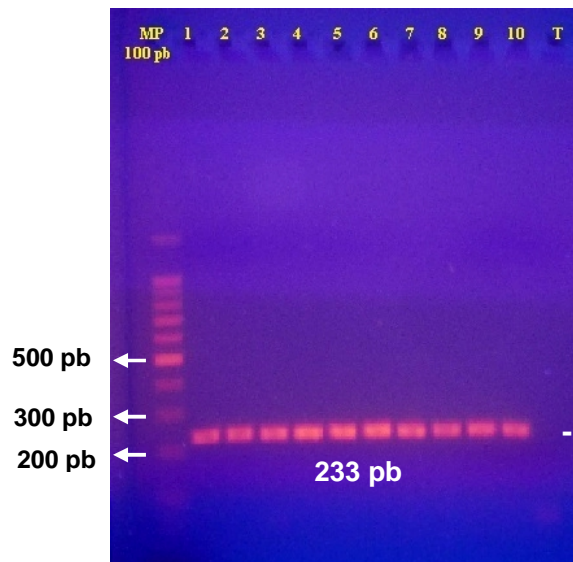
**Figura 19. Evaluación de la calidad y cuantificación de ADN por intensidad lumínica, empleando ADN de Timo.**



<sup>98</sup> FERREIRA, D. y GRATAPAGLIA, M. Op.Cit.

**6.1.2 Amplificación del Gen de la -Cs.** La aplicación del protocolo reportado por Medrano y Sharrow<sup>99</sup>, permitió amplificar vía PCR un fragmento de 233 pb correspondiente al gen de la -Cs. La amplificación se realizó en presencia de una muestra control, para verificar la pureza de la reacción y evitar la amplificación de secuencias adicionales como se observa en la Figura 20.

**Figura 20. Gel de agarosa al 2% en el cual se observa el producto de amplificación por PCR del gen de la -Cs, en presencia de una muestra control para verificar la pureza de la reacción.**



**MP:** Marcador de peso molecular de 100 pb.

**6.1.3 Identificación de las variantes alélicas de la -Cs.** Mediante la técnica molecular PCR-RFLP, en ganado holstein del Trópico Alto de Nariño, se lograron observar tres patrones de bandas para los genotipos AA, AB y BB de la -Cs. Como se indica en la Figura 21, los fragmentos observados fueron coincidentes con los reportados por Medrano y Sharrow<sup>100</sup>. Para el genotipo A/A la enzima de restricción realizó un corte en el palíndromo no metilado, obteniéndose dos fragmentos: 208 y 25 pb; para el genotipo B/B no existió un sitio de reconocimiento para la enzima, obteniéndose el fragmento completo de 233pb, mientras que para el heterocigoto A/B, se obtuvieron tres fragmentos: 233, 208 y 25 pb. (Figuras 21 y 22).

<sup>99</sup> MEDRANO, J y SHARROL, L. Op.Cit. p. 282

<sup>100</sup> Ibid., p.282

Figura 21. Identificación de los genotipos para la  $\beta$ -Cs bovina, mediante PCR-RFLP con la Enzima *MspI*.

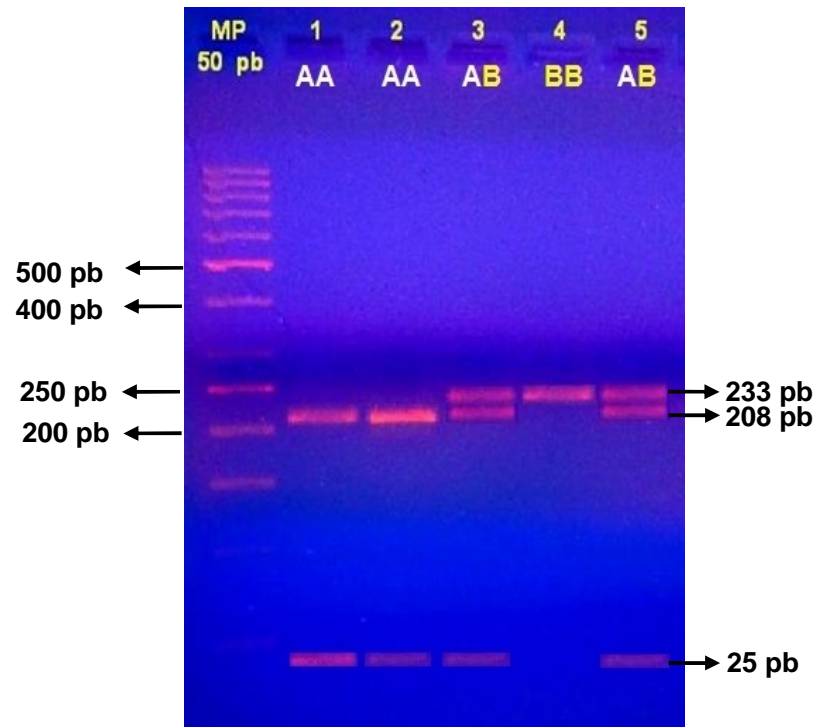


Figura 22. Esquema de Polimorfismos y Genotipos para la  $\beta$ -Cs bovina, obtenidos mediante digestión con la Enzima *MspI*.

pb	PCR	AA	AB	BB
233	■	■	■	■
208			■	
25		■	■	

Tomado de: Medrano, J. 1991

## 6.2 CÁLCULO DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS

**6.2.1 Frecuencias Alélicas Totales.** En el Cuadro 2 se indican las frecuencias alélicas del gen de la  $\alpha$ -Cs al analizar el total de los animales como una sola población. Se observó una alta frecuencia del alelo A (0.92), mientras que el alelo B tuvo una baja frecuencia (0.08). Al comparar los resultados con los reportados por Roginski<sup>101</sup>, Kaminski *et al*<sup>102</sup>, Caldwell *et al*<sup>103</sup>, Van Eenennaam y Medrano<sup>104</sup> y Formaggioni *et al*<sup>105</sup>, se observa que las frecuencias génicas son similares. Estos investigadores afirman que el alelo A es el más frecuente en la raza holstein y que el alelo B alcanza una frecuencia muy baja, aproximadamente de 0.1 y en general se encuentra en combinación con la variante A.

**Cuadro 2. Frecuencias alélicas de las variantes A y B del gen de la  $\alpha$ -Cs en hembras bovinas del trópico alto de Nariño.**

ALELO	NÚMERO DE ALELOS OBSERVADOS	FRECUENCIA ALÉLICA
A	184	0.9200
B	16	0.0800

### 6.2.2 Frecuencias Alélicas por Distrito

En el Cuadro 3 se observan los valores correspondientes a las frecuencias alélicas por distrito lechero en el Trópico Alto de Nariño. El comportamiento de las frecuencias tiende a ser similar como en la población total. En ambas poblaciones, la frecuencia del alelo A es muy alta, presentando valores superiores al 90% y por consiguiente una muy baja frecuencia del alelo B. La alta frecuencia de la variante A se puede explicar porque en el Trópico Alto de

---

<sup>101</sup> ROGINSKI, H. Op.Cit.

<sup>102</sup> KAMINSKI, S. *et al.*, Op.Cit.

<sup>103</sup> CALDWELL, J., WESELI, D. y CARTWRIGHT, T. Occurrence of Alpha-s1 and Beta-casein types in five breeds of beef cattle. [En internet] 1971. Journal of Animal Science. Vol. 32:601-604.

<sup>104</sup> VAN EENENNAAM, A. L., y MEDRANO, J. F. Milk protein polymorphisms in the California dairy cattle population. [En internet] 1991. Journal of Dairy Science. Vol.74:1730-1742.

<sup>105</sup> FORMAGIONNI, P. *et al.* Op.Cit.

Nariño se ha realizado una selección indirecta a favor de esta variante, que según varios autores está altamente relacionada con la característica volumen de producción; parámetro económico a favor del cual los ganaderos han venido seleccionando en esta región de Colombia.

**Cuadro 3. Frecuencias alélicas de las variantes A y B del gen de la -Cs en hembras bovinas del Trópico Alto de Nariño**

ALELO	DISTRITOS LECHEROS			
	PASTO (N=60)		PUPIALES (N=40)	
	No. ALELOS OBSERVADOS	FRECUENCIA ALÉLICA	No. ALELOS OBSERVADOS	FRECUENCIA ALÉLICA
A	112	0.9333	72	0.900
B	8	0.0667	8	0.100

### 6.3 CÁLCULO DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

**Cuadro 4. Frecuencias genotípicas del gen -Cs en hembras holstein del Trópico Alto de Nariño**

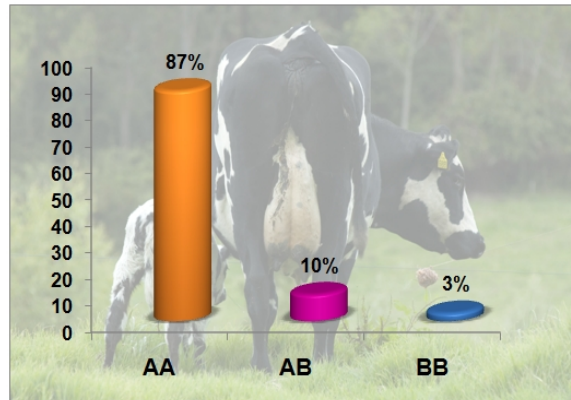
GENOTIPO	POBLACIÓN TOTAL (N=100)		DISTRITOS LECHEROS			
	No. GENOTIPOS OBSERVADOS	FREC. GENOT.	PASTO (N=60)		PUPIALES (N=40)	
			No. GENOTIPOS OBSERVADOS	FREC. GENOT.	No. GENOTIPOS OBSERVADOS	FREC. GENOT.
AA	87	0.870	52	0.916	35	0.875
AB	10	0.100	8	0.084	2	0.050
BB	3	0.030	0	0.000	3	0.075

En el Cuadro 4 y en las Figuras 23 a 25, se muestran las frecuencias genotípicas obtenidas para el gen de la -Cs en la población total y por distrito lechero en el Trópico Alto de Nariño. El genotipo más frecuente tanto en la población total como en cada uno de los distritos, fue el homocigoto AA, resultado que coincide con datos reportados por Formagionni *et al*<sup>106</sup> y Ng-Kwai-Hang y Grosclaude<sup>107</sup>.

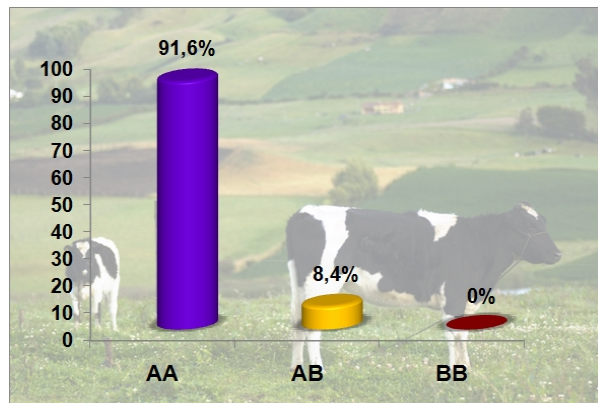
<sup>106</sup> *Ibíd*, p. 1742

<sup>107</sup> NG-KWAI-HANG, K. F. y GROSCLAUDE, F. *Op.Cit.*

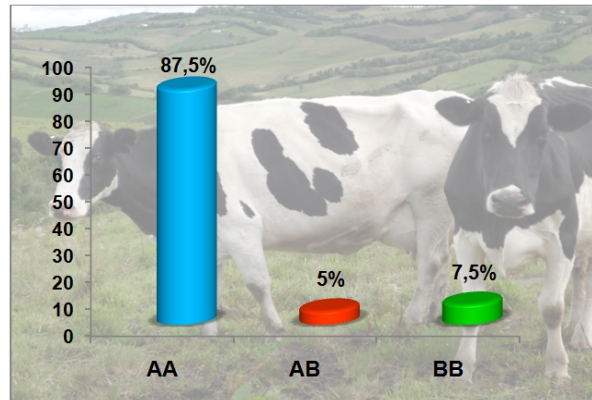
**Figura 23. Frecuencias genotípicas de la -Cs en la población total del Trópico Alto de Nariño**



**Figura 24. Frecuencias genotípicas de la -Cs en el Distrito de Pasto**



**Figura 25. Frecuencias Genotípicas de la -Cs en el distrito de Pupiales**



En el distrito Pasto no se observaron animales con el genotipo BB, lo cual indica que la selección indirecta a favor del alelo A ha sido más intensa en este distrito lechero, lo que podría causar a largo plazo la fijación del mismo.

En el distrito Pupiales, la frecuencia del homocigoto AA fue menor en comparación con el distrito Pasto (0.875) y a diferencia de éste se encontraron individuos homocigotos BB, el cual según diversos estudios, se encuentra relacionado con mayor porcentaje de proteína en la leche y por ende mejor rendimiento en la elaboración de cuajada, (Ng-Kwai Hang<sup>108</sup>).

La presencia de un mayor porcentaje de heterocigotos AB y homocigotos BB de la -Cs en este distrito, se puede explicar porque en éste ha predominado por muchos años el denominado mestizo, que es un cruce de un animal holstein puro con el “criollo” caracterizándose este último por ser un animal pequeño, con bajos volúmenes de producción de leche pero con mejor calidad composicional, características que de acuerdo Uffo *et al*<sup>109</sup> están relacionadas con la variante B de la -Cs.

#### 6.4 CÁLCULO DE LA HETEROCIGOSIDAD

En los Cuadros 5 y 6 se presentan los valores para heterocigosidad observada y esperada en la población total y por distritos lecheros en el Trópico Alto de Nariño.

Tanto en la población total como en los distritos lecheros analizados, se encontraron valores muy bajos de heterocigosidad, hasta del dos por ciento (2%), lo cual sugiere una baja variabilidad genética en estas poblaciones y por consiguiente menores posibilidades de seleccionar los genotipos superiores. Estos resultados posiblemente se ven influenciados por la selección realizada

<sup>108</sup> Ng-KWAI-HANG, K. F. Milk protein heterogeneity, fractionation and isolation. 2001. Encyclopedia of Dairy Science. Citado por ROGINSKI, H., FUQUARY, W., P. F. FOX (ed.). 2003. Academic Press London (In press).

<sup>109</sup> UFFO, O. *et al*. Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. [En internet] 2006. AGRI, 39:15-24. Disponible en la web <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a0806t/a0806t02.pdf>



indirectamente hacia uno de los alelos de la -Cs, reduciendo considerablemente la variabilidad y tendiendo a fijar uno de ellos, en este caso la variante A.

**Cuadro 5. Valores observados de (*Ho*) y esperados (*He*) de Heterocigosidad del gen de la -Cs en el Trópico Alto de Nariño.**

HETEROCIGOSIDAD	TOTAL
Heterocigosidad Observada ( <i>Ho</i> )	0.1000
Heterocigosidad Esperada ( <i>He</i> )	0.1479

**Cuadro 6. Valores observados (*Ho*) y esperados (*He*) de Heterocigosidad del gen de la -Cs en los distritos lecheros del Trópico Alto de Nariño.**

HETEROCIGOSIDAD	PASTO	PUPIALES
Heterocigosidad Observada ( <i>Ho</i> )	0,1333	0,050
Heterocigosidad Esperada ( <i>He</i> )	0,1244	0,180

### 6.5 ESTIMACIÓN DEL EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG (H-W)

Al realizar el análisis de equilibrio Hardy – Weinberg para la población total con el Test exacto de Haldane<sup>110</sup>, se observó que la población no se encuentra en equilibrio H-W para este locus ( $p < 0.05$ ) este hecho puede obedecer a ciertas fuerzas que lo han alterado, principalmente la selección direccionada a favor de un alelo, que se encuentra relacionado con características de interés económico, permitiendo incrementar su frecuencia en detrimento del otro alelo, en este caso la selección ha sido a favor del alelo A. Igualmente la deficiencia de heterocigotos ha coadyuvado a alterar el equilibrio de la población inicial. En el Cuadro 7 se presentan los valores genotípicos observados y esperados y equilibrio Hardy Weinberg para la población del Trópico Alto de Nariño.

**Cuadro 7. Equilibrio Hardy-Weinberg para el locus de la -Cs en la población del Trópico Alto de Nariño**

Genotipos	TOTAL	
	Observado	Esperado
AA	87	84,64
AB	10	14,72
BB	3	0,64

<sup>110</sup> HALDANE, J.B.S. The biochemistry of genetic. [En internet] 1954. Evolution as a process (Huxley J. et al. eds). P. 109 London: George Allen & Unwin Ltd.

<b>Prob. H-W</b>	0,0013
<sup>2</sup>	10,2818

Cuando la prueba de equilibrio H-W se realizó para cada uno de los distritos lecheros, se determinó que el distrito Pasto se encuentra en equilibrio H-W ( $p > 0.05$ ) y el distrito Pupiales no se encuentra en equilibrio ( $p < 0.05$ ) para el locus de la  $-Cs$ . Se debe tener en cuenta que estos resultados no se pueden generalizar ya que el tamaño de la muestra analizada puede inducir a un error de muestreo, dando lugar a una sobreestimación de los estadísticos.

En el Cuadro 8, se muestran los valores esperados y observados de los genotipos para la  $-Cs$  y el equilibrio Hardy-Weinberg para los distritos lecheros Pasto y Pupiales.

**Cuadro 8. Equilibrio Hardy-Weinberg para el locus de la  $-Cs$  en los distritos lecheros del Trópico Alto de Nariño**

Genotipos	Pasto		Pupiales	
	Observado	Esperado	Observado	Esperado
<b>AA</b>	52	52,2667	35	32,4
<b>AB</b>	8	7,4667	2	7.2
<b>BB</b>	0	0,2667	3	0.40
<b>Prob. H-W</b>	<b>0,5801</b>		<b>0,0000</b>	
<sup>2</sup>	<b>0,3061</b>		<b>20,8642</b>	

## 6.6 ESTIMACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA, ESTADÍSTICOS F

En la población holstein del Trópico Alto de Nariño, se calculó un valor medio de  $F_{ST}$  igual a 0.0064 que de acuerdo con la interpretación de Wright, indica una baja diferenciación genética entre las subpoblaciones, es decir que son poblaciones genéticamente muy parecidas entre sí, existiendo un moderado valor de endogamia en la población holstein del Trópico Alto de Nariño.

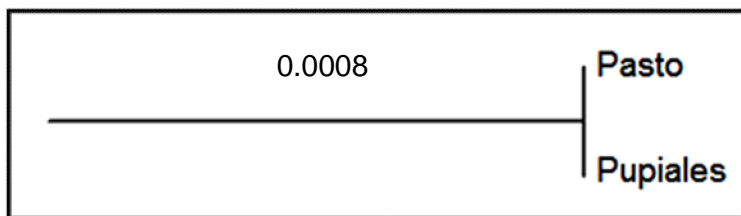
El estadístico  $F_{IS}$ , mide las diferencias entre  $H_o$  y  $H_e$ , se determinó un valor de 0.3272 el cual sugiere una baja heterocigosidad observada en las subpoblaciones y por ende la existencia de individuos genéticamente muy similares. Esto posiblemente se debe a que los apareamientos en los distritos lecheros del Trópico Alto de Nariño se estén realizando entre animales emparentados, lo que a su vez incrementa el coeficiente de consanguinidad.

Por otro lado, el  $F_{IT}$  tuvo un valor medio de 0.3229 indicando un fuerte déficit global de heterocigotos para este locus, lo que puede deberse a las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg indicadas por el valor de  $F_{IS}$  y a los apareamientos entre animales emparentados.

## 6.7 ESTIMACIÓN DE LA DISTANCIA GENÉTICA

El análisis de distancia genética para el gen de la *-Cs* (Figura 26), permitió establecer que los distritos Pasto y Pupiales se encuentran a poca distancia genética (0.0008), lo anterior posiblemente sea causa del bajo flujo genético entre ambas poblaciones, la similitud en las presiones de selección en cada distrito y al evidente uso de un limitado número de sementales. Asimismo, estos resultados, confirman los valores de frecuencias alélicas, genotípicas y de heterocigosidad anteriormente discutidas.

**Figura 26. Dendrograma de distancia genética de Nei (1972), basado en el método UPGMA entre los distritos lecheros Pasto y Pupiales**



## 6.8 RELACIÓN ENTRE LOS GENOTIPOS DE LA *-Cs* CON LAS VARIABLES PRODUCTIVAS

### 6.8.1 Asociación entre los genotipos de la *-Cs* con la producción de leche.

Como puede apreciarse en el Cuadro 9, la producción promedio de leche ajustada a 305 días y equivalente adulto para las vacas holstein evaluadas en la presente investigación, fue de 7407.96 litros, lo que representa un valor medio de 24 litros/vaca/día. Para la misma raza se encuentran diversos reportes que, en general, presentan promedios por debajo de los calculados en este estudio. Por ejemplo, para el Trópico Alto de Nariño el Programa de Mejoramiento Genético calculó una cifra de 4132.55 litros/lactancia; Echeverri *et al*<sup>111</sup>, indican un valor promedio de 4482 litros en Antioquia y según la Asociación holstein de Colombia, la producción media en el país es de 6258 litros.

Las discrepancias en las cifras para el caso específico del Trópico Alto de Nariño, se explican por el tamaño y tipo de muestras analizadas. Por ejemplo, la media de 4132.55 litros corresponde a la totalidad de vacas holstein incluidas en la evaluación genética del mencionado programa; mientras que en el presente trabajo, el promedio fue calculado únicamente con una muestra de

<sup>111</sup> ECHEVERRI, J. y Restrepo, L. Efecto meteorológico sobre la producción y calidad de la leche en dos Municipios de Antioquia-Colombia. [En internet] 2009. Revista Lasallista de Investigación. Vol.6(1):50-57.

100 vacas escogidas como donantes, donde uno de los criterios de selección fue precisamente la producción de leche por lactancia.

En cuanto a la cifra que referencia la asociación holstein, debe aclararse que ese valor se obtuvo con animales pertenecientes a dicha agremiación, que en la mayoría de los casos son de alto valor genético para este rasgo productivo.

**Cuadro 9. Estadística descriptiva de la variable producción de leche ajustada a 305 días y equivalente adulto, en hembras holstein del Trópico Alto de Nariño**

Variable	N	Lactancias	Media	Desviación estándar	Mín.	Máy.
Leche ajustada a 305 días y EA	100	358	7407.96	1929.69	3640	11891

La media de producción de leche ajustada a 305 días y equivalente adulto para cada genotipo de la -Cs, se presenta en la Figura 27. Las diferencias entre dichos valores, fueron comparadas estadísticamente mediante el análisis de contrastes máximo verosímiles (Cuadro 10), lo que permitió concluir la existencia de diferencias altamente significativas por efecto del genotipo ( $P < 0.05$ ) siendo los genotipos AA y AB los que están asociados a mayores producciones.

Estos resultados, son coincidentes con los descritos por varios investigadores en la misma raza, quienes afirman que el alelo A está estrechamente relacionado con un mayor volumen de producción de leche (Ng Kwai-Hang<sup>112</sup>; Çardak<sup>113</sup>; Bovenhuis<sup>114</sup>; IGENITY®<sup>115</sup>; Van Eenennaam y Medrano<sup>116</sup>).

**Figura 27. Producción media de leche ajustada a 305 días y EA para los genotipos de la -Cs**

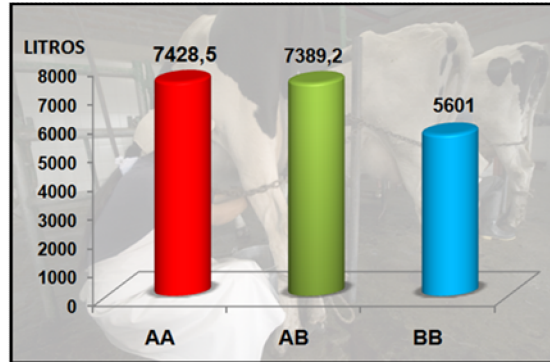
<sup>112</sup> NG-KWAI-HANG, K. F. Genetic polymorphism of milk proteins: Relationships with production traits, milk composition and technological properties. [En internet] 1998. Canadian Journal of Animal Science, 78:131–147.

<sup>113</sup> ÇARDAK, A.D. Effects of genetic variants in milk protein on yield and composition of milk from Holstein-Friesian and Simmentaler cows. [En internet] 2005. Journal of Animal Science, 35(1):41-47.

<sup>114</sup> BOVENHUIS, H *et al.* Op.Cit.

<sup>115</sup> IGENITY®. Bovinos de Leche, Interpretando resultados. 2008. Merial Limited. Duluth, GA. All rights reserved. Disponible en: [http://www.igenity.com.ar/interpretando\\_resultados/docs/1Interpretandolecheligenity.pdf](http://www.igenity.com.ar/interpretando_resultados/docs/1Interpretandolecheligenity.pdf)

<sup>116</sup> VAN ENEENAM, A. Y MEDRANO, J. Op.Cit.



**Cuadro 10. Contrastes entre los genotipos de la -Cs para la producción de leche ajustada a 305 días y EA**

Genotipo	Estimado (ds)
AA vs AB	-0.1260 SE= 0.9459 <sup>NS</sup>
AB vs BB	0.1891 SE= 0.2920 <sup>**</sup>
AA vs BB	0.1764 SE= 0.2793 <sup>**</sup>

**\*\***( $p < 0.01$ )= Altamente significativo; **\***( $p < 0.05$ )= Significativo; **NS** ( $p > 0.05$ )= No significativo

De lo anteriormente expuesto, la conclusión más importante con fines aplicados, es la posibilidad de seleccionar individuos portadores del alelo A, en los programas de mejoramiento genético que tengan como objetivo incrementar la cantidad de leche por lactancia, especialmente por el hecho de haber encontrado resultados similares en nuestra región, respecto a otras con condiciones ambientales diferentes.

### 6.8.2 Asociación entre los genotipos de la -Cs con la Producción de Proteína y Grasa medida en Kg por lactancia.

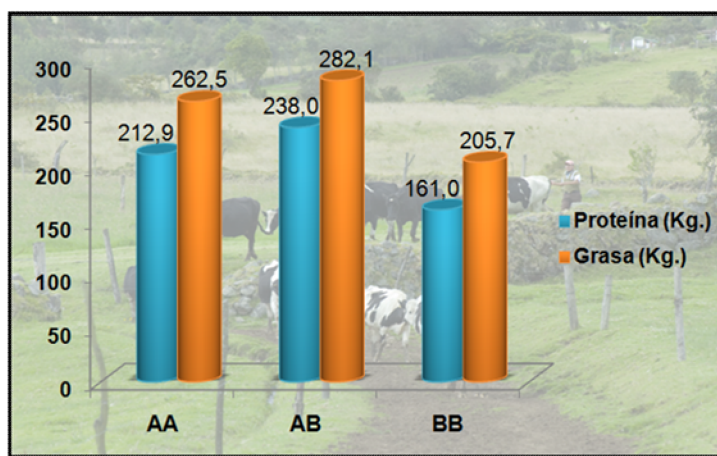
En el Cuadro 11, pueden apreciarse los promedios de producción en Kg de proteína y grasa por lactancia y en la Figura 28 la producción para cada genotipo. Al realizar el análisis de contrastes REML se observó que estas variables productivas no fueron afectadas significativamente por los genotipos de la -Cs ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 12).

**Cuadro 11. Estadística descriptiva de las variables Kilogramos de Proteína y Grasa por lactancia en hembras holstein del Trópico Alto de Nariño**

Variable	N	Media	Desv. Estándar	Mínimo	Máximo
Kilogramos Proteína	100	214.774	58.4015	105.0	350.0
Kilogramos	100	263.478	78.8738	112.0	535.0

Grasa					
-------	--	--	--	--	--

Figura 28. Producción media en Kilogramos de Proteína y Grasa por Genotipo de la -Cs.



Cuadro 12. Contrastes entre los genotipos de la -Cs para las variables producción en kilogramos de grasa y proteína.

Genotipo	Proteína Estimado (ds)	Grasa Estimado (ds)
AA vs AB	-0.2543 <sup>NS</sup> SE=0.9934	-0.1987 <sup>NS</sup> SE=0.8635
AB vs BB	0.7897 <sup>NS</sup> SE=0.2357	0.7721 <sup>NS</sup> SE=0.2003
AA vs BB	0.5354 <sup>NS</sup> SE=0.2189	0.5734 <sup>NS</sup> SE=0.1850

\*\*( $p < 0.01$ )= Altamente significativo; \*( $p < 0.05$ )= Significativo; NS ( $p > 0.05$ )= No significativo

Estos resultados son similares a los reportados por Van Eenennam y Medrano<sup>117</sup>, quienes no encontraron la existencia de diferencias significativas entre los genotipos de la -Cs con la producción de grasa y proteína en Kg por

<sup>117</sup> Ibíd. p. 1741

lactancia. No obstante, Ng-Kwai-Hang *et al*<sup>118</sup>, aseguran que los genotipos de esta fracción proteica tienen efecto sobre la producción de leche, proteína y grasa, en concordancia Bovenhuis *et al*<sup>119</sup> afirman que el genotipo BB de la -Cs, alcanza la menor producción de proteína y grasa en Kg por lactancia.

Otros estudios como los de Ng-Kwai-Hang<sup>120</sup>, Heck *et al*<sup>121</sup>, Grosclaude<sup>122</sup> y Hallén<sup>123</sup>, probaron que el alelo B de la -Cs y los genotipos que lo contienen, producen menos leche pero con mayores porcentajes de proteína y grasa.

Para explicar las variaciones encontradas en referencia a estos rasgos es necesario indicar varias circunstancias, como la diferencia en el tamaño de muestra y un mayor grado de influencia de los efectos ambientales, especialmente el ambiente nutricional. Para el caso del Trópico Alto de Nariño es necesario revisar los aspectos concernientes al manejo de los forrajes y la suplementación alimenticia con balanceados, puesto que para mejorar las características ligadas a la calidad composicional de la leche es necesario integrar el manejo genético y alimenticio.

## 6.9 RELACIÓN ENTRE LOS GENOTIPOS DE LA -Cs CON EL RENDIMIENTO INDUSTRIAL EN CUAJADA.

### 6.9.1 Estadística descriptiva

En los cuadros 13 y 14 se presentan los resultados de los litros requeridos para elaborar un Kg de cuajada (l/Kg), el porcentaje de grasa y el porcentaje de proteína, por genotipo y por tercio de lactancia, respectivamente.

**Cuadro 13. Estadística descriptiva de la variable rendimiento en cuajada y los porcentajes de grasa y proteína por genotipo de la -Cs.**

Genotipo	N	Variable	Media	Desviación estándar	Máxima	Mínima
AA	15	l/Kg	6.651	1.109	8.982	5.425

<sup>118</sup> NG-KWAI-HANG, K. F. *et al.* Association of genetic variants of casein and milk serum proteins within milk, fat and protein production by dairy cattle. [En internet] 1984. Journal of Dairy Science, 67:835-840.

<sup>119</sup>BOVENHUIS, H. Op.Cit.

<sup>120</sup> NG-KWAI-HANG, K. F. Genetic polymorphism of milk proteins: Relationships with production traits, milk composition and technological properties. [En internet] 1998. Canadian Journal of Animal Science, 78:131-147.

<sup>121</sup> HECK, J. *et al.* Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. [En internet] 2009. Journal of Dairy Science, 92:1192-1202.

<sup>122</sup> GROSCLAUDE, F. Le polymorphisme genetique des principales lactoproteines bovines. [En internet] 1988. Institute National Recherche Agronomique Production Animal, 1:5.

<sup>123</sup> HALLÉN, E. Op.Cit.

		%Proteína	3.003	0.162	3.210	2.720
		%Grasa	3.632	0.597	4.450	2.810
<b>AB</b>	15	l/Kg	5.727	0.767	7.317	4.324
		%Proteína	3.222	0.206	3.540	2.870
		%Grasa	3.585	0.449	4.180	2.410
<b>BB</b>	15	l/Kg	5.500	0.963	6.849	4.237
		%Proteína	3.074	0.036	3.150	3.020
		%Grasa	3.541	0.400	3.090	4.600

**Cuadro 14. Estadística descriptiva de la variable rendimiento en cuajada y porcentajes de grasa y proteína por tercio de lactancia.**

Tercio	N	Variable	Media	Desviación estándar	Máxima	Mínima
<b>1</b>	20	l/Kg	5.942	0.621	7.109	5.425
		%Proteína	3.117	0.148	3.210	2.770
		%Grasa	3.987	0.596	4.455	2.810
<b>2</b>	10	l/Kg	6.142	0.568	7.317	5.263
		%Proteína	3.093	0.133	3.340	2.870
		%Grasa	3.579	0.434	4.600	2.410
<b>3</b>	15	l/Kg	5.783	1.495	8.982	4.237
		%Proteína	3.085	0.223	3.540	2.720
		%Grasa	3.445	0.414	4.180	2.910

Los valores promedio para el rendimiento en cuajada por genotipo y tercio de lactancia calculados en esta investigación, no pueden compararse con otros referentes nacionales e internacionales ya que se carece de datos que permitan establecer la existencia de variación en los rangos aceptados por la industria láctea. No obstante, al comparar el rendimiento calculado en este estudio con el promedio nacional (7.5 a 8.5 l/Kg), donde no se discrimina por genotipo y tercio de lactancia, se observa que los valores de rendimiento se encuentran por debajo de los límites normalmente aceptados por la industria láctea (Betancourt<sup>124</sup>).

Los valores promedios para los porcentajes de proteína y grasa, calculados en esta investigación, son semejantes a los reportados por Solarte *et al*<sup>125</sup> (3.02% de proteína y 3.60 % de grasa) para la raza holstein en el Trópico Alto de Nariño, hecho que reafirma la necesidad de enfatizar el proceso selectivo para la región, orientado fundamentalmente al incremento porcentual de estas fracciones sólidas de la leche. En la búsqueda de ese propósito, el Programa de Mejoramiento Genético con la ejecución de diversos proyectos ha logrado establecer un esquema de selección, donde estas características, junto con

<sup>124</sup> BETANCOURT, A. Alimentos 2, Guía para la elaboración de productos lácteos, vegetales y carnes. 1999. Ministerio de Educación Nacional, República de Colombia. p.p. 71.

<sup>125</sup> SOLARTE, C. Caracterización y Evaluación Genética de la Población Bovina Lechera del Trópico Alto de Nariño, para la conformación de Núcleos de Selección. Universidad de Nariño, pp. 89, 2009.



rasgos anatómicos funcionales podrían producir un tipo de animal más apto para la zona, siempre y cuando se cuente con el apoyo para continuar con la evaluación fenotípica y molecular, debido a que los impactos del mejoramiento en especies de intervalo generacional prolongado como los bovinos, se evalúan en el mediano y largo plazo.

## 6.9.2 Análisis de Varianza

### 6.9.2.1 Análisis de varianza para la variable rendimiento en cuajada.

Al efectuar el análisis de varianza, incluyendo todos los efectos inicialmente considerados en el modelo, los resultados indicaron que la variable rendimiento en cuajada se ve influenciada por el genotipo y el tercio de lactancia ( $p < 0.01$ ) pero no por la covariable porcentaje de grasa ( $p > 0.05$ ). En el Cuadro 15 se presentan los resultados de dichos análisis y su significancia.

**Cuadro 15. Análisis de varianza para la variable rendimiento en cuajada**

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	Fc	Pr > F
Modelo	6	32.496	5.416	12.06	<.0001**
Error	38	17.071	0.449		
Total	44	49.568			
Fuente	GL	Tipo III SS	Cuadrado de la Media	Fc	Pr > F
Genotipo	2	29.319	14.659	32.63	<.0001**
Tercio	2	17.433	8.71	19.40	<.0001**
Grasa	1	0.1232	0.1232	0.27	0.6034 <sup>NS</sup>

\*\*( $p < 0.01$ )= Altamente significativo; \*( $p < 0.05$ )= Significativo; NS ( $p > 0.05$ )= No significativo

Las medias mínimas cuadráticas para el rendimiento en cuajada para cada genotipo pueden apreciarse en el Cuadro 16. El análisis realizado mediante la prueba de Tukey-Kramer y los contrastes ortogonales (Cuadro 17), permitió concluir que la leche de animales con genotipo BB y AB tiene el mejor rendimiento en cuajada respecto al homocigoto AA. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos AB y BB. Lo anterior indica que bajo las condiciones del Trópico Alto de Nariño, las mejores producciones de cuajada se obtienen con leche proveniente de vacas holstein que portan los genotipos BB y AB de la -Cs, los cuales requirieron en promedio 5.5 y 5.7 litros para producir un Kg de cuajada, respectivamente, en comparación con el genotipo AA que requirió 6.6 litros de leche (Figura 29).

**Cuadro 16. Medias mínimas cuadráticas para el rendimiento en cuajada, discriminadas por genotipo.**

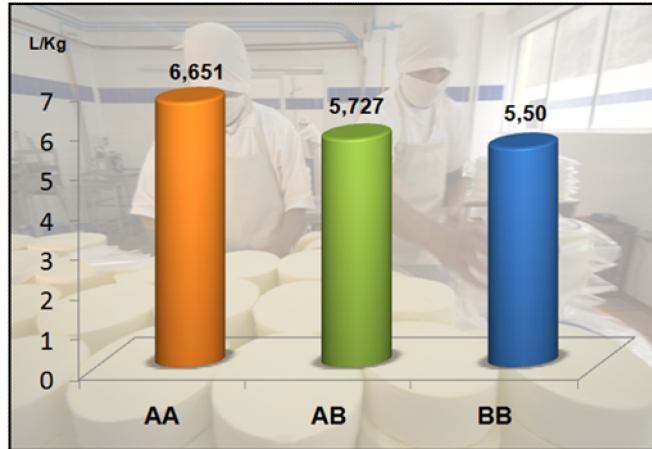
Genotipo	Rendimiento (l/Kg)
AA	7.476
AB	5.190
BB	4.078

**Cuadro 17. Contrastes entre los genotipos de la  $\beta$ -Cs para la variable rendimiento en cuajada.**

Contraste	GL	Contraste SS	Cuadrado de la media	P > F
AA vs AB	1	11.596	11.596	<.0001**
AA vs BB	1	8.372	8.372	0.0001*
AB vs BB	1	0.529	0.529	0.2847 <sup>NS</sup>

\*\*( $p < 0.01$ )= Altamente significativo; \*( $p < 0.05$ )= Significativo; NS ( $p > 0.05$ )= No significativo

**Figura 29. Rendimiento en cuajada expresado en litros por kilogramo, para los genotipos de la  $\beta$ -Cs en hembras holstein del Trópico Alto de Nariño.**



Estos resultados no pueden compararse con referentes bibliográficos, debido a que no existen reportes que relacionen el rendimiento en cuajada, expresado en litros por kilogramo con los genotipos de la  $\beta$ -Cs. Sin embargo, diversos estudios afirman que las vacas que portan los genotipos BB y AB producen leche con mejores propiedades para la elaboración de cuajada (Marziali y Ng-Kwai-Hang<sup>126</sup>; Graham<sup>127</sup> y Barroso<sup>128</sup>) por efecto de la presencia de micelas

<sup>126</sup> MARZIALI, A. y NG-KWAI-HANG, K. F. Op.Cit.

más estables y de menor tamaño en la leche, un mayor contenido de proteína, menor tiempo de coagulación y mayor firmeza de la cuajada (Jakob<sup>129</sup> y Mayer *et al*<sup>130</sup>), lo que se traduce en mejores rendimientos industriales.

Autores como Formaggioni *et al*<sup>131</sup> y Cervantes *et al*<sup>132</sup>, confirman los anteriores resultados, evidenciando que las leches caracterizadas por el alelo B de las fracciones proteicas, -Cs, K-Cs y -LG, presentan mejores propiedades de coagulación que aquellas leches determinadas por el alelo A.

Para el caso del Trópico alto de Nariño, Zambrano *et al* (2010) en un estudio de rendimiento en cuajada para la fracción proteica K-Cs, reportan valores de 5.4 l/Kg para el genotipo BB y 6.7 l/Kg para el genotipo AA, concluyendo que el homocigoto BB de la K-Cs, es el más favorable para la producción de cuajada en vacas de la raza holstein, resultados similares a los encontrados en este estudio.

En el Cuadro 18 se observan las medias mínimas cuadráticas para la variable rendimiento en cuajada por tercio de lactancia. El efecto del tercio de lactancia sobre el rendimiento se analizó mediante la prueba de Tukey-Kramer y contrastes ortogonales (Cuadro 19). Los resultados indicaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los tercios. Sin embargo, el primer tercio resultó el más favorable para esta variable ya que en promedio requirió menos litros de leche para elaborar un Kg de cuajada. Estos resultados son contradictorios con los reportados por Zambrano *et al*<sup>133</sup> y Aux y Vásquez<sup>134</sup>, quienes no encontraron diferencias significativas para el efecto del tercio de

---

<sup>127</sup> GRAHAM, E. R., MCLEAN, B. y ZVIEDRANS, P. The effect of milk protein genotypes on the cheesemaking properties of milk and on the yield of cheese. 1984. 4th Conference Australian Association Animal Breeding and Genetics, Adelaide, 4-6 June, pp.136-137.

<sup>128</sup> BARROSO, A., DUNNER, S., y CAÑÓN, J. A multiplex PCR-SSCP test to genotype bovine beta-casein alleles A1, A2, A3, B and C. [En internet] 1999. *Animal Genetics*, 30:322-323.

<sup>129</sup> JAKOB, E. Genetic polymorphism of milk proteins. [En internet] 1994. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Bulletin 298. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search/display>

<sup>130</sup> MAYER, H.K., ORTNER, M., TSCHAGER, E. y GINZINGER, W. Composite milk protein phenotypes in relation to composition and cheesemaking properties of milk. [En internet] 1997. *International Dairy Journal*, 7(5):305-310.

<sup>131</sup> FORMAGIONNI, P. *et al*. Op.Cit.

<sup>132</sup> CERVANTES, P. *et al*. Polimorfismo genético en el locus de la kappa-caseína, en vacas de diferentes razas y cruces en el trópico mexicano. [En internet] 2007. *Revista Salud Animal*, 29 (2): 78-84

<sup>133</sup> ZAMBRANO, G., ERASO, Y., SOLARTE, C. y ROSERO, C. Kappa casein genotypes and curd yield in holstein cows. [En Internet] 2010. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 23(4):422-428.

<sup>134</sup> AUX, Y. y VÁSQUEZ, A. Asociación entre genotipos de Kappa-Caseína, Calidad Composicional de la Leche y Rendimiento en Cuajada de la Raza Normando en el Trópico Alto de Nariño. San Juan de Pasto. P.p. 101. Tesis (Pregrado Zootecnia). 2010 Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal.

lactancia sobre el rendimiento en cuajada, en la fracción Kappa caseína en ganado holstein y normando en el Trópico Alto de Nariño, respectivamente.

**Cuadro 18. Medias mínimas cuadráticas para el rendimiento en cuajada, discriminadas por tercio de lactancia**

Tercio	Rendimiento (l/Kg)
1	4.165
2	7.176
3	5.403

**Cuadro 19. Contrastes entre los tercios de lactancia para la variable rendimiento en cuajada**

Contraste	GL	Contraste SS	Cuadrado de la media	P > F
1 vs 3	1	4.534	4.534	0.0003*
1 vs 2	1	16.820	16.820	<0.0001**
3 vs 2	1	10.092	10.092	<0.0001*

\*\*( $p < 0.01$ )= Altamente significativo; \*( $p < 0.05$ )= Significativo; NS ( $p > 0.05$ )= No significativo

### 6.9.2.2 Análisis de varianza para la variable porcentaje de proteína.

Para la variable porcentaje de proteína tanto el genotipo como el tercio de lactancia, resultaron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en el análisis de varianza (Cuadro 20).

**Cuadro 20. Análisis de varianza para la variable porcentaje de proteína**

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	Fc	Pr > F
Modelo	5	0.7654	0.1530	10.09	<.0001**
Error	39	0.5916	0.0151		
Total	44	1.3570			
Fuente	GL	Tipo I SS	Cuadrado de la Media	Fc	Pr > F
Genotipo	2	0.3735	0.1867	12.31	<.0001**
Tercio	2	0.2021	0.1010	6.66	0.0032*

\*\*( $p < 0.01$ )= Altamente significativo; \*( $p < 0.05$ )= Significativo; NS ( $p > 0.05$ )= No significativo

En el Cuadro 21 se indican las medias mínimo cuadráticas para la variable porcentaje de proteína discriminada por genotipo. La prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer y los contrastes ortogonales (Cuadro 22), señalaron la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos AA y AB ( $p < 0.05$ ), siendo el heterocigoto AB el que presentó el mayor porcentaje de proteína con un 3.22%, mientras que entre los genotipos AB y BB no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

**Cuadro 21. Medias mínimo cuadráticas para la variable porcentaje de proteína, discriminadas por genotipo.**

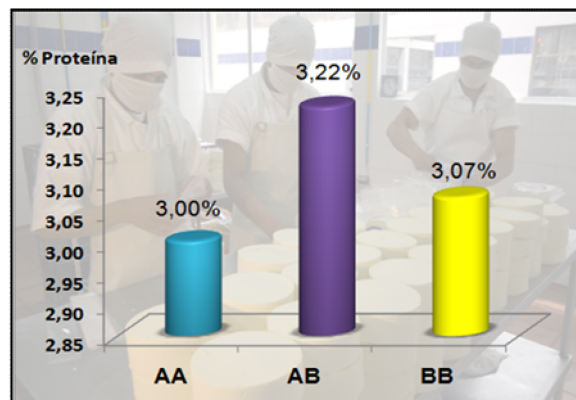
Genotipo	% Proteína
AA	3.020
AB	3.545
BB	2.814

**Cuadro 22. Contrastes entre los genotipos de la -Cs para la variable porcentaje de proteína.**

Contraste	GL	Contraste SS	Cuadrado de la media	P > F
AA vs AB	1	0.735	0.735	<.0001**
AA vs BB	1	0.299	0.299	<.0001**
AB vs BB	1	0.036	0.036	0.1284 <sup>NS</sup>

\*\*( $p < 0.01$ )= Altamente significativo; \*( $p < 0.05$ )= Significativo; NS ( $p > 0.05$ )= No significativo

**Figura 31. Porcentaje medio de proteína por genotipo de la  $\beta$ -Cs**



Estos resultados son coincidentes con los reportados por Ng-Kwai-Hang *et al*<sup>135</sup>, Aleandri *et al*<sup>136</sup> y Bovenhuis *et al*<sup>137</sup> quienes reportan que en el ganado holstein, el genotipo AB de la *-Cs* se encuentra relacionado con mayor porcentaje de proteína y grasa en la leche, en contraste con el genotipo AA. No obstante, otros autores como Martínez<sup>138</sup>, no encontraron diferencias significativas para el efecto del genotipo sobre el porcentaje de proteína en la leche.

En el Cuadro 23 se encuentran las medias mínimas cuadráticas para el porcentaje de proteína por tercio de lactancia. La prueba de Tukey-Kramer y los contrastes ortogonales (Cuadro 24), indicaron diferencias estadísticamente significativas entre el tercio 1 y 3, ya que el primer tercio en promedio presentó un porcentaje de 3.12% de proteína en comparación con el último tercio, el cual presentó el más bajo porcentaje de este sólido en la leche. Entre los tercios 2 y 3 no se observaron diferencias significativas.

**Cuadro 23. Medias mínimo cuadráticas para la variable porcentaje de proteína, discriminadas por tercio de lactancia.**

Tercio	% Proteína
1	3.229
2	3.090
3	3.061

**Cuadro 24. Contrastes entre tercios de lactancia para la variable porcentaje de proteína.**

Contraste	GL	Contraste SS	Cuadrado de la media	P > F
1 vs 2	1	0.0360	0.0360	0.1314 <sup>NS</sup>
1 vs 3	1	0.1051	0.1051	0.0121 <sup>**</sup>
2 vs 3	1	0.0031	0.0031	0.6525 <sup>NS</sup>

**\*\***( $p < 0.01$ )= Altamente significativo; **\***( $p < 0.05$ )= Significativo; **NS** ( $p > 0.05$ )= No significativo

<sup>135</sup> NG-KWAI-HANG, K. F. Op.Cit.

<sup>136</sup> ALEANDRI, R. *et al.* The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. [En internet] 1990. Journal of Dairy Science, 73: 241.

<sup>137</sup> BOVENHUIS, H. *et al.* Op.Cit.

<sup>138</sup> MARTINEZ, A. Op.Cit.

Estos resultados son similares a los reportados por Robinson<sup>139</sup> y Arunvipas *et al*<sup>140</sup>, quienes afirman que el contenido de proteína es mayor en las primeras semanas de lactancia con un porcentaje alrededor del 3,6%, sin embargo llegando al final del primer tercio, el porcentaje de proteína tiende a disminuir al incrementarse el volumen de producción de leche. Diversos estudios reportan que la etapa de lactancia es un factor que influye en los niveles del contenido proteico en la leche, no obstante los resultados no son consistentes, lo cual puede atribuirse a los efectos del ambiente como la alimentación, estado fisiológico y sanidad de la ubre (Richarth *et al*<sup>141</sup>).

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7.1 CONCLUSIONES

- La técnica de extracción de ADN, empleada en esta investigación, resultó adecuada para el análisis de polimorfismos de las proteínas lácteas, puesto que permitió obtener ADN de alta calidad para llevar a cabo los análisis complementarios requeridos en la presente investigación y para preservar el material genético, el cual podrá ser utilizado en trabajos posteriores.
- La técnica molecular PCR-RFLP, permitió detectar con facilidad las variantes alélicas A y B del gen de la *-Cs*.
- El alelo A del gen de la *-Cs* fue el de mayor frecuencia en esta zona de Colombia, considerando los dos distritos como una sola población y cada uno de ellos en forma independiente. Este hecho podría ser el reflejo de la selección directa por producción de leche en la raza holstein y de modo indirecto a favor de dicho alelo, por su relación con el aumento en el volumen de leche.
- Bajo las condiciones del Trópico alto de Nariño, en la raza holstein, existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a producción de leche por efecto del genotipo para la *-Cs*, donde el homocigoto AA presentó la mejor producción, resultados que coinciden con los reportados por varios investigadores en diversos países del mundo y en la misma raza.

---

<sup>139</sup> ROBINSON, H. Manipulating Milk Protein Percentage and Production in Lactating Dairy Cows. [En internet] 1999 cooperative extension university of california, davis

<sup>140</sup> ARUNVIPAS, P., DOHOO, I., VANLEEUWEN, J. y KEEFE, G. The effect of non-nutritional factors on milk urea nitrogen levels in dairy cows in Prince Edward Island, Canada. [En internet] 2003. Preventive Veterinary Medicine, 59: 83-93.

<sup>141</sup> RICHARDT, W., JEROCH, H. y SPILKE, J. The impact of nutrition and non-nutrition factors on milk urea concentration. [En internet] 2001 Tierz.-Archive. Animal. Breed, 44:251-262.

- El mayor rendimiento en cuajada, se obtuvo con leche procedente de animales con genotipos AB y BB para la  $\beta$ -Cs, puesto que en estos casos se requirió menor cantidad de leche para producir un kilogramo de cuajada.
- Los mayores contenidos de proteína se encontraron en la leche de animales con genotipo AB para la  $\beta$ -Cs.

## **7.2 RECOMENDACIONES**

- Considerar como un factor importante en los programas de mejoramiento genético para el trópico alto de Nariño el incremento de las frecuencias génicas del alelo B para la  $\beta$ -Cs, por su relación con la calidad composicional de la leche y el rendimiento industrial.
- Además de la recomendación antes indicada, Implementar estrategias integrales, para el mejoramiento de la calidad composicional de la leche en el Trópico Alto de Nariño, donde se consideren también los aspectos nutricionales.
- Ampliar el estudio genético de la población bovina del Trópico Alto de Nariño, mediante la utilización de otros marcadores moleculares, con el propósito de conocer más profundamente la diversidad y estructura de las razas.
- Utilizar las técnicas genómicas con fines de selección, para identificar los animales que posean las mejores combinaciones genéticas para los rasgos productivos, reproductivos y de salud, en el ambiente del Trópico Alto de Nariño.



## BIBLIOGRAFÍA

ALAIS, C. 1984. Science du Lait, Principes des techniques laitières. 4ta edición. Paris. Editions Sepaic. pp. 814

ALEANDRI, R., BUTTAZZONI, L., SCHNEIDER, J., CAROLI, A. y DAVOLI, R. 1990. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. Journal of Dairy Science, 73: 241.

ALIPANAH, M. y KALASHMIKOVA. 2007. Influence of kappa casein Genetic variant on cheese making ability. Journal of Animal and Veterinary Advance, 6(7):855-857.

ARUNVIPAS, P., DOHOO, I., VANLEEUEWEN, J. y KEEFE, G. 2003. The effect of non-nutritional factors on milk urea nitrogen levels in dairy cows in Prince Edward Island, Canada. Preventive Veterinary Medicine, 59: 83-93.

ASCHAFFENBURG, R. 1999. Inherited casein variants in cow's milk. Nature, 192:431-443. Citado por: FORMAGGIONI, P., SUMMER, A., MALACARNE, P. y MARIANI, P. 2001. Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in *Bos genus*. Istituto di Zootecnica, Alimentazione e Nutrizione, Università degli Studi, via del Taglio 8, 43100 Parma.

ASOHOLSTEIN. Asociación Holstein de Colombia. 2010. Disponible en: [www.asoholsteincolombia.com.co](http://www.asoholsteincolombia.com.co)

ASOHOLSTEIN. Asociación Holstein de Colombia. Resumen nacional de desempeño productivo y reproductivo, Junio de 2011. Disponible en: <http://www.holstein.com.co/index.php?doc=raza>.

AUX, Y. y VÁSQUEZ, A. 2010 Asociación entre genotipos de Kappa-Caseína, Calidad Composicional de la Leche y Rendimiento en Cuajada de la Raza Normando en el Trópico Alto de Nariño. San Juan de Pasto. Pp. 101. Tesis (Pregrado Zootecnia). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal.

AZEVEDO, A. C.S. NASCIMENTO, C., STEINBERG, R., CARVALHO, M., PEIXOTO, M., TEODORO, R., VERNEQUE, R., GUIMARÃES, S. Y MACHADOL, A. 2008. Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genetics and Molecular Research*, 7(3):623-630.

BARROSO, A., DUNNER, S., y CANON, J. 1999. A multiplex PCR-SSCP test to genotype bovine beta-casein alleles A1, A2, A3, B and C. *Animal Genetics*, 30:322-323.

BETANCOURT, A. 1999. Alimentos 2, Guía para la elaboración de productos lácteos, vegetales y carnes. Ministerio de Educación Nacional, República de Colombia. p.p. 71.

BOLDMAN, K., KRIESE, L., VAN VLECK, L. VAN TASSELL, C. y KACHMAN, S. 1995. A manual for use of MTDFREML. A set of programs to obtain estimates of variances and covariances, USDA-ARS, Washington, DC.

BOVENHUIS, H., VAN ARENDONK, J., y KORVER, S. 1992. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *Journal of Dairy Science*, 75: 2549–2559.

CALDWELL, J., WESELI, D. y CARTWRIGHT, T. 1971. Occurrence of Alpha-s1 and Beta-casein types in five breeds of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 32:601-604.

ÇARDAK, A.D. 2005. Effects of genetic variants in milk protein on yield and composition of milk from Holstein-Friesian and Simmentaler cows. *Journal of Animal Science*, 35(1):41-47.

CARLES, C., HUET, J.-C., RIBADEAU-DUMAS, B. 1988. A new strategy for primary structure determination of proteins: application to bovine  $\beta$ -casein. *FEBS Lett.* 229, 265-272.

CARRÉ, D., POLY et B. VISSAC. 1958. Étude des methods de détermination des performances laitières. *Annal Zootechniqué*, III:243-280.

CERÓN, M., TONHATI, H., COSTA, C., SOLARTE, C., y BENAVIDES, O. 2003. Factores de ajuste para producción de leche en bovinos Holstein Colombiano. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 16(1).

CERVANTES, P., LUNA, M., HERNANDEZ PEREZ, G., PONCE, P., y UFFO, O. 2007. Polimorfismo genético en el locus de la kappa-caseína, en vacas de diferentes razas y cruces en el trópico mexicano. *Revista Salud Animal*, 29 (2): 78-84

CHESSA, D. *et al.* 2007. Analysis of 22 Mutations within milk protein genes in Italian Friesian Cattle. *Italian Journal Animal Science*, 6(1).

CHOUDHARY, D., JANSSON, I., SARFARAZI, M. y SCHENKMAN, J. 2008 Characterization of the biochemical and structural phenotypes of four CYP1B1 mutations observed in individuals with primary congenital glaucoma. *Pharmacogenetics and Genomics Journal*, 18:665–676.

DUNNING, A.M *et al.* 2004. Errors in the Polymerase Chain Reaction. Citado por RODRÍGUEZ, I.P y BARRERA, H.A. 2004. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3).

ECHEVERRI, J. y Restrepo, L. 2009. Efecto meteorológico sobre la producción y calidad de la leche en dos Municipios de Antioquia-Colombia. *Revista Lasallista de Investigación*, 6(1):50-57.

EINSPANIER, R., KLOTZ, A., BUCHBERGER, J. y KRAUSE, I. 2001. Fast characterization of selected  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin variants using specific single nucleotide polymorphism derived from milk cell DNA: a novel real-time PCR approach. *European Food Research Technology*, 213: 356-360.

ERASO, M., y ZAMBRANO, G. 2009. Relaciones entre los genotipos de la Kappa caseína, el contenido proteínico total de la leche y el rendimiento en cuajada de los bovinos Holstein en el trópico alto de Nariño. San Juan de Pasto. Pp. 86. Tesis (Pregrado Zootecnia). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G. y SCHNEIDER, S Arlequín, Ver. 30.1. An Integrated Software Package for Population Genetics. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), 2006. Institute of Zoology, University of Berne, Switzerland.

EVERETT, R.W y CARTER, H.W. 1968. Accuracy of test interval method of calculating dairy herd improvement association records. *Journal of Dairy Science*, 51:1936-1941.

FARRELL, H., JIMENEZ FLOREZ, R., BLECK, G. T. BROWN, E. M., BUTLER, J. E., CREAMER, L. K., HICKS, C. L., HOLLAR, C. M., NG-KWAI-HANG, K. F. y SWAISWOOD, H. E. 2004 Nomenclature of the proteins of cows' milk-Sixth Revision, American Dairy Science Association. *Journal of Dairy Science*, 87:1641-1674.

FENNEMA, O. 2000. Química de los Alimentos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza. España. pp. 1258.

FERRANDINI, E. et al. 2006. Estructura de la micela de caseína. Anatomía Veterinaria, 22:5-18. Disponible en: <http://revistas.um.es/analesvet/article/viewFile/771/799>

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia: EMBRAPA-CENARGEN. pp. 220.

FORMAGGIONI, P., SUMMER, A., MALACARNE, P. y MARIANI, P. Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in *Bos genus*. Istituto di Zootecnica, Alimentazione e Nutrizione, Università degli Studi, Parma 1999. Disponible en <http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/formaggioni/formaggioni.htm>

GARCÍA, D. 2008. Diversidad genética y establecimiento de prioridades en esquemas de conservación: ejemplo de aplicación en la Raza de Lidia. Madrid, pp. 233. Tesis (Doctorado en Ciencias). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Producción Animal.

GRAHAM, E. R., MCLEAN, B. y ZVIEDRANS, P. 1984. The effect of milk protein genotypes on the cheesemaking properties of milk and on the yield of cheese. 4th Conference Australian Association Animal Breeding and Genetics, Adelaide, 4-6 June, pp.136-137.

GROSCLAUDE, F. 1988. Le polymorphisme genetique des principales lactoproteines bovines. Institute National Recherche Agronomique Production Animal, 1:5.

HALDANE, J.B.S. 1954. The biochemistry of genetic. Evolution as a process (Huxley J. et al. eds). P. 109 London: George Allen & Unwin Ltd.

HALLE, E. et al. 2008. Effect of  $\kappa$ -casein, K-casein and  $\beta$ -lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants. Journal Compilation Blackwell Verlag, Berlin, Journal Animal Breeding Genetics, 125:119–129.

HAN, S.K., HIN, Y.C. y BYUN, H.D. 2000. Biochemical, molecular and physiological characterization of a new  $\kappa$ -casein variant detected in Korean cattle. Animal Genetics, 31:49-51.

HARBOE, M. y BUDTZ, P. 2003. Producción, acción y aplicación de cuajo y coagulantes. CHR HANSEN, Buenos Aires, Argentina.

HECK, J., SCHENNINK, A., VAN VALENBERG, H., BOVENHUIS, H., VISKER, M., y VAN ARENDONK, J. 2009. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. Journal of Dairy Science, 92:1192-1202.

HENDERSON, C. R. 1984. Application of Linear Models in Animal Breeding. Univ. Guelph Press, Ontario, Canada.

HERNÁNDEZ, A., et al. 2003. Microbiología Industrial. Costa Rica: Editorial de la UNED, 2003, Pág. 74

Holstein Association USA. 2011. Holstein Breed Characteristics. Disponible en: [http://holsteinusa.com/holstein\\_breed/breedhistory.html](http://holsteinusa.com/holstein_breed/breedhistory.html)

IGENITY<sup>®</sup>, 2008. Bovinos de Leche, Interpretando resultados. Merial Limited. Duluth, GA. All rights reserved. Disponible en: [http://www.igenity.com.ar/interpretando\\_resultados/docs/1Interpretandolechelgenity.pdf](http://www.igenity.com.ar/interpretando_resultados/docs/1Interpretandolechelgenity.pdf)

IMAFIDON, G., NG-KWAI-HANG, K.F., HANVALKAR, V.R y MA, C.Y. 1992 Effect of genetic polymorphism on the susceptibility of  $\kappa$ -casein to calcium precipitation and stabilizing effects of K-casein. International Dairy Journal, 2:272 -285.

INDA, A. Optimización de Rendimiento y Aseguramiento de Inocuidad en la industria de la Quesería. México. 2000.

IPGRI. 2004. Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: módulo de aprendizaje, Medidas de la diversidad genética. Cornell University. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/50105468/II-Gen-C3-A9tica-20de-20poblaciones>.

JAKOB, E. 1994. Genetic polymorphism of milk proteins. Bulletin of the International Dairy Federation, Bulletin 298. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search/display>

JIMÉNEZ, M. 2007. Coagulantes y coagulación. Bogotá, Tecnolácteos, Disponible en: [www.chr-hansen.com](http://www.chr-hansen.com).

KAMI SKI, S. et al. 2006. A note on frequency of A1 and A2 variants of bovine beta-casein locus in Polish Holstein bulls, Supported by the University of Warmia and Mazury, Project No. 0105-0804 2006. Disponible en <http://psjc.icm.edu.pl/psjc/cgi-bin/getdoc.cgi?AAAA015878>

KARL, S., BOWEN, B. y AVISE, J. 1992. Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analysis of anonymous nuclear loci. Genetics, 131:163-173.

KEATING, A. SMITH, T. 2008. A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by Allele-specific PCR and relevance to  $\kappa$ -casomorphin. Irish Journal of Agricultural and Food Research, 47: 99–104.

KWOK, S. y HIGUCHI, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339: 237–238.

LATRILLE, L. 1999. Calidad de la leche. *Revista Producción Animal*. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias – Instituto de Producción Animal. Valdivia, Chile. 215 – 236 p.

Madrid, A., 1999. *Tecnología Quesera*, Madrid: Editorial Papel Cuché, Págs. 472.

MARTÍNEZ, P. A. 2002. Polimorfismos genéticos de las proteínas de la leche en ganado vacuno frisón, relación con los parámetros productivos, influencia en el rcs y la mamitis, aplicación a la tecnología de fabricación de queso de nata, “Queso de Cantabria” D.O disponible en: <http://www.cifacantabria.com>.

MARZIALI, A.S., NG-KWAI-HANG, K.F. 1986. Relationships between milk protein polymorphisms and cheese yielding capacity. *Journal of Dairy Science* 69(5): 1193-1201.

MAS, E. et al. 2001. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista AquaTIC*, No. 15.

MAYER, H.K., ORTNER, M., TSCHAGER, E. y GINZINGER, W. 1997. Composite milk protein phenotypes in relation to composition and cheesemaking properties of milk. *International Dairy Journal*, 7(5):305-310.

MEDRANO, J.F. y SHARROW, L. 1991. Genotyping of bovine Beta-casein loci by restriction site modification of Polymerase chain Reaction (PCR) Amplified Genomic DNA. *Journal of Dairy Science*, 74(1):282.

MILLER, M. 1997. TFPGA (Tools for Population Genetics Analysis). Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona.

MULLIS, K., FALOONA, E., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G y ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium. Quantitative Biology*, 51: 263-273.

NAGYLAKI, T. 1998. Fixation indices in subdivided populations. *Genetic Society of America*.

*National Center for Biotechnology Information*, Bovine beta-casein Gene, complete cds. 2010. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M55158.1>

NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106:283-292.

Ng-KWAI-HANG, K. F. et al. 1984. Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of Bovine milk by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 67:3052-3056.

Ng-KWAI-HANG, K. F. et al. 1984. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins within milk, fat and protein production by dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 67:835-840.

Ng-KWAI-HANG, K. F., HAYES, F., MOXLEY, J. y MONARDES, H. 1986. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 69:22.

Ng-KWAI-HANG, K. F. 2001. milk protein heterogeneity, fractionation and isolation. *Encyclopedia of Dairy Science*. Citado por ROGINSKI, H., FUQUARY, W., P. F. FOX (ed.). *Academie Press London* (In press).

NG-KWAI-HANG, K. F. y GROSCLAUDE, F. 2001. Genetic polymorphism of milk proteins. Chap. 16. *Advanced Dairy Chemistry*, 1:740-816.

NG-KWAI-HANG, K. F. 1998. Genetic polymorphism of milk proteins: Relationships with production traits, milk composition and technological properties. *Canadian Journal of Animal Science*, 78:131–147.

PATTERSON, H. D. y THOMPSON, R. 1971. Recovery of interblock information when block sizes are unequal. *Biometrika*, 58:545.

PETERSON, R. F. y KOPFLER, F. C. 1966. Detection of new types of  $\beta$ -casein by polyacrylamide gel electrophoresis at acid DH: A proposed nomenclature. *Biochemistry and Biophysics. Res. Commun.* 22:388.

PICCA, A., et al. 2004. Marcadores moleculares. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Argentina: Ediciones INTA, Págs. 61-68

POLLOTT, G. 2004. Deconstructing milk yield and composition during lactation using biologically based lactation models. *Journal of Dairy Science*, 87: 2375–2387.

REQUENA, F. D. *et al.* 2007. Genética de la caseína de la leche en el bovino frisón. *REDVET, Revista electrónica de Veterinaria*, VIII(1). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010107.html>.

RIEL, R. 1991. Composición y estructura físico-química de la leche. Citado por AMNIOT, J. *Ciencia y Tecnología de la Leche*, Zaragoza. Acribia S.A. p. 1-53

RIBADEAU-DUMAS, B., BRINGNON, G., GROSCLAUDE, F y MERCIER, J. C. 1972. Structure primaire de la caseine  $\beta$ -bovine. Sequence complete. *European Journal Biochemistry*, 25:505.

RICHARDT, W., JEROCH, H. y SPILKE, J. 2001. The impact of nutrition and non-nutrition factors on milk urea concentration. *Tierz.-Archive. Animal. Breed*, 44:251-262.

RODELLAR, C., OSTA, R., LEVÉZIEL, H., ELDUQUE, C., ZARAZAGA, I. y ZARAGOZA, P. 1992. Identificación de las variantes genéticas de caseína mediante la técnica de PCR/RFLP's en razas bovinas españolas. *Jornadas Feria Internacional Ganadera. Zafra, España.*

RODRÍGUEZ, I.P y BARRERA, H.A. 2004. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL Vol. 7 No. 3*

ROGINSKI, H. 2003. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, London.

RON, N., YOTFE, E., EZRA, E., MEDRANO, J. y WEILER. L. 1994. Determination of effects of milk protein genotype on production traits of Israeli Holstein. *Journal of Dairy Science*, 77:1106.

SAIKI, R. K., GELFAND, D., STOFFELS, S., SCHARF, J., HIGUCHI, R., HORN, G., MULLIS, K, y ERLICH, H. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerases. *Science*, 2(39): 487-491.

SAS. 2009. *Institute INC versión 9.20 y Enterprise SAS Guide versión 4.2.*

SOLARTE, C. et al. 2007. Mejoramiento genético y calidad de leche. *Infórmese, Publicación de la Cooperativa de Productos Lácteos de Nariño*. Disponible en: <http://promegalac.udenar.edu.co/default.aspx?pg=95120e09-7cab-4df4-a0c4-2f769c9e58f8>.

SOLARTE, C., ROSERO, C., ERASO, Y., ZAMBRANO, G., CÁRDENAS, H. y BURGOS, W. 2009. Frecuencias alélicas del gen de la Kappa caseína en la raza Holstein del Trópico Alto de Nariño-Colombia. *Livestock Research for Rural Development*, 21(1) artículo # 1.

SOLARTE, C. et al. 2009. Caracterización y evaluación genética de la población bovina lechera del Trópico Alto de Nariño, para la conformación de Núcleos de Selección. *Universidad de Nariño. Tipografía Cabrera.*

SUMANAS. 2004. *The Polymerase Chain Reaction (PCR) Animation* [www.sumanasinc.com](http://www.sumanasinc.com).

UFFO, O. *Aplicación de Marcadores Moleculares en Ganadería*. [En internet]. Cuba, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, 2006. [Citado el 12 de junio, 2010] Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos37/marcadores-moleculares/marcadores-moleculares3.shtml#refer>



UFFO, O., BURRIEL, M., MARTÍNEZ, S., RONDA, R., OSTA, R., RODELLAR, C. y RAGOZA, P. 2006. Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. *AGRI*, 39:15-24. Disponible en la web <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a0806t/a0806t02.pdf>

VALADEZ, E. y KAHL, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Universidad Autónoma de Chapingo, México.

VAN EENENNAAM, A. L., y MEDRANO, J. F. 1991. Milk protein polymorphisms in the California dairy cattle population. *Journal of Dairy Science*, 74:1730-1742.

WALSTRA, P., GEURTS, T., NOOMEN, A., JELLEMA, A. y VAN BOEKEL, M. 2001. *Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos*. Editorial Acribia S. A. Zaragoza. España. 730 p.

WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annal Eugen* 15: 323–354.

YAN, S. B. y WOLD, F. 1984. Neoglycoproteins: in vitro introduction of glycosyl units at glutamines in beta-casein using transglutaminase. *Biochemistry* 23(16):3759-65.

ZAMBRANO, G., ERASO, Y., SOLARTE, C. y ROSERO, C. 2010. Kappa casein genotypes and curd yield in holstein cows. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 23(4):422-428.

ZAVALA, J. 2005. Aspectos nutricionales y Tecnológicos de la Leche. Perú, Dirección de Promoción Agraria. Disponible en: [http://vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/Material%20II/A%20archivos%20internet/Biologia%20y%20fisiologia%20de%20la%20lactacion/agroin\\_doc2.pdf](http://vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/Material%20II/A%20archivos%20internet/Biologia%20y%20fisiologia%20de%20la%20lactacion/agroin_doc2.pdf)

ZIKAKIS, P. et al. 1974. Gene frequencies of electrophoretically determined polymorphisms in Guernsey blood and milk. *Journal of Dairy Science*, 57:405-410.