

DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS PARA LAS VARIANTES  
DE LA ALFA s<sub>2</sub> CASEÍNA ( s<sub>2</sub>-Cs) MEDIANTE PCR – RFLP Y SU RELACIÓN  
CON LAS VARIABLES PRODUCTIVAS Y RENDIMIENTO EN CUAJADA EN  
HEMBRAS BOVINAS DE LA RAZA HOLSTEIN DEL TRÓPICO ALTO DE  
NARIÑO

FRANCIS PAMELA CHAVES GALEANO  
MÓNICA LUCÍA GUERRÓN MELO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN Y PROCESAMIENTO ANIMAL  
PROGRAMA DE ZOOTECNIA  
SAN JUAN DE PASTO  
2011

DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS PARA LAS VARIANTES  
DE LA ALFA s<sup>2</sup> CASEÍNA ( s<sup>2</sup>-Cs) MEDIANTE PCR – RFLP Y SU RELACIÓN  
CON LAS VARIABLES PRODUCTIVAS Y RENDIMIENTO EN CUAJADA EN  
HEMBRAS BOVINAS DE LA RAZA HOLSTEIN DEL TRÓPICO ALTO DE  
NARIÑO

FRANCIS PAMELA CHAVES GALEANO  
MÓNICA LUCÍA GUERRÓN MELO

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

Presidente  
CARLOS EUGENIO SOLARTE PORTILLA  
Zootecnista, M.Sc., Dr.Sc.

Co-presidenta  
CAROL YOVANNA ROSERO GALINDO  
Bióloga Genética, M.Sc., Dr.Sc.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN Y PROCESAMIENTO ANIMAL  
PROGRAMA DE ZOOTECNIA  
SAN JUAN DE PASTO  
2011

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

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

**Nota de aceptación:**

---

---

---

---

---

---

---

---

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

---

**CAROL ROSERO GALINDO. Bióloga Genética. M.Sc. Dr.Sc.  
Co-presidente**

---

**HENRY ARMANDO JURADO GÁMEZ. Zoot., M.Sc. Dr.Sc  
Jurado Delegado**

---

**LUIS ERNESTO VITERI SARASTY. Zootecnista, Esp.  
Jurado**

**San Juan de Pasto, Agosto de 2011**

## DEDICATORIA

*A mis padres Guillermo y Socorro por reflejar cada día la importancia de ser un excelente profesional y un ser humano invaluable,*

*A mis hermanos Juan Pablo y Mario Andrés, sinónimo de apoyo y complicidad en los buenos y malos momentos,*

*A mis dos amores Juan y María, gracias por comprender y compartir su tiempo con el de este trabajo,*

*Al verdadero significado de amistad...Pame.*

*Mónica Lucía Guerrón Melo*

## **DEDICATORIA**

*A Dios por ser la luz en mi camino,  
A mis Padres Carlos y Stella porque sin su amor y apoyo incondicional  
no hubiese sido posible subir este escalón  
A mis hermanos Ricardo, Sandra, Fernando y Mónica  
A Mónica Guerrón gracias por esta hermosa amistad.*

*A mis principitos...  
Por aguantar las horas de ausencia  
Por su sonrisa y el brillo de sus ojos  
A ustedes mi única recompensa... Gabriel y Sebastian.*

*Pamela Chaves Galeano*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al programa de Mejoramiento Genético de la Universidad de Nariño y a la Cooperativa de Productos Lácteos - COLÁCTEOS, por haber facilitado los recursos necesarios para la culminación de esta investigación.

Al Doctor Carlos Solarte, por brindarnos su apoyo y sus valiosos conocimientos.

A la Doctora Carol Rosero, por compartir sus conocimientos y por su apoyo incondicional.

A nuestros compañeros y amigos Diana Barrera y Oscar Martínez, por su apoyo invaluable en el desarrollo de este proyecto.

A todas aquellas personas que de una u otra manera nos brindaron su apoyo y colaboración en el proceso y culminación de este trabajo de investigación.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	19
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. OBJETIVO GENERAL	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. MARCO TEÓRICO	23
4.1. LA RAZA HOLSTEIN	23
4.1.1. Características generales de la raza	23
4.1.2. Características de conformación	23
4.1.3. Producción de leche	23
4.2. COMPOSICIÓN FÍSICO QUÍMICA DE LA LECHE	24
4.2.1. Composición de la Leche	24
4.2.2. Fracción Proteica	25
4.2.3. Caseínas	26
4.2.3.1. Estructura de la micela de caseína	27
4.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE	28
4.3.1. Factores no Nutricionales	28
4.3.1.1. Raza	29
4.3.1.2. Estado de lactancia	29
4.3.1.3. Época del año	30
4.3.1.4. Número de lactancias y edad	30
4.3.2. Factores Nutricionales	30
4.3.2.1. Alimentación	30
4.4. POLIMORFISMO GENÉTICO DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE	31
4.4.1. La $\alpha$ -Cs: Ubicación, Expresión e Influencia en la Composición de la Leche	31
4.4.1.1. Las caseínas sensibles al calcio	32
4.4.1.2. Polimorfismo genético de la $\alpha$ -Cs	32
4.4.1.3. Gen de la $\alpha$ -Cs	35
4.5. RELACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA $\alpha$ -Cs, LA PRODUCCIÓN Y EL RENDIMIENTO EN CUAJADA	36
4.6. SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES	36

<b>4.6.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa - PCR</b>	<b>37</b>
<b>4.6.1.1. Componentes de la reacción</b>	<b>37</b>
<b>4.6.1.2. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa</b>	<b>39</b>
<b>4.6.2. Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción-RFLP</b>	<b>40</b>
<b>5. DISEÑO METODOLÓGICO</b>	<b>41</b>
<b>5.1. DETERMINACIÓN DE LAS VARIANTES ALÉLICAS PARA EL GEN DE LA <math>\alpha</math>2-Cs</b>	<b>41</b>
<b>5.1.1. Localización y Tamaño de Muestra</b>	<b>41</b>
<b>5.1.2. Materiales y Equipos</b>	<b>41</b>
<b>5.1.3. Toma de Muestras de Sangre</b>	<b>48</b>
<b>5.1.4. Extracción de ADN</b>	<b>42</b>
<b>5.1.5. Determinación de las variantes alélicas de la <math>\alpha</math>2-Cs</b>	<b>43</b>
<b>5.1.5.1. PCR-RFLP</b>	<b>43</b>
<b>5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>47</b>
<b>5.3.1. Análisis de Datos Moleculares</b>	<b>47</b>
<b>6. PRESENTACIÓN Y DISCUSION DE RESULTADOS</b>	<b>48</b>
<b>6.1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES ALÉLICAS DE LA <math>\alpha</math>2-Cs</b>	<b>48</b>
<b>6.1.1. Toma de muestras de sangre y extracción de ADN</b>	<b>48</b>
<b>6.1.2. Amplificación por PCR e identificación de los genotipos de la <math>\alpha</math>2-Cs</b>	<b>48</b>
<b>6.2. DIVERSIDAD GENÉTICA</b>	<b>50</b>
<b>6.2.1. Cálculo de las Frecuencias Alélicas y Genotípicas</b>	<b>50</b>
<b>6.2.2. Heterocigosidad</b>	<b>51</b>
<b>6.2.3. Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W)</b>	<b>51</b>
<b>7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>53</b>
<b>7.1. CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>7.2. RECOMENDACIONES</b>	<b>53</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>54</b>

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Composición de la leche cruda en distintas razas bovinas	26
<b>Tabla 2.</b> Posiciones y diferencias en aminoácidos en las variantes alélicas A, B, C y D del gen de la $\kappa$ 2-Cs	35
<b>Tabla 3.</b> Protocolo de amplificación por PCR para la $\kappa$ 2-Cs	44
<b>Tabla 4.</b> Protocolo de digestión de productos amplificados por PCR con el marcador molecular RFLP	46
<b>Tabla 5.</b> Valores observados (o) y esperados (e) de los genotipos del gen de la $\kappa$ 2-Cs y probabilidad del test de Haldane (1954) para equilibrio Hardy-Weinberg	52

## LISTA DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Características físico químicas de la leche de vaca	24
<b>Cuadro 2.</b> Composición de la leche de vaca	25
<b>Cuadro 3.</b> Secuencia de cebadores y fragmentos esperados en la amplificación para el gen de la $\beta$ 2-Cs	45
<b>Cuadro 4.</b> Corte de las enzimas para el gen de la $\beta$ 2-Cs	45

## LISTA FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Modelo de la micela de caseína	28
<b>Figura 2.</b> Comportamiento de la producción de leche, el porcentaje de grasa y proteína durante el ciclo de la lactancia	29
<b>Figura 3.</b> Efecto de la alimentación en la producción de leche	31
<b>Figura 4.</b> Estructura primaria de la $\kappa$ -Cs A	32
<b>Figura 5.</b> Secuencia nucleotídica de las variantes alélicas B,C y D de la fracción proteica $\kappa$ -Cs	35
<b>Figura 6.</b> Pasos básicos de la PCR	40
<b>Figura 9.</b> Toma de muestras de sangre	42
<b>Figura 10.</b> Proceso de extracción de ADN	43
<b>Figura 11.</b> Condiciones de amplificación para PCR	44
<b>Figura 12.</b> Proceso PCR	45
<b>Figura 13.</b> Condiciones de digestión para el marcador RFLP	46
<b>Figura 14.</b> Proceso de electroforesis en gel de agarosa	47
<b>Figura 15.</b> Visualización vía PCR para las variantes alélicas B,C y D de la $\kappa$ -Cs	61
<b>Figura 16.</b> Fragmentos de las formas alélicas de la $\kappa$ -Cs	50
<b>Figura 17.</b> Histogramas de frecuencias genotípicas de la $\kappa$ -Cs	51

## GLOSARIO

**ADN ó DNA.** Ácido desoxirribonucleico. Molécula que contiene y transmite la información genética de los organismos vivos, excepto en algunos casos como los retrovirus.

**ALELO:** cualquiera de las formas distintas de un gen que ocupa la misma posición o *locus* en cromosomas homólogos y que sufren apareamiento meiótico.

**ALELO FIJADO:** Alelo para el que son homocigóticos todos los miembros de la población en estudio, de manera que no existe ningún otro alelo para ese *locus* en dicha población

**ALFA s2 CASEÍNA ( s2-Cs):** fracción proteica, que ocupa el 10% de la caseína total de la leche bovina.

**CALIDAD HIGIÉNICA:** referencia a todas aquellas características físico-químicas, microbiológicas y organolépticas presentes en la leche.

**CASEÍNA:** del latín *caseus* que significa queso. Fosfoproteína presente en la leche y que en la fase soluble se encuentra asociada al calcio en un complejo denominado caseinógeno.

**COLOIDE:** suspensión coloidal o dispersión coloidal. Sistema físico-químico compuesto por dos fases una continua, normalmente fluida y otra dispersa en forma de partículas por lo general solidas, de tamaño mesoscópico o intermedio entre el macroscópico y microscópico.

**ELECTROFORESIS:** técnica de separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico.

**FENOTIPO:** conjunto de propiedades de tipo morfológico, físico, bioquímico y de comportamiento que un organismo desarrolla por la acción de los genes y del ambiente.

**FRECUENCIA ALÉLICA:** proporción de un determinado alelo en una población.

**FRECUENCIA FENOTÍPICA:** proporción de un genotipo en una población.

**GEN:** segmento corto de ADN que constituye la unidad funcional para la transmisión de los caracteres hereditarios.

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

**HOMOCIGOTO:** constitución genética de un individuo donde las dos copias son idénticas en los dos cromosomas homólogos.

**INDUSTRIALIZACIÓN DE LECHE:** proceso mediante el cual la leche natural, por medio del uso de materiales, elementos y métodos, se convierte en un derivado lácteo.

**LECHE:** producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños completos, sin ningún tipo de adición, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración posterior.

**LOCI:** plural de *locus*.

**LOCUS:** sitio físico en el cromosoma donde se localiza un gen.

**MARCADORES MOLECULARES:** biomoléculas (proteínas o ADN) que se pueden identificar y caracterizar para definir un genotipo determinado y en algunos casos establecer asociación entre dichos genotipos con fenotipos específicos.

**MEJORAMIENTO GENÉTICO ANIMAL:** conjunto de metodologías que aplican principios biológicos, económicos y matemáticos, con el fin de encontrar estrategias óptimas para aprovechar la variación genética, dentro y entre poblaciones; seleccionar los animales de mayor mérito y decidir el tamaño de su progenie.

**MICELA:** conglomerado de moléculas que constituye una de las fases de los coloides.

**POLIMORFISMO:** múltiples formas. Por polimorfismo genético se entiende los múltiples alelos de un gen en una población que por lo general se expresan como diferentes genotipos.

**PROTEÍNA:** del griego *prota* que significa “lo primero”. Biomoléculas formadas principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, que pueden contener azufre, fósforo, hierro, magnesio y cobre entre otros elementos.

**RAZA:** conjunto de individuos con caracteres morfológicos y fisiológicos propios transmisibles por herencia dentro de un margen de fluctuación conocido, por los que se les distingue de otros de su misma especie.

**RENDIMIENTO DE CUAJADA:** cantidad de cuajada en kilogramos, que se obtiene a partir de una cierta cantidad de litros de leche

**SELECCIÓN DIRECCIONAL:** Selección que cambia las frecuencias de un alelo en una dirección constante, ya sea a su fijación o su eliminación.

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar las variantes alélicas de la  $\beta$ 2-Cs en hembras bovinas donadoras de la raza holstein seleccionadas por su mérito genético y establecer su relación con las variables producción de leche, grasa y proteína ajustadas a 305 días y equivalente adulto (EA) y el rendimiento industrial en cuajada.

Para alcanzar dicho objetivo se caracterizaron 50 animales, ubicados en 10 hatos del distrito lechero de Pasto. Las variantes alélicas se identificaron mediante la técnica molecular PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction-Restricted Fragments Length Polymorphism*). Los resultados de la caracterización genética evidenciaron la fijación de la variante alélica A y por ende una frecuencia, equivalente al 100%, del genotipo en estado homocigoto AA. Los valores de heterocigosidad observada y esperada fueron iguales a cero y no se encontró equilibrio Hardy-Weinberg ( $P < 0.05$ ) para el *locus* de la  $\beta$ 2-Cs en la población de estudio.

Debido a la alta frecuencia del alelo A determinado en este estudio, no fue posible establecer el efecto del genotipo sobre las variables productivas y el rendimiento en cuajada en el Trópico Alto de Nariño.

## ABSTRACT

The objective of this work was to determine the allelic variants of the  $\beta$ -Caseins in donor holstein female's bovine selected by genetic merit and to establish its relation with the milk production, fat and protein variables adjusted to 305 days and adult equivalent and yield industrial curd.

For this purpose were characterized 50 animals, located in ten herds of the Pasto dairy district. The allelic variants were identified by molecular technique PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restricted fragments length polymorphism). The results of the genetic characterization, showed the fixation of the A allelic variant, genotypic frequency equivalent of 100% for the genotypic AA in homozygosis state. The values of the observed and expected heterozygosity were equals zero. Was not found Hardy-Weinberg equilibrium.

Due to the high frequency of the A allele determined in this study, was not possible to establish the genotype effect on production traits and industrial curd yield in the High Tropic of Nariño.

## INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas el enfoque de la producción de leche se focalizó en incrementar el volumen, mientras que la calidad composicional se ha quedado rezagada. Hoy, cuando el mercado nacional e internacional exige mayor competitividad, la calidad de la leche basada en su composición proteica y grasa toma gran fuerza y obliga a los productores a incrementar el contenido de sólidos en leche.

Para alcanzar esta meta es indispensable fortalecer los programas de mejoramiento genético, puesto que es uno de los pilares de la producción animal actual y que basados en el control de la producción han alcanzado importantes resultados con la creación de registros genealógicos, productivos, reproductivos y sanitarios vitales en un proceso de selección.

Con la utilización de biotecnologías y la implementación de técnicas moleculares, en el mejoramiento genético se ha logrado la identificación de marcadores de ADN, que localizan, sitúan e identifican las variantes genéticas de las proteínas lácteas, estableciendo así, una clara relación entre los distintos genotipos encontrados y los diversos parámetros de calidad composicional de la leche en el ganado bovino.

El objetivo principal de esta investigación fue determinar las variantes alélicas de la  $s2$ -Cs en hembras bovinas donadoras pertenecientes a la raza holstein, seleccionadas por su mérito genético, para establecer su relación con las variables productivas y el rendimiento industrial en cuajada bajo las condiciones del Trópico Alto de Nariño, utilizando la técnica molecular PCR-RFLP (por sus siglas en inglés *Polimerase Chain Reaction - Restricted Fragments Length Polymorphism*).

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en la Universidad de Nariño, en alianza con la Cooperativa de Productos Lácteos, Colácteos, y con el apoyo financiero del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), para el mejoramiento de la calidad de la leche enmarcada en las condiciones de nuestra región.

## 1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

La selección del ganado bovino en el mundo se basó, por mucho tiempo, en el volumen de producción de leche, sin embargo, en la actualidad se ha replanteado dicho proceso tomando como fundamento la calidad composicional de la misma. La dinámica de la producción lechera, ha venido acompañada por el desarrollo del consumo de productos lácteos, donde una mejor calidad composicional de la leche, principalmente, en lo relacionado con grasa y proteína, redundará en ganancia de competitividad del sector lácteo.

Como consecuencia de la reestructuración de este sector y debido a la fuerte competencia existente en el mercado mundial, en Colombia se ha acentuado, la revalorización de la proteína láctea. La tendencia general pretende producir leche con mayor contenido de proteína, factor que afecta el precio de la leche por el sistema de pago por calidad (Martínez)<sup>1</sup>, dicho fenómeno está directamente relacionado con las características genotípicas de los animales en producción.

La determinación de la secuencia nucleotídica de los genes y el conocimiento de los fundamentos moleculares del polimorfismo genético de las caseínas, ha conducido a la utilización de técnicas genéticas que permiten realizar una selección dirigida de las especies, con el fin de mejorar las propiedades de la calidad de la leche y las destinadas a la industrialización (Martin)<sup>2</sup>.

En la Cuenca Lechera del Trópico Alto de Nariño, incluida en el acuerdo de competitividad, la producción láctea proviene mayoritariamente de animales de la raza holstein, que se caracterizan, fenotípicamente, por sus altos volúmenes de producción, baja calidad composicional, especialmente en los contenidos de sólidos totales y proteína y genéticamente, por la alta frecuencia del alelo A para Kappa caseína ( -Cs) (PMG)<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> MARTÍNEZ, A. 2003. Polimorfismos genéticos de las proteínas de la leche en ganado vacuno Holstein-Frisón de Cantabria. Relación con los principales rasgos productivos y aplicación a la tecnología de fabricación de queso de Cantabria. Centro de Investigación y Formación Agraria. [En línea] [URL:http://www.cifacantabria.com/Documentacioncifa/download.php?sess=0&parent=18&expand=order=name&binary=1&id=11](http://www.cifacantabria.com/Documentacioncifa/download.php?sess=0&parent=18&expand=order=name&binary=1&id=11)

<sup>2</sup> MARTIN, P., SZYMANOWSKA, M., ZWIERZCHOWSKI, L., and LEROUX. C. 2002. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reprod. Nutr. Dev.* 42:433–459

<sup>3</sup> PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO. 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, Pasto – Colombia. p.p. 89.

Solarte *et al*<sup>4</sup> afirman que “La producción lechera en esta zona de Colombia debe alcanzar mayores niveles de competitividad, sostenibilidad y productividad dada su importancia social y económica”, siendo uno de los aspectos a profundizar, la investigación en el mejoramiento de la calidad composicional de la leche, especialmente en la fracción proteica, por su importancia en el proceso de industrialización y por las exigencias establecidas por el MADR de Colombia, en cuanto a remuneración al productor por calidad higiénica y composicional, tal como lo establece la resolución 000012 del 12 de enero de 2007<sup>5</sup>.

Teniendo en cuenta que una adecuada selección del genotipo para las proteínas de la leche, podría permitir la determinación de las características físicas y químicas de la misma para su procesamiento, y así aumentar considerablemente la calidad y el rendimiento quesero; el presente estudio permitirá identificar la variabilidad genética para la  $\beta$ -Cs en las condiciones del Trópico Alto de Nariño, siendo este el primer referente regional sobre dicha lactoproteína en el país.

---

<sup>4</sup> SOLARTE, C. *et al.* 2007. Mejoramiento Genético y Calidad de Leche. *Rev. INFÓRMESE*. Vol. 12(2): 24-25.

<sup>5</sup> COLOMBIA, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, resolución número 000012 del 2007 “por la cual se establece el sistema de pago de la leche cruda al productor”. 12 de enero de 2007.

## **2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

En la raza holstein, bajo condiciones del Trópico Alto de Nariño ¿Existe relación entre las variantes alélicas del gen de la  $\beta$ -CS, la producción de leche, grasa, proteína y el rendimiento industrial en cuajada?

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la relación existente entre las variantes alélicas A, B, C y D de la  $\kappa$ 2-Cs mediante PCR-RFLP con las variables productivas y rendimiento en cuajada en hembras bovinas de la raza holstein del Trópico Alto de Nariño.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**3.2.1.** Estandarizar la técnica molecular PCR-RFLP para la fracción proteica  $\kappa$ 2-Cs, en hembras holstein del Trópico Alto de Nariño.

**3.2.2.** Determinar las frecuencias génicas y genotípicas del gen de la  $\kappa$ 2-Cs en bovinos de la raza holstein.

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

**3.2.4.** Determinar la asociación existente entre los genotipos para la  $\kappa$ 2-Cs y la producción en volumen, contenidos totales de grasa y proteína de la leche y el rendimiento industrial en la elaboración de cuajada.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. LA RAZA HOLSTEIN

**4.1.1. Características Generales de la Raza.** La raza holstein es originaria de Europa, su desarrollo ocurrió en provincias del norte de Holanda. Tiene como sus ancestros 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 Rhin (Asoholstein)<sup>6</sup>.

Los primeros ejemplares llegaron a Colombia procedentes de Holanda: 3 machos y una hembra en 1872 y dos toros y una vaca en 1875 a Cundinamarca.

Por sus características únicas de color, conformación y producción de leche, esta raza es en la actualidad la más difundida y representativa.

**4.1.2. Características de Conformación.** El holstein es uno de los mayores productores de leche, es dócil y es reconocido por sus marcas distintivas de color negro y blanco o rojo y blanco. El peso al nacer para los machos es de 38 a 45Kg y para las hembras está entre 36 y 38Kg., alcanzado peso adulto de 1.100 a 1.300Kg en toros y 670 a 720Kg en vacas.

Los holstein son animales atractivos que indican feminidad, vigor, fortaleza, tamaño y estatura, con una armoniosa unión y balance proporcional de todas sus partes.

La edad al primer parto, en condiciones normales, está alrededor de los tres años. Puede permanecer en el hato durante más de cinco lactancias, en cada una de las cuales (305 días) su producción se encuentra entre 5.000 y 10.000Kg; datos reportados por el Programa de Mejoramiento Genético de la Universidad de Nariño<sup>7</sup>.

**4.1.3. Producción de Leche.** La raza holstein se ha popularizado por su excelente producción de leche, mayor retorno económico sobre costo de alimentación, mérito genético y flexibilidad ante una gama amplia de condiciones ambientales. En Colombia, la mayor producción la ha logrado una holstein, con 17.610Kg en 305 días (Asoholstein)<sup>8</sup>.

---

<sup>6</sup> ASOCIACIÓN HOLSTEIN DE COLOMBIA. 2011. [En línea] URL: <http://www.asoholsteincolombia.com.co>

<sup>7</sup> UNIVERSIDAD DE NARIÑO, PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO, 2009. Ibid.

<sup>8</sup> ASOCIACIÓN HOLSTEIN DE COLOMBIA. 2011. Op.Cit.

## 4.2. COMPOSICIÓN FÍSICO QUÍMICA DE LA LECHE

4.2.1. **Composición de la Leche.** el decreto 616 del 2006<sup>9</sup>, define a la leche como:

“Producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños completos, sin ningún tipo de adición, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración posterior y que cumpla con las características físico químicas mencionadas en el Cuadro 1”.

**Cuadro 1. Características físico químicas de la leche de vaca**

Parámetro/ unidad	Leche entera pasteurizada	
	Min	Max
Grasa % m/v mínimo	3.0	
Extracto seco total % m/m mínimo	11.30	
Extracto seco desengrasado % m/m mínimo	8.3	
Peroxidasa	Positiva	
Fosfatasa	Negativa	
	Min	Max
Densidad 15/15 °C g/ml	1.0300	1.0330
Acidez expresado como ácido láctico %m/v	0.13	0.17
Índice °C	-0.530	-0.510
Crioscopico °H	-0.550	-0.530

Adaptado del Decreto 616 de 2006 de la República de Colombia

Los principales componentes de la leche son el agua, los lípidos, los carbohidratos, las proteínas y las sales. Estos componentes se encuentran distribuidos en forma de emulsión, suspensión y solución en un equilibrio físico complejo. La grasa se encuentra en forma de glóbulos grasos, rodeados por una membrana, que están emulsionados en el suero lácteo.

<sup>9</sup> COLOMBIA, Ministerio de Protección Social, decreto número 616 de 2006 “Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendia, importe o exporte en el país”. 28 de febrero de 2006.

Las moléculas de proteína se encuentran dispersas en el suero lácteo en forma de partículas que se denominan micelas, constituidas principalmente por sales cálcicas de las caseínas (Walstra *et al*)<sup>10</sup>.

Aunque cualitativamente la composición y propiedades de la leche son constantes, los estudios desarrollados por algunos autores para determinar la composición de la leche a lo largo del tiempo, han demostrado que existen variaciones considerables en los contenidos de proteína y grasa (Walstra *et al*)<sup>11</sup>. Estas variaciones se atribuyen a diversos factores como son: la herencia genética, el ciclo de lactación, la edad, la alimentación, la temperatura ambiental, la época del año, el estado de salud y el procedimiento de lactación.

En el Cuadro 2 se indican los componentes principales de la leche bovina.

**Cuadro 2. Composición de la leche de vaca**

COMPUESTO	PORCENTAJE (%)
Agua	87.5
Grasas	3.5 - 5.25
Proteínas (caseínas, lactoalbúmina y lactoglobulina)	3.5
Azúcares (lactosa)	4.5
Fosforo	96mg/100ml
Sodio	58mg/100ml
Cloro	103mg/100ml

Adaptado de: Wattiaux, Michel. Instituto Babcock, 2005

**4.2.2. Fracción Proteica.** La concentración de la proteína en la leche es distinta en las diferentes especies domésticas, pero de forma general se encuentra entre el 3% y el 4 % siendo la media alrededor del 3.5% en la especie bovina.

Actualmente, el 95% de las proteínas de la leche bovina han sido caracterizadas y clasificadas de acuerdo a sus propiedades bioquímicas, representando aproximadamente un contenido de 32.7g de proteína por litro (Goursaud<sup>12</sup>).

<sup>10</sup> WALSTRA *et al.* 2001. Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos. Zaragoza, España, Ed. Acribia S.A.. 730 p.

<sup>11</sup> WALSTRA *et al.* 2001. *Ibid.*

<sup>12</sup> GOURSAUD, J., IN F. M. LUQUET (Ed.). 1991. Composición y propiedades físico-químicas. Leche y Productos Lácteos. *Société Scientifique D'Hygiene Alimentaire*. Ed. Acribia. España. P.p. 2-92

Las proteínas de la leche se separan principalmente en dos grupos mediante una acidificación de la misma hasta alcanzar un valor de pH de 4,6 (punto isoeléctrico) que da lugar a la formación de una fracción precipitada constituida por las caseínas (Webb *et al*<sup>13</sup>; Alais<sup>14</sup>; Fennema<sup>15</sup>).

La caseína ha sido la más estudiada y es la proteína de mayor importancia para la industria lechera, comprende cuatro principales familias de polipéptidos: Alfa-s1 ( s1-Cs), Alfa-s2 ( s2-Cs), Beta ( -Cs) y Kappa ( -Cs) Caseína que representan cerca del 80% del total de las proteínas de la leche, y el 20% restante corresponden a las del lactosuero, siendo estas la Alfa-lactoalbúmina ( -LA) y Beta-lactoglobulina ( -LG) (Requena y Aguera<sup>16</sup>).

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

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

RAZAS	Grasa (%)	Proteína (%)	Proteína Verdadera (%)	Sólidos Totales (%)
<b>Holstein</b>	3.64	3.16	2,97	12.69
<b>pardo suizo</b>	3.98	3.52	3.33	12.64
<b>Ayrshire</b>	3.88	3.31	3.12	12.69
<b>Jersey</b>	4.64	3.73	3.54	14.04

Adaptado de Amniot, 1994

**4.2.3. Caseínas:** Las caseínas son un complejo de proteínas fosforadas presentes en la leche como largas partículas coloidales o micelas que contienen cantidades apreciables de calcio, fosfato y pequeñas cantidades de magnesio y citrato. Sus diámetros fluctúan entre 30-300 nm, contienen un 92% de proteína, compuesta por s1-Cs, s2-Cs, -Cs y K-Cs y un 8% de constituyentes

<sup>13</sup> WEBB, B., JOHNSON, A. and ALFORD, J. 1980. Fundamentals of Dairy Chemistry. AVI publishing Company, Inc. Westport, Connecticut. P.p. 2-124.

<sup>14</sup> ALAIS, CH. 1985. Ciencia de la leche, principios de la técnica lechera. Ed. Reverté España.

<sup>15</sup> FENNEMA, O. 1993. Química de los alimentos. Ed. Acribia. S.A. Zaragoza, España.

<sup>16</sup> REQUENA, F.D. y AGÜERA, F. 2007. Genética de la caseína de la leche en el bovino frisón. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria.* 8(1). [En línea] URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010107.html>

inorgánicos, esencialmente fosfato cálcico (Ferrandini *et al*<sup>17</sup>; Alais<sup>18</sup>), las cuales son codificadas por cuatro genes autosomales característicos denominados CSN1S1, CSN1S2, CSN2, CSN3 respectivamente (Chessa *et al*<sup>19</sup>).

Las  $\alpha$ 1-Cs,  $\alpha$ 2-Cs,  $\beta$ -Cs se han descrito como sensitivas al  $Ca^{++}$  debido a que se precipitan en presencia de bajas concentraciones de este catión, mientras que la  $\kappa$ -Cs es la menos sensible al calcio (Walstra *et al*)<sup>20</sup>.

#### 4.2.3.1. Estructura de la Micela de Caseína.

Según Ferrandini *et al*<sup>21</sup>:

“La micela de caseína constituye un sistema coloidal muy estable en la leche. Este hecho tiene importantes implicaciones prácticas relacionadas con la formación de los geles de caseína, así como con la estabilidad de los productos lácteos durante su tratamiento térmico, concentración y almacenamiento.

Por este motivo, la micro estructura de la micela de caseína ha sido intensamente estudiada durante las últimas cinco décadas.

Walstra *et al*<sup>22</sup>, afirma que:

“A pH 7 y aisladamente, las caseínas están bajo la forma de pequeños polímeros, la  $\beta$ -Cs al estado de monómero y la  $\alpha$ -Cs al estado de polímeros mayores. A pH 7 y a 37°C, el agregado de iones  $Ca^{++}$  no afecta a la  $\beta$ -Cs, en cambio la  $\alpha$ -Cs precipita y la caseína coagula. Los complejos de  $\beta$ -Cs y  $\kappa$ -Cs se asocian con la caseína para formar las micelas.”

---

<sup>17</sup> FERRANDINI, E. *et al.* 2006. Estructura de la Micela de Caseína. En: Anatomía veterinaria. Vol. 22 p. 5-18. [En línea]URL: <http://revistas.um.es/analesvet/article/viewFile/771/799>.

<sup>18</sup> ALAIS. 1985. Op.Cit.

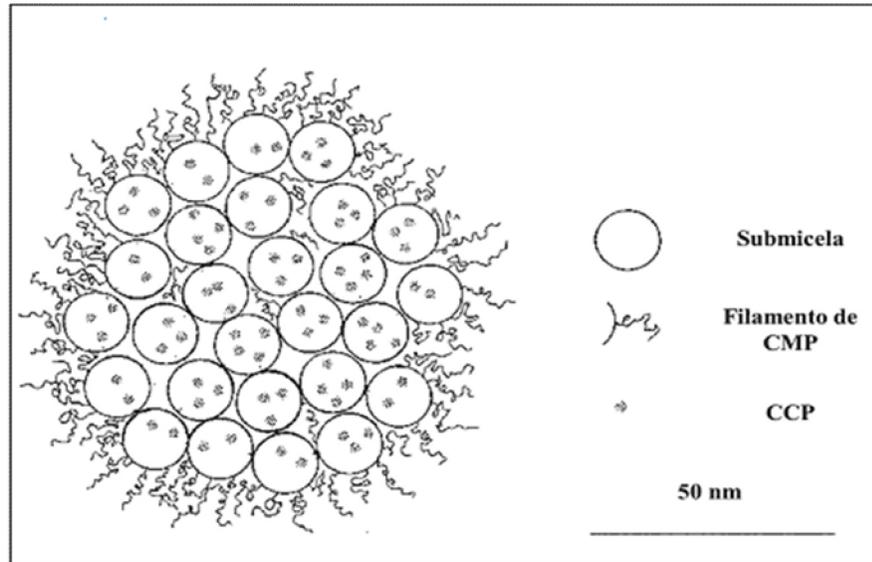
<sup>19</sup>CHESSA *et al.* 2007. Development of a Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Microarray Platform for the identification of bovine milk protein genetic polymorphisms. *J. Dairy Science*. 90: 451-464.

<sup>20</sup>WALTRA *et al.* 2001. Op.Cit.

<sup>21</sup>FERRANDINI *et al.* 2006. Op.Cit.

<sup>22</sup>WALSTRA *et al.* 2001. Op.Cit.

**Figura 1. Modelo micela de Caseína**



Fuente: Tomado de Walstra, 2001

### **4.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE**

#### **4.3.1. Factores no Nutricionales**

**4.3.1.1. Raza.** La raza constituye uno de los factores más importantes a considerar en la composición de la leche, puesto que la grasa y la proteína son caracteres genéticos con alta heredabilidad (Imagawa et al)<sup>23</sup>. La heredabilidad estimada para producción de leche es relativamente baja 0.25%, sin embargo la heredabilidad para la composición de la leche es bastante alta 0.50% (Mercier y Vilotte)<sup>24</sup> ; opuestamente los factores ambientales como la nutrición y el manejo pueden tener mayor efecto sobre la producción que sobre la composición de la leche. (Ng-Kwai-Hang et al<sup>25</sup> y Ponce<sup>26</sup>).

<sup>23</sup> IMAGAWA, W et al. Control of mammary gland development. 1994. The Physiology of Lactation. 2nd edition. P 1033.

<sup>24</sup> MERCIER, J.C y VILOTTE, J.L. 1993. Structure and function of milk protein genes. Journal of Dairy Science. 76:3079-3098.

<sup>25</sup> NG-KWAI-HANG et al. 1984. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins in milk fat and protein production by dairy cattle. Journal Of Dairy Science. 67: 835.

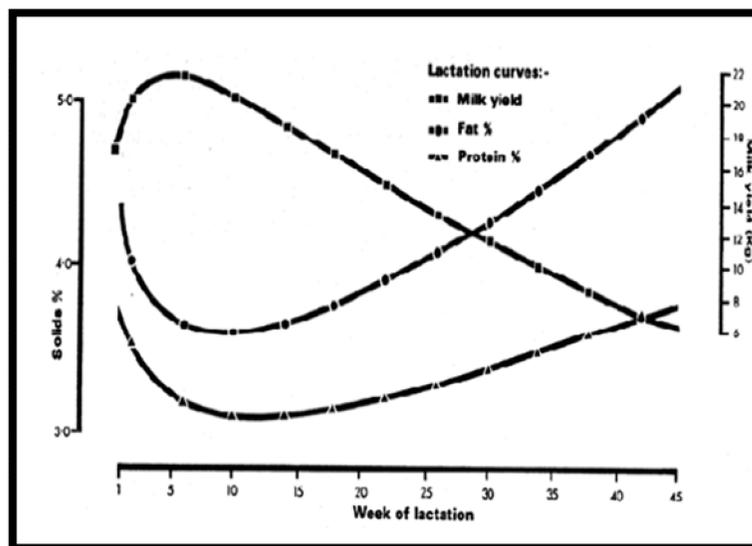
<sup>26</sup> PONCE, P. y BELL L. Estudio de la lactancia en vacas de la raza Holstein, Cebú y sus cruces en Cuba. Rev Salud Anim. 1986;8(1):73-88.

Existen notables diferencias entre razas con relación a los componentes mayores de la leche, donde se distingue la raza holstein con niveles de sólidos más bajos si se compara con otras razas como la jersey, que registra la mayor composición.

**4.3.1.2. Estado de lactancia.** El estado de la lactancia afecta la producción y la composición de la leche. Un aumento en el rendimiento de leche es seguido por una disminución en los porcentajes de grasa y proteína (Wilde y Hurley<sup>27</sup>, Akers<sup>28</sup> y Pérochon *et al*<sup>29</sup>).

Los cambios en los rendimientos productivos durante el ciclo de lactancia influyen de manera inversa a la composición. Generalmente, en el primer tercio de lactancia correspondiente con el pico de lactancia, se registran las menores concentraciones de grasa, proteína y sólidos de la leche, situación que se invierte al final de la lactancia. (Akers<sup>30</sup> y Hurley<sup>31</sup>).

**Figura 2. Comportamiento de la producción de leche, el porcentaje de grasa y proteína durante el ciclo de lactancia.**



Fuente: Adaptado de Wood, 1976.

<sup>27</sup> WILDE, C.J. y HURLEY, W.L. 1996. Animal models for the study of milk secretion. *Journal of Mammary Gland Biol.* 1:123-134.

<sup>28</sup> AKERS, R.M. 1990. Lactation physiology: a ruminant animal perspective. 159:96-111.

<sup>29</sup> PÉROCHON, L et al. 1996. Lactation curves of dairy cows with emphasis on individual variability *Journal of Animal Science.* 63: 189-200.

<sup>30</sup> AKERS, R.M. 1990. *Íbid*

<sup>31</sup> HURLEY, W.L. 2000. *Lactation biology.* University Press, University of Illinois. Urbana Champaign.

**4.3.1.3. Época del año.** Los porcentajes de grasa y proteína son más altos durante el invierno y más bajos durante el verano (Dahl *et al*)<sup>32</sup>. Esta variación está relacionada con los cambios en la disponibilidad y calidad forrajera (Pérocho *et al*)<sup>33</sup>.

**4.3.1.4. Número de lactancias y edad.** Los niveles de producción de leche aumentan con las sucesivas lactancias del animal, obteniéndose los mayores volúmenes de producción entre la tercera y la cuarta lactancia, lo que depende en gran medida de la edad en la que el animal empieza su vida reproductiva y el manejo de la misma durante su vida productiva (Ponce<sup>34</sup>, Imagawa *et al*<sup>35</sup> y Aranda *et al*<sup>36</sup>).

Mientras el contenido de grasa en la leche permanece relativamente constante, el contenido de proteína disminuye gradualmente con el progreso de la edad (Wilde y Hurley)<sup>37</sup>. Según Rodríguez en un estudio realizado en rebaños holstein, indicaron que el contenido de la proteína en leche disminuye de 0.02 a 0.05 unidades por lactancia.

#### **4.3.2. Factores Nutricionales**

**4.3.2.1. Alimentación.** Es un factor fundamental en la composición de la leche, por ende es necesario proporcionar raciones equilibradas y debidamente calculadas. Si el plano nutricional de acuerdo a los requerimientos normales, se eleva un 25 – 35% aumenta el extracto seco magro, sin grasa en un 0.3%. Este cambio se debe a una alteración en el contenido proteico y a modificaciones en la caseína.

La subalimentación, además de disminuir el volumen de leche, conduce una reducción en la concentración proteica de la leche y a un incremento en la grasa.

---

<sup>32</sup> DAHL, G., CHASTAIN, J. y PETERS, R. 1998. Manipulation of photoperiod to increase milk production in cattle: biological, economic and practical considerations. Amer. Soc. Agric. p.p. 259-265.

<sup>33</sup> PEROCHÓN *et al.* 1996. Op.cit.

<sup>34</sup> PONCE, 1984. Op.Cit.

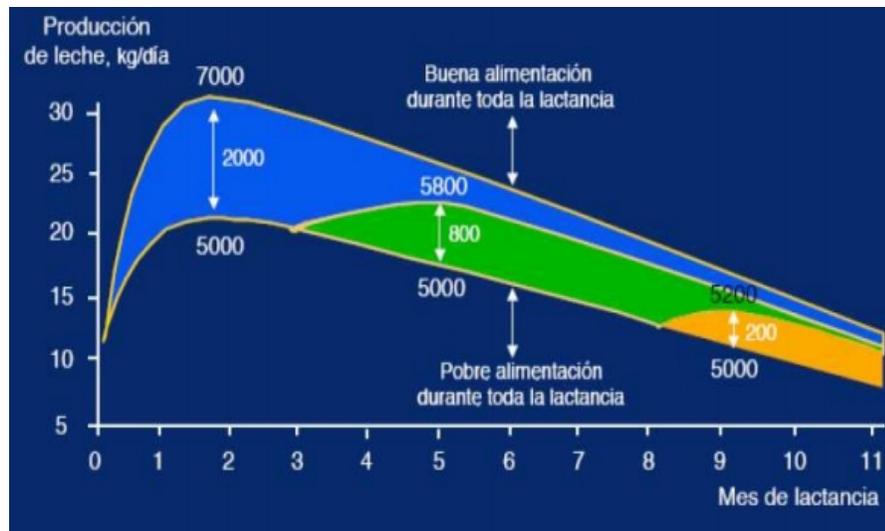
<sup>35</sup> IMAGAWA *et al.* 1994. Op.Cit.

<sup>36</sup> ARANDA, E. *et al.* 2001. Growth of heifers grazing stargrass complemented with sugar cane, urea and protein supplement. Livestock Production Science. 71:201-206

<sup>37</sup> WILDE y HURLEY. 1996. Op.Cit

La ingestión de gran cantidad de alimentos, además de incrementar el rendimiento, aumenta proporcionalmente la proteína de la leche y disminuye la grasa (Rivera e Insuasty)<sup>38</sup>

**Figura 3. Efecto de la alimentación en la producción de leche**



Fuente: Babcock Institute, 1994

#### 4.4. POLIMORFISMO GENÉTICO DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE

##### 4.4.1. La $\kappa$ -Cs: Ubicación, Expresión e Influencia en la Composición de la Leche

**4.4.1.1. Las caseínas sensibles al calcio.** El ligamiento de *loci* de variantes alélicas bovinas, concretamente  $\kappa$ 1-Cs y  $\kappa$ -Cs fue el primer descubrimiento de eventos de no independencia detectados entre ambas caseínas, hecho que llevaron a Grosclaude *et al*<sup>39</sup> a considerar que los genes que codifican para estas fracciones proteicas debían estar situados muy cerca dentro del cromosoma. Los genes que codifican las cuatro caseínas se encuentran en el cromosoma 6 (concretamente en la región 6q31) del ganado bovino, en un *locus* de 250 kilobases (kb) y organizados uno tras otro en el siguiente orden:  $\kappa$ 1-Cs,  $\kappa$ -Cs,  $\kappa$ 2-cs y  $\kappa$ -Cs. Los genes de las tres primeras se encuentran dentro del *locus* en una región de unas 140kb, mientras que el gen de la  $\kappa$ -Cs se encuentra en una

<sup>38</sup> RIVERA, J. e INSUASTY, E. 2008. Tecnología de Leche. Primera edición. Pasto.

<sup>39</sup> GROSCLAUDE, F., MAHE´, M. F. AND RIBADEAU-DUMAS. B. 1973. Structure primaire de la caseine  $\kappa$ 1-et de la caseine  $\kappa$ -bovine. Eur. J. Biochem.40:323–324.

región de unas 95-120kb (Requena y Aguera<sup>40</sup>; Farrell *et al*<sup>41</sup> ; Eigel *et al*<sup>42</sup>; Grosclaude<sup>43</sup>).

La  $\alpha_2$ -Cs constituye el 10% de la fracción caseínica en la leche bovina, y está formada por 207 aminoácidos (Farrell *et al*<sup>44</sup>). Su estructura primaria se determinó en 1977 por Brignon *et al*<sup>45</sup>; la cadena peptídica contiene 207 residuos que incluyen dos Cisteínas cercanas, en las posiciones 36 y 40. El número de residuos de Prolina es más bajo que el encontrado en otras caseínas y el de Lisina más alto. Se han localizado 13 grupos fosfato, 12 sobre Serina y 1 sobre Treonina, agrupados en tres áreas de la molécula (7-31; 55-66 y 129-143), lo que le da una gran sensibilidad a la acción del Calcio. La estructura primaria de esta proteína se muestra en la Figura 4.

**Figura 4. Estructura primaria de la  $\alpha_2$ -Cs A.**

1	10	20
H-Lys-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val- <b>SeP-<u>SeP-<u>SeP</u></u></b> -Glu-Glu-Ser-Ile-Ile- <b>SeP</b> -Gln-Glu-Thr-Tyr-		
21	30	40
Lys-Gln-Glu-Lys-Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro- <b>SeP</b> -Lys-Glu-Asn-Leu-Cys-Ser-Thr-Phe-Cys-		
41	50	60
Lys-Glu-Val-Val-Arg-Asn-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly- <b>SeP-<u>SeP-<u>SeP</u></u></b> -Glu-Glu-		
61	70	80
<b>SeP</b> -Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys-Ile-Thr-Val-Asp-Asp-Lys-His-Tyr-Gln-Lys-		
81	90	100
Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Gln-Phe-Tyr-Gln-Lys-Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr-Leu-Tyr-		
101	110	120
Gln-Gly-Pro-Ile-Val-Leu-Asn-Pro-Trp-Asp-Gln-Val-Lys-Arg-Asn-Ala-Val-Pro-Ile-Thr-		
121	130	140
Pro-Thr-Leu-Asn-Arg-Glu-Gln-Leu- <b>SeP-<u>Thr-<u>SeP</u></u></b> -Glu-Glu-Asn-Ser-Lys-Lys-Thr-Val-Asp-		
141	150	160
Met-Glu- <b>SeP</b> -Thr-Glu-Val-Phe-Thr-Lys-Lys-Thr-Lys-Leu- <b>Thr</b> -Glu-Glu-Glu-Lys-Asn-Arg-		
161	170	180
Leu-Asn-Phe-Leu-Lys-Lys-Ile-Ser-Gln-Arg-Tyr-Gln-Lys-Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-		
181	190	200
Lys-Thr-Val-Tyr-Gln-His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro-Lys-Thr-Lys-Val-		
201	207	
Ile-Pro-Tyr-Val-Arg-Tyr-Leu-OH		

Adaptado de: Brignon et al, 1977

<sup>40</sup>REQUENA Y AGUERA. 2007. Op.Cit.

<sup>41</sup> FARREL *et al*. 2004. Nomenclature of the proteins of cows milk- sixth revisión. *J. Dairy Science*. 87: 1641-1674.

<sup>42</sup> EIGEL *et al*. 1984. Nomenclature of protein of cow's milk: fifth revision. *J. Dairy Science*, 67: 1599-1631.

<sup>43</sup> GROSCLAUDE, F. 1988. Le polymorphisme genetique des principales lactoproteines bovines. Relations avec la quantite', la composition et les aptitudes fromageres du lait. *INRA Prod. Anim.* 1:5-17.

<sup>44</sup> FARREL *et al*. 2004. *Ibid*.

<sup>45</sup> BRIGNON *et al*. 1977. The complete amino acid sequence of bovine  $\alpha_2$ -casein. *FEBS Letters*. 76:274-279.

En los bovinos se han identificado molecularmente los alelos A, B, C y D para la  $\kappa$ 2-Cs (Ibeagha *et al*<sup>46</sup>; Farrell *et al*<sup>47</sup>; Bouniol *et al*<sup>48</sup>; Eigel *et al*<sup>49</sup>; Grosclaude<sup>50</sup>; Grosclaude<sup>51-52</sup>). Tras electroforesis en gel de urea alcalina, esta proteína migra entre la  $\kappa$ 1-Cs y la  $\lambda$ -Cs, y la más prevalente es la  $\kappa$ 2-Cs A, que ha servido de referencia para el estudio de esta caseína.

El ADNc de la molécula de  $\kappa$ 2-Cs bovina se secuenció en 1987 (Stewart *et al*)<sup>53</sup>. La secuencia proteica correspondiente mostró una única diferencia con la secuencia anteriormente establecida: Glicina en lugar de Glutámico en la posición 87.

En comparación con la  $\kappa$ 1-Cs, la fracción  $\kappa$ 2-Cs es más hidrofílica, contiene 3 grupos fosfoseril, puede contener puentes disulfuro inter o intramoleculares, y presenta un menor porcentaje de residuos de Prolina. Su estructura primaria sugiere la existencia de una zona polar N-terminal negativamente cargada, que contiene dos grupos fosfoseril, una zona interna hidrofóbica seguida de otra zona polar, con un grupo fosfoseril y, finalmente, una zona C-terminal hidrofóbica positivamente cargada. Esta estructura anfipática, debida a la distribución no uniforme de cargas positivas y negativas a lo largo de la cadena polipeptídica, hace que las características de asociación entre moléculas de la  $\kappa$ 2-Cs dependan, en gran medida, de la fuerza iónica del medio. Sin embargo, su grado de asociación es menos extenso que en el caso de la  $\kappa$ 1-Cs, probablemente como resultado de fuerzas de repulsión mayores y de una menor hidrofobicidad.

**4.4.1.2. Polimorfismo genético de la  $\kappa$ 2-Cs.** Las variantes de una proteína se diferencian solo por mínimas variaciones en su composición, a menudo se trata de la sustitución de uno o dos aminoácidos en la cadena peptídica. Estas representan

---

<sup>46</sup>IBEAGHA-AWEMU *et al.* 2007. Molecular characterization of bovine CSN1 $\kappa$ 2\*B and extensive distribution of zebu specific milk protein alleles in european cattle. *J. Dairy Science.* 90:3522-3529.

<sup>47</sup>FARREL *et al.* 2004. Op.Cit.

<sup>48</sup>BOUNIOL, C., PRINTZ, C. and MERCIER, J.C., 1993. Bovine  $\kappa$ 2-casein D is generated by exon VIII skipping. *Gene* 128, 289-293.

<sup>49</sup>EIGEL *et al.* 1984. Op.Cit.

<sup>50</sup>GROSCLAUDE *et al.* 1988. Op.Cit.

<sup>51</sup>GROSCLAUDE *et al.* 1974. Op.Cit.

<sup>52</sup>GROSCLAUDE *et al.* 1976. Polymorphisme des lactoprotéines de bovines Népalais. Polymorphisme des caseine  $\kappa$ 2-mineurs. *Ann. Genet.Sel. Evol.* 8:461-479

<sup>53</sup>STEWART, A.F., BONNING, J., BEATTIE, C.W., SHAH, F., WILLIS, I.M., and MACKINLAY, G. 1987. Complete nucleotide sequences of bovine  $\kappa$ 2- and  $\lambda$ -casein cADNs: Comparisons with related sequences in other species. *Mol. Biol. Evol.* 4:231-241.

varias formas de una misma proteína, es decir, se trata de variantes cuya síntesis está comandada por un gen en particular (Alais<sup>54</sup>; Lehninger y Nelson<sup>55</sup>).

Las variantes de la  $\kappa$ -Cs son controladas por genes autosómicos del cromosoma 6 y los bovinos heredan de cada progenitor un alelo, conformándose así los genotipos homocigotos o heterocigotos (Uffo *et al*)<sup>56</sup>.

La primera publicación acerca del polimorfismo genético de la  $\kappa$ -Cs se realizó en 1976 por Grosclaude<sup>57</sup>. Se designó como A la variante más frecuente en las razas europeas, que ha sido confirmado por estudios realizados por Osta<sup>58</sup> y Uffo *et al*<sup>59</sup>. Con la letra B se designó a una nueva variante descubierta en *Bos taurus* y *Bos indicus*. Así mismo, se observó una nueva variante en yaks (*Bos grunniens*) que fue designada como C. Entre las razas europeas de *Bos taurus* en Francia, se identificó posteriormente una nueva variante, denominada D en las razas Vosgienne y Montbéliarde (Grosclaude)<sup>60</sup>.

La variante D difiere de la variante A por una delección de 9 residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 59. Sin embargo, la secuenciación de ADN genómico no revela una delección, sino una sustitución, lo que sugiere que la delección en la secuencia aminoacídica se debe a la omisión del exón VIII, en una secuencia de 27 nucleótidos que codifican los residuos de aminoácidos del 51 al 59 (Bouniol)<sup>61</sup>. Y la variante C se diferencia de la variante A en las posiciones 33, 47, y 130 (Mahe y Grosclaude)<sup>62</sup>.

En la Tabla 2, se muestra el cambio de bases nitrogenadas que causa la diferencia entre las variantes A, B, C y D de la  $\kappa$ -Cs.

---

<sup>54</sup>ALAIS.1985.Op.Cit.

<sup>55</sup>LEHNINGER, A y NELSON, C. Principios de bioquímica. [En línea] 1995. Ed. Omega. Barcelona, España. Pp. 136 – 147.

<sup>56</sup>UFFO, O., MARTÍN-BURRIEL, I., MARTÍNEZ, S., RONDA, R., OSTA, R., RODELLAR, C y ZARAGOZA., P. 2006. Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. Animal Genetic Resources Information. 39: 15-24.

<sup>57</sup>GROSCLAUDE *et al.* 1976. Op.Cit.

<sup>58</sup>OSTA, R., S. MARCOS, I. MARTIN, E. GARCIA-MURO & P. ZARAGOZA. 1995. Caracterización genética de proteínas lácteas en ganado vacuno mediante análisis de ADN. VI Jornadas sobre producción animal. Vol. Extra, N°16, Tomo I.

<sup>59</sup>UFFO *et al.* 2006. Op.Cit.

<sup>60</sup>GROSCLAUDE *et al.* 1978. Op.Cit.

<sup>61</sup>BOUNIOL *et al.* 1993. Op.Cit.

<sup>62</sup>MAHÉ, M. F., AND F. GROSCLAUDE. 1982. Polymorphisme de la caseine  $\kappa$ 2 des bovines: Characterization du variant C du yak (*Bos grunniens*). Ann. Genet. Sel. Anim. 14:401–416.

**Tabla 2. Posiciones y diferencias en aminoácidos en las variantes alélicas A, B, C y D del gen de la s2-Cs.**

Proteína	Variante	Aminoácidos y su posición en la proteína			
		33	47	51-59	130
s2-Cs 207 aa	A	<i>Glu</i>	<i>Ala</i>		<i>Thr</i>
	B	Secuencia completa no ha sido determinada			
	C	<i>Gly</i>	<i>Thr</i>		<i>Ile</i>
	D	Delección			

Adaptado de: Farrel et al, 2004

**4.4.1.3. Gen de la s2-Cs.** El gen de la s2-Cs, se encuentra ubicado en el cromosoma 6, entre los exones VI y VIII, de acuerdo con la secuencia disponible en el NCBI<sup>63</sup> a través del Genbank sequence *M94327.1*, **GeneID:** 282209 (Figura 5).

**Figura 5. Secuencia nucleotídica variantes alélicas B, C y D de la fracción proteica s2-Cs.**

```

VARIANTE B (Exón VIII)
tcccctaaaagtctcttgcca aaaaca aacaggaataatgataaaa acaaaccaaaat agt gagat accttggcatttt aaatct acc
ataaaaactgagaactcgtatttgctttgtttagacgatggaacatgctctccagtgaggt aagcatactttagtatcaacagaaaat
cttttagttagtaaaaaacagaat atgacctaaactattgtctttaaaataaattttctccagtgaggtctagaactgt
VARIANTE C (Exon VI)
agagccattttgagccaca atgta aagcagaat atcttgaaagaatttcttgta aagattcatcatctttactttcttcttaattctg
tactctttgttca caaaatcatatctttcttctgataaa ctgtatgctcaagatgtatgtattacactacattcaataaatgttatctttt
ggctttgtttctttt aggagaaccttctccacattctgcaaggtatacagatttca catctgt agcataacgtgaagtaaaatattata
gtatttgaactacactgaaattaacctctatttgaaaat atattcaaatcaatcaaaactgaaaaccagattatctttaaacaatgag
accaaaatt agtcttctcaattctatga ctaaattaaatgaagaaa atatctttgcatgaatcaactaacacatttgattcccag
VARIANTE D (Exón VII)
aaaacaagcagcca agaagcctggtgcattgcttttatttaactcttttaactt atcatactaatgatcatggttgaataagagacata
tcttgagtaaatattaacatgcaaagaataatgttgcatcttcttggt aaccagatttatattgtatatatttttttcaaggaaattc
tatcggctcatctagtgaggt aagagacctttcttttaacatcaaatagca agttcatccaaaatagattttcagcagtggtagtaattt
gttgtaacatcgcaaatagggtgagcaatggagaatcattacccaacttaatgtcactggggagactgggaa

```

Secuencia blanco  
Cebador específico

<sup>63</sup> NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2011. The complete sequence of the gene encoding bovine alpha s2-casein [En línea] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/16279>

#### 4.5. RELACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA $\kappa$ -Cs, LA PRODUCCIÓN Y EL RENDIMIENTO EN CUAJADA

El papel de la  $\kappa$ -Cs dentro de la micela de caseína no se ha estudiado en detalle, en gran parte por la falta de información estructural de la molécula. Teniendo en cuenta que esta proteína fue la última en estudiarse, aún no se reportan trabajos en lo que respecta a su relación con las variables productivas y su rendimiento industrial.

Sin embargo, dentro de estudios realizados se ha encontrado que el interés en la utilización de esta molécula en los productos lácteos y la nutrición se enfoca en tres áreas de trabajo: actividad, funcionalidad dentro de la industria láctea y la nutrición en términos de captación de calcio (Farrell *et al*)<sup>64</sup>. Por ejemplo, en ensayos in vitro, se ha encontrado que la  $\kappa$ -Cs tiene propiedades antibacteriales únicas en la región C- terminal.

#### 4.6. SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES

A lo largo de los años la selección convencional ha sido el método aplicado por los distintos programas de mejoramiento. Medina *et al*<sup>65</sup> afirman que la base de la selección asistida por marcadores moleculares consiste en conjugar la variabilidad fenotípica y genotípica como fuente de información de la variabilidad existente y utilizar como criterio de selección una variable genética, en este caso marcadores moleculares asociados a la característica de interés.

Los marcadores genéticos, son fragmentos de ADN que sirven de referencia para detectar la transmisión de un segmento de cromosoma de una generación a otra. Con el desarrollo de la PCR (Mullis y Faloona<sup>66</sup>; Saiki<sup>67</sup>), se adelantaron nuevos métodos de detección de marcadores moleculares, definidos como todo aquel fenotipo molecular proveniente de un gen expresado, como en el caso de las isoenzimas o las proteínas (marcadores bioquímicos), o de un segmento

---

<sup>64</sup> FARRELL JR, H. M., MALIN, E.L., BROWN, E.M., and MORA-GUTIERREZ, A. 2009. Review of the chemistry of  $\kappa$ - casein and the generation of a homologous molecular model to explain its properties. *J. Dairy Science*. 92: 1338-1353.

<sup>65</sup> MEDINA, M., YANES, M.L. y ZAFFARONI, C. 2001. Selección Asistida por marcadores moleculares vs selección fenotípica convencional. Curso optativo

<sup>66</sup> MULLIS, K. y FALOONA, F. 1987. Specific synthesis of ADN in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Emzymol*. 55:335-350.

<sup>67</sup> SAIKI, R. K., D.H. GELFAND, S. STOEFFEL, S.J. SCHARF, R. HIGUCHI, G.T. HORN, K.B. MULLIS Y H. H. ERLICH 1988. Primer-directed enzymatic amplification of ADN with thermostable ADN polymerase. *Science*. 239:487-491.

específico de ADN (correspondiente a regiones expresadas o no del genoma) (Ferreira y Grattapaglia)<sup>68</sup>.

La clasificación por los criterios moleculares considera dos grupos de marcadores: las secuencias múltiples que incluyen inserciones y deleciones como el caso de los RFLP y las secuencias de nucleótido sencillo o único (López *et al*)<sup>69</sup>.

**4.6.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa.** La PCR es una técnica para la síntesis "in Vitro" de secuencias específicas de ADN, se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5'→ 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena.

El procedimiento consiste en realizar ciclos repetitivos de desnaturalización del ADN molde, el alineamiento de dos oligonucleótidos con las secuencias complementarias el ADN de interés, y la extensión mediante la actividad de una ADN polimerasa. Los oligonucleótidos se alinean en los extremos del fragmento del ADN molde que se desea amplificar, de tal manera que después de la síntesis de la cadena complementaria se desnaturaliza con calor después de repetir unas 30 veces este ciclo, lo que da lugar a una amplificación exponencial.

**4.6.1.1. Componentes de la reacción.** Para la realización de esta técnica se necesita el ADN molde, magnesio, un amortiguador o buffer, oligonucleótidos, los desoxirribonucleótidos de trifosfato (dNTPs), la enzima ADN polimerasa y agua.

Barrera *et al*<sup>70</sup> describen cada componente y su utilización dentro de la reacción:

✓ **ADN molde.** La cantidad de ADN puede ser de un nanogramo (ng) hasta un mínimo de 20ng, cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas.

✓ **Cloruro de Magnesio.** Tanto el ión magnesio como el manganeso tienen una función crítica en la reacción, la concentración oscila entre 0.5 y 2.5 minimolar (mM). La concentración de MgCl<sub>2</sub> debe optimizarse para cada ensayo en

---

<sup>68</sup> FERREIRA, M.A. y GRATTAPAGLIA, D. 1995. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia, Ed. Embrapa. p.p.17

<sup>69</sup> LÓPEZ, R., CANO, H., CHASSIN, O. y ZAVALA, M. 2007. Selección asistida por marcadores genéticos moleculares en especies animales de interés pecuario. Ciencia Nicolaita. 46:43-55. [En línea] URL: <http://es.scribd.com/doc/18940078/Selección-Animal-Asistida-por-marcadores-moleculares>

<sup>70</sup> BARRERA, H.A., ORTÍZ, R., ROJAS, A., RESÉNDEZ, D. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa: una nueva época dorada en la biología molecular. Ciencia y Desarrollo. 18(108):50-60

particular, ya que puede tener efecto tanto en la especificidad como en el rendimiento de la reacción. En general, concentraciones insuficientes de  $Mg^{+2}$  dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas.

✓ **Amortiguador o buffer.** La solución amortiguadora para la reacción se emplea, comúnmente, concentrada diez veces, y por lo general incluye Tris-HCl (pH=8.4 a temperatura ambiente), KCl, gelatina y  $MgCl_2$ .

Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes, los cuales en la práctica aumentan la especificidad y fidelidad de la reacción, tales como el dimetilsulfóxido (DMSO) añadido para disminuir la estructura secundaria del ADN, detergentes como el tween 20 o el Tritón X-100, que ayudan a estabilizar la enzima, y, finalmente, el polietilenglicol (PEG), el glicerol, la formamida, o la seroalbúmina bovina, entre otros; aunque en ningún caso estos últimos son imprescindibles.

✓ **Oligonucleotidos o cebadores.** Se deben seleccionar dos oligonucleótidos, que hibriden con regiones del ADN molde y que estén localizados en los extremos de la región de interés. La longitud de los oligonucleótidos es de 15 a 30 nucleótidos y su secuencia debe presentar la mayor similitud posible con la secuencia del ADN blanco, ya que de ello depende el éxito y la especificidad de la amplificación.

✓ **Desoxiribonucleósidos trifosfatados (dNTPs).** Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP; distinguibles por sus bases nitrogenadas) son los ladrillos con los que se construyen las nuevas cadenas de ADN (Figura 4). La variación en su concentración afecta la especificidad y fidelidad de la reacción. Concentraciones altas de los mismos hacen disminuir la fidelidad con la que la polimerasa efectúa su trabajo, e incluso pueden llegar a inhibir su actividad. También afecta a la fidelidad de la reacción el uso de concentraciones desbalanceadas de estos cuatro ingredientes, siendo las concentraciones usuales, en la mayoría de los casos, entre 0.2 a 1 mM.

Los dNTPs pueden captar iones de magnesio por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación, aconsejándose que la concentración de  $Mg^{+2}$  sea 0.5 a 1 mM superior a la concentración de los dNTPs.

✓ **Enzima ADN polimerasa.** Se deben emplear polimerasas que sean capaces de actuar a altas temperaturas, la más conocida y utilizada es la *Taq ADN polimerasa*, proveniente de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*<sup>71</sup>. Su temperatura óptima de catálisis oscila alrededor de los 72°C, manteniéndose estables por encima de los 92°C.

---

<sup>71</sup> SAIKI, R et al. 1988. Op.Cit.

Su fidelidad de replicación depende de la concentración del ión  $Mg^{+2}$  y de los dNTPs, así como de que exista o no balance en la concentración de estos últimos.

✓ **Agua.** El agua se usa como solvente del resto de los componentes de la reacción y se requiere al menos destilada.

**4.6.1.2. Etapas de la Reacción en cadena de la polimerasa.** A continuación se describe de forma detallada el tiempo y la temperatura de cada una de las etapas de un ciclo PCR (Saiki *et al*<sup>72</sup>).

✓ **Desnaturalización.** Se trata de una etapa crítica, ya que es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente. Para lograrlo de manera adecuada se recomiendan temperaturas de 94°C durante 30 segundos a 1 minuto. Si tiene alto contenido de G + C puede aumentar el tiempo o la temperatura.

Sin embargo hay que tener en cuenta que la actividad de la enzima decrece de manera muy rápida a partir de los 95°C, por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación.

En la práctica se suele añadir un período de desnaturalización antes de comenzar los ciclos para asegurarse que se produce a lo largo de toda la muestra de ADN. Esta etapa suele ser por 5 minutos a 94°C.

✓ **Hibridación.** En este caso, la temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los oligonucleótidos: la composición de bases, el tamaño y la concentración.

En la práctica, la temperatura de hibridación puede oscilar entre 45°C y 65°C, durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 1 minuto. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad ya que disminuye las uniones incorrectas de los iniciadores con la hebra molde.

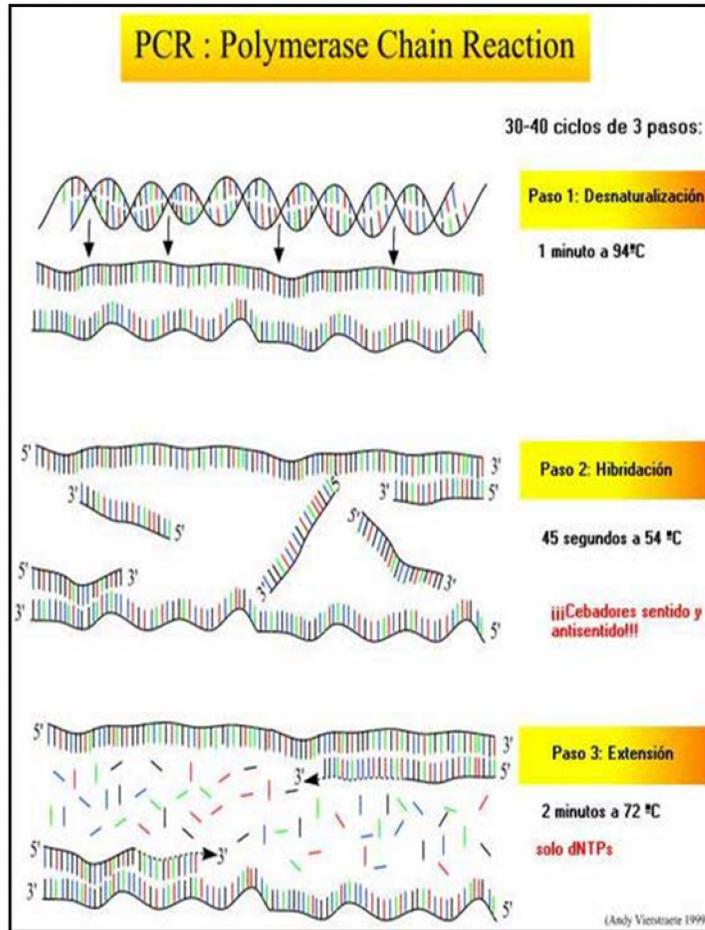
✓ **Elongación.** En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72°C. Teóricamente esta temperatura puede variar entre 70-72°C. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación. Se puede estimar un tiempo de 1 minuto para elongar 1 Kb

En la práctica es normal que al final de todos los ciclos se realice una última elongación de 5' a 72°C.

---

<sup>72</sup> SAIKI et al. 1988. Íbid

Figura 6. Pasos básicos de la PCR.



Tomado de Viestreacte, 1999.

#### 4.6.2. Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción – RFLP.

El análisis de los RFLP fue una de las primeras técnicas que se usó ampliamente para detectar variaciones a nivel de la secuencia del ADN. Esta tecnología se basa en el principio de que es posible comparar patrones de bandas generados a partir de moléculas de ADN de diferentes individuos que han sido sometidas a digestión con enzimas de restricción. Las diversas mutaciones que afectan a las moléculas de ADN de muchas maneras producen fragmentos de longitud variable. Estas diferencias de longitud de los fragmentos pueden observarse una vez realizadas la electroforesis, la hibridación y la visualización.

## 5. DISEÑO METODOLÓGICO

### 5.1. DETERMINACIÓN DE LAS VARIANTES ALÉLICAS PARA EL GEN DE LA $\beta$ -CS.

**5.1.1. Localización y Tamaño de la Muestra.** El presente trabajo se realizó en el municipio de Pasto, departamento de Nariño, región que corresponde a la zona ecológica bosque pluvial tropical<sup>73</sup>. La ciudad de Pasto está ubicada a 2.527 m.s.n.m., con coordenadas, 1°12'41" latitud norte y 77°16'52" longitud oeste, precipitación media de 960 mm/año y una temperatura promedio de 14°C (IGAC)<sup>74</sup>.

Para la identificación molecular de las variantes alélicas del gen de la  $\beta$ -CS, se tomaron 50 muestras de sangre de hembras holstein distribuidas en 10 hatos. Los animales se escogieron de un total de 5647 hembras holstein registradas en el pedigrí del PMG<sup>75</sup>, de las cuales 290 fueron seleccionadas como donantes de embriones por mayor mérito genético a través de un modelo animal multicarácter en el distrito lechero de Pasto en el Departamento de Nariño, a partir de estas, se escogieron las 50 hembras para realizar esta investigación.

**5.1.2. Materiales y equipos.** Para el trabajo en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Animal, fue necesario seguir el protocolo de bioseguridad establecido, donde para la realización de la genotipificación se utilizó: bata, tapabocas, guantes de nitrilo y gafas protectoras. Los materiales empleados fueron: jeringas, algodón, tarjetas FTA®, papel aluminio, puntas para Micropipetas (blancas, amarillas y azules), papel desechable y tubos *ependorf* de 1.5 y 0.2  $\mu$ l. Los reactivos utilizados fueron: agua estéril, agua IDT o de grado molecular, reagente FTA®, buffer TE 1X, Kit comercial de PCR (*Taq*- polimerasa, buffer PCR y Magnesio), dNTP's, cebadores específicos, enzimas de restricción *MbolI*, *NlaIV*, *MnII*, buffer TAE 1X, bromuro de etidio, agarosa, marcadores de peso molecular de 50 y 100 pb y buffer de carga para electroforesis. Los equipos empleados fueron: sacabocados, plantilla para corte de discos, micropipetas, microcentrífuga, termociclador, freezer, nevera, horno microondas, balanza electrónica, transiluminador, cámara de electroforesis horizontal y cámara fotográfica.

---

<sup>73</sup>Evaluación de los recursos forestales mundiales. 2000 [Zonas ecológicas de América del Sur](http://www.fao.org/DOCREP/005/Y1997S/y1997s1d.htm) BP. Capítulo 42: <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y1997S/y1997s1d.htm>

<sup>74</sup> INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI. 2010. [En línea] URL: <http://www.igac.gov.co>.

<sup>75</sup> PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO, 2009. Op.Cit.

**5.1.3. Toma de Muestras de Sangre.** Se extrajeron 2 c.c. de sangre de la vena coccígea media, para su conservación y posterior obtención de ADN se utilizaron tarjetas FTA® de Whatman Bioscience<sup>76</sup> (Figura 9), las cuales fueron protegidas con papel aluminio para evitar contaminación o deterioro y se llevaron al Laboratorio de Mejoramiento Genético Animal, ubicado en la Ciudadela Universitaria Torobajo de la Universidad de Nariño en la ciudad de Pasto.

Las tarjetas FTA®<sup>77</sup>, simplifican la colección, transporte, almacenamiento y procesamiento del ADN. Las tarjetas están impregnadas con una fórmula química patentada que rompe las membranas celulares y desnaturaliza las proteínas; de esta forma, el ADN es atrapado físicamente, siendo inmovilizado y estabilizado. Una vez inmóvil, el ADN queda protegido de nucleasas, oxidación, daño bacteriano y hongos, lo que permite el almacenamiento a temperatura ambiente por más de 10 años (Burgos *et al*<sup>78</sup>).

**Figura 9. Toma de muestras de sangre**



**5.1.4. Extracción de ADN.** Para la extracción de ADN se utilizó el KIT FTA® de Whatman Bioscience<sup>79</sup>, siguiendo las recomendaciones de la casa fabricante como se indican a continuación: en el laboratorio, con un sacabocados (*Micro puncher*) se extrajo un disco de 1.2 mm de diámetro, el cual se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 µl. El disco se lavó tres veces con 200µl de buffer de extracción

<sup>76</sup> WHATMAN. 2003. Room temperature simple collection, storage and purification of nucleic acids. [En línea] URL: [http://www.touchbriefings.com/pdf/16/fdd031\\_t\\_whatman.pdf](http://www.touchbriefings.com/pdf/16/fdd031_t_whatman.pdf).

<sup>77</sup> WHATMAN. 2002. FTA® protocols: collect transport, archive and access nucleic acids all at room temperature. 2002. [En línea] URL: [http://www.cosmobio.com.ar/docs/fta %20protocols](http://www.cosmobio.com.ar/docs/fta%20protocols).

<sup>78</sup> BURGOS, W., ROSERO, C., CARDENAS, H. y SOLARTE, C. 2007. Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA® para la especie *Cavia porcellus* Lin. (Rodentia: Caviidae). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.20(1):67-72

(FTA® Purification Reagent) y luego dos veces con 200µl de buffer TE (Tris HCl 1M - pH=9.0, EDTA 0.5M – Ph=8.0). Cada lavado se realizó durante cinco minutos mediante inversión a temperatura ambiente (Figura 10). Una vez terminado el proceso de aislamiento de ADN, los discos se pasaron a tubos eppendorf de 0.2µl y se secaron por 10 minutos a 56°C en el termociclador My Cycler de Biorad ®.

**Figura 10. Proceso de extracción de ADN a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA.**



**5.1.5. Determinación de las Variantes Alélicas.** La genotipificación de cada individuo se llevó a cabo mediante la técnica PCR-RFLP de acuerdo al protocolo expuesto por Ibeagha *et al*<sup>80</sup>, con modificaciones y ajustes realizados en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Animal de la Universidad de Nariño. Esta técnica reúne la PCR, con el marcador molecular RFLP, método que expresa diferencias del ADN reconocidas por enzimas de restricción particulares (endonucleasas).

**5.1.5.1. PCR-RFLP.** Para la amplificación del gen de la s2-Cs se utilizó una muestra de ADN extraída con el Kit FTA®<sup>81</sup> a una concentración aproximada de 50 ng. Las condiciones de amplificación de los fragmentos de las variantes de la s2-Cs se indican en la Tabla 3.

---

<sup>80</sup> IBEAGHA *et al*, 2007. Op.Cit.

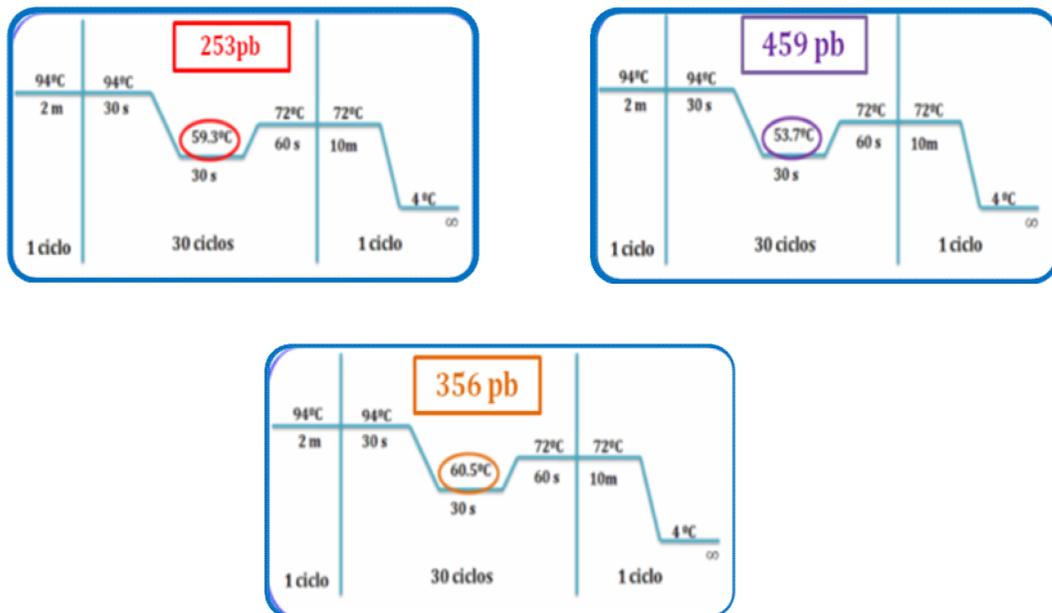
<sup>81</sup>WHATMAN, 2003. Op.Cit.

**Tabla 3. Protocolo de Amplificación por PCR para la s2-Cs**

Componentes	Solución Stock	[ ] Trabajo	Volumen (µl)
ADN	50ng		1 disco
Buffer PCR	5X	1X	3
d'NTPs	20mM	0.3mM	0.25
Cebador Directo	100 mM	1mM	0.15
Cebador Reverso	100 mM	1mM	0.15
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5mM	0.9
Taq Polimerasa	500 U/µl	3.3U/ µl	0.1
Agua mili-Q			10.45
<b>Volumen Total de reacción 15 µl</b>			

En un Termociclador My Cycler de Biorad se llevo a cabo la amplificación de las muestras para las variantes B, C y D con el siguiente programa: se sometió a un ciclo de desnaturalización por 2 minutos a 94°C, después 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 59.3°C, 53.7°C y 60.5° por 30 segundos (para las variantes B, C y D respectivamente), 72°C por 60 segundos y una elongación final de 72°C por 10 minutos (Figura 11).

**Figura 11. Condiciones de Amplificación para PCR del gen de la s2-Cs en un termociclador**



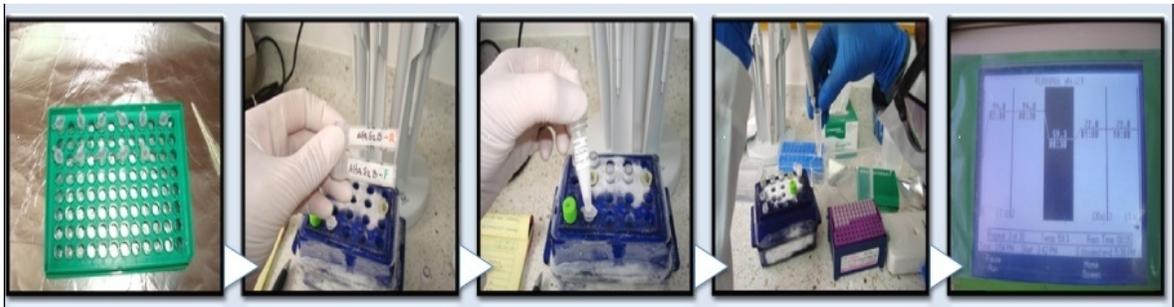
En la técnica PCR, se utilizaron cebadores específicos (IDT- Integrate ADN Technologies) que se relacionan en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Secuencias de cebadores y fragmentos esperados en la amplificación para el gen de la s2-Cs**

Fracción proteica	Cebadores	Fragmento esperado
s2-Cs	6090 Directo 5' CCTAAAAGTCTCTTGCCATC 3'	253pb
	6342 Reverso 5' ACAGTTCTAGACTCACTGGAGA 3'	
	7360 Directo 5' AGAGCCATTTTTGAGCCACA 3'	459 pb
	7818 Reverso 5' CTGGGAATCAAATGTGTTAG 3'	
	8675 Directo 5' AAAACAAGCAGCCAAGAAGC 3'	356 pb
	9030 Reverso 5' TTCCAGTCTCCCCAGTATG 3'	

Adaptado Ibeagha et al, 2007

**Figura 12. Proceso PCR.**



**Marcador Molecular RFLP.** Para la digestión de productos de PCR se utilizaron las enzimas *MbolI*, *NlaIV* y *MnI* (Fermentas), junto a una solución amortiguadora o buffer, las endonucleasas cortan en los sitios de restricción, como se indica en el Cuadro 4 determinando los cuatro posibles genotipos AA, BB, CC y DD.

**Cuadro 4. Cortes de las enzimas para el gen de la s2-Cs**

ENZIMA	<i>MbolI</i>	<i>NlaIV</i>	<i>MnI</i>
BUFFER	B	Tango	G
CORTE	5'...GAAGA(N)8 ...3' 3'...CTTCT (N)7 ...5'	5'...GGN NCC...3' 3'...CCs NGG...5'	5'...CCTC(N)7 ...3' 3'...GGAG(N)6 ...5'

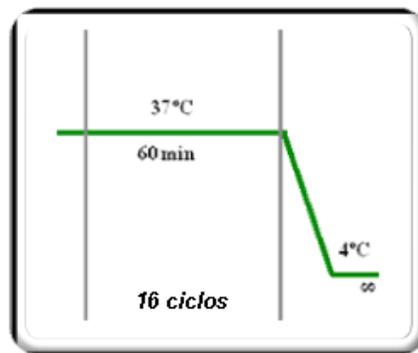
En la Tabla 4 se indica el protocolo de digestión que se utilizó para obtener el marcador molecular RFLP.

**Tabla 4. 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 (IDT)	-	-	18
Buffer	10 X	0,625X	2
Enzimas	10U/ $\mu\text{L}$	0,625 U/ $\mu\text{L}$	2
<b>volumen total de reacción 32 <math>\mu\text{l}</math></b>			

Los 32 $\mu\text{l}$  de solución se sometieron a digestión durante 16 horas a 37°C, en el termociclador My Cyclor de Biorad. En la Figura 3 se muestran las condiciones de digestión descritas por Ibeagha *et al*<sup>82</sup>, y modificadas en el laboratorio de mejoramiento genético animal de la Universidad de Nariño.

**Figura 13. Condiciones de Digestión para el Marcador RFLP del gen  $s2-Cs$**

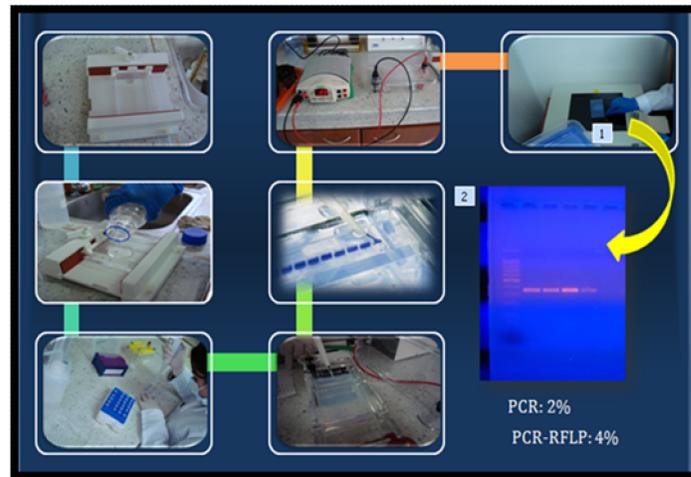


**Electroforesis:** Los resultados de la PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, TAE 1X (0,04 M Tris Base, 0,017 M Acetato 0,001M EDTA) y teñidos con 0.5mg/ml de bromuro de etidio. Se emplearon 5 $\mu\text{l}$  de producto de PCR con 2 $\mu\text{l}$  de buffer de carga (0,05% Azul de Bromofenol, 0,05% Xylenecianol, 60% Glicerol), Los geles fueron corridos a 110 voltios, durante 40 minutos, utilizando electroforesis horizontal (Cámara GT MINI SUB-CELL, BIORAD). La visualización se realizó mediante rayos ultravioleta en un

<sup>82</sup>IBEAGHA et al. 2007. Op.Cit.

transiluminador y su lectura se realizó con ayuda de un marcador de peso molecular de 50 y 100pb (*Fermentas*). Los resultados de la PCR-RFLP se analizaron en geles de agarosa al 4%. Igualmente se realizó el tratamiento de imágenes mediante un registro fotográfico de cada gel, para corroborar los resultados obtenidos durante el estudio.

**Figura 14. Proceso de electroforesis en gel de agarosa**



## 5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

**5.2.1. Análisis de Datos Moleculares.** La estimación de la diversidad genética se realizó con el programa Tools For Population Genetics Analysis, TFPGA (Miller)<sup>83</sup>, se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas, además de la heterocigosidad observada y esperada y el equilibrio Hardy-Weimberg para la  $s_2$ -Cs.

<sup>83</sup> MILLER, M. 1997. Tool for Population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

## 6. PRESENTACIÓN Y DISCUSION DE RESULTADOS

### 6.1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES ALÉLICAS DE LA $s2-Cs$

**6.1.1. Toma de Muestras de Sangre y extracción de ADN.** El transporte de las muestras desde la finca al laboratorio mediante el uso de tarjetas FTA® resultó eficiente, ya que algunas zonas son de difícil acceso y la utilización de otros métodos como la toma de sangre en tubos EDTA resulta de mayor dificultad en este tipo de investigaciones.

El kit FTA® aseguró la concentración óptima de ADN para la amplificación del gen de la  $s2-Cs$ , puesto que se observó amplificación positiva y sin ambigüedad para el total de la población en estudio.

Lo anteriormente expuesto, confirma que el uso del kit FTA® para la extracción y conservación de ADN es un método adecuado a pesar de tener altos costos por ser un kit comercial (Solarte *et al*<sup>84</sup>).

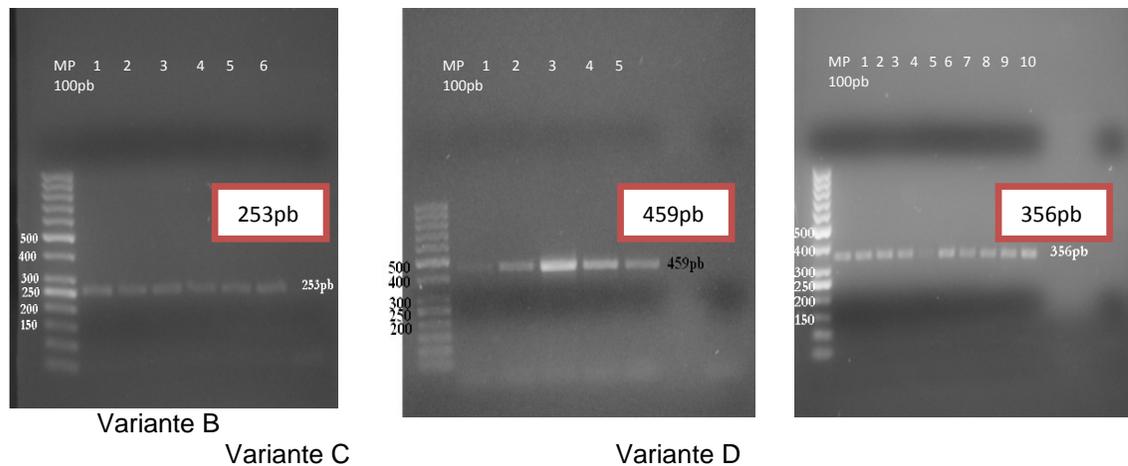
**6.1.2. Amplificación por PCR e Identificación de los Genotipos de la  $s2-Cs$ .** Mediante la técnica PCR se obtuvo una amplificación positiva, encontrándose un fragmento de 253 pb para el alelo B, 459 pb para el alelo C y 356 pb para el alelo D, de acuerdo con lo descrito por Ibeagha *et al*<sup>85</sup>, tal como se indica en la Figura 15.

---

<sup>84</sup> SOLARTE *et al.* 2009. *Op.Cit.*

<sup>85</sup>IBEAGHA *et al.* 2007. *Op.Cit.*

**Figura 15. Visualización vía PCR para las variantes alélicas B, C y D de la s2-Cs**



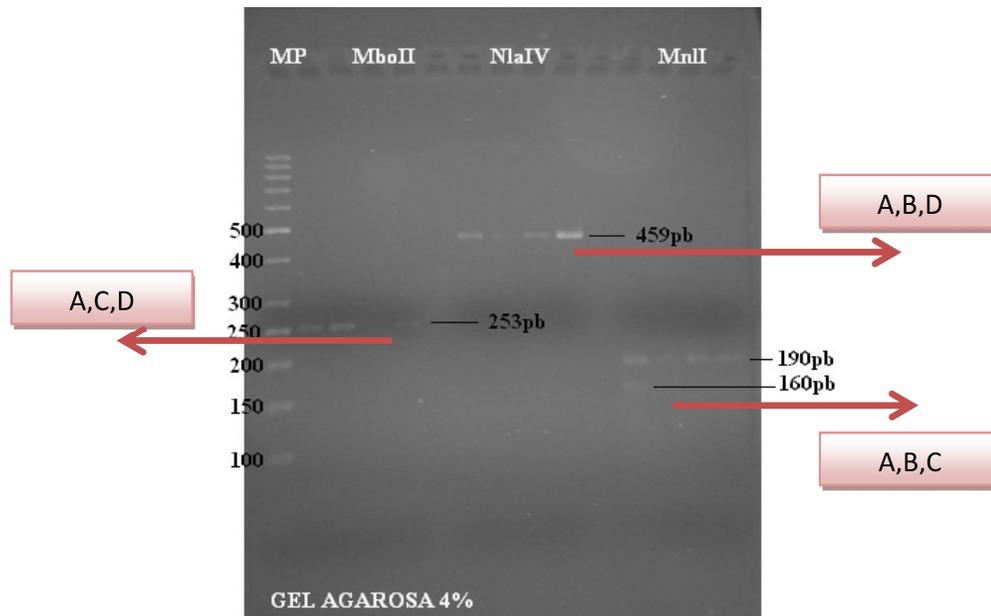
Para identificar las variantes correspondientes a esta proteína, fue necesario realizar la digestión con tres enzimas de restricción *MbolI*, *NlaIV*, *MnII*, con las cuales fue posible observar un fragmento de 253 pb utilizando la enzima *MbolI* cuyo resultado puede interpretarse como alelos A, C ó D. Por otra parte, con la enzima *NlaIV*, se observa un corte de 459 pb, el cual corresponde a los alelos A, B ó D. Finalmente, para la enzima *MnII*, se aprecia claramente dos cortes de 196 y 169 pb correspondientes a los alelos A, B ó C, es decir, que para la identificación de las variantes de la s2-Cs, fue necesario observar y comparar los alelos de cada digestión en cada individuo y de esta manera identificar el genotipo correspondiente para esta proteína láctea (Solarte *et al*<sup>86</sup>)

En la Figura 16 se presentan los fragmentos característicos de las formas alélicas para el gen de la s2-Cs, que a su vez corresponden a los polimorfismos de restricción obtenidos después de la digestión enzimática. Los polimorfismos fueron comparables, en peso molecular, a los obtenidos previamente por Ibeagha *et al*<sup>87</sup>.

<sup>86</sup>SOLARTE *et al.* 2011. Polimorfismo de las fracciones caseínicas de la leche en bovinos holstein del Trópico Alto de Nariño. *Livestock Research for Rural Development*. 23(6): artículo 136. [En línea] URL <http://www.lrrd.org/lrrd23/6/sola23136.htm>

<sup>87</sup>IBEAGHA *et al.* 2007. *Ibid.*

**Figura 16. Fragmentos de restricción para las variantes alélicas de la  $\beta$ 2-Cs.**



## 6.2. DIVERSIDAD GENÉTICA

**6.2.1. Cálculo de las Frecuencias Alélicas y Genotípicas.** Los resultados del análisis genético evidencian la fijación del alelo A con una frecuencia igual a uno, que a su vez representa el 100% de genotipos homocigotos AA observados en la población. Este hecho se puede explicar porque en esta región se ha venido realizando un tipo de selección indirecta a favor del volumen de producción de leche por lactancia.

Estos resultados son coincidentes con los reportados por Heck *et al*<sup>88</sup>, Osta<sup>89</sup> y Uffo *et al*<sup>90</sup> quienes afirman que el alelo A está fijado en la raza holstein Frisian Holandés, en la población española rubia gallega y en tres razas cubanas, estos mismos autores señalan que en las razas parda alpina, asturiana de los valles y frisona el alelo A fue muy frecuente (0.93-0.99), asimismo Grosclaude *et al*<sup>91</sup> observaron valores ligeramente superiores en las razas autóctonas francesas montbéliarde y vosgiènhe.

<sup>88</sup> HECK, J., SCHENNINK, A., VAN VALENBERG, H., BOHENVIUS, H., VISKER, H., VAN ARENDONK, J. and VAN HOOIJODONK, A. 2009. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 92:1192-1202.

<sup>89</sup> OSTA *et al*. 1995. *Op cit*.

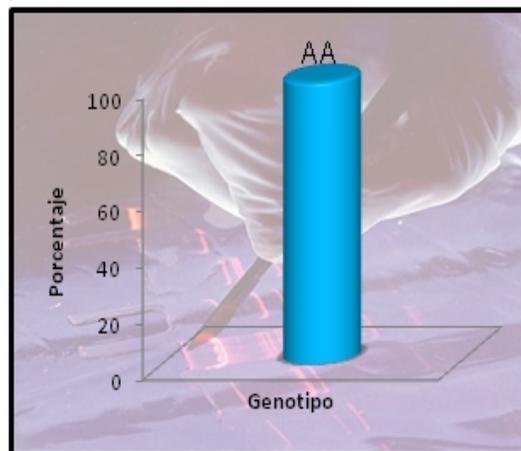
<sup>90</sup> UFFO *et al*. 2006. *Op.Cit*.

<sup>91</sup> GROSCLAUDE *et al*. 1988. *Op.Cit*.

Resultados similares han sido descritos por Ikonen<sup>92</sup> y Erdhardt<sup>93</sup> en el mismo año, quienes encuentran el alelo A prácticamente fijado en las razas ayrshire finlandesa (0.991) y limpurger alemana (0.984).

En la Figura 17 se muestra el histograma de frecuencias genotípicas para la fracción proteica en estudio.

**Figura 17. Histograma de frecuencias genotípicas para la s2-Cs**



**6.2.2. Heterocigosidad.** Los valores observados y esperados de heterocigosidad fueron iguales a cero. Estos resultados muestran un déficit de heterocigotos en la población de estudio, por ende ausencia de variabilidad para el gen de la s2-Cs en el distrito lechero de Pasto en el Trópico Alto de Nariño; descartando la posibilidad de selección para este gen.

**6.2.3. Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W).** Se observó que la población no se encuentra en equilibrio ( $P < 0.05$ ), hecho que se puede explicar por la selección practicada de modo indirecto a favor de un alelo en detrimento del otro. Puesto que los resultados de esta investigación han corroborado la alta frecuencia del alelo A, la selección ha sido a favor de dicha variante.

**Tabla 5. Valores observados (o) y esperados (e) de los genotipos del gen de la s2 caseína y probabilidad del test de Haldane (1954) para equilibrio Hardy-Weinberg**

<sup>92</sup> IKONEN T., O. RUOTTINEN, G. ERHARDT & M. OJALA. 1996. Allele frequencies of the major milk protein in the Finish Ayrshire and detection of a new -casein variant. Anim. Genet., 27, 179-181.

<sup>93</sup> ERHARDT G. 1993. A new S1-casein allele in bovine milk and its occurrence in different breeds. Anim. Genet. 24: 65-66

<b>Genotipos</b>	<b>Total</b>
<b>Observados</b>	0.00
<b>Esperados</b>	0.00
<b>Prob. Eq. H.W</b>	0.00

Los resultados de diversidad genética muestran que la fijación del alelo A, la heterocigosidad observada y el desequilibrio Hardy- Weinberg se podrían explicar por la presión de selección hacia el incremento en el volumen de leche por lactancia que se ha trabajado en el Trópico Alto de Nariño; estos resultados son confirmados por estudios realizados por Solarte *et al*<sup>94</sup>, a nivel nacional por Ortega y García<sup>95</sup> en estudios realizados en bovinos criollos e internacionalmente por Machugh *et al*<sup>96</sup> en especies *Bos taurus*.

Además por el porcentaje de homocigosis se puede inferir que existe un alto grado de endogamia en la población, posiblemente por el manejo reproductivo, la utilización de Inseminación artificial con semen de toros importados que provienen de la misma línea genética Machugh *et al*.

Teniendo en cuenta que en esta investigación se utilizó toda la información del pedigree de las vacas escogidas, la dirección de apareamientos con razas *Bos indicus* serviría para aumentar la variabilidad genética, buscando disminuir el número de homocigotos dentro de la población. En este contexto, Cañon *et al*<sup>97</sup>, afirman que con la aplicación de técnicas moleculares, además de la información genealógica se lograría aumentar la variabilidad genética de las poblaciones, ya que se conocería su estructura y las relaciones existentes dentro de la población.

---

<sup>94</sup> SOLARTE *et al*. 2009. Op.Cit.

<sup>95</sup> ORTEGA, J. y GARCÍA, L. 2010. Polimorfismo de microsatélites en individuos de razas de bovino criollo colombiano. *Acta biol. Colomb.* 15(1):223-236.

<sup>96</sup> MACHUHG, D., SHRIVER, M., LOFTUS, R., CUNNINGHAM, P. y BRADLEY, D. 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos Taurus* and *bos indicus*). *Genetics* 146:1071-1086

<sup>97</sup> CAÑON, J *et al*. 2001. Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genet. Sel. Evol.* 33:311-332

## **7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **7.1. CONCLUSIONES**

El uso de tarjetas FTA® resultó un método eficiente para la obtención de ADN de buena calidad para realizar estudios genéticos moleculares de las fracciones proteicas de la leche, en el Trópico Alto de Nariño. Adicionalmente presentó otras ventajas como la facilidad en el transporte, conservación y almacenamiento de muestras de sangre bovina.

En la raza holstein, bajo las condiciones del Trópico Alto de Nariño, la variante alélica A se encontró fijada. Este hecho se explica, fundamentalmente por la intensidad de selección indirecta a favor de esta variante, que está relacionada con mayores volúmenes de producción de leche, acorde con los resultados reportados en diversos países del mundo, donde también se ha detectado una alta frecuencia de este alelo de la s2-Cs.

La presente investigación sirve de base para posteriores estudios en lo referente al gen de la s2-Cs, puesto que es el primer referente bibliográfico a nivel nacional.

### **7.2. RECOMENDACIONES**

Utilizar las tarjetas FTA para la colecta de sangre destinada a análisis y estudios genéticos en las poblaciones bovinas.

Incrementar la variabilidad genética del ganado holstein en el trópico Alto de Nariño, mediante el diseño de apareamientos intra e inter raciales que tengan como fin de incrementar el número de heterocigotos, especialmente en alelos fijados o próximos a la fijación.

Ampliar la investigación genética, especialmente en análisis más detallados de la s2-Cs, a través de marcadores más informativos como los microsatélites y SNPs.

Utilizar técnicas genómicas y establecer las posibilidades de su uso con fines de selección en los bovinos lecheros del trópico Alto de Nariño, considerando sus particularidades geográficas, ambientales y socioeconómicas.

## BIBLIOGRAFÍA

- AKERS, R.M. 1990. Lactation physiology: a ruminant animal perspective. 159:96-111
- ALAIS, CH. 1985. Ciencia de la leche, principios de la técnica lechera. Ed. Reverté España.
- AGUDELO, D. y BEDOYA, O. 2005. Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. Revista Lasallista de Investigación. 2(1): 38-42
- AMNIOT, J. 1994. Ciencia y Tecnología de la leche. Universite Laval Quebec. Ed. Acribia. España.
- ASCHAFFENBURG, R. 1965. Variants of milk proteins and their pattern of inheritance. *J. Dairy Science*. 128 – 132
- ASOCIACIÓN HOLSTEIN DE COLOMBIA. 2011. [En línea] URL: <http://www.asoholsteincolombia.com.co>
- BARRERA, H.A., ORTÍZ, R., ROJAS, A., RESÉNDEZ, D. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa: una nueva época dorada en la biología molecular. Ciencia y Desarrollo. 18(108):50-60
- BOUNIOL, C., PRINTZ, C. and MERCIER, J. 1993. Bovine  $\kappa$ -casein D is generated by exon VIII skipping. *Gene* 128, 289-293.
- BRIGNON, G., RIBADEAU-DUMAS, B., MERCIER, J.-C., PELISSIER, J. and DAS, C. 1977. The complete amino acid sequence of bovine  $\kappa$ -casein. *FEBS Letters*. 76:274–279.
- BURGOS, W., ROSERO, C., CARDENAS, H. y SOLARTE, C. 2007. Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA® para la especie *Cavia porcellus* Lin. (Rodentia: Caviidae). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 20(1):67-72
- CAÑON, J., ALEXANDRINO, P., BESSA, I., CARLEOS, C., CARRETERO, Y., DUNNER, S., FERRAN, N., GARCÍA, D., JORDANA, J., LALOE, D., PEREIRA, AL., SANCHEZ, A. y MOAZAMI-GOUDARZY, K. 2001. Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genet. Sel. Evol.* 33:311-332
- COLOMBIA, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, resolución número 000012 del 2007 “por la cual se establece el sistema de pago de la leche cruda al productor”. 12 de enero 2007.
- COLOMBIA, Ministerio de Protección Social, decreto número 616 de 2006 “Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendi, importe o exporte en el país”. 28 de febrero de 2006.

- CHESSA, S., CHIATTI, F., CERIOTTI, G., CAROLI, A., CONSOLANDI, C., PAGNACCO, G. and CASTIGLIONI, B. 2007. Development of a Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Microarray Platform for the identification of bovine milk protein genetic polymorphisms. *J. Dairy Science*. 90: 451-464.
- DAHL, G., CHASTAIN, J. y PETERS, R. 1998. Manipulation of photoperiod to increase milk production in cattle: biological, economic and practical considerations. *Amer. Soc. Agric.* p.p. 259-265
- ERHARDT G. 1993. A new S1-casein allele in bovine milk and its occurrence in different breeds. *Anim. Genet*. 24: 65-66
- EIGEL, W., BUTLER, J., ERSTROM, C., FARREL, H., HARWALKER, V., JENNESS, R. and WHITNEY, R. 1984. Nomenclature of protein of cow's milk: fifth revision. *J. Dairy Science*, 67: 1599-1631.
- EVALUACIÓN DE LOS RECURSOS FORESTALES MUNDIALES. 2000. [Zonas ecológicas de América del Sur](http://www.fao.org/DOCREP/005/Y1997S/y1997s1d.htm) BP. Capítulo 42: <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y1997S/y1997s1d.htm>
- FARRELL JR, H, MALIN, E., BROWN, E., and MORA-GUTIERREZ, A. 2009. Review of the chemistry of s2- casein and the generation of a homologous molecular model to explain its properties. *J. Dairy Science*. 92: 1338-1353.
- FARREL JR, H., JIMENEZ-FLOREZ, R., BLECK, G., BROWN, E., BUTLER, J., CREAMER, L., HICKS, C., HOLLAR, C., NG-KWAI-HANG, K. and SWAISGOOD, H. 2004. Nomenclature of the proteins of cows milk- sixth revisión. *J. Dairy Science*. 87: 1641-1674.
- FENNEMA, O. 1993. Química de los alimentos. Ed. Acribia. S.A. Zaragoza, España.
- FERRANDINI, E. *et al.* 2006. 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>
- FERREIRA, M.A. y GRATTAPAGLIA, D. 1995. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia, Ed. Embrapa. p.p.17
- GOURSAUD, J., IN F. M. LUQUET (Ed.). 1991. Composición y propiedades físico-químicas. Leche y Productos Lácteos. *Société Scintifique D'Hygiene Alimentair*. Ed. Acribia. España. P.p. 2-92
- GROENEN, M., DIJKHOF, E, VERSTEGE, J, and VAN DER POEL. J. 1993. The complete sequence of the gene encoding bovine s2-casein. *Gene* 123:187-193.
- GROSCLAUDE, F., MAHE´, M.F., MERCIER, J.-C., BONNEMAIRE, J. and TEISSIER. J.H. 1976. Polymorphisme des lactoprotéines de bovines Népalais. Polymorphisme des caseine s2-mineurs. *Ann. Genet.Sel. Evol.* 8:461-479.

GROSCLAUDE, F., MAHE', M. F. AND MERCIER, J.-C. 1974. Comparaison du polymorphisme genetique des Lactoproteins du Zebu et des bovines. *Ann Ge'net. Se'l Anim.* 6:305–329.

GROSCLAUDE, F. 1988. Le polymorphisme genetique des principales lactoproteines bovines. Relations avec la quantite', la composition et les aptitudes fromageres du lait. *INRA Prod. Anim.* 1:5–17.

GROSCLAUDE, F., JOUDRIER, P., and MAHE', M. 1978. Polymorphisme de la caseine s2 bovine: Etroite liaison du locus s2-Cn avec les loci s1-Cn, -Cn et -Cn; mise en evidence d'une deletion dans le variant s2-Cn D. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 10:313–327.

GROSCLAUDE, F., MAHE', M. and RIBADEAU-DUMAS. B. 1973. Structure primaire de la caseine s1-et de la caseine -bovine. *Eur. J. Biochem.*40:323–324.

GROSCLAUDE, F., MAHE', M. and ACCOLAS, J.P. 1982. Note sur le polymorphisme genetique des lactoproteines de bovins et de yaks Mongols. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 14:545–550.

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

HURLEY, W.L. 2000. *Lactation biology.* University Press, University of Illinois. Urbana Champaign

IBEAGHA-AWEMU, E.M., PRINZENBERG, E., JANN, O.C., LÜHKEN, G., IBEAGHA, A.E., ZHAO, X., and ERHARDT, G. 2007. Molecular characterization of bovine CSN1s2\*B and extensive distribution of zebu specific milk protein alleles in european cattle. *J. Dairy Science.* 90:3522-3529.

IKONEN, O. RUOTTINEN, G. ERHARDT & M. OJALA. 1996. Allele frequencies of the major milk protein in the Finish Ayrshire and detection of a new -casein variant. *Anim. Genet.*, 27, 179-181.

IMAGAWA, W *et al.* Control of mammary gland development. 1994. *The Physiology of Lactation.* 2nd edition. P 1033.

INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI. 2011. [En línea] URL: <http://www.igac.gov.co>

LEHNINGER, A y NELSON, C. Principios de bioquímica. [En línea] 1995. Ed. Omega. Barcelona, España. Pp. 136 – 147.

LÓPEZ, R., CANO, H., CHASSIN, O. y ZAVALA, M. 2007. Selección asistida por marcadores genéticos moleculares en especies animales de interés pecuario. *Ciencia Nicolaita.* 46:43-55. [En línea] URL: <http://es.scribd.com/doc/18940078/Selección-Animal-Asistida-por-marcadores-moleculares>

MACHUHG, D., SHRIVER, M., LOFTUS, R., CUNNINGHAM, P. y BRADLEY, D. 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos Taurus* and *bos indicus*). *Genetics* 146:1071-1086.

MAHÉ, M. and GROSCLAUDE, F. 1982. Polymorphisme de la caseine  $\beta$  des bovines: Characterization du variant C du yak (*Bos grunniens*). *Ann. Genet. Sel. Anim.* 14:401–416.

MARTIN, P., SZYMANOWSKA, M., ZWIERZCHOWSKI, L. and LEROUX, C. 2002. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reprod. Nutr. Dev.* 42:433–459

MARTÍNEZ, A. 2003. Polimorfismos genéticos de las proteínas de la leche en ganado vacuno Hlstein-Frisón de Cantabria. Relación con los principales rasgos productivos y aplicación a la tecnología de fabricación de queso de Cantabria. Centro de Investigación y Formación Agraria. [En Línea] URL: <http://www.cifacantabria.com/Documentacioncifa/download.php?sess=0&parent=18&expand=1&order=name&binary=1&id=11>

MEDINA, M., YANES, M.L. y ZAFFARONI, C. 2001. Selección Asistida por marcadores moleculares vs selección fenotípica convencional. Curso optativo

MERCIER, J.C y VILOTTE, J.L. 1993. Structure and function of milk protein genes. *Journal of Dairy Science.* 76:3079-3098.

MILLER, M. 1997. Tool for Population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

MULLIS, K. y FALOONA, F. 1987. Specific synthesis of ADN in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Emzymol.* 55:335-350.

[NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/16279). 2010. The complete sequence of the gene encoding bovine alpha  $\beta$ -casein [En línea] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/16279>

NG-KWAI-HANG *et al.* 1984. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins in milk fat and protein production by dairy cattle. *Journal Of Dairy Science.* 67: 835

ORTEGA, J. y GARCÍA, L. 2010. Polimorfismo de microsatélites en individuos de razas de bovino criollo colombiano. *Acta biol. Colomb.* 15(1):223-236.

OSTA, R., MARCOS, S., MARTIN, I., GARCIA-MURO, E and ZARAGOZA, P. 1995. Caracterización genética de proteínas lácteas en ganado vacuno mediante análisis de ADN. VI Jornadas sobre producción animal. Vol. Extra, N°16, Tomo I.

PÉROCHON, L et al. 1996. Lactation curves of dairy cows with emphasis on individual variability *Journal of Animal Science.* 63: 189-200.

PONCE, B. 1986. Estudio de la lactancia en vacas de la raza Holstein, Cebú y sus cruces en Cuba. *Rev Salud Anim.* 8(1):73-88.

PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO. 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, Pasto – Colombia. p.p. 89.

REQUENA, F.D. y AGÜERA, F. 2007. Genética de la caseína de la leche en el bovino frisón. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria.* 8(1). [En línea] URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010107.html>

RIVERA, J. e INSUASTY, E. 2008. Tecnología de Leche. Primera edición. Pasto

RODRÍGUEZ, I.P. y BARRERA, H. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos Décadas de su invención. En: *Ciencia UANL* [En internet] jul-sep., 2004. Vol. VII, n.3. [Citado el 16 de enero de 2010]

SAIKI, R. K., D.H. GELFAND, S. STOEFFEL, S.J. SCHARF, R. HIGUCHI, G.T. HORN, K.B. MULLIS Y H. H. ERLICH 1988. Primer-directed enzymatic amplification of ADN with thermostable ADN polymerase. *Science.* 239:487-491.

SOLARTE, C., ROSERO, C., ERASO, Y., ZAMBRANO, G., BARRERA, D., MARTÍNEZ, O., GUERRON, M. y CHAVES, P. 2011. Polimorfismo de las fracciones caseínicas de la leche en bovinos holstein del Trópico Alto de Nariño. *Livestock Research for Rural Development.* 23(6): artículo 136. [En línea] URL <http://www.lrrd.org/lrrd23/6/sola23136.htm>

SOLARTE, C. *et al.* 2007. Mejoramiento Genético y Calidad de Leche. *Rev. INFORMESE.* Vol. 12(2): 24-25.

STEWART, A., BONSING, J., BEATTIE, C., SHAH, F., WILLIS, I. and MACKINLAY, G. 1987. Complete nucleotide sequences of bovine  $\kappa$ - and  $\beta$ -casein cADNs: Comparisons with related sequences in other species. *Mol. Biol. Evol.* 4:231–241.

UFFO, O., MARTÍN-BURRIEL, I., MARTÍNEZ, S., RONDA, R., OSTA, R., RODELLAR, C y ZARAGOZA., P. 2006. Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. *Animal Genetic Resources Information.* 39: 15-24.

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

WATTIAUX, M. 2005. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera Universidad de Wisconsin- Madison. [En línea] URL: <http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de/19.es.pdf>.

WEBB, B., JOHNSON, A. and ALFORD, J. 1980. *Fundamentals of Dairy Chemistry.* AVI publishing Company, Inc. Westport, Connecticut. P.p. 2-124.

WHATMAN. 2002. FTA® protocols: collect transport, archive and access nucleic acids all at room temperature. 2002. [En línea] URL: <http://www.cosmobio.com.ar/docs/fta%20protocols>.

WHATMAN. 2003. Room temperature simple collection, storage and purification of nucleic acids. [En línea] URL: [http://www.touchbriefings.com/pdf/16/fdd031\\_t\\_whatman.pdf](http://www.touchbriefings.com/pdf/16/fdd031_t_whatman.pdf).

WILDE, C.J. y HURLEY, W.L. 1996. Animal models for the study of milk secretion. Journal Mammary Gland Biol. 1:123-134