

28
29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

**ESTIMACION DE LAS FRECUENCIAS ALElicas DEL
GEN DE LA K-CASEINA EN BOVINOS CRIOLLOS
MEDIANTE LA TECNICA DE LA REACCION EN
CADENA DE LA POLIMERASA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :**

JOSE OSCAR HERNANDEZ PONCE DE LEON



**ASESORES: DR. ROGELIO A. ALONSO MORALES
M. EN C. RAUL ULLOA ARVIZU
DR. MOISES MONTAÑO BERMUDEZ**

MEXICO, D. F.,

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

265026



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi **Madre**, Susana Ponce de León Villuendas, a mi **Padre**, Jesús Hernández Martínez, a mi **Hermano**, Ricardo Hernández Ponce de León., a mis **Abuelitos** Roberto Ponce de León Gonzalez (†) y Genoveva Villuendas Garcia y a mi **Tía** Patricia Ponce de León V., por todo lo que significan en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al **MVZ. MC. Raúl Ulloa Arvizu**, por ser parte fundamental en mi formación profesional, por haberme invitado a colaborar en este proyecto y ser el principal impulsor de esta tesis.

Al **Dr. Rogelio A. Alonso Morales**, por transmitirme sus conocimientos y ser el responsable de los proyectos que financiaron este estudio.

Al **Dr. Moisés Montaña Bermúdez**, por todo el apoyo dado para la realización de este estudio y principalmente por sus consejos.

A **Marcia Bustamante Zepeda**, por su incondicional apoyo y compañía durante todo este tiempo.

A la **MC. Refugio Cortés Fernández**, por su apoyo en la revisión final del texto.

A todos los **Compañeros del Laboratorio**, que me brindaron su amistad y colaboraron de manera directa o indirecta en este trabajo.

Al **MC. Guillermo Martínez** y **MC. Antonio Palacios** del CEP. "El Verdineño" INIFAP-SAGAR

Al **Dr. Jorge de Alba** y a la **Asociación Mexicana de Producción Animal**

A **S. Avellaneda**, **A. Santibañez**, **E. Estrada** y **O. Boiro** de la EMV de la UAG.

Este trabajo fue financiado por el **CONACYT** proyecto No. 0114P-B9506 y por la **DGAPA-PAPIIT-UNAM** proyecto No. IN2007976

CONTENIDO

| | Pág. |
|--|-------------|
| INDICE DE CUADROS Y FIGURAS | i |
| RESUMEN | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 1.1 Ganado Criollo | 3 |
| 1.2 Componentes Lácteos | 5 |
| 1.2.1 Proteínas Lácteas | 6 |
| 1.2.2 κ -Caseína | 8 |
| 1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa | 8 |
| 1.4 Mejoramiento Genético | 9 |
| II. JUSTIFICACIÓN | 11 |
| III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS | |
| 3.1 Objetivos | 12 |
| 3.2 Hipótesis | 12 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | |
| 4.1 Material Biológico | 13 |
| 4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa | 14 |
| 4.3 Polimorfismo en los Fragmentos de los Tamaños de Restricción | 15 |
| 4.4 Análisis de los Resultados | 15 |
| V. RESULTADOS | 18 |

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

| CUADRO | TITULO | Pág. |
|--------|---|------|
| 1 | Características fisicoquímicas de las caseínas. | 31 |
| 2 | Frecuencias alélicas de la κ -caseína. | 31 |
| 3 | Sitios de restricción de las enzimas <i>Hinfl</i> y <i>HindIII</i> | 32 |
| 4 | Frecuencias genotípicas y prueba de bondad de ajuste de cada población. | 33 |
| 5 | Distancia genética de Nei y valores de probabilidad de la prueba de significancia. | 34 |
| 6 | Frecuencias alélicas de la κ -caseína en bovinos de razas Españolas. | 34 |

| FIGURA | TITULO | Pág. |
|--------|---|------|
| 1 | Mapa de los sitios de restricción de las enzimas <i>HindIII</i> y <i>Hinfl</i> | 35 |
| 2 | Patrones de los fragmentos de restricción del segmento amplificado del gen de la κ -caseína bovina. | 36 |
| 3 | Frecuencias alélicas en las poblaciones Criollas y comerciales. | 37 |
| 4 | Frecuencia genotípica de la población Criolla de Chihuahua. | 38 |
| 5 | Dendograma de las poblaciones bovinas utilizando las distancias genéticas de Nei. | 39 |

RESUMEN

HERNÁNDEZ PONCE DE LEÓN JOSÉ OSCAR. "Estimación de las frecuencias alélicas del gen de la κ -caseína en bovinos criollos mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa." (Asesores Dr. Rogelio A. Alonso Morales, M. en C. Raúl Ulloa Arvizu y Dr. Moisés Montaña Bermúdez).

El ganado Criollo presenta características de adaptación a los diferentes ecosistemas del país, lo cual lo hace un excelente candidato para ser utilizado en los sistemas de producción pecuaria. La κ -caseína es una proteína láctea con varios alelos, dentro de los cuales el A y B difieren en 2 aminoácidos. Con el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y digestión con enzimas de restricción, es posible identificar estos alelos. Con el fin de medir la frecuencia alélica del gen de la κ -caseína bovina, se obtuvo ADN de 201 animales de 5 poblaciones de bovinos Criollos: Nayarit (NAY; n=38.), Guerrero (GRO; n=40.), Chihuahua (CHIH; n=44.), Durango (DGO; n=30) y Criollos Lecheros (LECH; n=49), además de 66 de 2 de razas especializadas Holstein (HOLS; n=44) y Hereford (HER; n=22). La frecuencia encontrada del alelo A en las poblaciones HOLS, HER, GRO, NAY, DGO, CHIH y LECH fue de: 0.875, 0.818, 0.788, 0.684, 0.650, 0.591 y 0.480, respectivamente. Las poblaciones se encontraron en equilibrio genético de Hardy-Weinberg excepto CHIH, donde la frecuencia genotípica de los heterocigotos fue mayor a la esperada, posiblemente por una diferencia en el valor de selección de uno de los alelos. En general, la frecuencia estimada del alelo B en los Criollos fue mayor que en las razas especializadas. HOLS presentó diferencias significativas con todas las poblaciones, excepto con HER y GRO. HER fue diferente solo a CHIH y LECH; CHIH tuvo diferencias significativas con GRO; LECH solo tuvo frecuencias similares con CHIH. Para evaluar las relaciones genéticas entre las poblaciones se construyó un dendograma a partir de los valores calculados de las distancias D_{NA} las cuales señalan diferencias entre las poblaciones. La frecuencia del alelo A obtenida en HOLS fue similar a la reportada en otros países. En HER la frecuencia del alelo A fue mayor a la reportada para la raza. La frecuencia del alelo A obtenida en el ganado Criollo fue menor a la reportada para este tipo de ganado. Las frecuencias encontradas señalan diferencias, al menos en este gen, entre las distintas poblaciones criollas. Sin embargo, será necesario incluir otros marcadores moleculares para conocer con mayor exactitud el grado de diversidad y las relaciones genéticas existentes en las poblaciones bovinas.

I. INTRODUCCIÓN

En México la producción de leche es menor a la demanda de productos lácteos. La política que ha seguido el gobierno del País para solucionar este problema es la de comprar leche en el extranjero, dando como resultado que el país se convierta desde hace varios años en el mayor importador de leche en polvo a nivel mundial. En 1996, del volumen total de importaciones de productos agroindustriales, el 10% estaba constituido por la leche en polvo, calculándose que en los 4 años anteriores hasta ese, el país gastó en importaciones de leche en polvo, un promedio de 366 millones de dólares americanos (USD) por año. Para el mes de abril de 1997 el volumen acumulado de importaciones de leche en polvo es de 50.5 mil toneladas con un valor de 103.8 millones de USD. En 1995 la producción estimada fue de 6,361 millones de litros de leche, lo que representa 13.1% menos que lo producido en 1994 y también en ese año, hubo una reducción del 1.1% con respecto a 1993. Para 1997 la producción nacional de leche de bovinos en el mes de julio se calculó en 709.14 millones de litros, lo cual representó 6.6% por arriba de lo producido en el mismo mes del año anterior, para una producción acumulada en dicho mes de 4,215.14 millones de litros. Lo anterior representó una disminución del 1.2% con respecto al mismo lapso del año de 1996 en que se produjeron 4,267.30 millones de litros ^{1,2}. Con base en estos resultados, se calcula que para el año 2005 el déficit de leche sería de alrededor de 5,454,000 toneladas ³.

En México, en los sistemas de producción de leche tecnificado y semitecnificado se obtiene en total el 72% del volumen de producción láctea y los animales de estos sistemas constituyen el 8 y 20% del hato nacional, respectivamente. Se calcula que el ganado de razas especializadas en la producción láctea, aporta cerca del 50% del total de leche producida, predominando los animales de la raza Holstein y Suizo Pardo, esta última en menor proporción. El porcentaje restante lo aporta el ganado no especializado en donde se encuentran animales con una baja habilidad de producción de leche, animales de razas

seleccionadas para producir tanto leche como carne, cruza de *Bos taurus* x *B. indicus* y ganado Criollo^{3,4}.

1.1 Ganado Criollo

Se define como ganado Criollo a los animales *Bos taurus* que pertenecen a los tipos o "razas" de bovinos establecidos en América durante la época de la colonia, que se desarrollaron y adaptaron a las condiciones ecológicas nativas, mediante un proceso de selección natural y artificial, que ha durado varios siglos, con lo cual este ganado en la actualidad presenta características diferentes a las de sus ancestros Europeos. Este ganado criollo presenta una gran variedad de colores que van desde el amarillo hasta el negro pasando por el rojo, además de sus respectivas variantes como el berrendo, bragado, etc., son carentes de giba (característica del ganado *Bos indicus*) y en algunas variedades, se presenta un desarrollo prominente de los cuernos tanto en hembras como en machos⁵.

El ganado Criollo fue traído a México (antes Nva. España) por los colonizadores españoles en el año de 1526 y continuaron introduciéndolo hasta el siglo XVIII, Rouse⁶ menciona que los conquistadores trajeron ganado de las regiones de Extremadura y Andalucía; sin embargo, Azuara et al.⁷, señalan que la Rubia Gallega fue la principal raza de que se tiene conocimiento llegó a la Nueva España, además de otras como la Asturiana, Vasca y Navarra; también de Portugal se trajeron animales de las razas Borrosa y Arisquesa. Con el inicio de la independencia de México se terminaron las importaciones de ganado de razas Ibéricas destinadas para el abasto y solo se continuó introduciendo ganado de lidia. La principal función zootécnica para la cual se utilizó al Criollo, fue la de producción de carne; sin embargo este tipo de ganado constituyó hasta principios de este siglo, la fuente principal de leche para la población. En la actualidad la producción láctea de los Criollos Mexicanos se destina al autoconsumo y el sobrante a la elaboración de quesos casi de forma artesanal; la selección que se ha hecho en favor de la producción de leche ha sido poca⁸.

Debido a la introducción de razas mejoradas, el ganado Criollo está siendo paulatinamente sustituido por estas nuevas razas y se desconoce el número de cabezas

existentes de este ganado. Actualmente, los Criollos se encuentran localizados principalmente en las regiones montañosa y tropical seca, siendo criados en condiciones de poco desarrollo tecnológico. La mayoría de sus propietarios son de un nivel socioeconómico bajo y no cuentan con recursos suficientes para desarrollar una ganadería más eficiente ⁸.

Se han hecho algunos esfuerzos para conocer y evaluar las características de los Criollos, por ejemplo en el año de 1977, la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (S.A.R.H.) elaboró el "Programa Nacional de Rehabilitación de Ganado Criollo", desafortunadamente el programa no continuó y se desconoce mucha de la información obtenida. Utilizando parte de los recursos generados por dicho programa, Azuara et al.⁷ realizaron un estudio sobre polimorfismos bioquímicos de proteínas sanguíneas, donde mencionan que existen similitudes entre las frecuencias del alelo D₁ de las transferrinas del ganado Criollo Mexicano con la raza española Retinta. También en las proteínas albumina y hemoglobina, se encontraron similitudes entre las frecuencias de los Criollos con las de las razas Rubia Gallega y Pirenaica.

En un estudio realizado por Sandoval ⁹ sobre el polimorfismo genético de algunas proteínas sanguíneas tales como hemoglobina, anhidrasa carbónica eritrocítica, albúmina y transferrinas, se menciona que las frecuencias obtenidas de estas proteínas son similares entre los Criollos del estado de Chiapas y Bovinos de lidia. Hernández ¹⁰ realizó un estudio sobre el ganado Criollo, su localización y comportamiento productivo para determinadas características, donde menciona la existencia de algunas poblaciones Criollas, entre finales de la década de los setentas y principios de los ochentas ubicadas en Oaxaca, Cd. Altamirano, Gro., Jiquipilas, Chis., sur de la península de Baja California y en la región de la Huasteca de San Luis Potosí, señalando que en algunas de estas regiones, se tienen promedios de parámetros reproductivos, tales como presentación del primer celo a los 277 días con un peso de 176 kg., una tasa de concepción del 72% al primer servicio y 1.56 servicios por concepción.

Aunado a lo anterior, Rivera et al.¹¹ y Vazquez et al.¹², realizaron estudios para evaluar heterosis materna y comportamiento reproductivo de algunas características reproductivas del ganado Criollo, así como, sus cruzas con ganado Guzerat, ambos señalan que son más

productivas las hembras Criollas y F1 (Criollo-Guzerat) que las hembras Guzerat, por lo que pueden ser una alternativa para la producción de becerros para engorda en el trópico.

Existen algunos hatos de ganado Criollo Lechero localizados en los estados de Tamaulipas y Veracruz, Méx.; los cuales se originaron de un hato base, que fue fundado en el año de 1965 por la Asociación Mexicana de Producción Animal (AMPA) en el sur del estado de Tamaulipas; dicho hato fue establecido con animales importados de Nicaragua y Costa Rica; J. de Alba y Kennedy ¹³, estudiaron algunos parámetros genéticos de este hato y encontraron valores tales como lactancia ajustada a 305 días (1224 ± 320 kg), días de lactancia (314 ± 64 días), servicios por lactación (1.26 ± 0.36 servicios), edad a primer parto (39.3 ± 5.8 meses) y producción total de leche (3466 ± 2533 kg) para los Criollos Lecheros puros, también analizaron el comportamiento productivo de estos, realizando cruzas con las razas Holstein, Canadienne, Suizo Pardo (nativo de la localidad), Jersey y Criollo Mexicano (de Oaxaca), encontrando que las cruzas de Criollo Lechero x Holstein son más productivos que las cruzas con Criollo Mexicano y Suizo Pardo, teniendo las cruzas Jersey valores intermedios para estos parámetros genéticos. Si bien el Criollo Mexicano y el Criollo Lechero tienen el mismo origen histórico, son diferentes; ya que los Criollos Lecheros fueron importados de Centro América, además de que se les ha seleccionado por su habilidad de producción láctea en los climas tropical húmedo y seco.

1.2 Componentes Lácteos

La leche es de vital importancia para la supervivencia y el desarrollo de los animales recién nacidos. Esta constituye el único aporte de agua, nutrimentos orgánicos y minerales; tiene un alto nivel de calorías, además de otros componentes no nutritivos, tales como anticuerpos y factores bioactivos que también son importantes para los neonatos.

Existen factores genéticos, nutricionales, reproductivos y de manejo que intervienen en la cantidad y calidad de la leche producida. Las concentraciones de algunos componentes lácteos pueden variar entre las razas y entre los individuos de cada raza, siendo mayor la

diferencia entre individuos que entre razas, la grasa es el componente con mayor variabilidad entre las razas, los minerales y la lactosa presentan muy poca variación.

Las heredabilidades para el porcentaje de grasa y proteínas son altas, teniendo valores de 0.58 y 0.49 respectivamente, y una correlación de 0.45 a 0.55 entre ambas características, con lo cual el progreso genético que se puede alcanzar al seleccionar por estas características, puede ser amplio.

El principal componente de la leche es el agua, constituye el 87% del volumen total. El restante lo integran otros componentes como:

Lactosa (5.0%). Es un disacárido compuesto de glucosa y galactosa; producido únicamente en la glándula mamaria y es el mayor carbohidrato de la leche.

Grasa (3.9%). Es una mezcla compleja de lípidos, predominando principalmente los triglicéridos y constituye una fuente de energía.

Proteínas (3.3%). Son de varios tipos, los cuales únicamente están presentes en la leche, todas estas proteínas y en particular las caseínas están constituidas por aminoácidos esenciales para el desarrollo de los animales recién nacidos. Existen otro tipo de proteínas con funciones específicas como lo son los anticuerpos, las enzimas y las proteínas transportadoras.

Minerales (0.7%). El calcio y el fósforo son los minerales presentes en la leche, estos son necesarios para la formación de las estructuras óseas ¹⁴.

1.2.1 Proteínas Lácteas

El 80% de las proteínas de la leche bovina esta constituido por las caseínas κ , β , α -s1, α -s2; que son codificadas por sus respectivos genes, los cuales se expresan de manera específica en las células epiteliales de la glándula mamaria durante la lactación. Los genes de las caseínas están estrechamente ligados en el cromosoma 6 del bovino, en un segmento de 200 kilobases (kb) ^{15,16}.

Las caseínas se encuentran en la leche en forma de micelas (gránulos densos de proteínas), su estructura química (Caseína-PO₄-Ca⁺⁺-PO₄-Caseína) permite la formación de dichas estructuras, las cuales miden aproximadamente 140 nanómetros de diámetro.

Las micelas están formadas por la α -, β - y κ -caseína. La α -caseína se encuentra multifosforilada dando lugar a las diferentes variables de esta. La β -caseína es una proteína mayor en la leche bovina. La κ -caseína es un glicoproteína que está distribuida en la micela y su función es la de darle estabilidad a la misma.

Las caseínas tienen diferentes características fisicoquímicas (Cuadro 1) y constituyen una fuente muy importante de nutrientes para el recién nacido, aportando aminoácidos, calcio y fosfato ¹⁴.

Las frecuencias alélicas de la κ -caseína varía entre las razas (Cuadro 2). Se han hecho varios estudios en diferentes poblaciones bovinas, acerca de la relación existente entre la habilidad de producción de proteínas lácteas y los diferentes alelos de la κ -caseína, analizándolos de forma estadística, midiendo los efectos directos de cada genotipo a través de familias, tomando a cada proteína de la leche como un loci individual ²². Se ha encontrado en la mayoría de estos estudios, una correlación positiva entre las vacas con el genotipo homocigoto BB de la κ -caseína y una mayor cantidad de proteínas lácteas producidas, que influyen de manera importante en el rendimiento de la leche en queso, reduciendo el tiempo de coagulación y aumentando la consistencia del mismo; siendo estos valores superiores a los rendimientos de las vacas con otro genotipo de la κ -caseína, en especial el homocigoto AA ^{16,17,18,19}. Tanto el genotipo κ -caseína BB, como el β -lactoglobulina están asociados con un alto porcentaje de caseínas en la leche, las variantes genotípicas de κ -caseína afectan la concentración de la proteína κ -caseína (BB>AB>AA), la proporción de α_{2-1} -caseína y la concentración de β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina (AA>AB>BB) ²⁰.

Se ha sugerido que las diferencias entre la concentración de proteínas lácteas y los distintos alelos de la caseína, no se debe a que estos alelos tengan efectos directos sobre la producción, sino que son debido a regiones reguladoras de los genes o a variaciones en otros loci ligados a estos ²¹.

1.2.2 κ -Caseína

En investigaciones realizadas por Ng-Kwai-Hang et. al.²⁹, se encontraron diferencias entre algunas características lecheras, y los diferentes alelos de las caseínas, siendo la de mayor importancia productiva la κ -caseína; en la cual se detectaron 4 alelos: A, B, C y E¹⁷. También Van Eenennaam y Medrano²⁰ señalan, que la variación en las proteínas lácteas afecta la producción de queso, lo cual puede estar relacionado con el genotipo de las mismas y la composición de caseínas.

La diferencia entre el alelo A y el B de la κ -caseína es debido a la transición de una citosina (C) por una timina (T), provocando un cambio de aminoácidos, teniendo el alelo A una treonina (ACC) y el B una isoleucina (ATC) en el codón 136. También en el codón 148 hay una transversión de una adenina (A) por una citosina (C), cambiando el ácido aspártico (GAT) del alelo A por alanina (GCT) en el alelo B. Estas sustituciones dan como resultado sitios de restricción para 5 enzimas; así por ejemplo la *Hinfl* cuyo palíndromo es GANTC, se utiliza para caracterizar el alelo A y *HindIII* (AAGCTT) para el alelo B^{15,21,30}. (Cuadro 3)

1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa³¹

Es un proceso bioquímico también conocido como PCR (*polymerase chain reaction*), en el cual un segmento específico del ADN es amplificado por la enzima ADN polimerasa, esto es logrado mediante los ciclos sucesivos de síntesis que integran la reacción, los cuales pueden ser de 20 a 30; al término de cada uno de ellos, las nuevas cadenas del ADN formadas son de nuevo duplicadas por la misma enzima, con lo que se realizan un número exponencial de copias (2×10^{17}) del gen o segmento de ADN específico.

La amplificación es específica, para esto se utilizan iniciadores o "primers" los cuales son segmentos sintéticos de ADN u oligonucleótidos los cuales son complementarios a los sitios de inicio de la síntesis de ADN y la enzima ADN polimerasa reconoce estos sitios

para poder funcionar. Los iniciadores se diseñan para que se ubiquen en las regiones que flanquean el segmento que se desea amplificar.

Cada uno de los ciclos de síntesis que componen la reacción está constituido por tres pasos que varían en cuanto a tiempo y temperatura a la cual el ADN es sometido y estos son:

1) Desnaturalización.

Los intervalos de temperatura y tiempo de este paso varían de 92 a 98°C y de 30 a 90 segundos. El objetivo de someter el ADN a este paso es el de abrir o separar las 2 cadenas que lo conforman.

2) Alineamiento.

La temperatura puede ser de 50 a 60°C, durante 30 a 60 segundos con lo cual los dos iniciadores se aparean de forma específica con las cadenas simples del ADN muestra desnaturalizado.

3) Extensión.

A una temperatura de 70 a 74°C por 30 a 90 segundos, la enzima ADN polimerasa extiende los iniciadores previamente apareados al ADN, ya que va polimerizando los desoxinucleótidos libres, lo que produce nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas originales.

1.4 Mejoramiento Genético

Dentro de los programas de mejoramiento genético en el ganado, la confiabilidad del valor genético estimado de los animales jóvenes es baja, debido a que los registros tanto del animal como de su progenie no están disponibles o no se cuenta con un número suficiente de observaciones.

El desarrollo de las técnicas de análisis basadas en el ácido desoxiribonucleico (ADN), como la reacción en cadena de la polimerasa, hace posible identificar el potencial productivo de los animales detectando si están presentes algunos marcadores genéticos moleculares como: la κ -caseína, la β -lactoglobulina, la β -caseína, etc, indistintamente del

sexo del animal, a una edad temprana ²², con lo cual se reducen los costos de las evaluaciones de los animales destinados a ser el futuro pie de cría.

La identificación de las bases moleculares de los factores genéticos asociados a producción y su empleo en selección, permite desarrollar una nueva herramienta en la producción animal, conocida como Selección Asistida por Marcadores.

El estudio de las frecuencias génicas y genotípicas en una población y en sus subsecuentes generaciones, así como, su aplicación para determinadas características cualitativas es uno de los objetivos de la genética de poblaciones, en donde la ley de Hardy - Weinberg establece que en una población grande con apareamiento al azar y en ausencia de fuerzas como mutación, selección y migración, las frecuencias génicas y genotípicas, estas se mantendrán constantes de una generación a otra.

II. JUSTIFICACIÓN

El presente estudio se enfoca hacia dos aspectos importantes en las ciencias veterinarias. por un lado al conocimiento de la diversidad genética en las poblaciones de bovinos Criollos, debido a que no se han hecho estudios confiables, en particular sobre la frecuencia del gen de la κ -caseína; el cual afecta la concentración de proteínas lácteas y el rendimiento de la leche necesaria en la elaboración de queso, siendo por lo tanto una característica económicamente importante.

El otro aspecto a que se enfoca este estudio, es a la utilidad que tienen los marcadores genéticos moleculares en los programas de selección, con ellos es posible disminuir el tiempo y los costos de dichos programas.

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivos

3.1.1. Determinar las frecuencias alélicas del gen de la κ -caseína en 5 poblaciones de bovinos Criollos y en 2 poblaciones de razas comerciales.

3.1.2. Evaluar si las frecuencias alélicas en las poblaciones estudiadas están en equilibrio genético de Hardy-Weinberg.

3.1.3. Comparar las frecuencias alélicas entre las poblaciones Criollas y en dos poblaciones de animales de razas especializadas, una en la producción de leche (Holstein) y otra en la producción de carne (Hereford).

3.2 Hipótesis

Debido a que las poblaciones de bovinos Criollos están geográficamente separadas, el intercambio de individuos entre poblaciones es limitado y además cada población ha estado sujeta a diferentes procesos de selección y deriva génica, esperamos que las frecuencias alélicas sean diferentes entre las poblaciones de Criollos.

La frecuencia del alelo B será mayor en las poblaciones de bovinos Criollos, ya que la leche producida por animales con al menos un alelo B del gen de la κ -caseína contiene más proteínas que las vacas con alelo A, con lo cual los becerros que se alimentan con esta leche tienen mayores probabilidades de sobrevivir en las difíciles condiciones ambientales y de manejo en donde se localiza el ganado Criollo.

IV. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 Material Biológico

Para la realización del presente estudio se colectaron muestras de sangre de bovinos Criollos tanto de hembras como de machos de 5 regiones: del Centro Experimental Pecuario "El Verdineño" INIFAP-SAGAR, localizado en el municipio de Santiago Ixcuintla, Nay. (NAY.), de la región Tierra Caliente de Guerrero (GRO.), de la Sierra Tarahumara en Chihuahua (CHIH.), de la sierra de Durango (DGO.) y Criollos Lecheros localizados en el norte del estado de Veracruz y el sur del estado de Tamaulipas, (LECH.), además de bovinos de raza Holstein (HOLS.) provenientes de varios estados de la república y de ganado Hereford (HER.) localizado en el estado de Chihuahua. De las células sanguíneas nucleadas de cada muestra colectada se obtuvo el ADN de acuerdo a técnicas previamente descritas por Bruford et. al.³². En el ADN purificado se evaluó su integridad por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%; se cuantificó en un fluorómetro (Hoefer Scientific Instruments, modelo DQ200-115v) y se ajustó a una concentración de 50ng/ μ l.

El número de muestras por grupo que se procesaron fueron:

| POBLACIÓN | Num. DE INDIVIDUOS |
|-----------------|--------------------|
| Holstein | 44 |
| Hereford | 22 |
| Guerrero | 40 |
| Nayarit | 38 |
| Durango | 30 |
| Chihuahua | 44 |
| Criollo Lechero | 49 |
| TOTAL | 267 |

4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la realización de este método se utilizaron 150ng de ADN de cada muestra. Las condiciones de amplificación del ADN fueron las siguientes:

Primer paso:

Una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C durante 3:00 min.

Segundo paso:

Constituido por las siguientes etapas, las cuales se repiten 30 ciclos:

| Etapa | Temperatura (°C) | Tiempo (seg.) |
|-------------------|--------------------|---------------|
| Desnaturalización | 94 | 30 |
| Alineamiento | 54 | 30 |
| Extensión | 72 | 30 |

Tercer paso:

Una fase final de 72 °C durante 3:00 min.

Se utilizaron unos "Iniciadores" cuyas secuencias son para el Iniciador Delantero: 5' ATAGCCAAATATATCCCAATTCAGT 3' y para el Iniciador de Reversa: 5' TTTATTAATAGTCCATGAATCTTG 3' ¹⁵. Cada una de las reacciones de amplificación se realizó en un volumen final de 30µl, los cuales se obtienen de la suma de los siguientes componentes: 3µl de amortiguador 10x para PCR (20mM MgCl₂, KCl 500mM; Tris-HCl pH 8.3 100mM; gelatina 10µg/ml), 3µl de desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2mM c/u, 1.5µl de los iniciadores delantero y de reversa (10mM c/u), 1.5µl de albúmina sérica bovina (BSA) (3mg/ml), 1.5µl de Tritón x100 al 2%, 0.75µl de enzima *Taq* Polimerasa (5 U/µl), agua bidestilada estéril C.B.P. 30µl y 2-3µl de ADN genómico bovino (50ng/µl).

4.3 Polimorfismo en los Tamaños de los Fragmentos de Restricción (RFLP, restriction fragment length polymorphism)

Con la finalidad de identificar los alelos A y B de la κ -caseína, el producto amplificado de la PCR se digirió independientemente con las enzimas de restricción la *HindIII* y *HinfI*¹⁷, para esto se utilizan 10 μ l del producto de PCR que se agregan a 10 μ l de una mezcla que contiene el amortiguador recomendado por el proveedor para cada enzima (2x) 2 μ l, además BSA (3mg/ml) 0.3 μ l y 10 unidades (U) de la enzima enzima. Se incubó la reacción durante 8 horas a 37°C. El análisis de los productos digeridos se hizo mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%, dando como resultado patrones de bandeo específicos de cada genotipo. (Figura 1)

4.4 Análisis de los Resultados

Se determinaron las frecuencias genotípica y alélicas de cada población mediante las siguientes fórmulas³³:

Frecuencia Genotípica.

$$f(PP) = nPP / N$$

$$f(Pp) = nPp / N$$

$$f(pp) = npp / N$$

Donde:

$f(PP)$ = frecuencia genotípica de los individuos homocigotos κ -CN-AA

$f(Pp)$ = frecuencia genotípica de los individuos heterocigotos κ -CN-AB

$f(pp)$ = frecuencia genotípica de los individuos homocigotos κ -CN-BB

nPP = número de individuos homocigotos AA

nPp = número de individuos heterocigotos AB

npp = número de individuos homocigotos BB

N = Total de individuos de la muestra.

Frecuencia Alélica.

$$f(P) = f(PP) + (1/2)f(Pp)$$

$$f(p) = f(pp) + (1/2)f(Pp)$$

Donde:

$f(P)$ = frecuencia alélica del alelo A

$f(p)$ = frecuencia alélica del alelo B.

Para determinar si las frecuencias alélicas estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó una prueba de bondad de ajuste ³⁴.

$$\chi^2 = \frac{n D_A^2}{p_A^2 (1-p_A)^2}$$

En donde:

$$D_A = P_{AA} - p_A^2$$

p_A = frecuencia alélica de A en la población P

P_{AA} = frecuencia genotípica del homocigoto AA

Se compararon las frecuencias alélicas entre las poblaciones y entre las razas mediante una prueba de significancia ³⁵.

$$\chi^2 = 2n_x n_y \sum_{i=1}^m \frac{(x_i - y_i)^2}{x_i n_x + y_i n_y}$$

Donde:

n_x = número de individuos en la población X

n_y = número de individuos en la población Y

x_i = frecuencia del i -ésimo alelo en la población X

y_i = frecuencia del i -ésimo alelo en la población Y

Se construyó un dendograma con el método de "Neighbour Joining"³⁶ utilizando en la matriz de relación las distancias D_{NA} ³⁵.

$$D_{NA} = 1 - \sum_{i=1}^2 \sqrt{x_i y_i}$$

V. RESULTADOS

Mediante PCR se amplificó un fragmento de 530 pb que corresponde al gen de la κ -caseína bovina. La identificación de los alelos A y B se realizó por medio del polimorfismo en los tamaños de los fragmentos de restricción específicos, obtenidos después de digerir el fragmento amplificado con las enzimas de restricción *Hind*III y *Hinf*I. La enzima *Hind*III digiere el alelo B y se obtienen fragmentos de 375 y 155 pb, el alelo A no es cortado por esta enzima. La enzima *Hinf*I digiere el alelo A obteniéndose fragmentos de 326, 132, 51 y 20 pb. En cambio, para el alelo B se generan fragmentos de 458, 51 y 20 pb (Figura 2).

En el cuadro 4 se muestran los resultados de las frecuencias genotípicas obtenidas y los valores de χ^2 para evaluar el equilibrio genético en las diferentes poblaciones. Se observó que existen diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones, siendo mayores las frecuencias del alelo B en la población de Criollo Lechero, seguida por las poblaciones de ganado Criollo que en las poblaciones de razas comerciales (Figura 3). Todas las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg con excepción de los Criollos de Chihuahua, población en la cual la frecuencia de individuos heterocigotos observados fue mayor a la esperada (Figura 4).

Con base en la frecuencia genética de los alelos de la κ -caseína, se evaluó la probabilidad de que las frecuencias de 2 poblaciones fueran diferentes (Cuadro 5). La raza Holstein presentó diferencias significativas ($P < 0.01$) con todas las poblaciones, excepto con la de raza Hereford y la de Criollo de Guerrero. La raza Hereford fue diferente solo a las poblaciones de Chihuahua y Criollo Lechero, la población de Chihuahua tiene diferencias significativas ($P < 0.01$) con las 2 poblaciones de razas comerciales y con los Criollos de Guerrero, por último, la población de Criollo Lechero tiene frecuencias diferentes a las demás poblaciones y solo con la población Criolla de Chihuahua tiene frecuencias similares.

Los resultados obtenidos al calcular las distancias D_{NA} nos señalan que existen diferencias entre las poblaciones (Cuadro 5), las cuales se pueden observar en el dendograma elaborado con la matriz de relación de dichas distancias (Figura 5).

La topología de este dendograma está dada por las menores distancias genéticas calculadas entre las poblaciones. La mayor distancia obtenida entre dos poblaciones, es entre Holstein y Criollo Lechero (0.0805); la menor fue entre Guerrero y Hereford (0.0008). Los Criollos que presentaron menores distancias con las dos poblaciones especializadas, fueron los de Guerrero; además, estos presentaron las mayores distancias con las otras poblaciones Criollas. La población de Chihuahua fue la más próxima a los Criollos Lecheros. La menor distancia entre dos poblaciones Criollas Mexicanas se obtuvo entre Nayarit y Durango.

VI. DISCUSIÓN

La frecuencia del alelo A que se obtuvo en Holstein (0.875) es similar a las obtenidas para la misma raza en países como Israel (0.89)³⁷, Estados Unidos (0.89)²², Canadá (0.85)³⁸, (0.81)³⁹, Reino Unido (0.80)⁴⁰, Taiwar. (0.89)⁴¹, Corea (0.84)⁴², España (0.82)²³, Hungría (0.83)²⁶ y Polonia (0.83)⁴³. Solo se reportan en Argentina y Canadá frecuencias de (0.77)⁴⁴ y (0.74)²⁹ respectivamente, las cuales resultan menores a las encontradas en este estudio y a las reportadas por otros autores.

Estos resultados nos indican que en la raza Holstein existe una gran homogeneidad a nivel mundial en cuanto a la frecuencia de este gen, lo cual puede ser debido a la dependencia de determinadas líneas genéticas y a la masiva difusión de este germoplasma en todo el mundo. Esta raza tiene una enorme presión de selección a favor de altos niveles de producción láctea; esto muy probablemente, ha llevado a una selección negativa en contra de aquellos factores genéticos que contribuyen a un aumento en la concentración de sólidos en la leche, como es el alelo B de la κ -caseína.

La frecuencia del alelo A de la κ -caseína en la población de ganado Hereford (0.818) analizada en este estudio, fue mayor a la reportada en esta raza por Moody et al.⁴⁵, quienes analizaron 3 poblaciones con diferentes niveles de consanguinidad, obteniendo una frecuencia promedio de 0.6 en la raza.

Las frecuencias alélicas en las poblaciones Criollas fueron diferentes a las de las dos razas especializadas analizadas en este trabajo, exceptuando a la población de Guerrero, la cual no presentó diferencias significativas con ambas razas.

En la mayoría de las poblaciones criollas no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, sólo se encontraron diferencias entre la población de Chihuahua y la población de Guerrero. La frecuencia genotípica de individuos heterocigotos en la población de Chihuahua es más alta que la esperada, resultando ser la única que no se encuentra en equilibrio genético de Hardy-Weinberg. Este exceso de heterocigotos puede indicar una diferencia en el valor de selección de uno de los genotipos; aunque no ha

habido una aparente selección para determinado genotipo ²⁰ o que esta población esta siendo cruzada con otra, en la cual las frecuencias alélicas son diferentes.

En el ganado Criollo de Argentina, Poli y Antonini ⁴⁴ reportan una frecuencia para el alelo A de 0.751, la cual es mayor a la obtenida en las poblaciones Criollas analizadas en este trabajo. Es posible que la población de Criollos de la Argentina sea diferente a las de este estudio, aunque tengan el mismo origen histórico, debido a que han estado sujetas a diferentes procesos de selección y cruzamiento.

Sin embargo, Osta et al. ²³ analiza las frecuencias de las κ -caseínas en algunas razas de ganado español y francés encontrando frecuencias similares a las obtenidas en este estudio en algunas poblaciones de criollos (Cuadro 6).

En relación a las frecuencias obtenidas en las diferentes poblaciones animales, se puede observar que existen diferencias entre las distintas razas bovinas y no se reporta alguna correlación entre la frecuencia del gen y el sexo; así por ejemplo, encontramos que en la raza Simmental se reporta una frecuencia del alelo A de 0.765 y 0.729 para hembras y machos respectivamente, teniendo el genotipo BB, efectos significativos superiores a los genotipos AB y AA sobre el contenido de proteína en la leche ⁴⁶.

Las poblaciones analizadas en este trabajo, deberán ser estudiadas más a fondo, incluyendo otros marcadores moleculares para conocer con mayor exactitud el grado de diversidad genética de dichas poblaciones y su posible relación con determinadas características productivas.

La utilización del ganado Criollo en los sistemas de producción actuales, puede ser muy valioso para aumentar la producción pecuaria nacional. Si bien es poco probable, que el ganado Criollo pueda llegar a alcanzar en corto plazo los niveles de producción que tienen los animales de razas modernas, ya que estas últimas han estado sujetas de manera continua a procesos de mejoramiento genético intenso durante varios años. Es muy probable que este ganado posea atributos de adaptación a los diversos ecosistemas nacionales, en los cuales el ganado mejorado no se adapta fácilmente.

Por lo anterior, antes de que este recurso desaparezca, es necesario realizar más investigaciones sobre el ganado Criollo Mexicano, en relación a su desempeño y potencialidad dentro de sistemas alternativos de producción; principalmente en el aspecto

genético, ya que puede ser una fuente de germoplasma útil en los sistemas de producción intensivo y semi-extensivo en condiciones ambientales extremas y con bajos niveles de inversión. Esto es relevante, si consideramos que los animales de razas altamente especializadas, requieren para producir de manera eficiente de insumos costosos y de una gran infraestructura , y si además, sabemos que en zonas áridas y tropicales con pocos recursos económicos, las razas especializadas no se adaptan fácilmente.

VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

1. Se encontraron diferencias en las frecuencias del gen de la κ -caseína entre las distintas poblaciones analizadas. La única población Criolla que no presentó diferencias con las dos poblaciones de razas especializadas fue la de Guerrero.
2. La población de ganado Hereford fue diferente solo a las poblaciones de Chihuahua y Criollo Lechero, las cuales presentaron mayores frecuencias del Alelo.
3. Las poblaciones Criollas presentaron mayores frecuencias del alelo B (0.213 a 0.520) que las de razas especializadas (0.125 y 0.182). En la población Holstein se observó la menor frecuencia del alelo B (0.125) y en el Criollo Lechero se observó la mayor (0.520).
4. Las dos poblaciones de razas especializadas y cuatro de las cinco poblaciones Criollas analizadas en este estudio, están en equilibrio genético de Hardy-Weinberg. La única que no se encontró en equilibrio fue la población de Chihuahua.
5. Al utilizar marcadores genéticos moleculares, es posible realizar estudios para conocer el origen y la diversidad genética existente entre las poblaciones de una especie.
6. Se deben realizar más investigaciones sobre los polimorfismos de los genes que codifican para proteínas lácteas para poder determinar si existen o no efectos sobre la producción y calidad de la leche en nuestras poblaciones bovinas.
7. La utilización eventual de marcadores genéticos moleculares asociados a rasgos productivos, permitirá una mayor precisión en la selección temprana de los animales progenitores.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Gómez ORS, López BB, González LG, y Carmona MMA. **Comparación de las tendencias en el incremento de las variables población, producción e importación de leche de vaca en polvo de 1950 a 2010 en México.** Memorias del XX Congreso Nacional de Buiatría; 1996 agosto 14 -17;Acapulco Gro. México. México (DF): *Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC*, 1996: 423-429.
2. Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural. Centro de Estadística Agropecuaria. <http://www.sagar.gob.mx/users/cea>
3. Ruíz LF. **Estrategias para el establecimiento de programas de evaluación genética del ganado bovino lechero.** Memoria del Primer Foro de Análisis de los Recursos Genéticos de la Ganadería Bovina; 1997 noviembre 17-19; México (DF) México: *Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural*, 1997:36-44.
4. Villa I.M.R. **Situación actual y perspectivas de la industria lechera en México.**: Memorias del Seminario Internacional, Mejoramiento Genético de Bovinos Lecheros (Aspectos relevantes). *Colegio de Posgraduados*. México, 1990.
5. de Alba J. **Criollo cattle of Latin America.** Ed. *J.Hudges*. Animal Genetic Resource; Strategies for improved use and conservation. FAO, Animal Production and Health; paper 66, *Food and Agriculture Organization of The United Nations*. Rome,1987.

6. Rouse JE. **The Criollo: Spanish cattle in the Americas.** *The University Oklahoma Press.* U.S.A,1977.
7. Azuara BP, Velázquez EA, Ayala BF, Garza RJ. **Polimorfismo bioquímico de las proteínas sanguíneas en bovinos criollos y su aplicación en la selección.** Memorias del curso Citogenética e Inmunogenética; 1982 noviembre; México D.F.: *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.* Universidad Nacional Autónoma de México, , 1982:60-67.
8. de Alba J. **Panorama actual de la ganadería mexicana.** Memorias del Seminario Internacional de Ganadería Tropical. *Secretaría de Agricultura y Ganadería.* Banco de México, S.A. Acapulco, Gro. México. 1976; 41-62.
9. Sandoval VFC. **Estudio del polimorfismo genético de algunas proteínas sanguíneas en bovinos Criollos mexicanos (tesis de licenciatura).** México (DF) México: *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.* UNAM, 1981.
10. Hernández MF. **Aportación al estudio del ganado bovino Criollo en México (tesis de licenciatura).** México (DF) México: *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.* UNAM, 1984.
11. Rivera AU, Martínez VG, Montaña BM. **Heterosis materna Criollo-Guzerat para algunas características reproductivas.** Memorias de XXXIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 1997 noviembre 3-8; Veracruz (Veracruz) México. *S.A.G.A.R.-I.N.I.F.A.P.* 1997:167
12. Vázquez HEA, Martínez VG, Montaña BM. **Comportamiento reproductivo de vacas Guzerat y Criollo en cruzamiento dialélico.** Memorias de XXXIII

Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 1997 noviembre 3-8; Veracruz (Veracruz) México. *S.A.G.A.R.-I.N.I.F.A.P.* 1997:168.

13. de Alba J & Kennedy BW. **Genetics parameter of purebred and crossbred Milking Criollos in tropical Mexico.** *Animal Production* 1994; 58: 159-165.
14. Hurley WL. **Lactation Biology.** *University of Illinois, Urbana-Champaign.*
<http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308>
15. Denicourt D, Sabour MP & McAllister AJ. **Detection of bovine κ -casein genomic variants by the polymerase chain reaction.** *Animal Genetics* 1990;21: 215-216.
16. Lien S. Gómez-Raya L. **The use of bovine casein haplotypes as genetic marker.** Proceedings. 5th World Congress Genetics on Applied to Livestock Production, *University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 7-12 August 1994.* Volume 19. 1994: 323-326.
17. Schlieben S, Erhardt G. and Senft B. **Genotyping of bovine κ -casein (κ -CNA, κ -CNB, κ -CNC, κ -CNE.) following DNA sequence amplification and direct sequencing of κ -CNE, PCR product.** *Animal Genetics* 1991; 22: 333-342.
18. Bovenhuis H. and de Boer IJM. **The potential contribution of milk protein loci to improvement of dairy cattle.** Proceedings. 5th World Congress Genetics on Applied to Livestock Production, *University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 7-12 August 1994.* Volume 19. 1994: 311-318.
19. Schaar J, Hansson B & Pettersson HE. **Effects of genetic variants of κ -caseína and β -lactoglobulin on cheesemaking.** *Journal of Dairy Research* 1985; 52:429-437.

20. Van Eenennaam A, Medrano JF. **Milk protein polymorphisms in California dairy cattle.** *J.Dairy Sci.* 1991;74: 1730-1742.
21. Ferretti L, Leone P. and Sgaramella V. **Long range restriction analysis of the bovine casein genes.** *Nucl. Acids Res.* 1990;18(23): 6829-6833.
22. Medrano JF, Aguilar-Cordova E. **Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification.** *Bio/Technology*, February 1990; 8: 144-146.
23. Osta R, Zaragoza P, Rodellar C, Martin I, Marcos S, Zaragoza I. **Rapid typing of lactoprotein genetic variants in seven populations of cattle in Spain, using the PCR/RFLP genetic molecular technique.** *ITEA, Producción Animal* 1994; 94A(1):38-57.
24. Yamamoto T, Shimada K, Takahashi M, Tabata T, Takenouchi N, Ohshima K, Kikkawa A, Nakayama O, Kosugiyama M. **Genotype Effect of κ -casein on milk performance in Japanese Black cows.** *Anim. Sci. Technol. (Jpn)* 65(12):1119-1121
25. Ortner M, Essel A, Solkner J. **On the importance of various milk protein genotypes in cattle breeding.** *Zuchtungskunde* 1995; 67(5):353-367.
26. Bankyo G, Baricz A, Tavakkolian JS, Bosze Z. **Identification of kappa-casein allele polymorphis in bull semen by PCR and RFLP.** *Magyar Allatorvosok Lapja* 1995; 50(9): 553-556.
27. Citek J, Rehout V, Hajic F, Kosvanec K, Soch M. **Genetic polymorphism of kappa casein locus in Czech Pied and Black Pied cattle.** *Zivocisna Vyroba* 1997;42(1):1-4.

28. Nebola M, Dvorak J, Szulc T. **Kappa-casein gene polymorphism in cattle breeds in the Czech Republic and Poland.** *Zivocisna Vyroba* 1996;41(10):429-431.
29. Ng-Kwai-Hang KF, Hayes JF, Moxley JE, Monardes HG. **Association of Genetic Variants of Casein and Milk Serum Proteins with Milk, Fat and Protein Production by Dairy Cattle.** *J. Dairy Sci.* 1984;67: 835-840.
30. Damiani G, Ferretti L, Rognoni G, Sgaramella V. **Restriction fragment length polymorphism analysis of the k-casein locus in cattle.** *Animal Genetics* 1990; 21: 107-114.
31. Barrera SHA, Ortíz LR, Rojas MA, Reséndez PD. **Reacción en cadena de la polimerasa: Una nueva época dorada en la biología molecular.** *Ciencia y Desarrollo* 1993: enero-febrero: 50-60.
32. Bruford MW, O. Hanotte JFY, Brookfield and T. Burke. **Single-locus and multilocus DNA fingerprinting.** In: A.R. Hoelzel, Editors. *Molecular Genetic Analysis of Populations: The practical Approach Series Irl Press.* Oxford University Press New York. 1992.
33. Van Vleck LD, Pollak EJ, Branford OEA. **Genetics for the Animal Sciences.** *W.H. Freeman and company.* New York. USA 1987.
34. Weir BS. **Genetic Data Analysis.** *Sinaur Associates Inc. Publishers.* MA. USA. 1990
35. Nei M. **Molecular Evolutionary Genetics.** *Columbia University Press.* New York, USA. 1987.

36. Saitou N & Nei M. **The Neighbor-joining Method: A new method for reconstruction phylogenetic trees.** *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4:406-425.
37. Ron M, Yoffe O, Ezra E, Medrano JF, Weller JI. **Determination of effects of milk protein genotype on production traits of Israeli Holsteins.** *J. Dairy Sci.* 1994; 77:1106-1113.
38. Sabour MP, Lin CY, Lee AJ, McAllister AJ. **Association between milk protein genetic variants and genetic values of Canadian Holstein bulls for milk yield traits.** *J. Dairy Sci.* 1996; 79:1050-1056.
39. Masoudi M, Zhou JF, Zadworny D, Zhang J, Kuhnlein U. **Genotyping of kappa-casein alleles in Holstein dairy cattle using PCR and SSCP-PCR.** Proceedings. 5th World Congress Genetics on Applied to Livestock Production, *University of Guelph*, Guelph, Ontario, Canada, 7-12 August 1994. Volume 21. 1994, 140-143.
40. Pinder SJ, Perry BN, Skidmore CJ & Savva D. **Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of polymerase chain reaction.** *Animal Genetics* 1991;22, 11-20.
41. Hu-CC, Mao-FC. **Kappa-casein genotyping and its correlation with milk producing ability of Holstein bulls.** *Taiwan Journal of Veterinary Medicine and Animal Husbandry.* 1995; 65(3):247-254.
42. Lee KJ, Kim JU, Lee YK, Hong KP, Kim KS. **Analysis of kappa-casein and beta-lactoglobulin genotypes of dairy cattle in Korean Republic using the polymerase chain reaction.** *Korean Journal of Animal Sciences* 1994; 37(4):311-320.

43. Kaminski S. Use of the results of DNA restriction fragment length polymorphism analysis to determine the kappa-casein genotype in bulls. *Prace I Materialy Zootechniczne, Zeszyt-Specjalny* 1994; (3):99-101.
44. Poli MA, Antonini AG. Genetic structure of milk proteins in Argentinian Holstein and Argentinian Creole cattle. *Hereditas* 1991; 115:177-182
45. Moody DE, Pomp D, Newman S, MacNeil MD. Characterization of DNA polymorphisms in three population of Hereford cattle and their associations with growth and maternal EPD in line 1 Herefords. *J. Anim. Sci.* 1996; 74:1784-1793.
46. Falaki M, Prandi A, Corradini C, Sneyers M, Gengler N, Massart S, Fazzini U, Burny A, Portetelle D, Renaville R. Relationships of growth hormone gene and milk protein polymorphisms to milk production traits in Simmental cattle. *Journal of Dairy Research* 1997; 64: 47-56.

Cuadro 1. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LAS CASEÍNAS¹⁴.

| PROTEINA | PESO MOLECULAR | PUNTO ISOELECTRICO |
|-------------------|----------------|--------------------|
| α -caseína | 23 000 | 4.1 |
| β -caseína | 24 000 | 4.5 |
| κ -caseína | 19 000 | 4.1 |

Cuadro 2. FRECUENCIAS ALELICAS DE LA κ -CASEÍNA.

| RAZA | κ -CN A | κ -CN B | REFERENCIA |
|---------------------|----------------|----------------|------------------------------------|
| Jersey | 0.095 | 0.905 | Medrano et al. ²² |
| Jersey | 0.14 | 0.86 | Van Eenennaam et al. ²⁰ |
| Guernsey | 0.73 | 0.27 | Van Eenennaam et al. ²⁰ |
| Suizo Pardo | 0.33 | 0.67 | Van Eenennaam et al. ²⁰ |
| Suizo Pardo | 0.48 | 0.52 | Osta et al. ²³ |
| Limousin | 0.28 | 0.72 | Osta et al. ²³ |
| Japonés Negro | 0.77 | 0.23 | Yamamoto et al. ²⁴ |
| Simmental Austriaco | 0.7 | 0.3 | Ortner et al. ²⁵ |
| Slovakian Pieds | 0.509 | 0.491 | Bankyo et al. ²⁶ |
| Slovakian Pinzgaus | 0.633 | 0.364 | Bankyo et al. ²⁶ |
| Czech Pieds | 0.514 | 0.414 | Citek et al. ²⁷ |
| Montbeliard | 0.557 | 0.409 | Nebola et al. ²⁸ |

Cuadro 3. SITIOS DE RESTRICCIÓN DE LAS ENZIMAS *Hin*I y *Hind*III³⁰

| κ - Caseína A | | |
|--|--------------------------------|--------------------------------|
| Codon | 136 | 148 |
| Secuencia de aminoácidos | ...ProThr <u>Thr</u> GluAla... | ...LeuGlu <u>Asp</u> SerPro... |
| Secuencia de nucleótidos | ...CCTACCAC <u>CGA</u> AGCA... | ...CTAGAAG <u>ATT</u> CTCCA... |
| Sitios de restricción para <i>Hin</i> I | | GAAGA..... |
| κ - Caseína B | | |
| Codon | 136 | 148 |
| Secuencia de aminoácidos | ...ProThr <u>Ile</u> GluAla... | ...LeuGlu <u>Ala</u> SerPro... |
| Secuencia de nucleótidos | ...CCTACCA <u>TCG</u> AAGCA... | ...CTAGAAG <u>CTT</u> CTCCA... |
| Sitios de restricción para <i>Hae</i> III | | AAG <u>CTT</u> .. |

Cuadro 4. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y PRUEBA DE BONDAD DE AJUSTE DE CADA POBLACIÓN.

| Población | Individuos | Frecuencia Genotípica | | | χ^2 (A) | q^2 (B) |
|--------------|------------|-----------------------|-------|-------|--------------|-----------|
| | | AA | AB | BB | | |
| Holstein | 44 | 0.75 | 0.25 | 0.00 | 0.898 | 0.0156 |
| Hereford | 22 | 0.681 | 0.272 | 0.045 | 0.152 | 0.0330 |
| C. Guerrero | 40 | 0.625 | 0.325 | 0.05 | 0.033 | 0.0452 |
| C. Nayarit | 38 | 0.447 | 0.473 | 0.078 | 0.351 | 0.0997 |
| C. Durango | 30 | 0.366 | 0.566 | 0.066 | 1.806 | 0.1225 |
| C. Chihuahua | 44 | 0.272 | 0.636 | 0.090 | 4.4003* | 0.1674 |
| C. Lechero | 49 | 0.163 | 0.632 | 0.204 | 3.5041 | 0.2708 |

(A) Valores de Ji-cuadrada de la prueba de bondad de ajuste.

(B) Valor de la frecuencia genotípica de los homocigotos BB esperados.

* $P < 0.05$ $\chi^2_{(g-1)} = 3.84$

Cuadro 5. DISTANCIA GENÉTICA DE NEI Y VALORES DE PROBABILIDAD DE LA PRUEBA DE SIGNIFICANCIA.

| | HOLS. | HER. | GRO. | NAY | DGO. | CHIH. | LECH. |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| HOLS. | - | 0.38 | 0.12 | 0.0029 | 0.0011 | 0.0000 | 0.0000 |
| HER. | 0.0036 | | 0.68 | 0.11 | 0.058 | 0.009 | 0.0002 |
| GRO. | 0.0065 | 0.0008 | | 0.14 | 0.07 | 0.0060 | 0.0000 |
| NAY | 0.0279 | 0.0132 | 0.0068 | | 0.67 | 0.21 | 0.0069 |
| DGO. | 0.0367 | 0.0191 | 0.0113 | 0.0012 | | 0.458 | 0.0369 |
| CHIH. | 0.0548 | 0.0326 | 0.0224 | 0.0053 | 0.0018 | | 0.1288 |
| LECH. | 0.0805 | 0.0530 | 0.0401 | 0.0148 | 0.0087 | 0.0026 | |

NOTA. La diagonal superior muestra los valores de probabilidad de la χ^2 con un grado de libertad de que dos frecuencias sean diferentes y la diagonal inferior señala los valores de la matriz de distancias genéticas de Nei.

Cuadro 6. FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LA κ -CASEÍNA EN BOVINOS DE RAZAS ESPAÑOLAS²³.

| Raza | κ -CN A | κ -CN B |
|---------------|----------------|----------------|
| Asturiana | 0.62 | 0.38 |
| Rubia Gallega | 0.53 | 0.47 |
| Toro de lidia | 0.47 | 0.53 |
| Pirenaica | 0.53 | 0.47 |

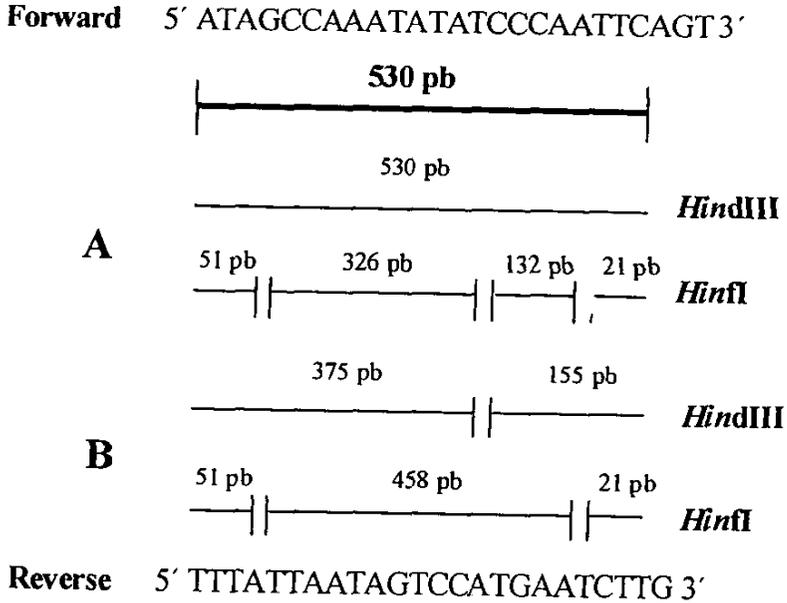


Figura 1. Mapa de los sitios de restricción de las enzimas *HindIII* y *HinfI* para el producto amplificado de PCR. Se muestra la posición y los tamaños de los fragmentos generados con las enzimas de restricción. El alelo A es cortado solo por *HinfI*, el alelo B es cortado por ambas enzimas *HindIII* y *HinfI*

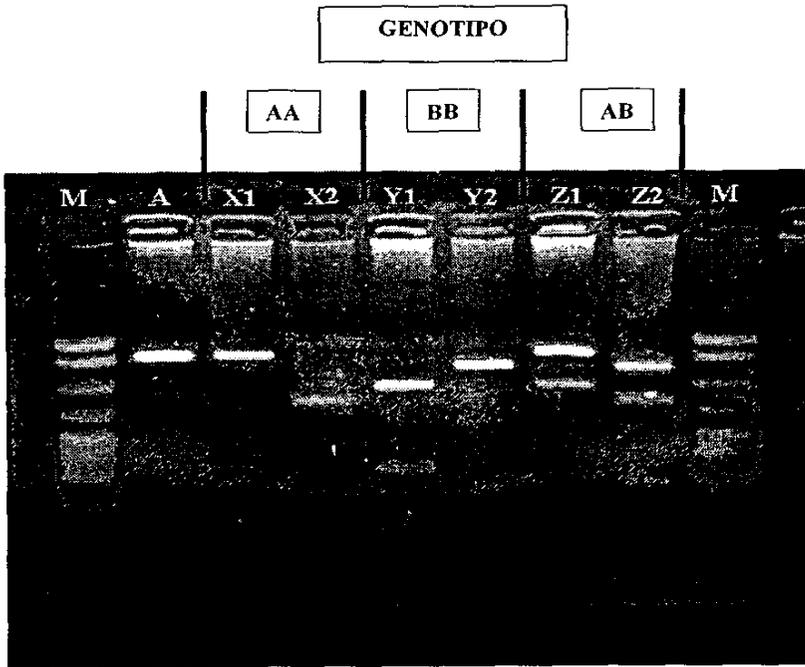


Figura 2. Patrones de los fragmentos de restricción del segmento amplificado del gen de la κ -caseína bovina. Muestras separadas en un gel de agarosa al 3%, donde M es el marcador de peso molecular pBR322/Msp I; A es el producto amplificado de 530 pb; X1, Y1 y Z1 son las muestra x, y, z respectivamente, digeridas con la enzima *Hind*III; y X2, Y2 y Z2 son las mismas muestras, pero digeridas con la enzima *Hinf*I.

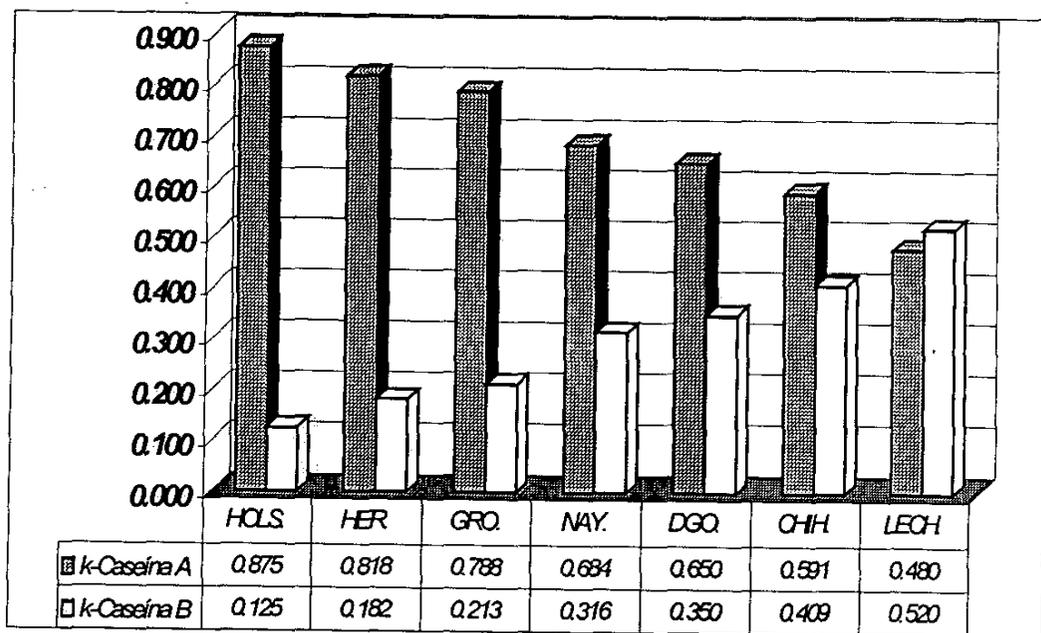


Figura 3. Frecuencias alélicas en las poblaciones Criollas y comerciales.

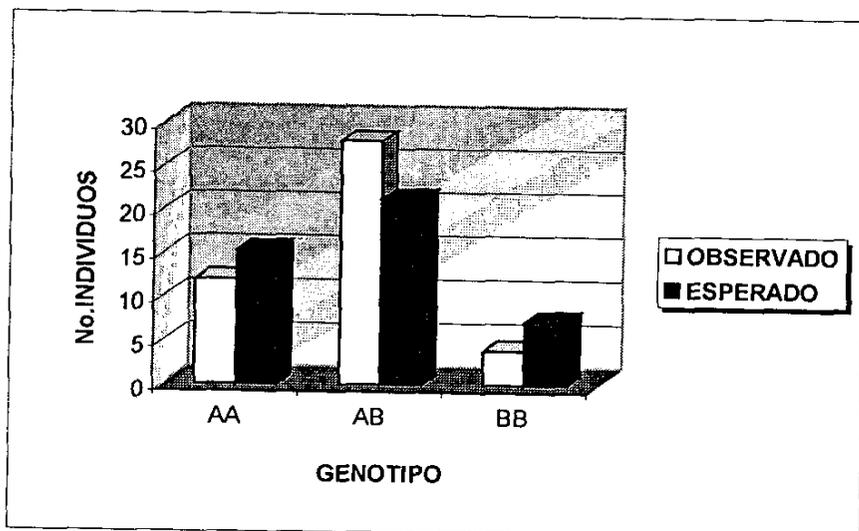


Figura 4. Frecuencia genotípica de la población Criolla de Chihuahua. En la gráfica se muestran las frecuencias genotípicas observadas (12, 28 y 4 para los genotipos AA, AB y BB respectivamente) y esperadas (15.36, 21.27 y 7.36 para los genotipos AA, AB y BB respectivamente) en la población Criolla de Chihuahua.

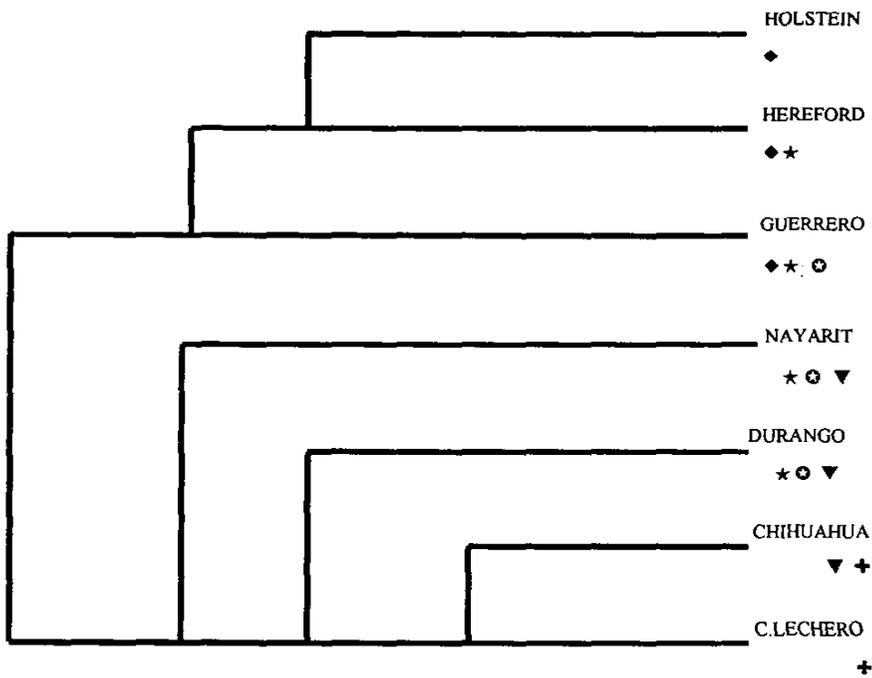


Figura 5. Dendrograma de las poblaciones bovinas utilizando las distancias genéticas de Nei. Las poblaciones con el mismo símbolo no presentaron diferencias significativas entre si ($P < 0.05$).