



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN
Y SERVICIO EN ZOOTECNIA
POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

GENOTIPIFICACIÓN PARA κ -CASEÍNA, β -CASEÍNA Y β -LACTOGLOBULINA EN BOVINOS JERSEY

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

JOSÉ LUIS ZEPEDA BATISTA

Bajo la supervisión de: BALDOMERO ALARCÓN ZÚÑIGA, Ph. D.
AGUSTÍN RUÍZ FLORES, Ph.D



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Julio de 2013

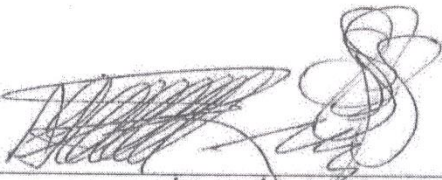
Chapingo, Estado de México

**GENOTIPIFICACIÓN PARA κ -CASEÍNA, β -CASEÍNA Y
 β -LACTOGLOBULINA EN BOVINOS JERSEY**

Tesis realizada por **JOSÉ LUIS ZEPEDA BATISTA** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

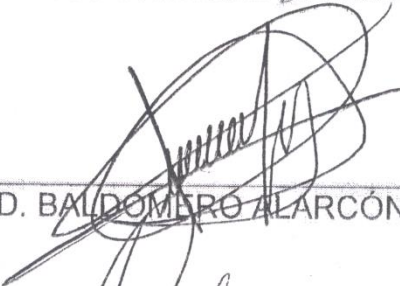
MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR:



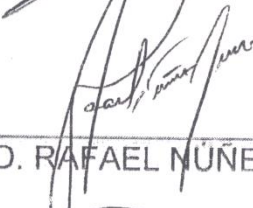
Ph.D. AGUSTÍN RUÍZ FLORES

CO-DIRECTOR:



Ph.D. BALDOMERO ALARCÓN ZÚÑIGA

ASESOR:



Ph.D. RAFAEL MUÑOZ DOMÍNGUEZ

ASESOR:



Ph.D. RODOLFO RAMÍREZ VALVERDE

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
DEDICATORIAS.....	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Selección asistida por marcadores (MAS).....	3
2.2. Proteínas lácteas.....	3
2.2.1. β -caseína.....	4
2.2.2. κ -caseína.....	5
2.2.3. β -lactoglobulina.....	8
2.3. Técnicas para genotipificación.....	11
2.4. Técnicas basadas en marcadores ligados.....	12
2.5. Genotipificación en especies domésticas.....	14
2.6. Genes con efectos mayores en bovinos lecheros.....	15
2.7. Inclusión de la genotipificación en la evaluación genética.....	16
2.8. Conclusiones generales.....	18
2.9. Literatura citada.....	19
3. POLIMORFISMOS DE TRES GENES DE PROTEÍNAS LÁCTEAS EN GANADO JERSEY MEXICANO.....	29
3.1. Resumen.....	29
3.2. Abstract.....	30
3.3. Introducción.....	31
3.4. Materiales y Métodos.....	32
3.4.1. Toma de muestras.....	32
3.4.2. Extracción de ADN de sangre.....	33

3.4.3. Extracción de ADN de semen congelado.....	34
3.4.4. Selección de los oligonucleótidos SNPs.....	34
3.4.5. Validación molecular de los oligonucleótidos SNPs.....	35
3.4.6. Genotipificación del ADN.....	36
3.4.7. Análisis de los datos.....	38
3.5. Resultados y Discusión.....	38
3.5.1. Genotipificación para tres proteínas lácteas.....	38
3.5.2. Estadísticos descriptivos de la población de muestreo.	45
3.6. Conclusiones.....	47
3.7. Literatura citada.....	48
3.8 Anexos.....	52

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro</u>	<u>Título</u>	<u>Página</u>
1	Codones y aminoácidos que cambian en las variantes alélicas de la β -caseína	7
2	Codones y aminoácidos que cambian en las variantes alélicas de la κ -caseína	9
3	Codones y aminoácidos que cambian en las variantes alélicas de la β -lactoglobulina	10
4	Frecuencias de los alelos más comunes de la κ -caseína en diferentes razas de bovinos	16
5	Frecuencias de los alelos más comunes de la β -caseína en diferentes razas de bovinos	17
6	Frecuencias de los alelos más comunes de la β -lactoglobulina en diferentes razas de bovinos	17
7	Número de animales utilizados para la obtención de ADN en el presente estudio	33
8	Frecuencias alélicas del gen de la β -caseína (CSN2) en bovinos Jersey mexicanos	38
9	Frecuencias genotípicas de una población de muestreo de bovinos Jersey del gen de la β -caseína (CSN2)	40
10	Frecuencias alélicas del gen de la κ -caseína (CSN3) en bovinos Jersey mexicanos	41
11	Frecuencias genotípicas de una población de muestreo de bovinos Jersey del gen de la κ -caseína (CSN3)	43
12	Frecuencias alélicas del gen de la β -lactoglobulina (LGB/PAEP) en bovinos Jersey mexicanos	43
13	Frecuencias genotípicas de una población de muestreo de bovinos Jersey del gen de la β -lactoglobulina (LGB/PAEP)	45
14	Valores estimados de heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e) para los loci CSN2, CSN3, y LGB en la población de bovinos Jersey Mexicanos	47

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Título</u>	<u>Página</u>
1	Estructura de los genes de la β -caseína, κ -caseína y β -lactoglobulina	5
2	Ejemplo de validación molecular de oligos para genotipificar bovinos Jersey	35
3	Ejemplo de validación de la repetibilidad de resultados de tres oligos para genotipificar bovinos Jersey	36
4	Ubicación del control negativo y las muestras de los animales en una placa de 96 pozos para realizar la genotipificación del ganado Jersey	37
5	Alelos observados (A) y alelos efectivos (Ae) para los tres loci de proteínas lácteas en toda la población	46

DEDICATORIAS

A Dios, por haberme acompañado a lo largo de esta gran empresa que significó la maestría.

A mis padres, por su incondicional apoyo y tan sabios consejos en los momentos que más lo he necesitado.

A mi esposa Isabel, por ser mi confidente y consejera de tiempo completo, además de la gran ayuda que me brindó durante el desarrollo de esta investigación.

A mi hijo José Luis, que llegó a mí en el momento que más necesitaba una razón para mantener el rumbo.

A mi hermana Olimpia y mi cuñado Omar, por todas las buenas experiencias que me dejaron en el corto convivir con ellos y que tan útiles fueron durante este tiempo lejos de casa.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, por la oportunidad de hacer los estudios de maestría.

Al Posgrado en Producción Animal por darme el privilegio de seguir formándome académicamente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamientos dado durante mis estudios de nivel maestría.

A la Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Jersey de Registro A.C. por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación.

Al Dr. Baldomero Alarcón Zúñiga por la paciencia, dirección, supervisión y enseñanza en todo momento, así mismo por los valiosos consejos y la amistad brindados durante la estancia en la maestría.

Al Dr. Agustín Ruíz Flores por darme la oportunidad de integrarme al grupo de estudiantes de la maestría en Innovación Ganadera bajo su dirección, su amistad, paciencia y enseñanza durante el tiempo que estuvimos en contacto directo.

Al Dr. Rafael Núñez Domínguez por sus valiosos consejos y por darme la oportunidad de forjar mi carácter a través de las vicisitudes presentadas a lo largo de mi estancia en la maestría. Así como por su amistad y apoyo.

Al Dr. Rodolfo Ramírez Valverde, por sus excelentes consejos y observaciones durante la investigación y en la realización del presente documento; así como por su amistad y las molestias que se tomó para corregir o mejorar algunas de mis conductas a través de atinadas sugerencias.

Al cuerpo de académicos e investigadores que forman parte del PPA por la experiencia transmitida para formarnos como profesionistas de alta calidad y enfrentar la realidad del sector agropecuario.

A los Maestros en Ciencias, Luis Saavedra, Pedro Meda, Juan Maldonado y María Elena Torres, por la gran amistad que me brindaron, así como el apoyo tan importante que recibí de ellos en diversas ocasiones a lo largo de la maestría.

A todos los que directa o indirectamente colaboraron para que esta investigación llegara a buen término.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: José Luis Zepeda Batista

Fecha de nacimiento: 25 de marzo de 1986

Lugar de nacimiento: Colima, Colima

CURP: ZEBL860325HCMPTS06

Profesión: Médico Veterinario Zootecnista

Cédula profesional: 6544444



Desarrollo académico

2011-2012	Maestro en Ciencias en Innovación Ganadera. Posgrado en Producción Animal. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
2004-2009	Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Colima. Tecomán, Colima.
2001-2004	Especialidad de Analista Químico. Bachillerato Técnico No. 4. Universidad de Colima. Villa de Álvarez, Colima.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La aplicación de técnicas moleculares como apoyo adicional para la selección de animales, ha adquirido importancia al ser posible identificar genes con efectos favorables para características productivas, así como de alelos detrimentales para el comportamiento productivo de los animales portadores.

La genotipificación es una técnica molecular con amplia difusión que permite detectar polimorfismos genéticos para las proteínas lácteas que influyen en la composición y propiedades tecnológicas de la leche (Jakob y Puhan, 1992; Caroli *et al.*, 2009).

La identificación de genotipos por medio de la genotipificación, ofrece alternativas adicionales al criador de ganado, ya que puede identificar a los animales portadores de los genotipos deseables según el objetivo de producción en las especies de interés zootécnico (Alarcón *et al.*, 2005), obteniendo una mejora genética en menor tiempo (Cervantes *et al.*, 2007).

Caroli *et al.* (2009) reportaron que la identificación de los alelos de las proteínas lácteas ha sido ampliamente utilizada en diversos países. En México la investigación acerca de estos genes es incipiente; hasta ahora se han estudiado los genes de la κ -caseína (Barreras *et al.*, 2001; Cortés, 2011) y la β -lactoglobulina (Barreras *et al.*, 2001; Castañeda, 2009; Meza-Nieto *et al.*, 2010) en las razas Holstein, Suizo Americano, Cebú y Criollo Lechero Tropical, y en las cruas entre las tres primeras razas. En México, no se encontró algún estudio acerca del gen de la β -caseína, el cual presenta efectos directos en las características productivas de los animales (Kamiński *et al.*, 2007; Woodford, 2011). Aunado a lo anterior, las técnicas utilizadas tienen altos costos e implican mucho tiempo para realizarse.

En el primer capítulo de esta Tesis, se aborda de manera breve y general la importancia de la genotipificación, su influencia en la selección de reproductores y los antecedentes de la misma a nivel nacional.

En el segundo capítulo se presenta una revisión de literatura de los conceptos básicos de las proteínas y sus genes: se describen las técnicas de genotipificación, su uso y aplicación en diversas especies animales, y los beneficios económicos que conlleva su implementación en bovinos.

Por último, en el tercer capítulo, se describe la genotipificación para genes de proteínas lácteas en animales de la raza Jersey pertenecientes a la Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Jersey de Registro A. C. En esta investigación se determinaron los genotipos de proteínas lácteas de cada uno de los animales muestreados, mediante oligonucleótidos diseñados específicamente para tal propósito.

En los anexos se muestran las secuencias que se utilizaron para genotipificar los animales utilizados en el segundo capítulo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Selección asistida por marcadores (MAS)

La MAS es una herramienta auxiliar en las evaluaciones genéticas en los hatos de bovinos ya que permite un avance genético mayor en combinación con los métodos convencionales (Cervantes *et al.*, 2007).

El uso de técnicas de identificación genética para la MAS, de animales de alta calidad, ha adquirido importancia en la identificación de genes relacionados con características productivas, así como de genes con efectos detrimentales para el comportamiento productivo de los animales portadores.

La MAS se utiliza en diversos países para determinar los polimorfismos en los alelos que conforman los genotipos de las proteínas lácteas, que tienen efectos directos en la composición y propiedades tecnológicas de la leche (Jakob y Puhán, 1992; Caroli *et al.*, 2009), hecho que Benavides (2003) demostró al reportar la influencia de las características genéticas de los animales en el comportamiento físico-químico de la leche.

Más recientemente Fernando y Grossman (1989) y Meuwissen *et al.* (2001) establecieron las bases teóricas para la selección de animales con base en las evaluaciones genómicas, ganando popularidad en producción animal. Dichas evaluaciones se fundamentan en considerar las partes del genoma que los animales heredaron de sus progenitores.

2.2. Proteínas lácteas

La leche bovina está compuesta por agua, proteína, grasa, lactosa, vitaminas y minerales en cantidades que varían con la raza. La fracción proteínica de la

leche se clasifica en dos grupos de acuerdo con su solubilidad a pH 4.6 y a 20°C de temperatura: caseínas y lactosuero.

Farrell *et al.* (2004) reportaron que las caseínas presentes en la leche son: α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína y κ -caseína, y se encuentran en proporciones relativas de 4:1:4:1. El lactosuero está conformado por diversas proteínas siendo más abundantes la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina (Ron *et al.*, 1994) en proporción 1:3; el conjunto de las seis caseínas más abundantes, la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina, representan el 90% de la proteína total en la leche.

De las proteínas de la leche, la β - y κ -caseínas, así como la β -lactoglobulina son importantes debido a que confieren diversas propiedades a la leche, en aspectos como rendimiento (Russo y Mariani, 1978; Marzalli y Ng-Kwai-Hang, 1986b; Gibson y Rozzi, 1990), tiempo de coagulación, y firmeza de la micela formada (Formaggioni *et al.*, 1999; Wedholm *et al.*, 2006; Jôudo *et al.*, 2008), vida de anaquel y niveles de lactoferrina (Lindmark-Månsson y Akesson, 2000).

2.2.1. β -caseína

La fracción de β -caseína constituye el 45% de las caseínas, está compuesta de 209 aminoácidos (Farrell *et al.*, 2004), es la más hidrofóbica de todas las caseínas (Aoki *et al.*, 1990), posee un peso molecular de 26.6 kilo daltones (kDa) (Creamer y Richardson, 1984) y forma junto con las α -caseínas un núcleo en la micela que interactúa con el Ca^+ (Schmidt, 1982).

El gen responsable de esta proteína se ubica en el cromosoma seis y recibe el nombre de CSN2, su estructura se muestra en la Figura 1. Este gen, posee 12 polimorfismos o alelos generados por el cambio en un codón y por tanto en un aminoácido (Farrell *et al.*, 2004), tal y como se muestra en el Cuadro 1.

Los alelos con mayor frecuencia en bovinos (*Bos taurus* y *Bos indicus*) son: A^1 , A^2 , A^3 , B y C (Jann *et al.*, 2002; Zwierzchowski, 2005; Keating *et al.*, 2008). Cada alelo confiere características específicas al comportamiento químico de la

leche; los animales con presencia de alelos A en su genotipo, en general producen mayor porcentaje de proteína del suero (Wedholm *et al.*, 2006) y producción de leche (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986; Wedholm *et al.*, 2006; Miciński *et al.*, 2007) con respecto a los animales con presencia de otros alelos en sus genotipos.

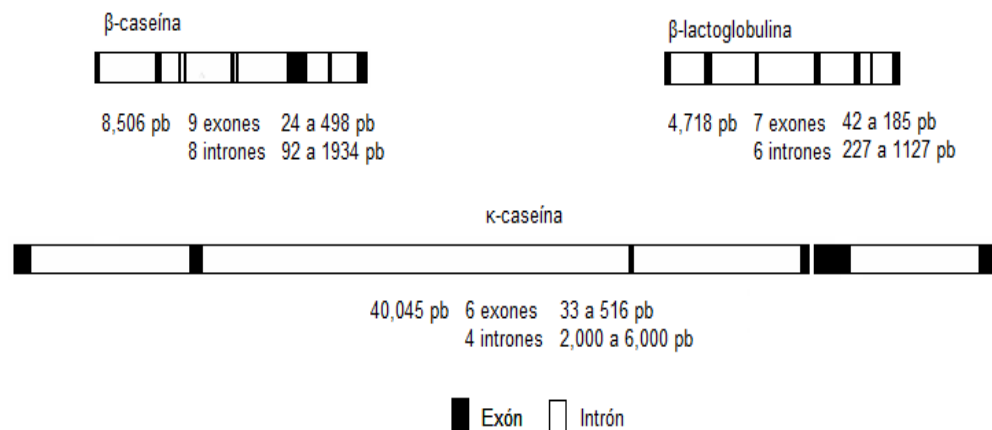


Figura 1. Estructura de los genes de la β-caseína, κ-caseína y β-lactoglobulina.

Fuentes: NCBI, 2012a, b, c; Requena y Agüera, 2007; Bawden y Nicholas, 1999 y Velmala *et al.*, 1999.

El alelo A¹ aumenta el porcentaje de lactoalbúmina en el suero (Wedholm *et al.*, 2006), los alelos A² y A³ aumentan el porcentaje de proteína en suero, y en el caso particular del alelo A², confiere propiedades reductoras de colesterol y triglicéridos a la leche de los animales portadores de dicho alelo (Tailford *et al.*, 2003; Wedholm *et al.*, 2006).

Los alelos B y C producen un mayor porcentaje de proteína en la fracción de caseínas (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986; Barłowska y Litwińczuk, 2001) con respecto a los otros alelos, pero el B produce un mejor rendimiento de leche y grasa (Heck *et al.*, 2009) y el C una mejor firmeza del coágulo de la leche (Gravert *et al.*, 1991; Jakob, 1992) de los animales portadores.

2.2.2. K-caseína

La fracción de la κ-caseína está formada por 169 aminoácidos (Farrell *et al.*, 2004), representa entre 12 y 15% del total de la caseína de la leche, se

encuentra en la superficie de la micela (Schmidt, 1982), posee un peso molecular de 19 kDa (Strange *et al.*, 1991) y junto con la β -caseína se encarga de la estabilidad de la molécula, además su hidrólisis modifica las características fisicoquímicas de la leche (Grosclaude, 1988).

El gen responsable de la κ -caseína se ubica en el cromosoma seis y recibe el nombre de CSN3, su estructura se muestra en la Figura 1. Además, posee 11 alelos generados por el cambio de un aminoácido en un codón (Farell *et al.*, 2004), como se muestra en el Cuadro 2.

Los alelos de la κ -caseína de mayor frecuencia en los bovinos son: A, B (Schlee y Rottmann, 1992) y E (Lúnden *et al.*, 1997). La variante A es la más común en la mayoría de las razas lecheras con excepción de Jersey (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 2003), en la que el alelo de mayor frecuencia es el B (Schlee y Rottmann, 1992).

Cada alelo confiere características específicas al comportamiento químico de la leche; el alelo A confiere una mayor producción de leche (Miciński *et al.*, 2007), mayor tiempo de coagulación (Schaar *et al.*, 1985) y en asociación con el alelo B se ha reportado una menor edad al primer parto en las vaquillas que los poseen.

El alelo B proporciona características como mayor rendimiento en el procesamiento de la leche, llegando a presentar rendimiento hasta 10% mayor en leche proveniente de animales con genotipo BB, comparado con otras combinaciones de polimorfismos (Tsiaras *et al.*, 2005).

Ojala *et al.* (1997) determinaron que la leche de los animales con presencia del alelo B en su genotipo, presenta tiempos de coagulación menores y un coágulo más firme que los encontrados en leche de animales con otros alelos.

Cuadro 1. Codones y aminoácidos* que cambian en las variantes alélicas de la β -caseína.

ALELO	CODONES Y AMINOÁCIDOS QUE CAMBIAN													
	18	25	35	36	37	67	72	88	93	106	122	137/138	152	?
A ¹						H								
A ²	S/P	R	S/P	E	E	P	Q	L	M	H	S	L/P	P	Q
A ³										Q				
B						H					R			
C			S		K	H								
D	K													
E				K										
F						H							L	
G						H						L		
H ¹		C						I						
H ²							E		L					
I									L					

? Desconocido.

*Nomenclatura molecular de aminoácidos: C=cisteína, E=ácido glutámico, H=histidina, I=isoleucina, K=lisina, L=leucina, M=metionina, P=prolina, Q=glutamina, R=arginina y S=serina.

Fuente: Farrell, 2004.

Barlowska y Litwińczuk (2001) reportaron que la presencia del alelo B en combinación con cualquier otro alelo en el genotipo de los animales genera una mayor concentración de grasa y proteína en la leche. Grosclaude (1988) determinó que los alelos C y E poseen características parecidas a las conferidas por el B y el A respectivamente, pero con menor eficiencia.

2.2.3. β -lactoglobulina

La β -lactoglobulina constituye 50% de la proteína del suero y de 12 a 18% de la proteína total de la leche (Fox y McSweeney, 1998; Liu *et al.*, 2007), está compuesta por 162 aminoácidos (Farrell *et al.*, 2004), su peso molecular es 18.4 kDa (Kontopidis *et al.*, 2004; Karimi *et al.*, 2009); además Liu *et al.* (2007) demostraron que presenta una menor capacidad antioxidante que la vitamina E y el probucol.

El gen responsable de la β -lactoglobulina se ubica en el cromosoma seis y recibe el nombre de LGB/PAEP, su estructura se muestra en la Figura 1. Este gen explica 90% de la variación en la concentración de la β -lactoglobulina en la proteína total de la leche, y presenta 11 polimorfismos generados por el cambio de un aminoácido en un codón (Cuadro 3).

Paterson *et al.* (1995b) encontraron que los alelos presentes en las razas *Bos taurus* son: A, B y C, este último con frecuencia baja; los alelos A y B están presentes en las razas Holstein, Ayrshire, Jersey y Pardo Suizo, el alelo C se presenta sólo en Jersey.

Cada alelo presente en el genotipo de los animales confiere características específicas al comportamiento químico de su leche; el alelo A aumenta el contenido de proteína de la leche (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1984; Heck *et al.*, 2009) siendo la fracción proteínica del suero la que se eleva.

Cuadro 2. Codones y aminoácidos* que cambian en las variantes alélicas de la κ-caseína.

ALELO	CODONES Y AMINOÁCIDOS QUE CAMBIAN						
	10	97	104	135	136	148	155/1552
A	R	R	S	T	T	D	S
B					I	A	
C		H					
E							G
F ¹						V	
F ²	H				I	A	
G ¹		C			I	A	
G ²						A	
H					I		
I			A				
J					I	A	R

*Nomenclatura molecular de aminoácidos: A=alanina, C=cisteína, D=ácido aspártico, G=glicina, H=histidina, I=isoleucina, R=arginina, S=serina, T=treonina y V= valina.

Fuente: Farrell, 2004.

Ng-Kwai-Hang *et al.* (1984) demostraron que al igual que la proteína en suero la producción de leche también aumenta con el alelo A; así también el porcentaje de grasa es menor y la estabilidad de la leche al calor es mayor que el de la leche producida por animales con otros alelos (Bikker *et al.*, 2000).

El alelo B confiere mayor rendimiento de la leche en su transformación en queso, así como mayor porcentaje de caseínas (Aleandri *et al.*, 1990; Lúnden *et al.*, 1997; Ng-Kwai-Hang, 1998), contenido de grasa (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1984; Balcan *et al.*, 2007), y permite la formación de micelas más firmes (Meza-Nieto *et al.*, 2010)

Cuadro 3. Codones y aminoácidos* que cambian en las variantes alélicas de la β -lactoglobulina

ALELO	CODONES Y AMINOÁCIDOS QUE CAMBIAN											
	45	50	56	59	64	70	78	108	118	126	129	158
A					D				V			
B	E	P	I	Q	G	K	I	E	A	P	D	E
C				H								
D	Q											
E												G
F		S									Y ²	G
G							M					G
H					D	N			V			
I								G				
J										L		
W			L									

*Nomenclatura molecular de aminoácidos: A=alanina, D=ácido aspártico, E=ácido glutámico, G=glicina, H=histidina, I=isoleucina, K=lisina, L=leucina, M=metionina, N=asparagina, P=prolina, Q=glutamina, S=serina, V= valina y Y²=tirosina.

Fuente: Farrell, 2004.

El alelo C ha sido poco estudiado debido a su poca relación con las características de interés en la industrialización de la leche (Paterson *et al.*, 1995a).

2.3. Técnicas para genotipificación

Hasta mediados de la década de los sesenta, los marcadores usados en genética y mejoramiento animal estaban controlados por genes asociados a caracteres polimórficos, en general fáciles de identificar visualmente (Ferreira y Grattapaglia, 1996). Estos autores reportan que sólo un pequeño número de marcadores morfológicos y características fenotípicas de fácil identificación visual, permitieron encontrar asociaciones significativas entre éstos y características de importancia económica; sin embargo, por sus limitaciones surgieron los marcadores isoenzimáticos, marcadores bioquímicos que distinguen genotipos homocigóticos de los heterocigóticos, accesibles a un mayor número de especies y que brindaban mejores resultados en la diferenciación de individuos.

Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular, aparecieron diversos métodos de detección de polimorfismos genéticos a nivel de ADN. Inicialmente el descubrimiento de las enzimas de restricción permitió el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (Grodzicker *et al.*, 1974).

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Mullis y Faloona (1987), permitió implementar nuevas técnicas como son la de conformación de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismo de cadena simple (SSCP; Barroso *et al.*, 1998), microsatélites (MST) y más recientemente polimorfismos de nucleótido simple (SNP).

Los marcadores moleculares se definen como fragmentos de ADN con ubicación específica identificable, cuya herencia es factible de rastrear a nivel genómico y corresponden a regiones expresadas o no del genoma (Ferreira y Grattapaglia, 1996).

Los dos tipos de marcadores moleculares mayormente utilizados en las genotipificaciones son: marcadores indirectos o MST y los directos también llamados marcadores ligados (ML).

Los MST son secuencias cortas de uno a cuatro nucleótidos repetidos de 10 a 50 veces a lo largo del genoma de la especie y flanqueados por regiones altamente conservadas. Venter *et al.* (2001) reportan que se conocen más de 900,000 de ellos, y poseen una confiabilidad hasta de 99.3% en razas cebuínas y de 99.9% en razas europeas en pruebas de determinación de paternidad (Trujillo *et al.*, 2000; Riojas-Valdés *et al.*, 2006; Wiggans *et al.*, 2009).

Los ML son loci específicos a lo largo del genoma de la especie encargados de codificar los genes correspondientes a ciertas características bien definidas, Hayes *et al.* (2009) indican el conocimiento de cerca de tres millones de ellos y se han validado poco más de 700,000 en humanos y bovinos (Matukumalli *et al.*, 2009). Para estos marcadores, se han desarrollado variantes de la técnica de la PCR basadas en diferentes propiedades físico químicas del ADN.

2.4. Técnicas basadas en marcadores ligados

El desarrollo de la secuenciación del ADN permitió el descubrimiento de SNPs, considerados los marcadores ligados a caracteres genotípicos alelarios entre sí, determinada en última instancia por el número de ellos que se rastrean en el genoma de la especie en estudio. Comercialmente el chip más ampliamente utilizado en la genotipificación de animales es el de 54,609 SNPs.

Las propiedades de los SNP respecto a presencia abundante en el genoma, estabilidad genética y la alta capacidad de inclusión en análisis automatizados, los hacen una herramienta útil para la genotipificación (Vignal *et al.*, 2002), y recientemente en estudios de asociación del genoma completo (genome-wide association study).

La característica de diferenciar entre polimorfismos generados por una sola base nitrogenada, es lo que los hace tan efectivos en la realización de

genotipificaciones (Collins *et al.*, 1997) y la elaboración de patrones de herencia genética asociados a enfermedades (Johnson y Todd, 2000; Risch, 2000).

Simianer (2007) reporta más de dos millones de SNPs identificados en animales, los cuales se dividen en: SNPs de posición, que sirven para localizar áreas específicas del genoma, y SNPs individuales, que identifican las diferencias entre los polimorfismos de un gen (Pui-Yan y Xiangning, 2003).

Además, los SNP están presentes en regiones codificantes y no codificantes, pudiendo existir al menos un SNP por cada 1,000 pares de bases, por lo que pueden utilizarse para detectar polimorfismos en materiales pertenecientes a diversas bibliotecas genómicas (Stoneking, 2001; Vignal *et al.*, 2002), presentan la ventaja de necesitarse menor número de SNPs para realizar análisis genéticos complejos que con MST (Wang *et al.*, 1998).

Los marcadores ligados pueden utilizarse para la genotipificación mediante las técnicas de detección: hibridación, extensión de primer, ligamiento y división invasiva. De acuerdo con varios autores (Hsu *et al.*, 2001; Latif *et al.*, 2001) la división invasiva es la más utilizada actualmente en su modalidad de aplicación de marcadores fluorescentes, ya que se basa en la implementación de la detección de los polimorfismos por medio de la PCR, pudiendo ser automatizada por medio de termocicladores en tiempo real.

Bonfatti *et al.* (2008) implementaron la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la detección de polimorfismos de los genes, ya que permite determinar dichos polimorfismos mediante la detección de las isoformas de las proteínas correspondientes a estos genes.

La técnica de HPLC, presenta variantes relacionadas con el tipo de material analizado, siendo la HPLC de fase reversa (RP-HPLC), la que se utiliza para validar los resultados de las genotipificaciones realizadas por métodos moleculares, ya que la confiabilidad para detectar las isoformas de las proteínas

de la leche es superior a 95%, además de ser relativamente sencilla y barata con respecto a otros métodos de HPLC (Bonfatti *et al.*, 2008).

Estas técnicas han sido ampliamente utilizadas en diversas especies animales obteniéndose resultados importantes para el desarrollo de esquemas de cruzamiento, conservación de razas o aplicación de dichos conocimientos en la medicina preventiva genómica (Barendse *et al.*, 1997; Meijerink *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2002).

2.5. Genotipificación en especies domésticas

Las especies domésticas en las que se ha realizado la determinación del genoma son: bovino (Barendse *et al.*, 1997; Kappes *et al.*, 1997; Takeda *et al.*, 2002), ovino (Maddox, 2004), cerdo (Rohrer *et al.*, 1994), cabra (Schibler *et al.*, 1998), perro (Ostrander y Wayne, 2005), pollo (NCBI, 2012d) y caballo (Penedo *et al.*, 2005).

Para estas especies son varios los marcadores moleculares conocidos, constituidos por genes relacionados con defectos congénitos (Shuster *et al.*, 1992; Takeda *et al.*, 2002), deficiencias o ausencias en la síntesis de hormonas relacionadas con el color de la capa del animal (Joerg *et al.*, 1996; Seitz *et al.*, 1999), calidad de la leche (Medrano y Aguilar-Cordova, 1990; Rincón y Medrano, 2003), calidad de la carne (Fuji *et al.*, 1991), consumo de alimento (Kim *et al.*, 2000), enfermedades (Vögeli *et al.*, 1997; Meijerink *et al.*, 2000), características reproductivas (Galloway *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2001), de crecimiento (Grobet *et al.*, 1998; Freking *et al.*, 2002), y producción y rendimiento en queso de la leche (Grisart *et al.*, 2002; Blott *et al.*, 2003).

La selección del método para realizar la genotipificación depende de la aplicación específica que se desea; si el objetivo es identificar el genoma o evaluar la diversidad genética, los métodos con rango múltiple de elevado o alto volumen (por ejemplo: SSCP y SNP), son apropiados debido a que pueden ser detectados muchos loci distribuidos al azar en el genoma, o aledaños entre sí.

Los métodos con rango múltiple de elevado o alto volumen de marcadores también son útiles en análisis genotípicos y taxonómicos para construir mapas genéticos y para identificar marcadores asociados a una característica en particular. Para varios aspectos de la biología poblacional (análisis de paternidad, flujo de genes, etc.) y mejoramiento genético, los métodos con alto contenido de información son más útiles (Boichard *et al.*, 2002).

2.6. Genes con efectos mayores en bovinos lecheros

Los genes con efectos mayores poseen altos niveles de repercusión económica por estar asociados con características como mortalidad o disminución de la producción (Meijerink *et al.*, 2000; Grisart *et al.*, 2002; Blott *et al.*, 2003).

En bovinos lecheros, algunos de estos genes están relacionados con la producción y calidad de la leche, como los genes de la κ -caseína (gen CSN3), β -caseína (gen CSN2) (Eigler y Butler, 1984) y β -lactoglobulina (gen LGB) (NCBI, 2012c); estos genes regulan la consolidación y resistencia de las micelas formadas por las moléculas lácteas (Aleandri *et al.*, 1990; Ng-Kwai-Hang, 1998; Formaggioni *et al.*, 1999), de las cuales depende el rendimiento de la leche al transformarla en queso (Russo y Mariani, 1978; Marzalli y Ng-Kwai-Hang, 1986a; Gibson y Rozzi, 1990) y en consecuencia el valor económico de la leche.

Debido a los efectos que los alelos poseen en las características productivas de los animales, es importante conocer las frecuencias alélicas de estos genes en las poblaciones de bovinos lecheros nacionales, pues representan una herramienta adicional en la selección de animales orientados a una mejora genética de la leche para la industria quesera.

Varios autores (Mariani y Summer, 1999; Di Stasio y Mariani, 2000; Wedholm *et al.*, 2006) señalan que la combinación de los alelos B de κ -caseína, β -caseína y β -lactoglobulina en los genotipos de los animales, promueve la formación de una micela óptima para el uso en la industria quesera; sin embargo, se sabe

que el alelo B en la proteína β -caseína, posee propiedades dañinas para la salud del consumidor de la leche (Laugessen *et al.*, 2003; Tailford *et al.*, 2003).

El alelo B en las proteínas β -caseína, κ -caseína y β -lactoglobulina, se presenta con distinta frecuencia en cada raza, por lo que esta información es valiosa para el diseño de programas de mejoramiento genético enfocados al mejoramiento de la eficiencia de la leche en su transformación a queso.

2.7. Inclusión de la genotipificación en la evaluación genética

En el campo de la genética animal se ha producido una revolución en todas las vertientes de la investigación relacionadas con el mejoramiento genético de poblaciones animales. Por una parte, se encuentra la genética cuantitativa, con una concepción y estudio integrales de los factores que inciden en el mejoramiento genético.

Cuadro 4. Frecuencias de los alelos más comunes de la κ -caseína en diferentes razas de bovinos.

RAZA	FRECUENCIA DE LOS ALELOS			AUTOR
	A	B	C	
Jersey	0.29	0.71	s/d	Jann <i>et al.</i> , 2004
Holstein	0.83–0.9	0.1–0.17	s/d	Van Eenennaam y Medrano, 1991; Jann <i>et al.</i> , 2004
Guernsey	0.71–0.73	0.27	0.02	Van Eenennaam y Medrano, 1991; Schlee y Rottmann, 1992
PSA	0.43	0.57	s/d	Cervantes <i>et al.</i> , 2007
Ayrshire	0.61	0.39	s/d	Van Eenennaam y Medrano, 1991; Ilkonen <i>et al.</i> , 2000

s/d: dato no reportado

PSA: Pardo Suizo Americano

Las metodologías cuantitativas utilizan información productiva y genealógica, el procesamiento de esta información requiere de grandes capacidades de cálculo para el análisis estadístico, los resultados de las evaluaciones cuantitativas resultan en la estimación de la habilidad de transmisión predicha, que es una

medida de la superioridad/inferioridad que tendría la progenie de un animal comparada con sus contemporáneos.

Cuadro 5. Frecuencias de los alelos más comunes de la β -caseína en diferentes razas de bovinos.

RAZA	FRECUENCIA DE LOS ALELOS			AUTOR
	A ¹	A ²	B	
Jersey	0.1	0.72	0.18–0.35	Van Eenennaam y Medrano, 1991; Ehrmann <i>et al.</i> , 1997
Holstein	0.31–0.66	0.24–0.62	s/d	Swaissgood, 1992; Van Eenennaam y Medrano, 1991
Guernsey	0.03	0.97	s/d	Van Eenennaam y Medrano, 1991
PS	0.4	0.25–0.42	0.18–0.35	Ehrmann <i>et al.</i> , 1997; Keating <i>et al.</i> , 2008
Normanda	0.22	0.09	0.69	Thompson <i>et al.</i> , 1964; Keating <i>et al.</i> , 2008

PS: Pardo Suizo

s/d: dato no reportado

Por otro lado, Zaragoza *et al.* (1994) señalan que las metodologías de biología molecular y genética bioquímica, basadas en el estudio del material genético, tienen un papel imprescindible en la identificación genética y pruebas de parentesco, en el diagnóstico de enfermedades hereditarias y en el aporte de los marcadores genéticos para el apoyo a la selección dirigida a caracteres cuantitativos o económicos.

Cuadro 6. Frecuencias de los alelos más comunes de la β -lactoglobulina en diferentes razas de bovinos.

RAZA	FRECUENCIA DE LOS ALELOS			AUTOR
	A	B	C	
Jersey	0.12	0.56	0.1–0.18	Paterson <i>et al.</i> , 1995b; Celik, 2003
Holstein	0.51–0.58	0.41–0.42	s/d	González de Llano, 1990; Heck <i>et al.</i> , 2009
PS	0.37	0.63	s/d	Van Eenennaam y Medrano, 1991
CLT	0.35	0.65	s/d	Meza-Nieto <i>et al.</i> , 2010

s/d: dato no reportado

PS: Pardo Suizo

CLT: Criollo Lechero Tropical

Van Eenennaam *et al.* (2007) reportan que debido a las características de las evaluaciones genéticas realizadas en conjunto con marcadores moleculares, éstas utilizan muestras de tamaño pequeño, alrededor de 400 a 500 animales, siendo una ventaja en cuanto a número de animales necesarios para obtener resultados confiables, teniendo en cuenta además que los costos son relativamente bajos cuando las genotipificaciones se realizan comercialmente.

La información de los marcadores moleculares se incluye en las evaluaciones genéticas, por medio de un recuadro o anexo en el área de la información propia del reproductor que señala el genotipo del animal para la proteína láctea correspondiente (Oltra, 2011).

2.7. Conclusiones generales

La genotipificación es una herramienta auxiliar en programas de mejoramiento genético, que puede incrementar el progreso genético al utilizarse para reducir el periodo de tiempo necesario para obtener resultados en dichos programas, así como coadyuvar en la selección temprana de reproductores y sobre todo, incrementar la confiabilidad de los valores genéticos de caracteres de importancia productiva y calidad de la leche.

La aplicación y resultados de estas metodologías moleculares están relacionados con las características de manejo y función zootécnica del hato, por lo que el empresario ganadero deberá adoptar el nivel de inclusión de estas tecnologías que mejor convenga a sus expectativas de producción.

La genotipificación no aumenta la producción individual de leche o carne *per se*, sino que la utilización de los datos que esta herramienta genera, en conjunto con los datos productivos y los resultados de las evaluaciones genéticas tradicionales, conduce al mejoramiento en las características para las cuales se realiza la selección.

Los genotipos identificados en esta investigación podrán ser incluidos en los resúmenes de las evaluaciones genéticas de la raza Jersey, realizadas en la Universidad Autónoma Chapingo, tal y como aparece en los catálogos de sementales de compañías comerciales, para su eventual utilización e implementación en los programas de mejoramiento genético de los criadores de dicha raza.

2.8. Literatura citada

- Alarcón, A. D., J. O. Duarte, F. A. Rodríguez y H. Janacua. 2005. Incidencia de carne pálida-suave-exudativa (PSE) y oscura-firme-seca (DFD) en cerdos sacrificados en la región del Bajío en México. *Técnica Pecuaria en México* 43(3): 335-346.
- Aleandri, R., L. G. Buttazzoni, J. C. Schneider, A. Caroli, and R. Davoli. 1990. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese producing ability. *Journal of Dairy Science* 73: 241-255.
- Aoki, T., N. Yamada, and Y. Kako. 1990. Relation between colloidal calcium phosphate cross-linkage and release of β -casein from bovine casein micelles on cooling. *Agricultural Biology and Chemistry* 54: 2287–2292.
- Balcan, R. A., S. E. Georgescu, M. Adina, D. Anca, C. D. Tesio, and C. Marieta. 2007. Identification of beta-lactoglobulin and kappa-casein genotypes in cattle. *Zoology and Biotechnology* 40(1): 211-216.
- Barendse, W. J., D. Vaiman, S. J. Kemp, Y. Sugimoto, S. M. Armitage, J. L. Williams, H. S. Sun, A. Eggen, M. Agaba, S. A. Aleyasin, M. Band, M. D. Bishop, J. Buitkamp, K. A. Byrne, F. Collins, L. Cooper, W. Coppettiers, B. Benys, R. D. Drinkwater, K. Easterday, C. Elduque, S. Ennis, G. Erhardt, L. Ferretti, N. Flavin, Q. Gao, M. Georges, R. Gurung, B. Harlizius, G. Hawkins, J. D. Hetzel, T. Hirano, D. Hulme, C. Jorgensen, M. Kessler, B. W. Kirkpatrick, B. Konfortov, S. Kostia, C. Kuhn, J. A. Lenstra, H. Leveziel, H. A. Lewin, B. Leyhe, L. Lil, I. Martin B., R. A. McGraw, J. R. Miller, D. E. Moody, S. S. Moore, S. Nakane, I. J. Nijman, I. Olsaker, D. Pomp, A. Rando, M. Ron, A. Shalom, A. J. Teale, U. Thieven, B.G.D. Urquhart, D.I. Vage, A. Van de Weghe, S. Varvio, R. Velmala, J. Vilkki, R. Weikard, C. Woodside, J. E. Womack, and M. Z. P. Zanotti. 1997. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mammalian Genome* 8: 21-28.
- Barlowska J., and Z. Litwińczuk. 2001. Influence of genetic combinations β -lactoglobulin and κ -casein on productiveness and chemical composition of milk of Jersey cows. In: *Proceedings of the International Scientific Conference*. Poznań, Poland, pp. 119-127.
- Barreras, A., O. Robinson, F. J. Monge, O. Vizcarra, and L. H. Navarro. 2001. Effects of genotypes of casein and serum proteins on milk production in Holsteins. *Journal of Animal Science* 52(3): 669-673.

- Barroso, A., S. Dunner, and J. Cañón. 1998. Technical Note: Detection of bovine kappa-casein variants A, B, C, and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Journal of Animal Science* 76: 1535–1538.
- Bawden, W. S., and K. R. Nicholas. 1999. Molecular Genetics of Milk Production. *The Genetics of Cattle*. CAB International. pp. 539-564.
- Benavides, C.T. A. 2003. Efecto de las variantes genéticas A y B de k-caseína y β -lactoglobulina sobre las propiedades de coagulación de la leche. Tesis Profesional. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. pp 50-63.
- Bikker J. F., S. G. Anema, Y. Li, and J. P. Hill. 2000. Rheological properties of acid gels prepared from heated milk fortified with whey protein mixtures containing the A, B and C variants of β -lactoglobulin. *International Dairy Journal* 10: 723-732.
- Blott S., J. J. Kim, S. Moio, A. Schmidt-Kuntzel, A. Cornet, P. Berzi, N. Cambisano, C. Ford, B. Grisart, D. Johnson, L. Karim, P. Simon, R. Snell, R. Spelman, J. Wong, J. Vilkki, M. Georges, F. Farnir, and W. Coppieters. 2003. Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics* 163: 253–266.
- Boichard, D., S. Fritz, M. N. Rossignol, and M. Cornide 2002. Marcadores moleculares: nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Editorial Félix Varela, La Habana, Cuba. pp. 212-220.
- Bonfatti, V., L. Grigoletto, A. Cechinato, L. Gallo, and P. Carnier. 2008. Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *Journal of Chromatography A* 1195: 101-106.
- Caroli, A. M., S. Chessa, and G. J. Erhardt. 2009. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science* 92: 5335–5352.
- Castañeda M., E. A. 2009. Caracterización molecular del gen de beta lactoglobulina (LGB) en un hato de vacas de doble propósito. Tesis Profesional. Universidad Veracruzana. Jalapa, Veracruz. 56 p.
- Celik, S. 2003 Beta-lactoglobulin genetic variants in Brown Swiss breed and its association with compositional properties and rennet clotting time of milk. *International Dairy Journal* 13: 727–731.
- Cervantes, P., M. Luna, A. Hernández, F. Pérez-Gil, P. Ponce, y O. Uffo. 2007. Polimorfismo genético en el locus de la kappa-caseína, en vacas de diferentes razas y cruces en el trópico mexicano. *Revista de Salud Animal* 29(2): 78-84.
- Cervantes E, F., G. A. Villegas, V. A. Cesín, y O. A. Espinoza. 2008. Los quesos mexicanos genuinos. Patrimonio que debe rescatarse. Mundiprensa. México. pp. 186.
- Collins, F. S., M. S. Guyer, and A. Charkravarti. 1997. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 278:1580-1581.

- Cortés L., N. G. 2011. Frecuencias alélicas y genotípicas del gen kappa caseína en bovinos de doble propósito. Tesis Profesional. Universidad del Papaloapan. México. 66 p.
- Creamer, L. K., and T. Richardson. 1984. Anomalous behavior of bovine alpha S₁- and β -caseins on gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate buffers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 234(2): 476-486.
- Di Stasio, L., and P. Mariani. 2000. The role of protein polymorphism in genetic improvement of milk production. *Zootecnica e Nutrizione Animale* 26(3): 69-90.
- Ehrmann, S., H. Bartenschlager, and H. Geldermann. 1997, Quantification of gene effects on single milk proteins in selected groups of dairy cows, *Journal of Animal Breeding*. 114(1-6): 121-132.
- Eigler, W. N., and J. E. Butler. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk, Fifth revision. *Journal of Dairy Science* 67: 1599-1631.
- Farrell, H. M., R. Jimenez-Flores, G. T. Bleck, E. M. Brown, J. E. Butler, and L. K. Creamer. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk – sixth revision. *Journal of Dairy Science* 87: 1641-1674.
- Fernando, R. L., and M. Grossman. 1989. Marker assisted selection using best linear unbiased prediction. *Genetics Selection Evolution* 21: 467-477.
- Ferreira, M. A., e D. Grattapaglia. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2a. ed. Embrapa. Brasil. 220 p.
- Formaggioni, P., A. Summer, M. Malacarne, and P. Mariani. 1999. Milk protein polymorphism detection and diffusion of the genetic variants in Bos genus. Disponible en: [\[http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/formaggioni/formaggioni.htm\]](http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/formaggioni/formaggioni.htm) Consultada el 26 de abril de 2011.
- Freking, B. A., S. K. Murphy, A. A. Wylie, S. J. Rhodes, J. W. Keele, K. A. Leymaster, R. L. Jirtle, and T. P. Smith. 2002. Identification of the single base change causing the callipyge muscle hypertrophy phenotype, the only known example of polar overdominance in mammals. *Genome Research* 10: 1496–1506.
- Fox, P. F., and P. L. H. McSweeney. 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London: Blackie Academic & Professional. 478 p.
- Fuji, J., K. Otsu, F. Zorzato, S. De León, V. K. Khanna, J. E. Weiler, P. J. O'Brien, and D. H. MacLennan. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253: 448–451.
- Galloway, S. M., K. P. McNatty, L. M. Cambridge, M. P. E. Laitinen, J. L. Juengel, T. S. Jokiranta, R. J. McLaren, K. Luiro, K. G. Dodds, G. W. Montgomery, A. E. Beattie, G. H. Davis, and O. Ritvos. 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage- sensitive manner. *Nature Genetics* 25: 279–283.
- Gibson, J. P., and P. Rozzi. 1990. The use of κ -casein genotypes in dairy cattle breeding. In: *Proceedings 4th. World Congress of Genetic Applied to Livestock Production*. 23 to 27 July. Edinburgh, Scotland. p.163.

- González de Llano, D. 1990. Polimorfismo genético de las proteínas de la leche de vaca. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 4: 77-81.
- Gravert, H. O., H. Schulte-Coerno, and K. Oloffs. 1991. The relevance of α -casein for genetic differences in cheese making properties. *International Circle of Dairy Research Leaders on Genetic Polymorphism of Milk Proteins*. Laboratory of Dairy Science, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.
- Grisart, B., W. Coppieters, F. Farnir, L. Karim, C. Ford, N. Cambisano, M. Mni, S. Reid, R. Spelman, M. Georges, and R. Snell. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Research* 12: 222–231.
- Grobet, L., D. Poncelet, L. J. Royo, B. Brouwers, D. Pirottin, C. Michaux, F. Menissier, M. Zanotti, S. Dunner, and M. Georges. 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mammalian Genome* 9: 210–213.
- Grodzicker, T., J. Williams, P. Sharp, and J. Sambrook. 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology* 39: 439-446.
- Grosclaude F. 1988. Le polymorphisme génétique des principaux lactoprotéines bovines. *Institut National de la Recherche Agronomique*. *Producción Animal* 1: 5-17.
- Hayes, B. J., P. J. Bowman, A. C. Chamberlain, K. Verbyla, and M. E. Goddard. 2009. Accuracy of genomic breeding values in multi-breed dairy cattle populations. *Genetics Selection Evolution* 41: 51.
- Heck, J. M. L., A. Schennink, H. J. F. Van Valenberg, H. Bovenhuis, M. H. P. W. Visker, and J. A. M. Van Arendonk. 2009. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science* 92: 1192-1202.
- Hsu, T. M., S. M. Law, S. Duan, B. P. Neri, and P. Kwok. 2001. Genotyping single nucleotide polymorphisms by the invader assay with dual-color fluorescence polarization detection. *Clinical Chemistry* 47: 1373-1377.
- Ikonen, T. L., M. Ojala, and O. Ruottinen. 2000. Possibilities of genetic improvement of milk coagulation properties of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82: 1026–1033.
- Jakob, E. 1992. Unterschiede zwischen labtrüßiger und normalgerinnender Milch unter besonderer Berücksichtigung der Caseinfraktion. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung* 15: 27-29.
- Jakob, E., and Z. Puhán. 1992. Technological properties of milk as influenced by genetic polymorphism of milk proteins. *International Dairy Journal* 2(3): 157-178.
- Jann, O., E. M. Ibeagha-Awemu, C. Özbeyaz, P. Zaragoza, J. L. Williams, and P. Ajmone-Marsan. 2004. Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus. *Genetic Selection Evolution* 36: 243-257.
- Jann, O., G. Ceriotti, A. Caroli, and G. Erhardt. 2002. A new variant in exon VII of the bovine β -casein gene (CSN2) and its distribution among European cattle breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 119: 65–68.

- Joerg, H., H. R. Fries, E. Meijerink, and G. F. Stranzinger. 1996. Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. *Mammalian Genome* 7: 317–318.
- Johnson, G.C., and J. A. Todd. 2000. Strategies in complex disease mapping. *Current Opinion in Genetics and Development* 10: 330–334.
- Jōudo, I., M. Henno, T. Kaart, T. Pussa, and O. Kart. 2008. The effect of milk protein contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. *International Dairy Journal* 18: 964–967.
- Kamiński, S., A. Cieślińska, and E. Kostyra. 2007. Polymorphism of bovine beta casein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics* 48(3): 189–198.
- Kappes, S. M., J. W. Keele, R. T. Stone, R. A. McGraw, T. S. Sonstegard, T. P. L. Smith, N. L. Lopez-Corrales, and C. W. Beattie. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. Cold Spring Harbor Laboratory Press 7: 235–249.
- Karimi, K., M. T. Beigi Nasiri, J. Fayyazi, K. H. Mirzadeh, and H. Roushanfekr. 2009. Allele and genotype frequencies of β -lactoglobulin gene in Iranian Najdi cattle and buffalo populations using PCR-RFLP. *African Journal of Biotechnology* 5(8): 3654–3657.
- Keating, A. F., T. J. Smith, R. P. Ross, and M. T. Cairns. 2008. A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to β -casomorphin. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 47: 99–104.
- Kim, K. S., N. Larsen, T. Short, G. Plastow, and M. F. Rothschild. 2000. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth and feed intake traits. *Mammalian Genome* 11: 131–135.
- Kontopidis, G., C. Holt, and L. Sawyer. 2004. Invited review: β -lactoglobulin: binding properties, structure and function. *Journal of Dairy Science* 87: 785–796.
- Latif, S., I. Bauer-Sardiña, K. Ranade, K. Livak, and P. Y. Kwok. 2001. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis II: 5'-nuclease assay. *Genome Research* 11: 436–440.
- Laugessen, M., and R. Elliot. 2003. Ischaemic heart disease, type 1 diabetes, and cow milk A1 beta casein. *New Zealand Medical Journal* 116: 1168.
- Liu, H. C., W. L. Chen, and S. J. T. Mao. 2007. Antioxidant nature of bovine milk β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science* 90: 547–555.
- Lúnden, A., M. Nilsson, and L. Janson. 1997. Marked effect of β -lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. *Journal of Dairy Science* 80: 2996–3005.
- Lindmark-Månsson, H., and B. Akesson. 2000. Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition* 84: 103–110.
- Maddox, J.F. 2004. Enhancing the sheep genome map. Procedures in the 29th International Conference of Animal Genetics. p. 86. 11–16 September. Tokyo, Japan, International Society for Animal Genetics and Japanese Society of Animal Breeding and Genetics. Disponible en: www.isag.org.uk/ISAG/all/ISAG_Tokyo_2004_Proceedings.pdf.

- Mariani, P., y A. Summer. 1999. Polimorfismo delle proteine ed attitudine tecnologico-casearia del latte. *Scienza y Tecnica Lattiero-Casearia* 50: 197-230.
- Marziali, A. S., and K. F. Ng-Kwai-Hang. 1986a. Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. *Journal of Dairy Science* 69: 1793-1798.
- Marziali, A. S., and K. F. Ng-Kwai-Hang. 1986b. Relationships between milk protein polymorphisms and cheese yielding capacity. *Journal of Dairy Science* 69: 1193-1201.
- Matukumalli, L. K., C. T. Lawley, R. D. Schnabel, J. F. Taylor, M. F. Allan, M. P. Heaton, J. O'Connell, S. S. Moore, T. P. L. Smith, T. S. Sonstegard, and C. P. Van Tasell. 2009. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *Plos One* 4(4): 1-13.
- Medrano, J. F., and E. Aguilar-Cordova. 1990. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Animal Biotechnology* 1: 73-77.
- Meijerink, E., S. Neuenschwander, R. Fries, A. Dinter, H. U. Bertschinger, G. Stranzinger, and P. Vögeli. 2000. A DNA polymorphism influencing alpha (1,2) fucosyltransferase activity of the pig FUT1 enzyme determines susceptibility of small intestinal epithelium to *Escherichia coli* F18 adhesion. *Immunogenetics* 52: 129-136.
- Meuwissen, T. H. E., B. J. Hayes, and M. E. Goddard. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819-1829.
- Meza-Nieto, M. A., A. F. González-Córdova, C. M. Becerril-Pérez, F. J. Ruiz-López, P. Díaz-Rivera, y B. Vallejo-Cordoba. 2010. Polimorfismo genético de la β -lactoglobulina en la leche de vacas Holstein y Criollo Lechero Tropical. *Agrociencia* 44(5): 532-539.
- Miciński, J., J. Klupczyński, W. Mordas, and R. Zabłotna. 2007. Yield and composition of milk from Jersey cows as dependent on the genetic variants of milk proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 57(3): 95-99.
- Mullis, K., and F. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods of Enzymology* 55: 335-350.
- NCBI. 2012a. Gen de la β -caseína. Consultada el 15 de marzo de 2012. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281099>.
- NCBI. 2012b. Gen de la β -lactoglobulina. Consultada 15 de marzo de 2012. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAI08214.1>.
- NCBI. 2012c. Gen de la κ -caseína. Consultada el 15 de marzo de 2012. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281728>.
- NCBI. 2012d. Genoma del pollo. Consultada 15 de abril de 2012. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/assembly/317958/>.

- Ng-Kwai-Hang, K. F., J. F. Hayes, J. E. Moxley, and H. G. Monardes. 1984. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat and protein production by dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 67: 835–840.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., J. F. Hayes, J. E. Moxley, and H. G. Monardes. 1986. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science* 69: 22-26.
- Ng-Kwai-Hang, K. F. 1998. A review of the relationship between milk protein polymorphism and milk composition/milk production. *International Dairy Journal* 2: 22-37.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., and F. Grosclaude. 2003. Genetic polymorphism of milk proteins. *Advanced Dairy Chemistry* 1: 739–816.
- Ojala, M., T. R. Famula, and J. F. Medrano. 1997. Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. *Journal of Dairy Science* 80: 1776–1785.
- Oltra C., J. 2011. Criterios de selección, pruebas de progenie e interpretación de catálogos. <http://intranet.uach.cl/dw/canales/repositorio/archivos/1012.pdf>
Consultada 28 de julio de 2011.
- Ostrander E. A., and R. K. Wayne. 2005. The canine genome. *Genome Research* 15: 1706-1716.
- Paterson, G. R., J. P. Hill, and D. E. Otter. 1995a. Separation of β -lactoglobulin A, B and C variants bovine whey using capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 700: 105-115.
- Paterson, G. R., J. P. Hill, and D. E. Otter. 1995b. Application of capillary electrophoresis in the identification of phenotypes containing the β -lactoglobulin C variant. *Journal of Dairy Science* 78: 2637-2644.
- Penedo, M.C.T., L. V. Millon, D. Bernoco, E. Bailey, M. Binns, G. Cholewinski, N. Ellis, J. Flynn, B. Gralak, A. Guthrie, T. Hasegawa, G. Lindgren, L. A. Lyons, K. H. Roed, J. E. Swinburne, and T. Tozaki. 2005. International equine gene mapping workshop report: a comprehensive linkage map constructed with data from new markers and by merging four mapping resources. *Cytogenetic and Genome Research* 111: 5-15.
- Pui-Yan, K., and C. Xiangning. 2003. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Current Issues in Molecular Biology* 5: 43-60.
- Requena, F. D., y E. I. Agüera. 2007. Genética de la caseína de la leche en el bovino Frisón. *Revista Electrónica de Veterinaria* 8(1): 1-9.
- Rincón, G., and J. F. Medrano. 2003. Single nucleotide polymorphism genotyping of bovine milk protein genes using the tetra-primer ARMS-PCR. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120: 333–337.
- Riojas-Valdés, V. M., J. C. Gómez de la F., J. A. Salinas, R. Montes de Oca, y A. Wong. 2006. Confiabilidad del análisis de ADN en pruebas de paternidad para bovinos Brahman y Brangus en México. *Ciencia UANL* 9(1): 41-50.
- Risch, N.J. 2000. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 405: 847-856.

- Rohrer, G. A., L. J. Alexander, J. W. Keele, T. P. Smith, and C. W. Beattie. 1994. A microsatellite map of the porcine genome. *Genetics* 136: 231-245.
- Ron, M., O. Yoffe, E. Ezra, J. F. Medrano, and J. I. Weller. 1994. Determination of effects of milk protein genotype on production traits of Israeli Holsteins. *Journal of Dairy Science* 77: 1106–1113.
- Russo, V., y P. Mariani. 1978. Polimorfismo delle proteine del latte e relazioni tra varianti genetiche e caratteristiche di interesse zootecnico, tecnologico e caseario. *Revista Zootechnica Veterinaria* 5: 1-31.
- Schaar, J., B. Hansson, and H. E. Pettersson. 1985. Effects of genetic variants of β -casein and β -lactoglobulin on cheesemaking. *Journal of Dairy Research* 52: 429-437.
- Schibler L., D. Vaiman, A. Oustry, N. Guinec, A. L. Dangy-Caye, A. Billault, and E. P. Cribiu. 1998. Construction and extensive characterization of a goat bacterial artificial chromosome library with threefold genome coverage. *Mammalian Genome* 9: 119–124.
- Schlee, P., and O. Rottmann. 1992. Identification of bovine β -casein C using the polymerase chain reaction. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 109: 153-155.
- Schmidt, D. 1982. Association of caseins and casein micelle structure. *Development Dairy Chemistry* 1: 61.
- Secretaría de Economía. 2012. Análisis del sector lácteo en México. [http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/analisis_sector_lacteo.pdf]. 23 de noviembre de 2012.
- Seitz, J. J., S. M. Schmutz, T. D. Thue, and F. C. Buchanan. 1999. A missense mutation in the bovine MGF gene is associated with the roan phenotype in Belgian Blue and Shorthorn cattle. *Mammalian Genome* 10: 710–712.
- Shuster, D. E., M. E. Kehrli, M. R. Ackermann, and R. O. Gilbert. 1992. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 9225–9229.
- Simianer, H. 2007. Report of the ISAG/FAO advisory group on animal genetic diversity. 6 p.
- Stoneking, M. 2001. Single nucleotide polymorphisms: from the evolutionary past. *Nature* 409: 821-822.
- Strange, E. D., D. Van Hekken, and M. P. Thompson. 1991. Qualitative and quantitative determination of caseins with reverse-phase and anion-exchange HPLC. *Journal of Food Science* 56: 1415–1420.
- Swaissgood, H. E. 1992. Chemistry of the caseins. *Advanced Dairy Chemistry*. Elsevier. London, England. pp. 63–77.
- Tailford, K. A., C. L. Berry, A. C. Thomas, and J. H. Campbell. 2003. A casein variant in cow's milk is atherogenic. *Atherosclerosis* 170(1): 13-19.

- Takeda, H., M. Takami, T. Oguni, T. Tsuji, K. Yoneda, H. Sato, N. Ihara, T. Itoh, S. R. Kata, J. E. Womack, Y. Moritomo, Y. Sugimoto, and T. Kunieda. 2002. Positional cloning of the gene LIMBIN responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(16): 10549-10554.
- Thompson, M. P., C. A. Kiddy, J. O. Johnston, and R. M. Weinberg. 1964. Genetic polymorphism in caseins of cows' milk. II. Confirmation of the genetic control of β -casein variation. *Journal of Dairy Science* 47(4): 378-381.
- Trujillo E., D. Noriega, y M. Camargo. 2000. Genotipificación de κ -caseína bovina y evaluación de las frecuencias genotípicas y alélicas de sus polimorfismos en cuatro razas. *Actual Biology* 22(7-13): 145-152.
- Tsiaras, A. M., G. G. Bargouli, G. Banos, and C. M. Boscós. 2005. Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 88: 327-334.
- Van Eenennaam, A. L., and J. F. Medrano. 1991. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 74: 1730-1742.
- Van Eenennaam, A. L., J. Thallman, R. M. Li, R. L. Quaas, M. E. Dikeman, C. A. Gill, D. E. Franke, and M. G. Thomas. 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal of Animal Science* 85: 891-900.
- Velmalá, R. J., H. J. Vilkkí, K. T. Elo, D. J. de Koning, and A. V. Maki-Tanila. 1999. A search for quantitative trait loci for milk production traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. *Animal Genetics* 30: 136-143.
- Venter, J.C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, and P. E. Yandell. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
- Vignal, A., D. Milan, M. Sancristobal, and A. Eggen. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution* 34: 275-305.
- Vögeli, P., E. Meijerink, R. Fries, S. Neuenschwander, N. Vorlander, G. Stranzinger, and H. U. Bertschinger. 1997. A molecular test for the identification of *Escherichia coli* F18 receptors—A break-through in the battle against porcine edema disease and post-weaning diarrhea. *Schweiz Archives Tierheilkd* 139: 479-484.
- Wang, D.G., J. B. Fan, C. J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M. S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Hudson, and E. S. Lander. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280: 1077-1082.
- Wedholm, A., L. B. Larsen, H. Lindmark-Mansson, A. H. Karlsson, and A. Andrén. 2006. Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89(9): 3296-3305.

- Wiggans, G. R., T. S. Sonstegard, P. M. Van Raden, L. K. Matukumalli, R. D. Schnabel, J. F. Taylor, F. S. Schenkel, and C. P. Van Tassell. 2009. Selection of single-nucleotide polymorphisms and quality of genotypes used in genomic evaluation of dairy cattle in the United States and Canada. *Journal of Dairy Science* 92: 3431-3436.
- Wilson, T., X. Y. Wu, J. L. Juengel, I. K. Ross, J. M. Lumsden, E. A. Lord, K. G. Dodds, G. A. Walling, J. C. McEwan, A. R. O'Connell, K. P. McNatty, and G. W. Montgomery. 2001. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biology of Reproduction* 64: 1225-1235.
- Woodford, K. 2011. Milk proteins and human health: A1 versus A2 beta-casein. In: *Milk proteins and human health. General Practitioners Conference (comp)*. Sydney, Australia. 2 de mayo. GPCE. pp. 1-6.
- Zaragoza, R., P., R. Osta, C. Elduque, S. Marco, F. J. Vázquez, A. Romero, E. García, y I. Zarazaga. 1994. *Ingeniería genética y biotecnología: nuevas perspectivas en veterinaria*. Publicaciones del Gobierno de Aragón, Zaragoza, España.
- Zwierzchowski, L. 2005. Cattle genomics: functional polymorphism in milk protein genes and other genes related to milk and meat production. *Workshop on Genomics and Bioinformatics in Animal Biotechnology*. 31.1–34.2. Jastrzebiec, Poland.

3. POLIMORFISMOS DE TRES GENES DE PROTEÍNAS LÁCTEAS EN GANADO JERSEY MEXICANO

3.1. Resumen

El objetivo fue estimar las frecuencias alélicas y genotípicas, así como la diversidad génica e información polimórfica de los genes de β -caseína, κ -caseína y β -lactoglobulina en ganado Jersey. Se tomaron muestras de sangre y semen congelado de 155 individuos Jersey pertenecientes a la Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Jersey de Registro A. C. Se validó un grupo de 28 oligos SNP específicos de la raza, identificándose en la población las frecuencias alélicas en cada locus. El alelo B de la κ -caseína presentó mayor frecuencia (0.80), que los alelos A (0.15) y E (0.05). Para el gen de la β -lactoglobulina, el alelo de mayor frecuencia fue B (0.76), presentándose en la población también los alelos A y C en una menor proporción (0.22 y 0.02, respectivamente). En el caso de la β -caseína, el alelo con mayor frecuencia (0.62) fue A^2 ; sin embargo, otras tres variantes se encontraron presentes para este locus, A^1 (0.18), A^3 (0.09) y B (0.11). Los genotipos A^1A^3 , A^1B , A^3A^3 , A^3B y BB de la β -caseína, están ausentes en los machos de la población, de la misma manera sucede con los genotipos AA y EE en los loci de la κ -caseína. El valor de diversidad genética promedio (H_e) de la población fue de 0.424, con un número efectivo de alelos por locus de 0.5. Los resultados indican una diversidad alélica de genes favorables en la calidad de leche κ -caseína, β -caseína y β -lactoglobulina, representando una gama amplia para la inclusión de progenitores en programas de mejora genética.

Palabras claves: κ -caseína, β -caseína, β -lactoglobulina, polimorfismo genético.

Tesis de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: José Luis Zepeda Batista

Directores de Tesis: Baldomero Alarcón Zúñiga y Agustín Ruíz Flores

POLYMORPHISMS OF THREE MILK PROTEIN GENES IN MEXICAN JERSEY CATTLE

3.2. Abstract

The main task of this assay was to estimate the allelic and the genotypic frequencies, genetic diversity and polymorphic information content for the β -casein, κ -casein and β -lactoglobulin genes in the Mexican Jersey cattle population. Blood and frozen semen samples were collected in 155 Jersey cattle individuals registered by the Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Jersey de Registro A. C. A group of 28 breed specific SNP oligos was validated for genotyping the sample population and allelic frequencies at each locus were determined. The B allele of the κ -casein had higher frequency (0.80) than the A (0.15) and E (0.05) alleles. For β -lactoglobulin gene, the allele with the highest frequency was B (0.76), also show up in lower frequencies the A and C alleles (0.22 and 0.02 respectively). The β -casein allele with higher frequency was A² (0.62); however, other three variants were reported for this *locus*, A¹ (0.18), A³ (0.09) and B (0.11). The genotypes A¹A³, A¹B, A³A³, A³B and BB of the β -casein protein in the male population, same as the AA and EE genotypes of κ -casein, were not identified in the sample population. The average value of genetic diversity (H_e) for the population was 0.424, with a locus effective allele number of 0.5. These results indicate a high allelic diversity of milk quality genes κ -caseín, β -casein y β -lactoglobulin, suggesting a wide range of favorable genes of candidate progenitors to be included in breeding programs for Mexican Jersey cattle.

Key words: κ -casein, β -casein, β -lactoglobulin, genetic polymorphism.

Master of Science Thesis, Universidad Autónoma Chapingo

Author: José Luis Zepeda Batista

Advisors: Baldomero Alarcón Zúñiga and Agustín Ruíz Flores

3.3. Introducción

La genotipificación en el ganado bovino se ha generalizado desde la publicación del genoma bovino (Barendse *et al.*, 1997); para ello, el uso de marcadores SNP (Polimorfismos de Nucleótidos Simples) ha resultado ser relativamente de bajo costo y altamente confiable, por lo que su utilización en diversas especies ha aumentado a través de los años. Según Illumina (2012), las características que actualmente se analizan en bovinos incluyen: 1) conformación, 2) producción de leche y de carne, y 3) enfermedades genéticas.

En países como Australia, Nueva Zelanda y Dinamarca, las genotipificaciones para características de producción lechera incluyen a las proteínas lácteas y se realizan de manera rutinaria, por lo que, se han determinado las frecuencias de α S1-caseína (CSN1S1), α S2-caseína (CSN1S2), β -caseína (CSN2), κ -caseína (CSN3), α -lactoalbúmina (LALBA) y β -lactoglobulina (LGB) en algunas poblaciones de bovinos lecheros.

Oleński *et al.* (2011) reportaron las frecuencias del ganado Holstein-Friesian Polaco para la β -caseína, encontrando presencia de dos alelos dentro de la población, A^1 (0.33) y A^2 (0.67). Kučerová *et al.* (2006) determinaron las frecuencias en ganado Fleckvieh Checo para cuatro de los genes de proteínas lácteas mayores: CSN1S1 (B: 0.89 y C: 0.11), CSN2 (A^1 : 0.18; A^2 : 0.81; A^3 : 0.4 y B: 0.6), CSN3 (A: 0.60; B: 0.38 y E: 0.02) y LGB (A: 0.51 y B: 0.49).

Jakob y Puhán (1992) y Caroli *et al.* (2009) concluyeron que es importante detectar los polimorfismos genéticos de β -caseína, κ -caseína y β -lactoglobulina en bovinos productores de leche, debido a que sus polimorfismos influyen en características de importancia económica como: rendimiento (Gibson y Rozzi, 1990), tiempo de coagulación, firmeza de la micela formada (Wedholm *et al.*, 2006; Jôudo *et al.*, 2008), entre otras.

En México, la información publicada para genes de proteínas lácteas es escasa (Barreras *et al.*, 2001; Cervantes *et al.*, 2007; Meza-Nieto *et al.*, 2010) y está

disponible sólo para las razas Holstein, Suizo Americano, Cebú y Criollo Lechero Tropical, enfocándose principalmente en los genes de las proteínas κ -caseína y β -lactoglobulina. No se encontraron publicaciones acerca de la proteína β -caseína, la presencia de polimorfismos de genes de las proteínas en la raza Jersey ni en la utilización de marcadores SNP para la obtención de información genómica.

Además, la tecnología desarrollada actualmente está basada en una sola raza, por lo que al aplicar dicha tecnología en razas distintas a la raza modelo, las imprecisiones de las predicciones causadas por diferencias a nivel del genoma pueden ser de entre 8.3% y 54.9% (Villa-Angulo *et al.*, 2009; Van Raden *et al.*, 2011), haciendo necesario el diseño de marcadores SNP representativos para genotipificar cada raza específica.

El objetivo de este estudio fue determinar los genotipos para β -caseína, κ -caseína y β -lactoglobulina, estimar sus frecuencias alélicas, diversidad génica, y contenido de información polimórfica en bovinos Jersey mexicanos de registro.

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. Toma de muestras

Las muestras para la obtención de ADN se obtuvieron de 155 animales con influencias genéticas de varios países (México, Canadá, Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia) pertenecientes a la Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Jersey de Registro A. C. (Cuadro 7). Las hembras seleccionadas debían tener al menos una cría, mientras que los sementales dos o más, y que dichas crías se encontraran en dos o más hatos distintos.

Muestreo de sangre y semen

Las muestras de sangre se extrajeron de 144 hembras (adultas y jóvenes) por venopunción coccígea, previa limpieza y asepsia. Se tomó una muestra de

4 mL de sangre por individuo en un tubo con anticoagulante, se etiquetó con el número y sexo del animal, y el nombre del rancho. Se refrigeraron para su conservación y envío al laboratorio.

Las muestras de semen se obtuvieron de pajillas de semen congelado de 11 machos (adultos); se utilizaron dos pajillas por animal para contar con suficiente ADN para realizar el estudio.

Cuadro 7. Número de animales utilizados para la obtención de ADN en el presente estudio.

Machos	Hembras	Total	Rancho
5	44	49	UACH*
3	86	89	El Puente
1	11	12	La Hondonada
2	3	5	Los Flamboyanes
11	144	155	Total

* Universidad Autónoma Chapingo

3.4.2. Extracción de ADN de sangre

En un tubo se colocaron sangre, solución de lisis y proteinasa K, se agregó un volumen de fenol posterior a una incubación, se centrifugó la muestra, y el sobrenadante se colocó en otro tubo.

Al sobrenadante se agregaron dos volúmenes de Cloroformo-Octanol, se centrifugó nuevamente y el sobrenadante se colocó en otro tubo; se le agregó Isopropanol y se mezcló por inversión hasta que el ADN se precipitó. Se colocó en un tubo con agua grado molecular que contenía ARNasa y se incubó la muestra.

Se precipitó el ADN nuevamente con Isopropanol, se lavó con Etanol al 70%; posteriormente, se depositó en TE (Tris-EDTA) para su resuspensión. Se incubó y se analizó con el espectrofotómetro para determinar calidad y concentración de la muestra.

3.4.3 Extracción de ADN de semen congelado

La pajilla de semen congelado se incubó; posteriormente se lavó con dos volúmenes de PBS (Buffer Salino Fosfato) y se centrifugó. Se recuperó el sobrenadante y se repitió el lavado con el PBS y la centrifugación de la muestra.

Se agregaron dos volúmenes de solución de lisis al sobrenadante y se incubó. Posteriormente, el sobrenadante se lavó con dos volúmenes de solución PCI (Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico) y se centrifugó; repitiendo el lavado y centrifugación del sobrenadante con tres volúmenes de solución CI (Cloroformo-Alcohol Isoamílico).

Se agregó ARNasa al sobrenadante y se llevó a incubación; después se agregaron un volumen de Isopropanol y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M, se incubó a -20°C durante ocho horas. Se centrifugó la muestra, se conservó el pellet obtenido y se lavó con Etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente, se decantó el sobrenadante, y se le adicionó TE. Se incubó y se cuantificó con el espectrofotómetro para determinar calidad y concentración de la muestra.

3.4.4 Selección de los oligonucleótidos SNPs

La realización de este estudio requirió el diseño y elaboración de oligonucleótidos específicos para bovinos Jersey, por lo que se seleccionaron 200 nuevos oligos para detección de los alelos en los genes de las proteínas lácteas en estudio.

Los oligos utilizados fueron diseñados con el programa OligoAnalyzer 3.1® (Integrated DNA Technologies, 2012, Iowa, Estados Unidos) a partir de secuencias reportadas en la base de datos de SNPs del GenBank (NCBI, 2012) correspondientes a los genes de cada proteína, y se sintetizaron por la compañía KBioscience (Massachusetts, Estados Unidos) marcándose con distinto fluoróforo los nucleótidos cambiantes en la posición del SNP para diferenciarlos durante la identificación de alelos.

Además, con el programa OligoAnalyzer 3.1® se obtuvieron las secuencias reversas y los complementos de las secuencias reversas, así como los coeficientes de creación de rizos, autodimerización y creación de heterodímeros, así como los porcentajes de presencia de cada base nitrogenada y los puntos de fusión de cada secuencia, características necesarias para diseñar el programa de termociclaje. Los oligos utilizados, el gen y la proteína a la que corresponden, se muestran en los Anexos 1 a 3.

3.4.5. Validación molecular de los oligonucleótidos SNPs

La validación molecular se inició realizando amplificaciones de los oligos diseñados previamente para corroborar los comportamientos obtenidos *in silico*. Con las secuencias que amplificaron correctamente, se elaboraron bloques de SNPs para corrida y verificación de la resolución de la curva, y así asegurar la correcta interpretación. Una vez verificada la resolución de las curvas, el número de oligos escogidos para realizar la genotipificación se redujo a 33 oligos. Las curvas sigmoides mostradas en color azul en la Figura 2, corresponden a los oligos que presentaron el comportamiento correcto para realizar la genotipificación.

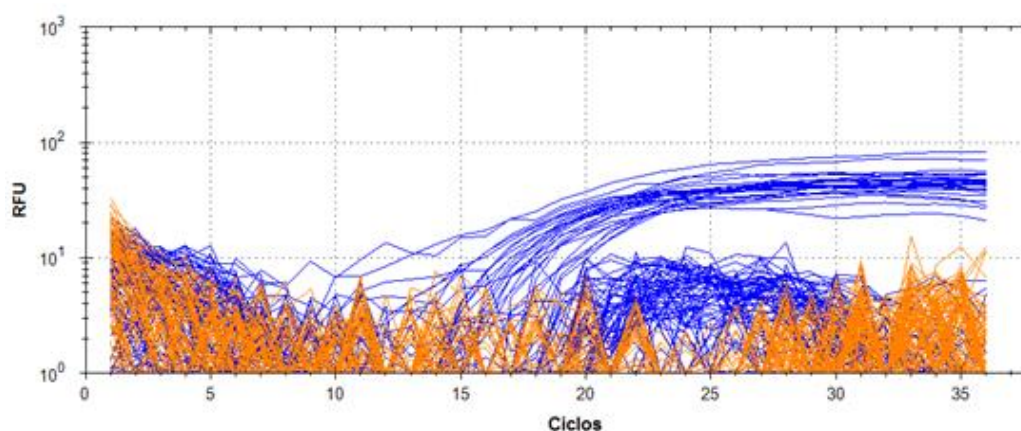


Figura 2. Ejemplo de validación molecular de oligos para genotipificar bovinos Jersey.

RFU: unidad relativa de fluorescencia.

Ciclos: ciclos de amplificación del ADN en la PCR.

Los 33 oligos seleccionados por amplificación se utilizaron para realizar tres repeticiones de PCR y comprobar la repetibilidad de sus resultados; por lo que solamente 28 oligos presentaron una mayor resolución de amplificación y repetibilidad, adecuados para genotipificar los 3 genes de la leche. Un ejemplo de la validación de repetibilidad de los oligos se muestra en la Figura 3, el oligo que indicó muestras con alelo 1 y muestras no amplificadas, no presentó la repetibilidad requerida para realizar la genotipificación de manera correcta.

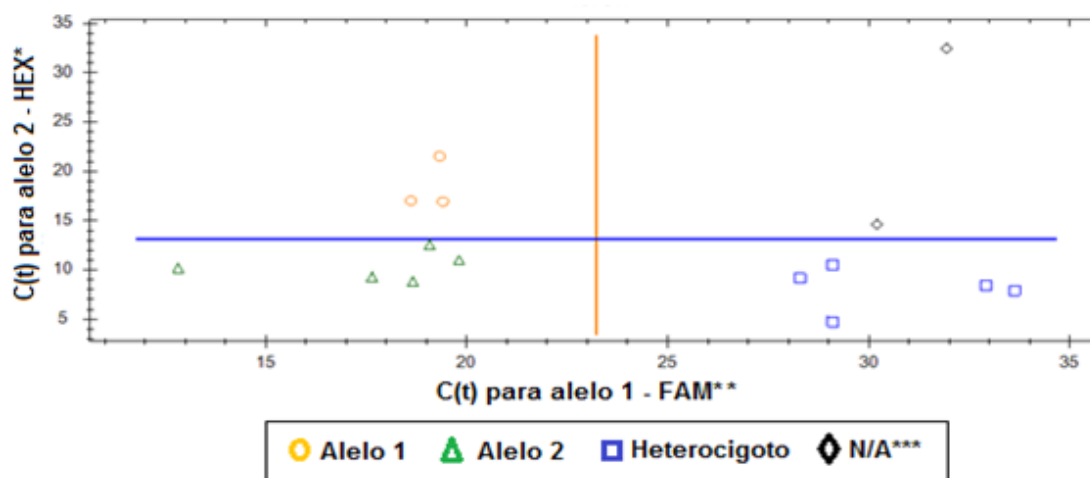


Figura 3. Ejemplo de validación de la repetibilidad de resultados de tres oligos para genotipificar bovinos Jersey.

*HEX: fluoróforo marcador del alelo dos.

**FAM: fluoróforo marcador del alelo uno.

***N/A: primer no amplificado.

****C(t): umbral de ciclos

Cabe señalar que los 28 oligos validados se pudieron identificar los alelos frecuentes de las tres proteínas lácteas, aumentando la posibilidad de detección de alelos reportados como de baja frecuencia en las poblaciones *Bos taurus* (Farrell *et al.*, 2004).

3.4.6. Genotipificación del ADN

La genotipificación se realizó con el siguiente protocolo: se prepararon por duplicado diluciones de 5 ng de ADN/ μ L, de cada una de las muestras obtenidas; se rotularon los tubos con los números de muestra y se congelaron para su conservación a -20°C . Posteriormente, se llenaron 95 pozos de una

placa para PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de 96 pozos, con 4 μL por muestra en cada pozo; los blancos y las muestras se distribuyeron en la placa como lo muestra la Figura 4.

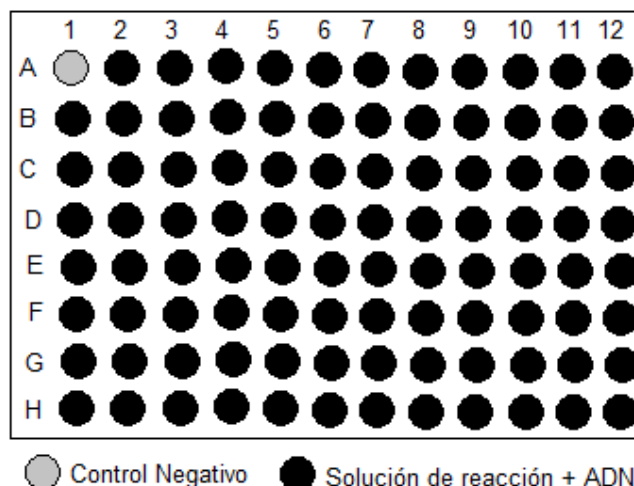


Figura 4. Ubicación del control negativo y las muestras de los animales en una placa de 96 pozos para realizar la genotipificación del ganado Jersey.

El control negativo utilizado fue una mezcla de 4 μL de agua grado molecular y 4.11 μL de solución de reacción (master mix comercial y el oligo); para analizar las muestras, se utilizaron 4.11 μL de la solución de reacción y 4 μL de la dilución de ADN de cada muestra.

La reacción en cadena de polímera con oligos selectivos SNPs se hizo en un termociclador de tiempo real (CFX 96, Bio-Rad, California, Estados Unidos). El programa de termociclaje fue: un ciclo de 94 °C durante 15 minutos, 10 ciclos de 94 °C durante 20 segundos y 65 °C durante un minuto, aplicando un decremento de 0.8 °C por ciclo en el segundo paso y 35 ciclos de 94 °C durante 20 segundos, seguido de 57 °C por 20 segundos, incluyendo el reporte de la fluorescencia de cada ciclo en este último paso.

Los polimorfismos se identificaron con el lector UV-Vis del termociclador durante la realización de la PCR, por medio de la detección de las fluorescencias que presentaron los oligos utilizados, los cuales marcaron la

base nitrogenada cambiante de la secuencia, indicando así los alelos presentes en la muestra.

3.4.7. Análisis de los datos

Para el monitoreo de bandas polimórficas se consideró la heterocigosidad de fragmentos amplificados, y se incluyeron en la matriz de datos, los cuales se procesaron para realizar diversidad génica y número efectivo de alelos.

Por medio del software Popgen32 (Yeh *et al.*, 1999) se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas, así como también la frecuencia de heterocigóticos de la muestra.

3.5. Resultados y discusión

3.5.1. Genotipificación para tres proteínas lácteas

Frecuencias alélicas y genotípicas de β -caseína

Los alelos encontrados en la población Jersey en estudio para β -caseína fueron cuatro y sus frecuencias, se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Frecuencias alélicas del gen β -caseína (CSN2) en bovinos Jersey mexicanos.

Alelos	Frecuencia de los alelos		
	Machos	Hembras	Total
A ¹	0.13	0.18	0.18
A ²	0.73	0.61	0.62
A ³	0.05	0.10	0.09
B	0.09	0.11	0.11

Los alelos presentes en la muestra de animales fueron A¹, A², A³, y B; siendo el alelo A² el más común con una frecuencia de 0.62. La alta frecuencia del alelo A² encontrada en este estudio fue similar a las detectadas en otras poblaciones Jersey. Bech *et al.* (1990), Winkelman y Wickham (1997) y Miciński *et al.* (2007)

genotipificaron alelos para β -caseína en poblaciones Jersey de Dinamarca, Nueva Zelanda y Polonia, estimando frecuencias alélicas del alelo A² entre 0.58 y 0.65. La frecuencia similar para este alelo en varias poblaciones sugiere una ausencia de selección para este alelo en la raza Jersey (incluyendo a la población mexicana). Al respecto, algunos investigadores han mostrado que la presencia del alelo A² en bovinos produce leche de alta calidad asociada con efectos benéficos (disminución de colesterol y triglicéridos) para la salud de los humanos que la consumen (Tailford *et al.*, 2003; Kamiński *et al.*, 2007) y en algunos países la leche proveniente de vacas con este alelo reciben un sobreprecio (Keating *et al.*, 2008). El hecho de que en las vacas de poblaciones Jersey se encuentre el alelo A² en alta frecuencia es un aspecto importante y distintivo de la raza, que podría ser aprovechado por los productores para mejorar sus márgenes de utilidades en la comercialización de la leche.

La frecuencia obtenida del alelo A1 en este estudio, fue similar a la reportada por Van Eenennaam y Medrano (1991) en la población de Pardo Suizo de Estados Unidos, con frecuencia de 0.18, coincidiendo con las frecuencias de dicho alelo reportadas en otras razas de bovinos (Guernsey y Jersey) con elevadas producciones de sólidos totales en leche (Swaigood, 1992; Winkelman y Wickham, 1997). Por el contrario, en la raza de bovinos más difundida en el mundo (Holstein), se han reportado frecuencias altas (49–95%) de este alelo en sus poblaciones (Miluchová *et al.*, 2009; Smiltina *et al.*, 2010; Kemal, 2011).

Con respecto a la frecuencia obtenida para el A³, ésta fue baja y similar a la reportada para varias poblaciones de razas bovinas. Ng-Kwai-Hang y Grosclaude (2003), encontraron que la presencia de dicho alelo en las poblaciones Holstein Friesian y Pardo Suizo estadounidenses fue cercana a 0.04. Similarmente, el alelo B presentó frecuencias bajas en la población Jersey en estudio, y similar a lo reportado en otras poblaciones bovinas Jersey en Alemania y Estados Unidos, así como para Pardo Suizo de Estados Unidos (Van Eenennaam y Medrano, 1991; Swaigood, 1992; Erhmann *et al.*, 1997). La

poca variabilidad en las frecuencias antes mencionadas de ambos alelos en este estudio y en otros considerando otras razas bovinas lecheras, sugiere que dichos polimorfismos tienen poca importancia en diferencias raciales de ganado lechero.

Los genotipos encontrados en la muestra poblacional Jersey en estudio para β -caseína fueron diez y sus frecuencias, se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Frecuencias genotípicas de una población de muestreo de bovinos Jersey del gen de la β -caseína (CSN2).

Genotipos	Frecuencia de los genotipos		
	Machos	Hembras	Total
A ¹ A ¹	0.09	0.10	0.10
A ¹ A ²	0.09	0.09	0.09
A ¹ A ³	NP	0.04	0.04
A ¹ B	NP	0.03	0.03
A ² A ²	0.55	0.49	0.49
A ² A ³	0.09	0.06	0.06
A ² B	0.18	0.09	0.10
A ³ A ³	NP	0.04	0.04
A ³ B	NP	0.01	0.01
BB	NP	0.05	0.04

NP: genotipo no presente en individuos muestreados.

El genotipo más común para el locus de β -caseína en el presente estudio fue el A²A² con una frecuencia del 49%. Estos resultados difieren de lo reportado por Çardak (2005) en ganado Holstein Friesian de Turquía, donde el genotipo más común fue el A¹A² con una frecuencia de 0.46. Además, en el presente estudio se encontraron los genotipos A¹A³ y A³B, con frecuencia bajas (<0.05), lo que fue similar a lo reportado por varios autores (Swaigood, 1992; Winkelman y Wickham, 1997) en poblaciones de bovinos Holstein, Pardo Suizo y Ayrshire de otros países (0.01 a 0.06), como Nueva Zelanda, Dinamarca y Estados Unidos.

Las frecuencias de los genotipos presentes en la población total y la población de hembras en el presente estudio, fueron similares, no así en la población de machos, en donde algunos genotipos reportados para la población general están ausentes. Hanusová *et al.* (2010) encontraron de manera similar que en el ganado Holstein de Eslovaquia los machos no presentaban uno de los genotipos reportados para la población general. La ausencia de ciertos alelos y genotipos en los machos del presente estudio, podrían ser consecuencia del reducido número de machos en la muestra (11 individuos), el origen de dichos machos es diverso a través de hatos, y que los alelos ausentes presentaron frecuencias bajas en la población total (<0.10), disminuyendo aún más la probabilidad de ser detectados.

Frecuencias alélicas y genotípicas de κ -caseína

El número de los alelos encontrados en la población de muestreo Jersey en estudio para κ -caseína fueron tres y sus frecuencias se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Frecuencias alélicas del gen de la κ -caseína (CSN3) en bovinos Jersey mexicanos.

Alelos	Frecuencia de los alelos		
	Machos	Hembras	Total
A	0.09	0.15	0.15
B	0.73	0.80	0.80
E	0.18	0.05	0.05

Los alelos presentes en la muestra de animales fueron A, B, y E; siendo el alelo B el más común con una frecuencia del 80%. La alta frecuencia del alelo B reportada en este estudio fue similar a las detectadas por Trujillo *et al.* (2000), Jann *et al.* (2004), y Ren *et al.* (2011), quienes reportaron alelos para κ -caseína en poblaciones Jersey de Colombia, Alemania y China, estimando frecuencias alélicas del alelo B entre 0.71 y 0.89. La frecuencia similar para este alelo en varias poblaciones del mundo sugiere una selección indirecta para este alelo en

la raza Jersey por parte de los criadores a nivel mundial (incluyendo la población mexicana). Al respecto, algunos investigadores han mostrado que la presencia del alelo B en bovinos confiere a la leche características que mejoran su rendimiento y calidad, como son mayor porcentaje de caseína en leche y menor porcentaje de proteína en suero (Wedholm *et al.*, 2006; Jôudo *et al.*, 2008). El hecho de que en los animales de raza Jersey se encuentre el alelo B en alta frecuencia es un aspecto importante, que podría ser aprovechado por los productores para mejorar sus márgenes de utilidades en la comercialización de subproductos derivados de la leche.

La frecuencia obtenida del alelo A en este estudio, fue similar a la reportada por Trujillo *et al.* (2000) y Ren *et al.* (2011) en las poblaciones Jersey de Colombia y China, con una frecuencia de 0.11 para ambas poblaciones, así como en las razas bovinas de Normanda y Guernsey (Trujillo *et al.*, 2000), sugiriendo un acervo genético similar de las tres razas. Por el contrario, en la raza de mayor difusión en el mundo (Holstein), se han reportado frecuencias altas (68.0-88.5%) de este alelo en sus poblaciones (Tsiaras *et al.*, 2005; Kemal, 2011).

Con respecto a la frecuencia obtenida para el alelo E, fue mayor que la del alelo A y similar a la reportada para varias poblaciones de razas bovinas. Jann *et al.* (2004) y Boetcher *et al.* (2004), reportaron frecuencias para el alelo E en ganado Ayrshire y en Holstein, de 0.08 y de 0.32 respectivamente, en Alemania e Italia. Las frecuencias antes mencionadas de ambos alelos en este estudio entre otros considerando otras razas bovinas lecheras, posiblemente responda al objetivo de selección de animales (producción de sólidos totales) común entre la mayoría de los criadores de ganado Jersey, ya que al presentar influencia positiva hacia la producción de leche y desfavorable para la producción de sólidos totales en leche, estos alelos han sido indirecta y sistemáticamente reducidos del *pool* genético de la población Jersey.

Los genotipos encontrados en la población Jersey en estudio para κ -caseína fueron cinco y sus frecuencias, se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11. . Frecuencias genotípicas de una población de muestreo de bovinos Jersey del gen de la κ -caseína (CSN3).

Genotipos	Frecuencia de los genotipos		
	Machos	Hembras	Total
AA	NP	0.01	0.01
AB	0.18	0.28	0.27
BB	0.46	0.63	0.62
BE	0.36	0.06	0.08
EE	NP	0.02	0.02

NP: genotipo no presente en animales muestreados.

El genotipo más común para el locus de κ -caseína en el presente estudio fue el BB, con una frecuencia del 62%. Estos resultados difieren de lo reportado por Hernández *et al.* (2006) y Cervantes *et al.* (2007) en poblaciones de Holstein y Criollo Lechero Tropical de México, donde el genotipo más común fue el AA con una frecuencia que osciló entre 0.57 y 0.62. Además, en el presente estudio se encontraron los genotipos BE y EE, con frecuencias bajas (<0.1), lo que fue similar a lo reportado por Boetcher *et al.* (2004) en una población Holstein (0.08) de Italia.

Frecuencias alélicas y genotípicas de β -lactoglobulina

Los resultados de frecuencias alélicas en la población de muestreo de Jersey para β -lactoglobulina, se reportan en el siguiente cuadro.

Cuadro 12. Frecuencias alélicas del gen de la β -lactoglobulina (LGB-PAEP) en bovinos Jersey mexicanos.

Alelos	Frecuencia de los alelos		
	Machos	Hembras	Total
A	0.22	0.22	0.22
B	0.78	0.76	0.76
C	NP	0.02	0.02

NP: alelo no presente

Los alelos detectados en la población de muestreo de ganado Jersey fueron A, B, y C; siendo el alelo B el más común con una frecuencia de 76%. La alta frecuencia del alelo B en este estudio fue superior a las detectadas en otras poblaciones de ganado bovino en el mundo. Varios autores (Çardak, 2005; Miciński *et al.*, 2007; Meza-Nieto *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2011) genotipificaron alelos para el locus de β -lactoglobulina en poblaciones de Holstein, Suizo, Jersey, y Criollo Lechero Tropical de varios países (Turquía, Polonia, y México), estimando frecuencias alélicas del alelo B entre 0.31 y 0.65. Debido a que el alelo B de la β -lactoglobulina está relacionado con una mayor producción de sólidos totales, y a la relativamente escasa y reciente información de los polimorfismos de este locus, las diferencias entre las frecuencias para este alelo en varias poblaciones alrededor del mundo sugieren la presencia de selección indirecta de este alelo, mediante la selección del alelo B de la κ -caseína en bovinos lecheros. El hecho de que en las vacas Jersey mexicanas se encuentre el alelo B en alta frecuencia es un aspecto importante y distintivo de la raza.

La frecuencia obtenida del alelo A en este estudio, presentó cierta similitud solo con la frecuencia reportada por Ren *et al.* (2011) en la población de Jersey de China, con una frecuencia de 0.32, lo que sugiere un comportamiento particular de la población mexicana en este locus.

Con respecto a la frecuencia obtenida para el alelo C, ésta fue baja (<0.05) y similar a la reportada por Berry *et al.* (2010) en un hato Neozelandés de animales F1 Holstein x Jersey, con una frecuencia de 0.01, lo que pudiera obedecer a la presencia de hembras de origen Neozelandés en la población de este estudio.

Los genotipos encontrados en la población Jersey en estudio para β -lactoglobulina fueron diez y sus frecuencias, se muestran en el Cuadro 13. El genotipo más común para β -lactoglobulina en el presente estudio fue el BB, con una frecuencia de 0.61. Lo que era de esperarse, dado que el alelo más común fue B. Este resultado es similar a lo reportado por Meza-Nieto *et al.* (2010) para esta fracción proteica en ganado Criollo Lechero Tropical, donde la frecuencia

del genotipo BB fue de 53%. Caso contrario el de la raza Holstein, donde varios autores (Tsiaras *et al.*, 2005; Meza-Nieto *et al.*, 2010; Kemal, 2011) reportaron frecuencias entre 0.24 y 0.38, en poblaciones de Turquía y México.

Cuadro 13. Frecuencias genotípicas de una población de muestreo de bovinos Jersey del gen de la β -lactoglobulina (LGB/PAEP).

Genotipos	Frecuencia de los genotipos		
	Machos	Hembras	Total
AA	NP	0.09	0.09
AB	0.45	0.26	0.27
BB	0.55	0.62	0.61
BC	NP	0.03	0.03

NP: genotipo no presente en animales muestreados.

El genotipo más común para β -lactoglobulina en el presente estudio fue el BB, con una frecuencia de 0.61. Este resultado es similar a lo reportado por Meza-Nieto *et al.* (2010) para esta fracción proteica en ganado Criollo Lechero Tropical, donde la frecuencia del genotipo BB fue de 53%. Caso contrario el de la raza Holstein, donde varios autores (Tsiaras *et al.*, 2005; Meza-Nieto *et al.*, 2010; Kemal, 2011) reportaron frecuencias entre 0.24 y 0.38, en poblaciones de Turquía y México.

El genotipo BC presenta una frecuencia relativamente baja y al igual que el genotipo AA, muestran cierta similitud a lo reportado por Berry *et al.* (2010) en ganado F1 Holstein x Jersey Neozelandés destinado a producción de leche con alto porcentaje de sólidos totales.

3.5.2 Estadísticos descriptivos de la población de muestreo

Diversidad genética

Los *loci* analizados presentaron un comportamiento 100% polimórfico, similar a lo reportado por Rosero *et al.* (2009) para poblaciones Colombianas de bovinos

criollos, Brahman y Holstein, y por Cervantes *et al.* (2007) para poblaciones mexicanas de Holstein, Suizo, Cebú y Criollo Lechero Tropical, lo que supone que el comportamiento de dichos *loci* es constante sin importar la raza o el origen de la población.

El *locus* más polimórfico fue el de la β -caseína (CSN2) con un total de cuatro isoformas, resultado similar al reportado por Rosero *et al.* (2009) para la población colombiana de ganado Brahman. Seguido de los *loci* de κ -caseína (CSN3) y β -lactoglobulina (LGB) con tres alelos presentes, considerando la población completa.

Al comparar el promedio de alelos observados con el promedio de alelos efectivos (que indica el número de alelos que pueden estar en una población; alelos esperados) en los tres *loci*, se observa una diferencia de hasta 30% menos alelos efectivos en comparación con los alelos observados (Figura 5), lo que sugiere que la población no está en equilibrio Hardy-Weinberg en ningún *loci*.

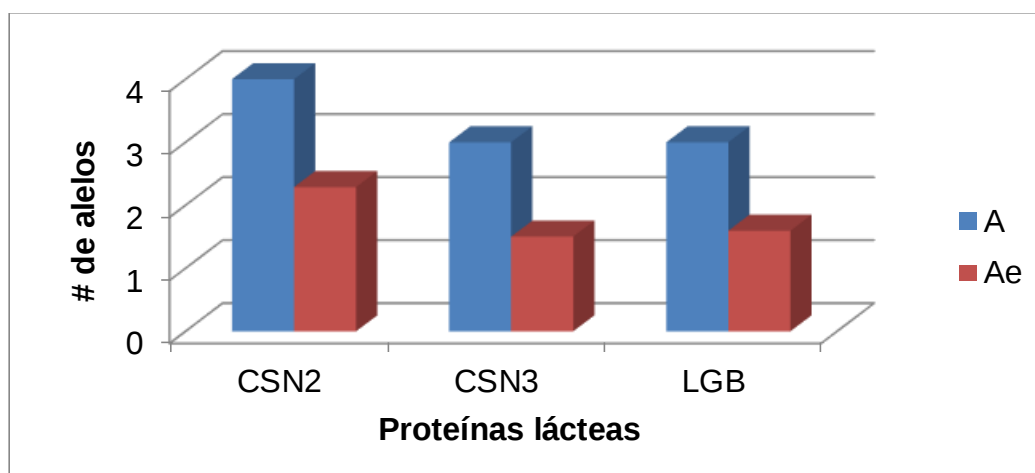


Figura 5. Alelos observados (A) y alelos efectivos (Ae) para los *loci* de las tres proteínas lácteas en toda la población.

Heterocigosidad y equilibrio Hardy-Weinberg

De acuerdo con las estimaciones de heterocigosidad (observada y esperada) mostradas en el Cuadro 14, la población de este estudio presenta

heterocigosidades observadas (H_o) para los tres loci analizados que difieren de las heterocigosidades esperadas (H_e). Estos resultados son similares a los reportados por Dinç (2009) para poblaciones bovinas turcas, donde la H_o fue hasta del doble que la H_e en las razas con mayor manejo reproductivo y aplicación de programas de mejoramiento genético.

Cuadro 14. Valores estimados de heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e) para los loci CSN2, CSN3, y LGB en la población de bovinos Jersey mexicanos

Locus	H_o	H_e	X^2
CSN2	0.600	0.563	0.014
CSN3	0.400	0.335	
LGB	0.500	0.374	
Población	0.500	0.424	

La diferencia en los resultados obtenidos para la H_o y la H_e poblacional, y el valor de X^2 ($P < 0.05$), confirman la ausencia de equilibrio Hardy-Weinberg en los loci para los genes de las tres proteínas lácteas, lo que es similar a lo reportado por varios autores (Hernández *et al.*, 2006; Rosero *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2011) en poblaciones mexicanas y extranjeras de Holstein, Brahman, Suizo y Jersey, siendo considerado común entre las razas especializadas, ya que en ellas se presentan los apareamientos controlados, los cuales son influenciados por la selección artificial relacionada con algún carácter productivo.

3.6. Conclusiones

La población representativa de ganado Jersey de registro de México, presentó un gran acervo genético, en el cual los alelos más comunes fueron A^2 para β -caseína (CSN2) y B para κ -caseína (CSN3) y β -lactoglobulina (LGB), que son los de mayor importancia económica. Además, la muestra utilizada en este estudio presentó alelos con frecuencias moderadas como el A^1 y el B (CSN2) y el A (CSN3 y LGB), frecuencias que representan menos de la mitad de las mostradas por los alelos más comunes. Los alelos de baja frecuencia obtenidos en el presente estudio fueron el A^3 (CSN2), el E (CSN3) y el C (LGB), por lo que

sería necesario el aumento en el tamaño de la muestra para constatar si realmente son raros en la población.

Los genotipos de mayor frecuencia son el A²A² (CSN2) y el BB (CSN3 y LGB), y son los de mayor potencial económico en cuanto a aumento de utilidades de los productores se refiere. Los otros genotipos presentes en el estudio muestran valores menores a la mitad de las frecuencias de los genotipos más comunes para cada locus, incidiendo en menor grado en el comportamiento productivo de la población.

Los resultados obtenidos para los genes de las tres proteínas, muestran que la población mexicana de ganado Jersey posee el potencial para ser incluida en programas de selección y mejoramiento genético extensivos, orientados a un mejoramiento de las propiedades físico-químicas de la leche de importancia económica.

3.7. Literatura citada

- Barendse, W. J., D. Vaiman, S. J. Kemp, Y. Sugimoto, S. M. Armitage, J. L. Williams, H. S. Sun, A. Eggen, M. Agaba, S. A. Aleyasin, M. Band, M. D. Bishop, J. Buitkamp, K. A. Byrne, F. Collins, L. Cooper, W. Coppettiers, B. Benys, R. D. Drinkwater, K. Easterday, C. Elduque, S. Ennis, G. Erhardt, L. Ferretti, N. Flavin, Q. Gao, M. Georges, R. Gurung, B. Harlizius, G. Hawkins, J. D. Hetzel, T. Hirano, D. Hulme, C. Jorgensen, M. Kessler, B. W. Kirkpatrick, B. Konfortov, S. Kostia, C. Kuhn, J. A. Lenstra, H. Leveziel, H. A. Lewin, B. Leyhe, L. Lil, I. Martin B., R. A. McGraw, J. R. Miller, D. E. Moody, S. S. Moore, S. Nakane, I. J. Nijman, I. Olsaker, D. Pomp, A. Rando, M. Ron, A. Shalom, A. J. Teale, U. Thieven, B.G.D. Urquhart, D.I. Vage, A. Van de Weghe, S. Varvio, R. Velmala, J. Vilkki, R. Weikard, C. Woodside, J. E. Womack, and M. Z. P. Zanotti. 1997. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mammalian Genome* 8: 21-28.
- Bech, A. M., and K. R. Kristiansen. 1990. Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetic variants on milk yield. *Journal Dairy Research* 57: 53–62.
- Berry, S. D., N. Lopez-Villalobos, E. M. Beattie, S. R. Davis, L. F. Adams, N. L. Thomas, A. E. Ankersmit-Udy, A. M. Stanfield, K. Lehnert, H. E. Ward, J. A. Arias, R. J. Spelman, and R. G. Snell. 2010. Mapping a quantitative trait locus for the concentration of β -lactoglobulin in milk, and the effect of β -lactoglobulin genetic variants on the composition of milk from

- Holstein-Friesian x Jersey crossbred cows. *New Zealand Veterinary Journal* 58(1): 1-5.
- Çardak, A. D. 2005. Effects of genetic variants in milk protein on yield and composition of milk from Holstein-Friesian and Simmentaler cows. *South African Journal of Animal Science* 35(1): 41-47.
- Cervantes, P., M. Luna, A. Hernández, F. Pérez-Gil, P. Ponce, y O. Uffo. 2007. Polimorfismo genético en el locus de la kappa-caseína, en vacas de diferentes razas y cruces en el trópico mexicano. *Revista de Salud Animal* 29(2): 78-84.
- Dinç, H. 2009. Genotyping of beta-casein, kappa-casein and beta-lactoglobulin genes in Turkish native cattle breeds and efforts to delineate BCM-7 on Human PBMC. Middle East Technical University. Ankara, Turquia. 208 p.
- Farrell, H. M., R. Jimenez-Flores, G. T. Bleck, E. M. Brown, J. E. Butler, and L. K. Creamer. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk – sixth revision. *Journal of Dairy Science* 87: 1641-1674.
- Gibson, J. P., and P. Rozzi. 1990. The use of κ -casein genotypes in dairy cattle breeding. In: *Proceedings 4th World Congress of Genetic Applied to Livestock Production*. 23 to 27 July. Edinburgh, Scotland. p. 163.
- Hanusová, E., J. Huba, M. Oravcová, P. Polák, and I. Vrtková. 2010. Genetic variants of beta casein in Holstein dairy cattle in Slovakia. *Slovak Journal of Animal Science* 43(2): 63-66.
- Hernández, A., V. M. Salinas, M. Luna, R. García, P. Cervantes, O. Uffo, y J. L. Álvarez. 2006. Caracterización de genes CSN3, LAA y bGH en Criollo Tropical Lechero. *Revista de Salud Animal* 28(2): 96-104.
- Illumina Incorporated. 2012. BovineSNP 50. San Diego, California, United States of America.
- Integrated DNA Technologies. 2012. OligoAnalyzer 3.1. Disponible en: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> Consultada el 15 de noviembre de 2012.
- Jakob, E., and Z. Puhán. 1992. Technological properties of milk as influenced by genetic polymorphism of milk proteins. *International Dairy Journal* 2(3): 157-178.
- Jann, O., E. M. Ibeagha-Awemu, C. Özbeyaz, P. Zaragoza, J. L. Williams, and P. Ajmone-Marsan. 2004. Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus. *Genetic Selection Evolution* 36: 243-257.
- Jôudo, I., M. Henno, T. Kaart, T. Pussa, and O. Kart. 2008. The effect of milk protein contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. *International Dairy Journal* 18: 964–967.
- Kamiński, S., A. Cieślińska, and E. Kostyra. 2007. Polymorphism of bovine beta casein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics* 48(3): 189-198.
- Keating, A. F., T. J. Smith, R. P. Ross, and M. T. Cairns. 2008. A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to β -casomorphin. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 47: 99-104.

- Kemal G., E. 2011. Association between milk protein polymorphism and milk production traits in Black and White dairy cattle in Turkey. *African Journal of Biotechnology* 10(6): 1044-1048.
- Kučerová, J., A. Matějček, O. M. Jandurová, P. Sørensen, E. Němcová, M. Štípková, T. Kott, J. Bouška, and J. Frelich. 2006. Milk protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. *Czech Journal of Animal Science* 51(6): 241-247.
- Meza-Nieto, M. A., A. F. González-Córdova, C. M. Becerril-Pérez, F. J. Ruíz-López, P. Díaz-Rivera, y B. Vallejo-Córdoba. 2010. Polimorfismo genético de la β -lactoglobulina en la leche de vacas Holstein y Criollo Lechero Tropical. *Agrociencia* 44(5): 532-539.
- Miciński, J., J. Klupczyński, W. Mordas, and R. Zabłotna. 2007. Yield and Composition of milk from Jersey cows as dependent on the genetic variants of milk proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 57(3): 95-99.
- Miluchová, M., A. Trakovická, and M. Gábor. 2009. Analysis of polymorphism of beta casein of Slovak Pinzgau cattle by PCR-RFLP for alleles A1 and A2. *Zootehnie și Biotehnologii* 42(2): 288-292.
- NCBI (National Center of Biotechnology Information). 2012. GenBank: SNP database. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> Consultada el 31 de marzo de 2012.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., and F. Grosclaude. 2003. Genetic polymorphism of milk proteins. *Advanced Dairy Chemistry* 1: 739-816.
- Oleński, K., A. Cieślińska, T. Suchocki, J. Szyda, and S. Kamiński. 2011. Polymorphism in coding and regulatory sequences of beta-casein gene is associated with milk production traits in Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports* 30(1): 5-12.
- Ren, D. X., S. Y. Miao, Y. L. Chen, C. X. Zou, X. W. Liang, and J. X. Liu. 2011. Genotyping of the k-casein and β -lactoglobulin genes in Chinese Holstein, Jersey and Water Buffalo by PCR RFLP. *Journal of Genetics* 90(1): 1-5.
- Rosero A., J. A. 2009. Polimorfismo de los genes k-caseína, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina en razas bovinas criollas Colombianas. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 105 p.
- Smiltiņa, D., B. Andris, and G. Ziedonis. 2010. Study of the milk protein genetic characterization in Latvian dairy cattle breeds populations. In: *International Scientific Conference Animals*. pp. 125-129.
- Swaissgood, H. E. 1992. Chemistry of the caseins. *Advanced Dairy Chemistry*. Elsevier. London, England. pp. 63-77.
- Tailford, K. A., C. L. Berry, A. C. Thomas, and J. H. Campbell. 2003. A casein variant in cow's milk is atherogenic. *Atherosclerosis* 170(1): 13-19.
- Trujillo E., D. Noriega, y M. Camargo. 2000. Genotipificación de κ -caseína bovina y evaluación de las frecuencias genotípicas y alélicas de sus polimorfismos en cuatro razas. *Actual Biology* 22(7-13): 145-152.

- Tsiaras, A. M., G. G. Bargouli, G. Banos, and C. M. Boscos. 2005. Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 88: 327–334.
- Van Eenennaam, A. L., and J. F. Medrano. 1991. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 74: 1730–1742.
- Van Raden, P. M., K. M. Olson, G. R. Wiggans, J. B. Cole, and M. E. Tooker. 2011. Genomic inbreeding and relationships among Holsteins, Jerseys and Brown Swiss. *Journal of Dairy Science* 94: 5673-5682.
- Villa-Angulo, R., L. K. Matukumalli, C. A. Gill, J. Choi, C. P. Van Tassell, and J. J. Grefenstette. 2009. High-resolution haplotype block structure in the cattle genome. *Bio Med Central Genetics* 10:19.
- Wedholm, A., L. B. Larsen, H. Lindmark-Mansson, A. H. Karlsson, and A. Andrén. 2006. Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89(9): 3296-3305.
- Winkelman, A. M., and B. W. Wickham. 1997. Associations between milk protein genetic variants and production traits in New Zealand dairy cattle. In: *Milk protein polymorphism. Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North, New Zealand. International Dairy Federation.* pp. 38-46.
- Yeh, C. F., R. C. Yang, and T. Boyle. 1999. Popgen32 program. University of Alberta, Canada.

3.8. Anexos

Anexo 1. Oligos* para identificación de alelos en el gen de la β -caseína.

PRIMER	GEN
CCCCTTTGCCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCC[A/C]TAACAGCCTCCCAC AAACATCCCTCCTCTTACTCAAACCCCTGTGGTGG	CSN2
CTCTTACTCAAACCCCTGTGGTGGTGCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTA[A/C]TGGGAGTCTCCAAA GTGAAGGAGGCTATGGCTCCTAAGCAMAAGAAATG	CSN2
CCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAGTGAAGGAGGCTATGGCTCCTAAGCA[A/C]AAAGAAATGCCNTT CCCTAAATATCCAGTTGAGCCCTTTACTGAAAGNCA	CSN2
GGAGTCTCCAAAGTGAAGGAGGCTATGGCTCCTAAGCANAAAGAAATGCC[C/T]TTCCCTAAATATCC AGTTGAGCCCTTTACTGAAAGNCAGAGCCTGACTCT	CSN2
CACAAAGAAATGCCCTTCCCTAAATATCCAGTTGAGCCCTTTACTGAAAG[C/G]CAGAGCCTGACTCT CACTGATGTTGAAATCTGCACCTTCCTCTGCCTCT	CSN2
TGAGATTAATGATTGTCAGCATTAGTTATAAATAGAATAAGCTGGAGAAC[C/T]TTCACCTCCCCTCCA CCACCAGATCTCAATGTCTAGGCTTACCCGTGGAG	CSN2
TTGTAAATTCATTTTGATTTAGAATTTGGCCTAAGTGCCAAACAATCAAA[C/G]TTCAATTATAAAACAC GAAAGCTTAAATATCATAATTAGATAAATATGTT	CSN2
TGCAAGAAATAAAAACTTTGACAAAATGAAAATATTTTAAAAATATAAAC[A/G]CATTTTAAAACACATAA TCAAATTTACAGTATAGAATAAATAGCTAAGA	CSN2
GTCCTAAGGAGAGAACAGGATGATTGAGAGACATGTATGCATGCAAAGTT[A/G]CTTCAGCCCTTTCC AACTCTGTATGACCCTATGGACTGTAACCTGCCAGG	CSN2
TAAGGATGTTTAAGATAAAGTTTACAGTATTTTCAGCAAATTTGTTAAAA[-/AA]TAGAAGCAACTATAAA GATTTGTAACAGTGGTTGCTATTTTCTTTACCAC	CSN2
TAAGACTTCTGTTTCATTTTAGCATTTCTTCTATTTGTTCCATTGATCCA[C/G]ATGTTTTCTTGGACTGA CTAGATTGTTTCTTCTGTACTCAGTCTTCATCC	CSN2

*Los nucleótidos señalados entre corchetes, corresponden al SNP que identifica la secuencia.

Anexo 2. Oligos* para identificación de alelos en el gen de la κ-caseína.

PRIMER	GEN
AAAGAGGATGATCAACCACAGCCCATAATATATGTAGAATTACTTCATAC[C/T]CAGGTTCTTGAAATA ATAAGAAACATTTGAAATGTAAAAGTGCTATGGCT	CSN3
TAAAGCTTTTAATAAAAATAGATTTTTCACATTGGCTATATCTCCCCCTCA[A/T]TCTGGCTTTTCCCACC CTTAAATCAAATAAAACATTGCTCCAAGTCACTC	CSN3
CATTGGCTATATCTCCCCCTCATTCTGGCTTTTCCCACCCTTAAATCAAA[G/T]AAAACATTGCTCCAA GTCACCTCTAAATTATCAGCAACAGATCCTGTAA	CSN3
TAACCTAGAAAAGTGCTTTATAATATTTTACAATACTAAAATAAAAGCAA[C/G]AAAAACATGTTTTATCT TTTTTATAAAAGATATTTTAAATCACAAAAAC	CSN3
TCCTAAAATTTATGTTACTTGACCAATTCACCTTAATAAGCTCAACGCTG[-/AC]ACACACAGAGCTTTG TTCCTACTACGTTATTGGTACATATGAAACGAATA	CSN3
CAAATACTGTGCCTGCCAAGTCCTGCCAAGCCCAGCCAACCTACCATGGCA[A/C]GTCACCCACACCC ACATTTATCATTTATGGCCATTCCACCAAAGAAAAAT	CSN3
CCTGCCAAGCCCAGCCAACCTACCATGGCACGTCACCCACACCCACATTTA[G/T]CATTTATGGCCATT CCACCAAAGAAAAATCAGGATAAAACAGAAATCCCT	CSN3
GCATTTTCAGGGCCCATGTGCCAGGAGGGCGTGGGCATCGGCGAGTGGAG[G/T]CTCCTGGCCGTG TCAGCTGGCCCAGGGGGAGGAGGGGACCCAGACAGCCA	CSN3

* Los nucleótidos señalados entre corchetes, corresponden al SNP que identifica la secuencia.

Anexo 3. Oligos* para identificación de alelos en el gen de la β -lactoglobulina.

PRIMER	GEN
CCATGTGCCAGGAGGGCGTGGGCATCGGCGAGTGGAGGCTCCTGGCCGTG[C/T]CAGCTGGCCCA GGGGGAGGAGGGGACCCAGACAGCCAGAGGTGGGGAGCA	LGB
CGCCTCTGGGGTAAGCTGCCTGCCCTGCCCCACGTCCTGGGCACACACAT[G/T]GGGTAGGGGTTCT TGGTTGGGCCCCGGGAGCCCCCATTAGGCCCTGGGGTC	LGB
CCTGAGGGCGACCTGGAGATCCTGCTGCAGAAATGGTGGGYGTCCCCCCC[A/C]AAAAAAGCATGGA ACCCCCACTCCCCAGGGATATGGACCCCCCGGGGTG	LGB
CCAGCCTGGACCCAGAGCCTGGACACCCCCTGCGCCCCACTTCTGGGGC[C/G]TACCAGGAACCG TCCAGGCCCAGAGGGGGCCTTCTGCTTGGCCTCGAAT	LGB
TGGCGGGGACTTGGTACTCCTTGGCCATGGCGGCCAGCGACATCTCCCTG[C/G]TGGACGCCCAGA GTGCCCCCCTGAGAGTGTATGTGGAGGAGCTGAAGCCC	LGB
GAAAATGGTCCATGCCCGTGGCTCAGAAAGCAGCTGTCTTTCAGGGAGAA[C/T]GGTGAGTGTGCTC AGAAGAAGATCATTGCAGAAAAAACCAAGATCCCTGC	LGB
GTGGAGGAGCTGAAGCCCACCCCTGAGGGCGACCTGGAGATCCTGCTGCA[G/T]AAATGGTGGGCG TCCCCCCCCAAAAAAGCATGGAACCCCCACTCCCCAGG	LGB
ACATCTCCCTGCTGGACGCCCAGAGTGCCCCCCTGAGAGTGTATGTGGAG[C/G]AGCTGAAGCCCAC CCCTGAGGGCGACCTGGAGATCCTGCTGCAGAAATGG	LGB
GAATATGGACTCTTCCAGATAAATAATAAAATTTGGTGCAAAGACGACCA[G/T]AACCCCTCACTCAAGC AACATCTGTAAACATCTCCTGTGACAGTGAGTAACT	LGB
GATAAAGCTAGATGTAAATCTAACCAAGATCCTGTCAGTAATTTGCCTTG[C/T]CTCCTTCTTCATGATC AGGTTGGCCCATAAAGCACTCTGTTCTGAGAAGC	LGB

* Los nucleótidos señalados entre corchetes, corresponden al SNP que identifica la secuencia.