

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Frequency of the β -lactoglobulin polymorphism in a Holstein cattle population from the Sabana de BogotáFrecuencia del polimorfismo β -lactoglobulina en una población de ganado Holstein de la Sabana de BogotáPaola Cuartas Otálora¹, Gina Alessandra Garzón², Gloria Patricia Barrera³

ABSTRACT

Despite of Cundinamarca nearly produces the 27% of the total milk production in Colombia, the quality of this product (protein, fat and total solids) is considered lower than others Colombian regions; which negatively affect the local milk market as the Colombian milk industries pay for high milk quality. Due to this situation, Corpoica have started to implement breeding programs based on molecular marker assisted selection. Under this scheme, genetic polymorphisms associated with bovine milk production traits have been determined, particularly in the variant region of the exon four of the β -lactoglobulin gene (β -LG); which is linked (related) with the casein and fat production. The aim of this study was to estimate the genotypic and allelic frequencies of β -LG by using PCR-RFLP in six different Holstein populations in Cundinamarca. For genotyping analysis a fragment of 247 pb was amplified and then digested using the restriction enzyme *Hae* III. The results showed that the frequency of allele A (0.51) was similar to allele B (0.49), which is comparable with frequencies values reported for European Holstein cattle. However, the genotypic frequency distribution showed to be different in comparison with those values obtained for worldwide dairy cattle. Thus, AA genotype had the higher frequency (0.35), whereas BB genotype had a lower frequency (0.31). In conclusion, the similar genotypic and allelic frequencies may be related to the absence of breeding programs in Cundinamarca.

Keywords: Dairy production traits, dairy cattle, β -LG, genetic markers, PCR-RFLP.

RESUMEN

El departamento de Cundinamarca participa con aproximadamente 27% de la producción de leche en Colombia, con desventajas competitivas en cuanto a la calidad del producto (proteína, grasa y sólidos totales); lo cual influye en su participación en el mercado, ya que las empresas lácteas elaboran sus esquemas de pago basándose en estas características de producción. Debido a esta situación, Corpoica ha implementado programas de mejoramiento basados en la selección asistida por marcadores moleculares. Bajo este esquema, se han encontrado diversos polimorfismos genéticos asociados con características de producción de leche bovina; particularmente, en el exón 4 del gen de β -lactoglobulina, donde se ha descrito una variante asociada con producción de caseínas y grasa. El objetivo del presente estudio fue estimar las frecuencias alélicas y genotípicas de β -lactoglobulina en seis poblaciones Holstein de la sabana de Bogotá, mediante la técnica de PCR-RFLP. Para la genotipificación se amplificó un fragmento de 247 pb, digerido con la enzima de restricción *Hae* III. Las frecuencias de los alelos A y B encontradas en la población son similares (0,51 y 0,49 respectivamente). Estos valores coinciden con los reportados en ganado Holstein europeo. Sin embargo, la distribución de frecuencias genotípicas varía de las frecuencias reportadas mundialmente para ganado lechero. El principal genotipo encontrado fue el AA (0,35), seguido por el BB (0,31). La distribución de los genotipos y de los alelos en la población fue muy similar, lo cual puede estar relacionado con la falta de implementación de programas de mejoramiento en la sabana de Bogotá.

Palabras clave: características de producción lechera, ganado bovino, β -LG, marcadores genéticos, PCR-RFLP.

Radicado: 20 de abril de 2009
Aprobado: 11 de agosto de 2009

¹ Microbióloga Agrícola y Veterinaria, investigadora profesional asistente, Laboratorio de Genética Molecular Animal, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica, Mosquera, Cundinamarca. pcartas@corpoica.org.co

² Estudiante de Biología, tesista, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Laboratorio de Genética Molecular Animal, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica, Mosquera, Cundinamarca. ggarzon@corpoica.org.co

³ Bacterióloga M.Sc., investigadora máster asistente. Laboratorio de Genética Molecular Animal, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica, Mosquera, Cundinamarca. gbarrera@corpoica.org.co

INTRODUCCIÓN

LA PRODUCCIÓN DE LECHE en Colombia ha tenido un crecimiento promedio anual de 5% durante los últimos 30 años, hasta alcanzar 6.176 millones de litros de leche durante el 2007 (Fedegan, 2007). La ganadería lechera en el país, se basa en múltiples sistemas de producción con diferencias en pisos térmicos, grados de intensificación y ambientes socioeconómicos, donde se incluyen la lechería

especializada y la de doble propósito (Fedegan, 2007). La mayoría de los sistemas de producción especializados se encuentran localizados en el trópico alto con zonas entre los 2540 a 2782 msnm, con climas de frescos a fríos (12 °C a 23 °C), con mayor participación de animales *Bos taurus*, con predominio de la raza Holstein. Bajo este sistema, el departamento de Cundinamarca participa con aproximadamente 27% de la producción nacional, con un promedio de 6.470 kg de leche a 305 días (Asoholstein, 2008), donde la sabana de Bogotá representa una zona de gran importancia en la producción del departamento (Holmann *et al.*, 2003; Fedegan, 2007).

Uno de los factores que determinan la calidad de la leche es su composición, representada en contenido de grasa y proteína. Según la unidad de seguimiento de precios de la leche (Agronet Colombia, 2008) en Cundinamarca, la composición es de 3,4% de grasa y 3,0% a 3,1% de proteína. Estos porcentajes se encuentran por debajo de la producción reportada para esta raza mundialmente (USDA, 2006), teniendo en cuenta que la composición depende de la variación de condiciones genéticas, medioambientales y fisiológicas (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986).

Para mejorar la calidad de la composición de la leche, se pueden utilizar estrategias de manejo y de mejoramiento genético. Esta última se puede apoyar en la selección asistida por marcadores moleculares, en la cual es posible usar el ADN procedente de muestras de sangre (hembras o machos) o semen de los animales para determinar el genotipo de interés, que se encuentra relacionado con características productivas deseables (Rachagani *et al.*, 2006). En este sentido, se ha descrito un polimorfismo en el gen de β -LG bovino, el cual ha sido relacionado con un efecto importante en la composición de la leche y en la producción de queso. La β -LG de la familia de las lipocalinas es la proteína que se encuentra en mayor proporción en la leche de los rumiantes y su función principal es el transporte de proteínas, feromonas y síntesis de prostaglandinas; además de encontrarse involucrada en la respuesta inmune y en la homeostasis celular (Flower, 1996; Habib, 2003). Se han descrito doce variantes del gen β -LG; sin embargo, las más comunes en *Bos taurus* y *Bos indicus* son la A y la B (Habib, 2003). Estas difieren en la sustitución de dos aminoácidos en la posición 64 (Asp > Gly) y 118 (Val > Ala). En la posición 118 la sustitución T > C puede ser reconocida por la endonucleasa de restricción *Hae* III mediante la técnica de PCR-RFLP (Habib, 2003).

Existen varios reportes que relacionan la variante B con una alta producción de caseínas y grasa, y un alto rendimiento quesero al elevar la síntesis de caseínas sobre las proteínas del suero de la leche (Bobe *et al.*, 1999); mientras que la variante A la relacionan con mayor contenido de

proteínas del lactosuero, proteínas totales y con mayor producción de leche (Habib, 2003; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986; Sabour *et al.*, 1992; Tsiaras *et al.*, 2005); siendo esta última característica inconsistente, ya que mientras unos estudios muestran algún tipo de efecto (Ikonen, Ojala, Ruottinen, 1999), otros estudios no detectan esta asociación (Ojala, Famula, Medrano, 1997).

El objetivo del presente estudio fue estimar la frecuencia de las variantes A y B de β -LG en poblaciones Holstein de la sabana de Bogotá, como paso inicial para la implementación de metodologías moleculares que permitan la caracterización de genes relacionados con calidad de la composición de la leche en Colombia y su aplicación en futuros programas de mejoramiento a través de selección asistida por marcadores moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Se analizó una población de ganado Holstein (*Bos taurus*) perteneciente a seis fincas productoras de leche de la sabana de Bogotá, departamento de Cundinamarca. Se seleccionaron para el muestreo y genotipificación del gen en estudio en total 236 hembras entre primera a sexta lactancia, con edad promedio de 63 meses, pertenecientes a 25 familias de medias hermanas paternas; las cuales se encontraban en óptimas condiciones sanitarias.

Análisis genotípico

A la población seleccionada se le tomó muestra de sangre periférica en tubos Vacutainer con EDTA al 13%. Para la extracción de ADN, inicialmente se separaron las células nucleadas por lisis de glóbulos rojos con una solución de sucrosa (Bio Basic Inc. Estados Unidos) y tritón (Mallinckrodt Estados Unidos) a una concentración 2X. La extracción de ADN se desarrolló de acuerdo con los protocolos de referencia (Sambrook *et al.*, 1989), utilizando digestión con proteinasa K (Invitrogen, Estados Unidos), extracción con fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1) (Sigma, Estados Unidos) y precipitación con acetato de sodio (Molecular Biology Reagent Estados Unidos) y etanol absoluto (JT Baker, México). Las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría a 260 y 280 nm de longitud de onda, en un equipo Nanodrop 500 de BioRad. Se realizaron diluciones de ADN para una concentración final de 10 ng/ μ l, el cual se utilizó como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Mediante la técnica de PCR, se amplificó un fragmento de 247 pb del exón IV de β -LG. Para cada reacción de PCR se utilizaron 50 ng de ADN genómico bovino, 200 μ M de

dNTP (Pharmacia Biotech), 0,5 μ M de cada uno de los iniciadores directo y reverso, 2 U de Taq ADN polimerasa (Promega, Estados Unidos) y 2,25 mM de MgCl₂ (Promega, Estados Unidos) para un volumen total de 25 μ L. Los cebadores utilizados fueron los descritos por Medrano y Aguilar-Córdova (1990). La PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC 100 (MJ Research, Inc.) programado para iniciar con una denaturación a 94 °C durante 3 min, seguido por 35 ciclos definidos así: denaturación a 95 °C durante 1 min, anillamiento a 56 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min; se realizó un paso final de extensión a 72 °C durante 15 min. Los productos de amplificación fueron verificados en un gel de agarosa (Invitrogen, Estados Unidos) al 2% teñidos con Syber-safe (Invitrogen, Estados Unidos).

Para la identificación del polimorfismo de β -LG se usó enzima de restricción *Hae* III (Promega, Estados Unidos) la cual reconoce la sustitución de C por T mencionada anteriormente, según la metodología propuesta por Medrano y Aguilar-Córdova (1990). Para esto se utilizaron 8 μ L del producto de PCR, 10 U/ μ L de enzima de restricción *Hae* III (Promega, Estados Unidos) y 1 μ L de buffer (Promega 10X), para una reacción final de 10 μ L. La digestión enzimática se llevó a cabo en un termociclador PTC 100 (MJ Research, Inc.) durante 3 h a 37 °C, seguido por una inactivación enzimática a 65 °C durante 20 min.

La separación de los productos se llevó a cabo por electroforesis en gel de poliacrilamida (Acrilamida (JT Baker, China) y NN-metilbisacrilamida (Invitrogen, Estados Unidos) a una concentración 29:1, a 1000 V durante 2 h. La visualización se realizó mediante tinción con nitrato de plata (JT Baker, México). La lectura de los genotipos se llevó a cabo calculando el tamaño de los alelos tomando como referencia la migración de fragmentos de un marcador de 100 pb (Bioline, Estados Unidos) (tabla 1).

Con los resultados obtenidos se estimaron las frecuencias genotípicas y alélicas de la población utilizando el

Tabla 1. Genotipos para las variantes A y B del polimorfismo en β -LG mediante la técnica de PCR-RFLP (enzima de restricción *Hae* III (Medrano y Aguilar-Córdova, 1990)

Pares de bases	β -lactoglobulina Control (sin digerir)	<i>Hae</i> III		
		AA	AB	BB
247	—			
148		—	—	
99		—	—	—
75			—	—
73			—	—

método de conteo directo de genes (Sabour *et al.*, 1992) cuya fórmula es:

$$F_A = (n_{AB} + 2n_{AA}) / 2n$$

$$F_B = (n_{AB} + 2n_{BB}) / 2n$$

Donde n es el tamaño de la población, n_{AA} , n_{BB} y n_{AB} son los números de los genotipos AA, BB y AB respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron tres patrones diferenciales para los tres genotipos posibles de β -LG descritos (figura 1). Los individuos homocigotos para la variable valina (A/A) presentaron un sitio de corte no específico para el polimorfismo, el cual generó un fragmento de 99 pb y otro de 148 pb; los individuos homocigotos para la variable alanina (B/B) presentaron el sitio de corte de la enzima de restricción para el polimorfismo y el sitio de corte no específico, lo cual se evidenció por la visualización de tres fragmentos (73 pb, 75 pb y 99 pb); por último los individuos heterocigotos (A/B) se identificaron por presentar los fragmentos correspondientes a los alelos A y B (148 pb, 99 pb, 75 pb y 73 pb).

La distribución de frecuencias de los genotipos y de los alelos para β -LG en la población se muestra en la

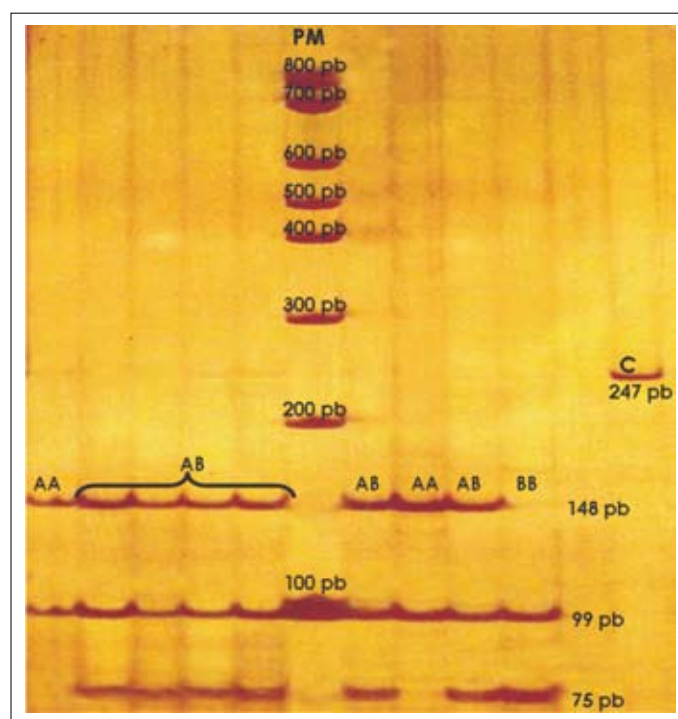


Figura 1. Gel de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata para los fragmentos de PCR digeridos con *Hae* III para β -LG (PM: marcador de peso molecular 100 pb, C: muestra control (producto de PCR sin cortar) y AA, AB y BB: genotipos de β -LG)

tabla 2. Las frecuencias encontradas de los alelos A y B en la población analizada fueron similares, con una leve superioridad del alelo A (0,51). Estos resultados son similares a los reportados en ganado Holstein de diversas partes del mundo, donde las frecuencias varían entre 0,51 y 0,54 para el alelo A y entre 0,46 y 0,49 para el alelo B (Hines *et al.*, 1977; Gonyon *et al.*, 1987; Bech *et al.*, 1990; Tsiaras *et al.*, 2005; Mele *et al.*, 2007). Otros trabajos realizados en poblaciones lecheras muestran que el alelo B es más frecuente que el alelo A (Oner y Elmaci, 2006; Botaro *et al.*, 2008), aunque la diferencia entre alelos es mínima. Lo anterior, contrasta con los resultados obtenidos en machos cruzados Holstein y Jersey donde el alelo B presentó alta frecuencia (0,72) (Patel *et al.*, 2007).

Tabla 2. Distribución de frecuencias de los genotipos y los alelos para β -LG

Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas		N
AA	AB	BB	A	B	
35,1	31,8	33,1	51,0	49,0	236

Las frecuencias genotípicas en la población fueron equitativas, de manera similar a las frecuencias alélicas. Así, los tres genotipos posibles presentaron frecuencias de 0,35 (AA), 0,33 (BB) y 0,31 (AB). Esta distribución es diferente a la reportada por otros autores para la raza, donde se observa mayor frecuencia del genotipo heterocigoto AB (Tsiaras *et al.*, 2005; Oner y Elmaci, 2006; Mele *et al.*, 2007) o del genotipo homocigoto BB (Botaro *et al.*, 2008). En general, es evidente que la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes A y B de β -LG encontradas en poblaciones lecheras es muy similar mundialmente. Los parámetros de cruzamiento utilizados en poblaciones Holstein en diversas partes del mundo han favorecido el aumento de genotipos con alelo B, a diferencia de los resultados en poblaciones Holstein colombiano, donde el genotipo AA presentó la mayor frecuencia.

La leve superioridad del alelo A y del genotipo AA en la población de ganado Holstein de este trabajo se puede presentar debido a la intervención involuntaria de algunos ganaderos que han seleccionado animales para reproducción por la cantidad de leche que producen, teniendo en cuenta que el alelo A de β -LG ha sido relacio-

nado con un mayor volumen de leche. Los programas de cruzamiento y selección de reproductores pueden tener un efecto significativo sobre las frecuencias encontradas en la población; en países como Colombia no se han establecido programas de cruzamiento donde se seleccionen reproductores con alelos deseados para determinadas características de producción.

Sin embargo, para la implementación de un programa de mejoramiento, además de considerar el factor genético, hay que tener en cuenta que la composición de la leche se relaciona también con diferentes regímenes de alimentación, tamaño de la población, raza y condiciones de manejo en general, que son potenciales fuentes de variabilidad (Tsiaras *et al.*, 2005). Por lo anterior, es importante validar la asociación de las variantes estudiadas con la calidad de la composición de la leche en poblaciones sometidas a condiciones agroecológicas del país y sistemas de manejo de la región, para así poder utilizar metodologías moleculares para la selección de individuos con el polimorfismo deseable.

CONCLUSIONES

Las frecuencias genotípicas para el polimorfismo de β -LG evaluado en la población Holstein de la sabana de Bogotá fue de 35,1% para el genotipo AA -el más frecuente en la población-, seguido por 33,1% para el genotipo BB y 31,8% para el genotipo AB. La distribución de los genotipos y de los alelos en la población fue muy similar, lo cual puede estar relacionado con la falta de implementación de programas de mejoramiento en la sabana de Bogotá.

Esta investigación es un paso inicial de caracterización, necesario para el establecimiento futuro de programas estructurados de mejoramiento genético en ganadería lechera en Colombia, donde actualmente se utiliza material importado para inseminación, sin tener en cuenta el genotipo de los animales.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresan su agradecimiento al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por su apoyo financiero para la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

- Agronet Colombia. 2008. Unidad de seguimiento de precios de la leche. En: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, <http://conjtronz.net/agronet2008/site2/analisis.html>; consulta: febrero de 2009.
- Asociación Holstein de Colombia (Asoholstein). 2008. Unidad de seguimiento de precios de la leche. En: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, <http://controlz.net/agronet2008/site2/analisis.html>; consulta: febrero de 2009.
- Bech A, Kristiansen K. 1990. Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and influence of genetic variants on milk yield. *Journal of Dairy Research*. 57: 53-62.
- Bobé G, Beitz D, Freeman E, Lindberg G. 1999. Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates. *Journal of Dairy Science*. 57(219):341-344.
- Botaro B, Lima Y, Aquino A, Hernández R, García J, Santos M. 2008. Effect of beta-lactoglobulin polymorphism and seasonality on bovine milk composition. *Journal of Dairy Research* 75:176-181.
- Federación Colombiana de Ganaderos (Fedegan). 2007. En: http://portal.fedegan.org.co/portal/page?_pageid=93,1768323&_dad=portal&_consulta=febrero de 2009.
- Flower D. 1996. The Lipocalin protein family: structure and function. *Journal Biochem*. 318:1-14.
- Gonyon D, Mather R, Hines H, Haenlein G, Arave C, Gaunt S. 1987. Association of bovine blood and milk polymorphism with lactation traits: Holstein. *Journal of Dairy Sci*. 70:2585-98.
- Habib M. 2003. Genetic polymorphism in goat. Study of the Kappa Casein, Beta Lactoglobulin, and Stearoyl Coenzyme A desaturase genes. Universidad Autónoma de Barcelona (tesis de grado) 169 p.
- Hines H, Haenlein G, Zikakis J, Dickey H. 1977. Blood antigen serum protein and milk gene frequencies and genetic interrelationships in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* 60:1143-51.
- Holmann F, Rivas L, Carulla J, Rivera B, Giraldo L, Guzmán S, Martínez M, Medina A, Farrow A. 2003. Evolución de los sistemas de producción de leche en el trópico latinoamericano y su interrelación con los mercados: Un análisis del caso colombiano. En: http://flar.org/tropileche/articulos.pdf/ArtCol_Esp_May_2003.pdf; consulta: junio de 2009.
- Ikonen T, Ojala M, Ruottinen O. 1999. Associations between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. *Journal of Dairy Science* 82:1026-1033.
- Medrano JF, Aguilar-Córdova E. 1990. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Biotechnology* 1:73-77.
- Mele M, Conte G, Serra A, Buccioni A, Secchiari P. 2007. Relationship between beta-lactoglobulin polymorphism and milk fatty acid composition in milk on Massese dairy ewes. *Small Ruminant Research* 73:37-44.
- Ng-Kwai-Hang K, Hayes J, Moxley J, Monardes H. 1986. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci*. 69:22-26.
- Patel R, Chauhan J, Singh K, Soni K. 2007. Allelic frequency of kappa-casein and beta-lactoglobulin in Indian crossbred (*Bos taurus* x *Bos indicus*) dairy bulls. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Science* 31:399-402.
- Ojala M, Famula T, Medrano J. 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.
- Oner Y, Elmaci C. 2006. Milk protein polymorphisms in Holstein cattle. *International Journal of Dairy Technology* 59(3):180-182.
- Rachagani S, Dayal I, Gupta N, Gupta SC. 2006. Genotyping of β -Lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds. *BMC Genetics* 7(31):1-4.
- Sabour M, Lin C, Keough A, Mechanda S, Lee J. 1992. Effects of selection practiced on the frequencies of Kappa-Casein and β -Lactoglobulin genotypes in Canadian Artificial Insemination Bulls. *J. Dairy Sci*. 76:274-280.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Estados Unidos.
- Tsiaras A, Bargouli G, Banos G, Boscós M. 2005. Effect of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. *J. Dairy Sci*. 88:327-334.
- United States Department of Agriculture (USDA). 2006. State and National Standardized Lactation Averages by Breed for Cows Calving in 2006. Animal Improvement Programs Laboratory, ARS-USDA, Beltsville, MD 20705-2350.