

CARACTERIZACION GENETICA DE PROTEINAS LACTEAS EN GANADO VACUNO MEDIANTE ANALISIS DEL DNA.

Osta, R.; Marcos, S.; Martín, I.; García-Muro, E. y Zaragoza, P.

Laboratorio de Genética Bioquímica. Facultad de Veterinaria. Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza.

INTRODUCCION

La solución posible para la producción láctea en nuestro país, como en la Comunidad Económica Europea, no está en aumentar la producción de leche sino en la realización de un giro sustancial hacia la potenciación de la calidad tecnológica y funcional de la misma (Zarazaga y cols.,1992). Desde hace tiempo se conoce que los distintos genotipos de proteínas lácteas tienen influencia sobre la calidad de la leche y se recomiendan determinados genotipos para la producción de queso (Aleandri y Buttazoni, 1990).

Por ello teniendo en cuenta la influencia que los genotipos de las proteínas lácteas tienen calidad en la calidad tecnológica de la leche (de gran importancia debido a los excedentes de leche), se abordó es estudio de proteínas lácteas en razas lecheras explotadas en España. El objetivo es el analizar comparativamente la variabilidad genética de las proteínas lácteas de razas explotadas en España con distintos grados de selección y conocer su distribución en la población.

MATERIAL Y METODOS.

Se estudiaron 296 animales no emparentados que pertenecen a 4 razas bovinas explotadas en España: Frisona (146 animales: 50 procedentes de una explotación de ganado selecto (Frisona 1), 46 de un Centro de Inseminación (Frisona 2) y 50 de explotaciones familiares (Frisona 3), Para Alpina (50), Rubia Gallega (50) y Asturiana de los Valles(50). La extracción de DNA genómico se realizó a partir de 3 tipos de muestra: sangre (Osta y cols.,1994), semen (Thompsen y cols.,1991) y leche (Vazquez,1994) aproximadamente 250 ng de DNA fueron utilizados en la amplificación.

Cada reacción de amplificación presentó un volumen final de 50 µl que contienen 60 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,01p. 100 de gelatina y 0,1p. 100 Triton X-100, 10 mM MgCl₂, 75 pm de cada oligonucleótido cebador, 2 µl de mezcla de dNTP (5 mM) y una unidad de Taq DNA polimerasa.

Tras la amplificación el fragmento amplificado fue digerido con su específica enzima de restricción para observar los distintos genotipos, excepto en el caso del microsatélite de la CASK. Las características de cada PCR y las enzimas utilizadas para la detección del polimorfismo se observan en la Tabla I.

Tabla 1.- Características del análisis del polimorfismo de los marcadores.

LOCUS	CEBADORES	T ^a HIBRI. °C	E. R.
CASK	Leveziel y cols.,1994	42	Hind-III
ms	Leveziel y cols.,1994	50	---
CASB	Medrano y Sharrow, 1991	59	Msp-I
CASA1	Osta ,1994	57	Hph-I
CASA2	Osta,1994	62	Mnl-I
LGB	Medrano y Aguilar-Córdova,1990	64	Hae-III
LAA	Osta ,1994	62	Msp-I

La visualización de la amplificación se realizó en agarosa al 2%. La visualización de los fragmentos obtenidos tras la digestión con la enzima de restricción se realizó en agarosa al 4% (2% Nuesieve-2%normal). En

el caso del microsátélite de la CASK la visualización del polimorfismo se hizo mediante gel de acrilamida al 6%. Para la obtención de los parámetros poblacionales fué utilizado el programa BYOSYS.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Los resultados obtenidos para las distintas poblaciones se muestran en la **Tabla 2**. En todas las poblaciones estudiadas los loci CASK, CASB y LGB han mostrado dos alelos. La proteína CASA1 excepto para la población Frisona 2 en la se mostró monomórfica también se observaron 2 alelos en las distintas poblaciones. La proteína CASA2 se comportó como monomórfica en las poblaciones de Rubia Gallega y Frisona 1, mostrando una frecuencia más elevada del alelo **CASA2^D** de las obtenidas por otros autores, que solamente encontraron variabilidad en este locus para las razas autóctonas francesas Montbèliare y Vosgiènhe (Grosclaude,1988). Todas las poblaciones se han mostrado monomórficas para la proteína LAA, correspondiéndose con lo descrito por otros autores que observan solo polimorfismo para esta proteína en el ganado Zebú.

En el caso de la CASK para las razas autóctonas y Parda Alpina se han observado frecuencias intermedias para los dos alelos siendo en la raza Frisona mucho más elevado el alelo **CASK^A**. Nos parece interesante resaltar, que si bien las diferencias respecto a **CASK^B** no son muy elevadas en las poblaciones Frisona, es cierto que la Frisona 3 es superior si la comparamos con las poblaciones 1 y 2, siendo estas últimas las que más se han seleccionado para la producción de leche. En el caso de la CASB la frecuencia más elevada del alelo **CASB^B** se corresponde con la raza Parda Alpina. La proteína LGB presenta frecuencias intermedias en todas las poblaciones estudiadas, siendo el locus que mayor variabilidad ha mostrado junto con el microsátélite de la CASK. En las razas autóctonas se ha observado la presencia de 5 alelos para dicho microsátélite, 4 en Para Alpina y 3 en la raza Frisona , aunque en todas la poblaciones han sido los alelo **ms⁴** y **ms⁵** los que han presentado frecuencias superiores, resultado similares a los obtenidos por Leveziel y cols.,1994.

Excepto para la raza Parda Alpina para los loci CASA1 y CASA2, todas las poblaciones se encuentran en equilibrio genético, resultado concordante con los valores del índice de Fijación de Wright (F), que no se mostraron diferentes de 0. En el caso de la falta de equilibrio por la raza Parda Alpina en los dos loci se debe a un defecto de heterocigotos, que origina que el valor de F sea diferente de 0. No conocemos que puede originar este desequilibrio observado, aunque puede deberse a la existencia de consanguinidad en la población estudiada. Por último, apuntar que la mayor variabilidad encontrada para los loci estudiados se corresponden a la Parda Alpina, Asturiana de los Valle y Rubia Gallega y son en estas razas en las que los alelos que se han descrito como favorables para la producción de queso (**CASK^B** y **CASB^B**) presentan también una mayor frecuencia.

BIBLIOGRAFIA.

- ALEANDRI, R. & BUTTAZZONI, L. (1990). *Bianconero* . 6: 55-60.
GROSCLAUDE, F. (1988). *Prod. Animal* , 1: 5-17.
LEVEZIEL, H.; RODELLAR, C.; LEROUX, C.; PEPIN, L.; GROHS, C.; VAIMAN, D.; MAHE, M.F.; MARTIN, P. y GROSCLAUDE, F.(1994). *Animal Genetics*, 25 nº 4:223-228.
MEDRANO, J.F & AGUILAR-CORDOVA, E.(1990). *Biotecnology*, 8: 144-146.
MEDRANO, J.F. & SHARROW, L.(1991). *J. Dairy Sci.*, 74: 282.
OSTA, R.(1994). Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
VAZQUEZ, F.J. (1994). Tesis de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.
ZARAZAGA, I; ZARAGOZA, P.; ZARAZAGA, M.; RODELLAR, C. & OSTA,R.(1992). BOVINOTECNIA (1992) Ortega-Mora et al. Gestora de Estudios e Información (Ciencias Veterinarias).Madrid.

Tabla 2.-Estructura genética (frecuencias génicas, X2 de equilibrio, heterocigosidades observadas y esperadas, "F" de Wright y X2 de F, heterocigosidades medias esperadas y observadas, % de loci polimórficos y número medio de alelos por locus) de las distintas razas vacunas, para los loci CASK, CASB, CASA1, CASA2, LGB y ms

Locus	Parámetros	P. A. (n=50)	A. V. (n=50)	R. G. (n=50)	Fri. 1 (n=46)	Fri. 2 (n=50)	Fri. 3 (n=50)	Total Fri. (n=146)
CASK	CASK ^A	0.45	0.58	0.49	0.84	0.81	0.76	0.80
	CASK ^B	0.55	0.42	0.51	0.16	0.19	0.24	0.20
	X ² Equil.	0.13(N.S.)	0.60(N.S.)	0.18(N.S.)	0.00(N.S.)	0.02(N.S.)	0.00(N.S.)	0.00(N.S.)
	Hete. Obser.	0.54	0.56	0.46	0.28	0.33	0.36	0.32
	Hete. Esper.	0.50	0.49	0.50	0.27	0.30	0.37	0.31
	F	-0.09	-0.15	0.08	-0.04	-0.08	0.01	-0.02
	X ² F	0.40(N.S.)	1.13(N.S.)	0.32(N.S.)	0.09(N.S.)	0.31(N.S.)	0.00(N.S.)	0.06(N.S.)
CASB	CASB ^A	0.63	0.94	0.93	0.97	0.91	0.90	0.93
	CASB ^B	0.37	0.06	0.07	0.03	0.09	0.10	0.07
	X ² Equil.	0.67(N.S.)	0.00(N.S.)	0.00(N.S.)	0.00(N.S.)	0.00(N.S.)	0.04(N.S.)	0.00(N.S.)
	Hete. Obser.	0.54	0.12	0.14	0.06	0.17	0.16	0.13
	Hete. Esper.	0.47	0.11	0.13	0.06	0.16	0.18	0.13
	F	-0.16	-0.06	-0.07	-0.03	-0.09	0.11	0.02
	X ² F	1.28(N.S.)	0.20(N.S.)	0.28(N.S.)	0.05(N.S.)	0.37(N.S.)	0.60(N.S.)	0.06(N.S.)
CASA1	CASA1 ^B	0.94	0.78	0.62	0.98	1	0.99	0.99
	CASA1 ^C	0.06	0.22	0.38	0.02	0	0.01	0.01
	X ² Equil.	1.05(N.S.)	0.02(N.S.)	0.00(N.S.)	0.00(N.S.)	-	0.00(N.S.)	0.00(N.S.)
	Hete. Obser.	0.08	0.36	0.48	0.40	-	0.02	0.00
	Hete. Esper.	0.12	0.35	0.47	0.40	-	0.02	0.00
	F	0.29	-0.04	-0.19	-0.02	-	-0.01	-0.01
	X ² F	4.21*	0.08(N.S.)	1.81(N.S.)	0.02(N.S.)	-	0.01(N.S.)	0.01(N.S.)
CASA2	CASA2 ^A	0.93	0.94	1	1	0.98	0.99	0.99
	CASA2 ^D	0.07	0.06	0.00	0.00	0.02	0.01	0.01
	X ² Equil.	28.71***	0.00(N.S.)	-	-	0.00(N.S.)	0.00(N.S.)	0.00(N.S.)
	Hete. Obser.	0.02	0.12	-	-	0.43	0.02	0.00
	Hete. Esper.	0.13	0.11	-	-	0.43	0.02	0.00
	F	0.84	-0.06	-	-	-0.02	-0.01	-0.01
	X ² F	35.28***	0.18(N.S.)	-	-	0.02(N.S.)	0.01(N.S.)	0.15(N.S.)

Locus	Parámetros	P. A. (n=50)	A. V. (n=50)	R. G. (n=50)	Fri. 1 (n=46)	Fri. 2 (n=50)	Fri. 3 (n=50)	Total Fri. (n=146)
LGB	LGB ^A	0.50	0.40	0.46	0.34	0.33	0.44	0.37
	LGB ^B	0.50	0.60	0.54	0.66	0.67	0.56	0.63
	X ² Equil.	1.28(N.S.)	0.78(N.S.)	0.45(N.S.)	0.00(N.S.)	0.07(N.S.)	1.33(N.S.)	0.77(N.S.)
	Hete. Obser.	0.60	0.56	0.44	0.44	0.48	0.60	0.50
	Hete. Esper.	0.50	0.48	0.50	0.45	0.44	0.50	0.47
	F	-0.20	-0.17	0.11	0.02	-0.09	-0.22	-0.09
	X ² F	2.00(N.S.)	1.45(N.S.)	0.60(N.S.)	0.02(N.S.)	0.36(N.S.)	2.42(N.S.)	1.18(N.S.)
ms	ms ¹	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	ms ²	0.00	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	ms ³	0.01	0.01	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00
	ms ⁴	0.18	0.42	0.20	0.63	0.60	0.69	0.64
	ms ⁵	0.73	0.54	0.64	0.27	0.26	0.27	0.27
	ms ⁶	0.08	0.00	0.05	0.10	0.14	0.04	0.10
	X ² Equil.	0.02(N.S.)	0.45(N.S.)	1.48(N.S.)	0.00(N.S.)	1.42(N.S.)	0.71(N.S.)	1.48(N.S.)
	Hete. Obser.	0.44	0.48	0.60	0.52	0.61	0.50	0.54
	Hete. Esper.	0.43	0.54	0.54	0.52	0.56	0.45	0.51
	F	-0.03	0.10	-0.116	0.00	-0.10	-0.11	-0.06
	X ² F	0.04(N.S.)	0.50(N.S.)	0.72(N.S.)	0.00(N.S.)	0.46(N.S.)	0.66(N.S.)	0.52(N.S.)
H.M.O. ± s.e.	0.37±0.10	0.36±0.08	0.35±0.09	0.22±0.09	0.27±0.09	0.28±0.10	0.26±0.09	
H.M.E. ± s.e.	0.36±0.07	0.35±0.07	0.36±0.09	0.22±0.09	0.25±0.09	0.26±0.08	0.24±0.09	
% loci polim.(99%)	100%	100%	83.3%	83.3%	83.3%	100%	100%	
% loci polim.(95%)	100%	100%	83.3%	50%	66.6%	66.6%	66.6%	
Nº med.alelos/locus ± s.e.	2.33±0.33	2.50±0.50	2.33±0.56	2.00±0.26	2.00±0.26	2.17±0.17	2.17±0.17	