

Rev.MVZ Córdoba 17(1):2878-2883, 2012.

ORIGINAL

Comparación de metodologías moleculares para identificar el gen de la kappa caseína en ganado Holstein

Comparison of molecular methodologies to identify the kappa casein gene in Holstein cattle

Carlos Solarte P,^{1*} Ph.D, Carol Rosero G,¹ Ph.D, Yohana Eraso C,¹ Zoot.

¹Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Programa de Zootecnia, Programa de Mejoramiento Genético, Ciudadela Universitaria Torobajo. Pasto. Colombia. *Correspondencia: csolarte@udenar.edu.co.

Recibido: Octubre de 2010; Aceptado: Junio de 2011.

RESUMEN

Objetivo. Comparar las metodologías moleculares, PCR-RFLPs y PCR-SSCP, para identificar las variantes alélicas del gen de la kappa caseína (CSN3) en bovinos Holstein del trópico alto de Nariño-Colombia. **Materiales y métodos.** Se escogieron al azar 50 vacas Holstein y mediante punción en la vena coxígea media se tomaron muestras de 5cc de sangre, que se almacenaron y preservaron en tarjetas FTA[®] para su posterior análisis en el laboratorio. El ADN se amplificó por PCR utilizando cebadores específicos. Los cambios en la conformación de cadena sencilla (SSCP) fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 12%; mientras que los RFLPs se obtuvieron por digestión con tres enzimas de restricción y se visualizaron en geles de agarosa al 4%. **Resultados.** La metodología PCR-RFLPs fue útil para detectar mutaciones puntuales y por lo tanto se identificó un mayor número de alelos, lo que contribuye a una mejor estimación de las medidas de diversidad genética en poblaciones seleccionadas, ya que evita problemas de sobreestimación de los valores en las frecuencias alélicas. Por su parte, la técnica PCR-SSCP resultó más sencilla y económica, ideal para investigaciones en las que no existe información previa sobre los genotipos de las poblaciones bovinas y en estudios con bajos presupuestos. **Conclusiones.** Las dos metodologías evaluadas son herramientas moleculares que contribuyen a la orientación de los procesos de selección en los bovinos para leche, ya que identifican los alelos del gen CSN3. La diferencia radica en el costo de las mismas y en el número de variantes identificadas.

Palabras clave: Colombia, genotipos, kappa caseína, PCR (*Fuente: CAB*).

ABSTRACT

Objective. Compare the PCR-RFLP's and PCR-SSCP's molecular techniques in order to identify the allelic variants of the kappa casein (CSN3) gene in Holstein cattle in Nariño-Colombia. **Materials and methods.** 50 female Holstein cows were randomly chosen and 5cc of blood samples were obtained from the animals' medium coccygeal vein. The samples were stored and preserved in FTA® cards for further lab analysis. and were analyzed in the molecular laboratory. The DNA was amplified through PCR using specific primers. The changes in the single strand of DNA were visualized in 12% polyacrylamide gels, whereas the RFLPs were obtained through digestion with three restriction enzymes and visualized in 4% agarose gels. **Results.** The PCR-RFLP's technique was useful to detect punctual mutation and to identify a greater number of alleles which contributed to a better estimate of the genetic diversity measurements on a selected populations, because it avoids the over estimation of values in allelic frequencies. On the other hand, the PCR-SSCP's technique was simpler and cheaper, ideal for research where there is no previous genotype information on cattle populations or in studies that are limited by budget. **Conclusions.** Both evaluated methodologies are molecular tools which contribute to the design of selection procedures on dairy cattle because they correctly identify the alleles of CSN3 gene. The difference lies in the cost and the number of identified variants.

Key words: Colombia, genotypes, kappa casein, PCR (*Source: CAB*).

INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los sistemas especializados en producción de leche de varios países, incluido Colombia, la raza predominante es la holstein, la cual se considera la más lechera del mundo. Esta condición se ha logrado luego de un proceso selectivo de varias generaciones, donde el objetivo de mejoramiento está orientado a incrementar el volumen por lactancia, lo que a su vez ha contribuido con el detrimento de la calidad composicional de la leche (1).

La baja calidad composicional de la leche, es una de las limitantes para la competitividad en el trópico alto de Nariño, donde el ganado holstein de esta región produce leche con baja calidad composicional, especialmente en contenido total de proteína, el cual está alrededor de 3.01%, por lo que es muy importante mejorar este rasgo (2). Para cumplir este objetivo, se debe tener en cuenta que el porcentaje de proteína en la leche está determinado fundamentalmente por el potencial genético del animal y las condiciones ambientales, especialmente el manejo nutricional. Por lo tanto, es necesario integrar los componentes genéticos y alimenticios al sistema productivo, con el fin de incrementar los porcentajes de sólidos en la leche, especialmente proteína.

En el manejo genético debe tenerse en cuenta que, en la actualidad, la selección clásica de reproductores se puede complementar con la utilización de técnicas moleculares para identificar genes relacionados con la calidad de la leche. De esta manera se contribuye al incremento del progreso genético, por efecto de

la disminución del intervalo generacional, debido a que no es necesario esperar los resultados del desempeño productivo, en al menos una lactancia, puesto que los genotipos pueden identificarse incluso en estado embrionario (3).

En el trópico alto de Nariño se viene desarrollando un programa donde se utilizan metodologías tradicionales de evaluación genética, complementadas con la identificación de los alelos de CSN3 mediante las técnicas PCR-SSCP y PCR-RFLP. La identificación de estos alelos es importante, puesto que algunas variantes alélicas como la B, están relacionadas con mayores contenidos de proteína y mejores rendimientos industriales para la producción de queso (4,5). Desde 1983 hasta el 2007, en *Bos taurus*, se han reportado 11 variantes alélicas para la CSN3, denominadas A, B, C, E, F, G, H, I, A1, A2 y A3, (6-9), estableciéndose la necesidad de identificarlos correctamente y determinar en ambientes específicos su relación con las variables de calidad composicional de la leche.

Por un lado la técnica PCR-SSCP es una técnica rápida, sencilla y de bajo costo que se basa en la migración diferencial de cadenas desnaturalizadas de ADN, debido a que las cadenas simples adquieren estructuras secundarias complejas que depende de la secuencia de nucleótidos (10), mientras que en la PCR-RFLP se amplifica una región del gen de CSN3 para la detección de las variantes alélicas las cuales se digieren con enzimas de restricción que aunque son de alto

costo, resultan altamente sensibles en la identificación de los puntos mutación, lo que a su vez garantiza la correcta identificación de los alelos (11).

El objetivo principal de esta investigación, consistió en el uso de dos herramientas moleculares PCR-RFLP (Reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) y PCR-SSCP (Reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo en la conformación de ADN de cadena única), con el fin de identificar los genotipos para CSN3 en animales holstein del trópico alto de Nariño-Colombia y comparar las ventajas y desventajas de cada una de ellas en dicho proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras. Se utilizó una muestra poblacional aleatoria de 50 hembras holstein del departamento de Nariño, sur occidente de la República de Colombia.

Se tomaron 5 cc de sangre total, mediante punción en la vena coxígea media. Las muestras se almacenaron en tarjetas FTA® y posteriormente se transportaron para su análisis en el Laboratorio de Mejoramiento Genético de la Universidad de Nariño, Colombia.

Obtención de ADN. Para la obtención del ADN desnudo se siguió el protocolo descrito por Solarte et al (12), utilizando el kit comercial FTA® de Whatman Bioscience.

Diseño de cebadores. Las secuencias utilizadas para la amplificación del gen de la CSN3 fueron las descritas por Barroso et al (13), para la cadena adelantada 5`-TGT GCT GAG TAG GTA TCC TAG TTA TGG-3` y para la cadena atrasada: 5`-GCG TTG TCT TCT TTG ATG TCT CCTTAG-3, los cebadores utilizados permitieron el reconocimiento del gen, equivalente a un fragmento de 453pb.

Amplificación por PCR. En un volumen de 20µl se utilizó un disco de ADN, buffer PCR 1X, 2.0mM de MgCl₂; 0.2mM de dNTPs; 2U de taq polimerasa (Promega) y 0.75µM de cada cebador. El programa de amplificación fue: un ciclo de cinco minutos a 94°C; seguido de 35 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 65°C, dos minutos a 72°C y se finalizó con un ciclo de cinco minutos a 72°C.

PCR-RFLP. Los polimorfismos de restricción se obtuvieron a partir de la digestión del producto amplificado utilizando tres enzimas de restricción: HinfI, MaeII y HaeIII. La digestión, por separado, consistió en una incubación a 37°C por dos horas utilizando 2µl de enzima, 2µl de Buffer R 10X, 18µl de agua y 10µl del producto amplificado.

La visualización de cada PCR y de los polimorfismos de digestión se hizo en geles de agarosa al 2% y 4% respectivamente, preparados con solución TAE 1X y bromuro de etidio como colorante.

PCR-SSCP. Los polimorfismos en la conformación de ADN de cadena única se visualizaron en geles no denaturantes al 12% (relación de acrilamida-N`N bis-acrilamida 100:1), previa desnaturalización a 94°C por tres minutos. Las muestras se corrieron durante 16 horas a 160 voltios y la tinción de los geles se realizó con hidróxido de sodio y nitrato plata.

Estudio de costos de las técnicas. Una de las principales desventajas en el uso de herramientas moleculares para el conocimiento de la caracterización y diversidad genética de las poblaciones naturales se relaciona con su costo. La implementación del Programa de Mejoramiento Genético de la Universidad de Nariño en Colombia, ha permitido el uso de técnicas de ADN para el estudio de poblaciones bovinas, cuyos resultados pioneros en la región han sido un valioso aporte para el mejoramiento de la cadena láctea, además de permitir que pequeños agricultores del trópico alto de Nariño, quienes dependen económicamente de la actividad lechera, puedan acceder al conocimiento del genotipo de los animales de su hato. Por esta razón se consideró importante determinar el costo de cada técnica para cada muestra analizada, para ello se empleó el método contable orden de producción (14) incluyendo en el costo total de cada técnica, los reactivos empleados en el desarrollo del proceso, desde la reacción en cadena de la polimerasa hasta la determinación del genotipo.

RESULTADOS

La determinación de genotipos se realizó mediante las técnicas PCR-RFLPs y PCR-SSCP. Inicialmente se verificó la amplificación del gen de CSN3, acorde con el patrón indicado en la figura 1 y posteriormente se identificaron los genotipos.

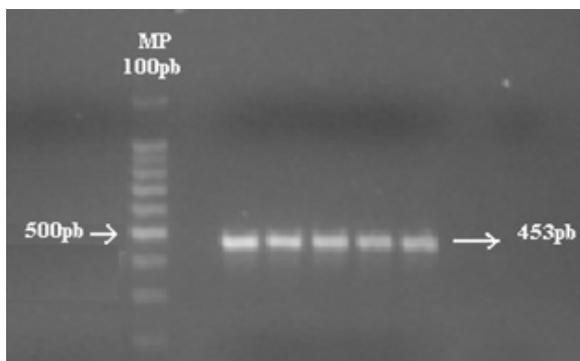


Figura 1. Amplificación por PCR del gen de la CSN3 con un peso molecular de 453 pares de bases.

Se logró determinar polimorfismos de restricción con las tres enzimas utilizadas en este estudio (Figura 2) y los pesos moleculares de los fragmentos digeridos fueron acordes con lo reportado inicialmente por Barroso et al (13). Con la enzima *Hae*III claramente se identificaron los alelos A, B y C. Los alelos A, B y E fueron identificados con la *Mae*II y para *Hin*I fue posible la visualización de los alelos A, B, C y E.

De igual forma, fue posible la correcta identificación de los patrones de bandas con la técnica PCR-SSCP y así determinar los alelos A y B al igual que los genotipos resultantes de la combinación de estos, alelos que son los de mayor importancia para la raza holstein (Figura 3).

DISCUSIÓN

Ventajas y desventajas de los métodos utilizados. Los dos métodos utilizados en esta investigación permitieron la identificación de las variantes alélicas de la CSN3. En relación al uso de la metodología PCR-RFLPs, el empleo de la PCR-SSCP resultó más sencilla y económica en la determinación de las variantes alélicas A y B, sin embargo, se presentaron algunas dificultades en la visualización de los genotipos resultantes de la conformación de cadena sencilla de ADN. En total, se logró estimar que esta técnica requiere siete horas por encima del tiempo empleado en la obtención de genotipos con la PCR-RFLPs.

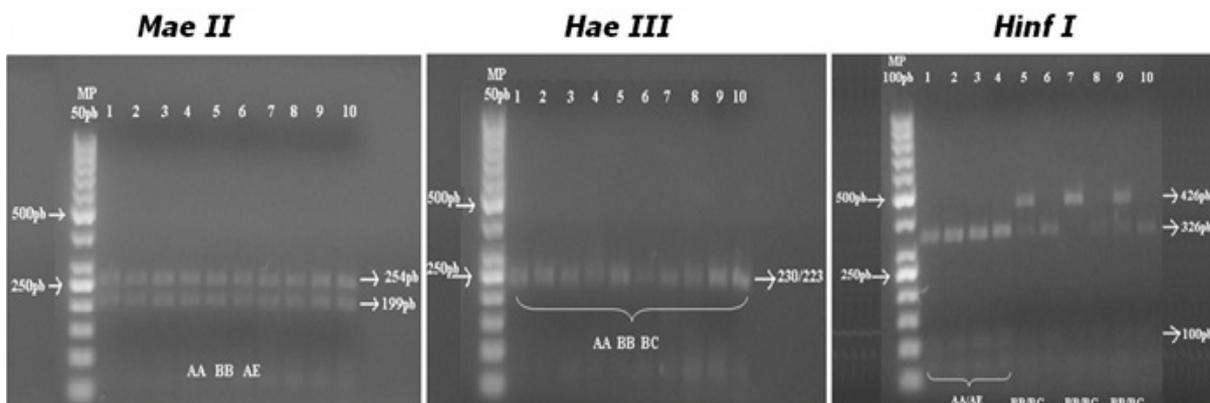


Figura 2. Digestión del gen de CSN3 mediante las enzimas de restricción *Hinf*I, *Mae*II y *Hae*III.

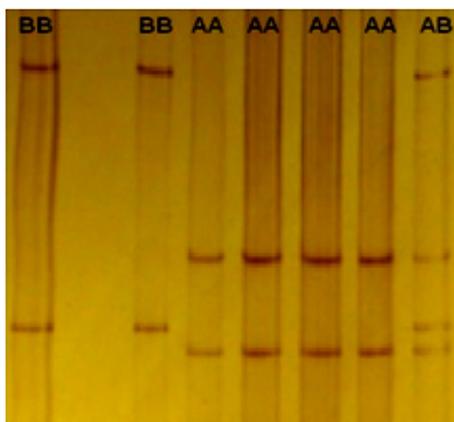


Figura 3. Patrón de bandas generado por SSCP para el gen de CSN3.

Adicionalmente, uno de los factores críticos en la aplicación de la PCR-SSCP fue la visualización de los alelos previamente teñidos con nitrato de plata, tinción que resultó altamente sensible a la calidad de agua empleada para la preparación de las soluciones involucradas; hecho que implicó un incremento en el tiempo de obtención de los genotipos, de hasta 18 horas. Es importante mencionar, que la calidad de agua incluso afecta la lectura de los genotipos, debido a la baja nitidez de las bandas resultantes de la amplificación de cada alelo, lo que conlleva a la repetición de los procesos para la obtención de estos fragmentos, sobre todo en los alelos que discriminan el genotipo heterocigoto AB de los homocigotos.

Una desventaja adicional de la técnica PCR-SSCP, radicó en que con los cebadores utilizados (13) solo fue posible identificar las variantes A y B, a diferencia de la PCR-RFLP que permitió identificar, a partir de la digestión de un único producto de PCR, las variantes C y E sin ambigüedades, hecho que le confiere cierta ventaja en cuanto a la correcta identificación de los genotipos, no obstante, es necesario aclarar que utilizando otro tipo de cebadores también es posible identificar dichas variantes con la PCR-SSCP lo que confirma la mayor ventaja económica de esta técnica.

Respecto a PCR-RFLP, pese al proceso laborioso que resulta en la obtención de cada variante alélica, la digestión específica con enzimas de restricción permitió identificar un mayor número de alelos y por ende de genotipos, lo que resulta más adecuado para efectos del conocimiento y estimación de los índices de diversidad genética de la población holstein distribuida en el Trópico Alto de Nariño. Estos resultados además permiten entender más claramente la estructura de la población estudiada, en cuanto a la distribución real de los porcentajes de variación genética, y que pueden sobreestimar las frecuencias alélicas de la población respecto a los alelos A y B, con el uso de la técnica PCR-SSCP.

Finalmente los resultados permiten concluir que las dos metodologías usadas en este estudio son aplicables en la identificación correcta de los genotipos para las variantes alélicas A y B. Asimismo se recomienda el uso de la metodología PCR-RFLPs, la cual resultó más sensible en la identificación de mutaciones puntuales representadas en un mayor número de alelos y genotipos; mientras que la técnica PCR-SSCP se recomienda en los casos en los cuales se requiera minimizar los costos de la investigación.

Costos en las dos técnicas utilizadas. Los costos de identificación del genotipo de cada individuo utilizado en la presente investigación, con una conversión de pesos a dólares al valor de la tasa representativa del mercado (TRM) publicada en la fecha del estudio por el Banco de la República (15) para la técnica PCR-SSCP el análisis molecular para la identificación del gen CSN3 es de US\$ 4.8 y con PCR-RFLPs el valor se incrementa hasta US\$ 14.36 por muestra.

Agradecimientos

Al Ministerio de Agricultura, Colácteos y la Universidad de Nariño por permitir el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

1. Cervantes P. Caracterización de la composición y producción láctea en vacas de diferentes genotipos en Veracruz, México [Tesis Doctoral]. La Habana Cuba: Universidad de la Habana; 2005.
2. Caracterización y evaluación genética de la población bovina lechera del trópico alto de Nariño, para la conformación de núcleos de selección. Pasto-Nariño: Universidad de Nariño; 2009. URL Disponible en: http://promegalac.udenar.edu.co/wp-content/uploads/2010/05/Informe_Final_Proyecto_48-1.pdf
3. Lopez V, Garrick ND, Blair HT, Holmes CW. Possible effects of twenty five years of selection and crossbreeding on the genetic merit and productivity of New Zealand dairy cattle. *J Dairy Sci* 2000; 83:154-163.
4. López E, Vásquez N. Determinación del sexo y genotipificación del gen de la K-caseína en embriones bovinos. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2004; 17:231-240.
5. Braunschweig M, Hagger C, Stranzinger G, Puhán Z. Associations between casein haplotypes and milk production traits of Swiss Brown Cattle. *J Dairy Sci* 2000; 86(6):564-569.
6. Chessa S, Chiatti F, Ceriotti G, Caroli A, Consolandi C, Pagnacco G and Castiglioni B. Development of a Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Microarray Platform for the Identification of Bovine Milk Protein Genetic Polymorphisms. *J Dairy Sci* 2007; 90:451-464.
7. Soria LA, Iglesias GM, Hugué MJ, Mirande SL. A PCR-RFLP test to detect allelic variants of the bovine kappa-casein gene. *Anim Biotechnol* 2003; 14(1):1-5.
8. Uffo O, Martín I, Martínez S, Ronda R, Osta R, Rodellar C, Zaragoza P. Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. *AGRI* 2006; 39:15-24.

9. Requena FD, Agüera EI, Requena F. Genética de la caseína de la leche en el bovino Frisón (Milk of casein of genetic in the Frison bovine). REDVET 2007; 21:1695-7504.
10. Hoelzel A. Molecular genetics Analysis of Populations. ed 2nd. New York: Oxford University Press; 1998.
11. Naranjo J, Posso A, Cárdenas H, Muñoz JE. Detección de variantes alélicas de la Kappa-caseína en bovinos hartón del Valle. ACTA AGRON (COLOMBIA) 2007; 56(1):43-47.
12. Solarte CE, Rosero CY, Cárdenas H, Burgos WO Eraso YM, Zambrano GL. Identificación de polimorfismos del gen de la Kappa caseína bovina: Nariño-Colombia. Revista Lasallista de Investigación 2009; 6(2):39-45.
13. Barroso A, Dunner S, Cañon J. Detection of Bovine Kappa casein Variants A, B, C y E by Means of Polymerase Chain Reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). Technical note. J Anim Sci 1998; 76:1535-1538.
14. Álvarez CA, Sánchez ZB. Costos y Métodos de Costeo. Aplicación y análisis para el sector agropecuario. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 1998.
15. Banco de la República de Colombia. Metodología de cálculo de la tasa de cambio representativa del mercado (TRM). Bogotá, Colombia: BANREP; 2004. URL Disponible en: <http://www.banrep.gov.co/reglam/circularesdodm/asunto8tcrm.pdf>.