

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Trabajo de Graduación

Frecuencias genotípicas y alélicas del gen de la kappa caseína en sementales bovinos doble propósito ubicados en fincas del municipio Camoapa, departamento de Boaco, 2018

Autor

D.M.V. Julio Omar López Flores

Asesores

Cristóbal Roldán Corrales Briceño, PhD

René Silva Arrechavala, PhD

Diciembre, 2018

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Trabajo de Graduación

Frecuencias genotípicas y alélicas del gen de la kappa caseína en sementales bovinos doble propósito ubicados en fincas de Camoapa, departamento de Boaco, 2018

Autor:

D.M.V. Julio Omar López Flores

Asesores:

Cristóbal Roldán Corrales Briceño, PhD

René Silva Arrechavala, PhD

Diciembre, 2018

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado en su presente forma por el tribunal examinador, designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía (FAGRO), de la Universidad Nacional Agraria (UNA), como requisito parcial para optar al título profesional de:

Maestro en Ciencias en Biotecnología

Miembros del tribunal examinador

Ing. Guillermo Reyes Castro MSc. PhD

Presidente

Ing. Raúl Piad. MSc. PhD

Secretario

Ing. Ulises Blandón Díaz MSc. PhD

Vocal

Lugar y Fecha (día/mes/año) _____

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE ANEXOS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS	4
3.1 Ubicación del área de estudio	4
3.1.1 Tipo de estudio	5
3.2 Razas de sementales y cruces de estas muestreadas para estudio	5
3.2.1 Raza Holstein	5
3.2.2 Características generales de la raza Holstein	5
3.2.3 Raza Pardo suizo	6
3.2.4 Características generales de la raza Pardo suizo	6
3.2.5 Raza Brahman gris	7
3.2.6 Características generales de la raza Brahman gris	7

3.3	Ganado doble propósito	8
3.4	Toma de muestras sanguíneas	10
3.4.1	Extracción del ADN de las muestras de sangre	10
3.4.2	Amplificación y visualización del gen de la kappa caseína (PCR)	11
3.4.3	Determinación de los genotipos del gen de la kappa caseína por PCR-FRLP	12
3.4.4	Diseño experimental	12
3.4.5	Análisis estadístico	12
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1	Identificación molecular del gen de la kappa caseína	13
4.2	Distribución de la frecuencia de los genotipos de kappa caseína	15
V.	CONCLUSIONES	18
V.	RECOMENDACIÓN	19
VI	LITERATURA CITADA	20
VIII	ANEXOS	25

Dedicatoria

A DIOS primeramente por darme la vida, sabiduría, perseverancia y fuerza de voluntad para alcanzar otra de mis metas en mi vida personal y profesional, también porque nunca me faltó cuando más lo necesite para darme fortaleza espiritual en mis momentos difíciles por los que he atravesado durante todos estos años de mi vida.

A mis PADRES Fidelina del Socorro Flores (q.e.p.d) y José Alfredo López Dávila (q.e.p.d) por haberme educado con sus ejemplos y valores que siempre estarán en mí hasta el último día de mi vida y por apoyarme cuando estaban en vida en cada una de mis metas y retos que yo me proponía.

A mi FAMILIA, en especial a mi esposa por su magnífica devoción a la familia y por ser tolerante y paciente conmigo en los momentos que me encontraba estudiando mi maestría y por cuidar y educar a nuestros hijos para hacer de ellos personas de bien a la sociedad nicaragüense.

D.M.V. Julio López Flores

AGRADECIMIENTOS

A *DIOS* por haberme permitido culminar mis estudios de maestría y así poder emprender nuevos retos en mi vida y continuar con mi digna labor de educar y formar a los futuros profesionales de las Ciencias Agrarias.

A mis *ASESORES* Roldán Corrales Briceño. PhD y René Silva. PhD. a quienes admiro y respeto mucho por ser buenos ejemplos de profesional, quienes a pesar de todas las vicisitudes que presenté durante el inicio y culminación de mi investigación siempre estuvieron anuentes a apoyarme, dedicándome el tiempo necesario para culminar con un buen trabajo de graduación de mi grado de Maestría.

A mi *AMIGO* y *COLEGA* Ing. Pasteur Parrales García por su noble apoyo y ayuda en el procesamiento estadístico de los resultados obtenidos en esta investigación.

A mi *AMIGO* y *COLEGA* Dr. Oscar De La Rosa. MSc. PhD, por su noble e incondicional apoyo que recibí durante mi estancia en el INIA, de la hermana República de Venezuela, en mi capacitación de Biología molecular, la cual fue de mucha importancia para mi formación profesional. También al personal que labora en dicho laboratorio que de una u otra forma me ayudaron de manera incondicional.

A mi *AMIGO* y *COLEGA* Lic. Isaías Sánchez. MSc. por su noble e incondicional apoyo que recibí de él en la fase laboratorial de mi investigación, adquiriendo las herramientas básicas en el procesamiento de las muestras para la obtención y tipificación del ADN de los sementales seleccionados para esta investigación. Asimismo agradezco al Ing. Eliezer Lanuza por apoyarme de manera incondicional en el área de laboratorio.

A todos los *CATEDRÁTICOS* de las diferentes universidades pertenecientes al C.N.U que estuvieron involucrados directa e indirectamente en esta Maestría Interinstitucional, los cuales aportaron sus conocimientos y vasta experiencia académica y profesional en la formación de los futuros profesionales en el área de la Biotecnología. Aportando así al desarrollo científico técnico de nuestro país.

A mis *COLEGAS DE CLASE*, quienes algunos se convirtieron en amigos incondicionales, compartiendo también su experiencia y conocimientos en las áreas de formación que eran graduados y que siempre estuvimos unidos en los buenos y malos momentos que pasamos durante el inicio y desarrollo de estos estudios de maestría.

D.M.V. Julio López Flores

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de los sementales en el estudio	16
2. Distribución del genotipo CSN3 y frecuencia de los alelos en las diferentes razas de sementales y cruces de estas encontradas en el estudio	17

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Mapa de las comunidades seleccionadas para el estudio	5
2. Semental de la Raza Holstein	6
3. Semental de la Raza Pardo suizo	7
4. Semental de la Raza Brahman gris	8
5. Semental con encaste Pardo suizo con Brahman	10
6. Semental con encaste Pardo suizo con Holstein	10
7. Semental con encaste Brahman con Gyr	11
8. Integridad del ADN de las muestras obtenidas	14
9. Bandas generadas en gel de agarosa al 1.5% a partir de la digestión con la enzima Hinf I donde se muestran los patrones de restricción a 351 pb	15

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Preparación de los materiales para la toma de muestras	26
2. Toma de muestras de sangre	26
3. Extracción del ADN	26
4. Centrifugación de las muestras de sangre	27
5. Muestras puestas en baño de María	27
6. Aplicación de solución de lavado	28
7. Cambio del microtubo de la muestra	28
8. Evaluación de la calidad del ADN	28
9. Identificación de las variantes alélicas del gen de κ caseína	29
10. Distribución del genotipo CSN3 y frecuencia de los alelos en los sementales de la raza Holstein	29
11. Distribución del genotipo del gen CSN3 y frecuencia de los alelos en los sementales Pardo suizo	29
12. Distribución del genotipo del gen CSN3 y frecuencia de los alelos en sementales Pardo suizo con braman	30
13. Distribución del genotipo del gen CSN3 y frecuencia de los alelos en sementales de la raza Brahman gris	30
14. Distribución del genotipo del gen CSN3 y frecuencia de los alelos en sementales Pardo suizo con Holstein	30
15. Distribución del genotipo del gen CSN3 y frecuencia de los alelos en sementales con el cruce de Brahman con Gyr	31
16. Datos de las muestras recolectadas para el estudio	31
17. Datos de las muestras recolectadas para el estudio	32

RESUMEN

La presente investigación se realizó en las fincas de pequeños y medianos productores del Municipio de Camoapa. El objetivo principal fue identificar los sementales bovinos portadores del gen κ - caseína con fines de mejora genética. Se recolectaron un total de cincuenta muestras de sangre, conservadas en un tubo vacutainer que contenía EDTA. A partir del material genético extraído utilizando un kit comercial QIAGEN, las muestras de ADN fueron amplificadas utilizando los cebadores BLKC-For 5'-ATT AGC CCA TTT CGC CTT CT-3' y BLKC-Rev 5'-ATT TAT GGC CAT TCC ACC AA-3' amplificando fragmentos de 351 pb mediante la utilización de la técnica de PCR. Para la genotipificación de los alelos A y B del gen de CAS κ se utilizó la enzima de restricción *Hinf I*, la cual cortó el producto PCR en dos fragmentos 261/89 pb para el genotipo homocigótico recesivo BB, en tres fragmentos de 131/131/89 pb para el genotipo homocigótico dominante AA y para el genotipo heterocigoto AB, es una combinación de ambos alelos A y B lo cual fue cortada en cuatro fragmentos 262/131/131/89 pb. Las frecuencias genotípicas obtenidas del gen CAS κ de los sementales fueron de 0.60, 0.02 y 0.38 para los homocigotos AA y BB, y para el heterocigoto AB. Las frecuencias alélicas fueron 0.79 y 0.21 para el alelo A y B. Finalmente el cálculo de la extensión de la Prueba Exacta de Fisher se obtuvo una probabilidad de $P_a=0.000052$ dando altamente significativo con un nivel de significancia del 0.05, lo que significa que la población muestreada no se encuentra en Equilibrio Hardy Weinberg.

Palabras claves: Kappa caseína, PCR-RFLP, Frecuencias genotípicas y frecuencias alélicas

ABSTRACT

This research was carried out on the small and scale farms of the Municipality of Camoapa. The main objective was to identify bovine sire bearing the κ -casein gene for genetic improvement purposes. A total of fifty samples of blood, collected in a vacutainer tube containing EDTA, were collected. From the genetic material extracted using a commercial QIAGEN kit, the DNA samples were amplified using the primers BLKC-For 5'-ATT AGC CCA TTT CGC CTT CT-3 'and BLKC-Rev 5'-ATT TAT GAT CAT CAT ACC AA-3 'amplifying 351 bp fragments using the PCR technique. For the genotyping of the A and B alleles of the CAS κ gene, the restriction enzyme Hinf I was used, which cut the PCR product into two 261/89 bp fragments for the BB genotype in three fragments of 131/131/89 bp For the AA genotype and for the heterozygous AB genotype, is a combination of both A and B alleles, which was cut into four 262/131/131/89 bp fragments. The genotypic frequencies obtained from the CAS κ gene of the sire were 0.60, 0.02 and 0.38 for the homozygous AA and BB, and for the heterozygote AB. Allele frequencies were 0.79 and 0.21 for allele A and B. Finally the calculation of the Exact Fisher's Extent Test yielded a probability of $P_a = 0.000052$ giving highly significant with a significance level of 0.05, which means that the sampled population is not found in Hardy Weinberg equilibrium.

Key words: Kappa casein, PCR-RFLP, Genotypic frequencies and Allelic frequencies

I. INTRODUCCIÓN

En Nicaragua la actividad pecuaria contribuye con el 10% a la generación del PIB nacional, con una población de 4.1 millones de cabeza de ganado. La producción anual de leche del 2012 fue de 216 millones de galones, de esta cantidad 10 millones de galones de leche fueron pasteurizados y el resto convertidos en cuajada, queso y leche agria entre otros derivados, convirtiendo a Nicaragua en el principal país centro americano exportador de queso (MAGFOR, 2012).

La producción de leche en Nicaragua procede de los sistemas de producción de doble propósito (leche y carne), con genotipos indefinidos procedentes del cruce de *Bos Taurus* (Pardo suizo, Holstein y Jersey, mayormente) con *Bos indicus* (Brahman, Indubrasil y Nellore) que integran los hatos con una gran heterogeneidad y baja productividad 3.5 L/vaca/día, por el bajo valor genético de los animales (FAO, 2001).

La leche es un fluido biológico complejo, cuya función es asegurar el desarrollo adecuado de los mamíferos en su primera etapa de vida. Para que la leche sea asimilada correctamente por la cría de los bovinos se coagula en el abomaso del becerro por la acción de enzimas proteolíticas como la pepsina y la quimosina, siendo este fenómeno la base de la producción del queso (Alexander *et al.*, 1988).

Las proteínas lácteas están divididas en la fracción soluble como: la α -lactoalbúmina (α -La) y la β -lactoglobulina (β -Lg); y en la fracción insoluble: la α -s1 caseína (α s1-Cn), la α -s2 caseína (α s2-Cn), la β -caseína (β -Cn) y la κ -caseína (κ -CN) (Abdel *et al.*, 2009; López y Vásquez, 2004). La κ -CN es de gran interés para la industria láctea ya que define la formación del cuajo para la elaboración de los derivados lácteos, trayendo consigo un importante rendimiento quesero debido a su participación en la estabilización de la formación de micelas, previniendo la precipitación de las caseínas de la leche. En bovinos de razas lecheras europeas (*Bos taurus*) se han descrito dos variantes alélicas del gen *CAS κ* , A y B (Requena y Agüera, 2007).

Los alelos AA para kappa caseína están relacionados con una mayor producción de leche, que la tipo BB, mientras que el heterocigoto AB muestra una producción media (Alvarado *et a.*, 2006).

Por otro lado, los productores señalan que la producción y productividad de sus hatos es baja debido a la baja calidad y/o composición racial de los sementales, mayormente genotipos indefinidos y sin evaluación genética, usados en monta natural. Lo anterior sugiere que la calidad y composición de la leche esta posiblemente asociada a la naturaleza desconocida de estos sementales en rasgos relacionados con los contenidos de proteína en leche, los cuales están determinados por algunas variantes alélicas de genes de la kappa caseína (López, 1998).

Debido a esto se hace necesario buscar nuevas alternativas de razas lecheras que mejoren la calidad y productividad del queso a través de la selección de los sementales que brindan el servicio de monta natural, determinando en qué frecuencia se encuentran los genotipos de la kappa caseínas que favorecen el rendimiento en queso.

Por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del gen de kappa caseína en bovino de doble propósito con fines de mejoramiento genéticos, que permitan una adecuada selección de estos genotipos, trayendo consigo un incremento en la calidad y rendimiento quesero.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar las frecuencias genotípicas y alélicas del gen de la kappa caseína en los sementales bovinos doble propósito, con fines de la mejora genética, en finca de pequeños y medianos productores en el municipio de Camoapa, departamento de Boaco

Objetivos específicos

- Identificar el genotipo de los sementales bovinos doble propósito con alelos favorables para el gen kappa caseína, haciendo uso de la técnica PCR-RFLP
- Calcular las frecuencias alélicas y genotípicas del gen de la kappa caseína, de los sementales bovinos doble propósito en estudio
- Precisar si la proporción de la población de sementales bovinos doble propósito muestreada se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg para el gen de la kappa caseína

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del área de estudio

El estudio de los 50 sementales seleccionados en esta investigación se llevó a cabo en las fincas de pequeños y medianos productores del municipio de Camoapa, perteneciente al departamento de Boaco, se localiza entre los 12°03'40" y los 12°47'00" de latitud y entre los 84°52'20" y los 85°59'12" de longitud, además se encuentra a 520 msnm aproximadamente. (INETER, 2017).

Este municipio limita al norte con los municipios de Boaco y Matiguas, al oeste con los municipios de Boaco y San Lorenzo, al sur y al este con los municipios de Cuapa y Santo Domingo del departamento de Chontales. Las comunidades seleccionadas para esta investigación se muestran en la figura número uno (Ver fig.1).

El procesamiento de las muestras para su análisis se realizó en los Laboratorios del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, perteneciente al INTA (CNIA) y el de Microbiología de la Universidad Nacional Agraria, ubicada en el km 12 ½ de la carretera norte Managua, en las coordenadas 12°08' de latitud norte y 86°09' de longitud oeste.



Figura 1. Mapa de las comunidades seleccionadas para el estudio

3.1.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio de esta investigación es prospectivo, transversal y según el análisis y alcance de los resultados es tipo descriptivo.

3.2 Razas de sementales y cruces de estas muestreadas para estudio

3.2.1 Raza Holstein

La raza de ganado Holstein se originó en dos provincias septentrionales de Holanda: Frisia Occidental y País Bajo del Norte (North Holland). Poco se sabe de su más remoto origen, pero no hay duda de que fue Holanda el núcleo del cual se diseminó esta raza que, sin objeciones, es la más formidable lechera de la historia.



Figura 2. Semental de la Raza Holstein perteneciente a la finca El Milagro

3.2.2 Características generales de la raza Holstein

Color blanco con manchas negras o pueden ser negras con manchas blancas. Poco resistentes a las condiciones del trópico seco de Nicaragua. Llegan a producir hasta 22 litros de leche al día en 2 ordeñadas; su leche es baja en grasa y alcanza apenas de 3.2 a 3.5% y con un porcentaje de proteína de 3.08. Al nacer, los becerros pesan entre 38 y 42 kg; las becerras entre 34 y 38 kg. La raza Holstein es la mejor productora de las razas lecheras, por su amplia capacidad abdominal consume grandes cantidades de alimentos y agua, sus crías son igual de exigentes y cuando no

se les suministra los nutrientes adecuados tienen la tendencia a desmejorar su condición física de forma acelerada (Román y Wilcox, 1978) (Ver figura 2).

3.2.3 Raza Pardo suizo

Su origen queda confinado a lo que es la parte media oriental del país Helvético. La raza Pardo Suiza es famosa en todo el mundo y es la segunda raza por su rendimiento lechero. En Suiza compete con la Simmental en el suministro de leche y carne para el pequeño mercado suizo.



Figura 3. Semental de la Raza Pardo suizo, perteneciente a la finca San Francisco

3.2.4 Características de la raza Pardo suizo

Características: Ojos saltones, excelentes productoras de leche, color café claro a café oscuro, posee el famoso Lomo de candela, excelente para pastoreo, produce hasta 15-16 litros al día. Se establece bien en temperaturas entre los 28 y 36 grados, con sombra abundante (Bustamante, 2004).

La raza Pardo Suizo moderna se caracteriza entre otras cosas por su talla mediana; su capa es de un sólo color "café-gris" el cual varía en tono aunque se prefieren las sombras oscuras; las áreas de un color más claro se localizan en los ojos, hocico, orejas y en las partes bajas de las

patas. El pelo es corto, fino y suave; la piel pigmentada; muestra negro en la parte expuesta como en el hocico. Los cuernos son blancos con puntas negras, medios o pequeños, dirigidos hacia afuera y arriba, encorvándose en las puntas. La cabeza es ancha y moderadamente larga. La espalda es amplia y la línea dorsal recta. El pecho es profundo con costillas bien arqueadas, y los desarrollados cuartos traseros son carnosos (Ver figura 3).

Peso: Los animales adultos son fuertes y de buen peso, las vacas pueden pesar de 600 a 700 kg, y de 950 a 1 000 kg los toros, pero hay ejemplares de ambos sexos con más peso. Por lo que respecta a su rendimiento lechero la raza suiza es la segunda del mundo. El promedio actual de la estirpe americana es de 7,200 kg ajustado a edad adulta con 4% de grasa y 3.51% de proteína (Bustamante, 2004).

3.2.5 Raza Brahman gris

La raza de ganado Brahman tiene su origen en el ganado cebú llevado originariamente a los Estados Unidos de América proveniente de la India. Se ha cruzado extensivamente con *Bos taurus*, el ganado europeo.



Figura 4. Semental de la Raza Brahman gris, perteneciente a la finca Lucitania

3.2.6 Características de la raza Brahman gris

El Brahman se caracteriza por una joroba en su lomo y por sus orejas blandas largas. Los colores más comunes son blancos, grises y rojos. El Brahman posee una capacidad notable de

adaptación y supervivencia. Puede alimentarse con pastos inadecuados y es muy resistente a pestes de insectos, parásitos, enfermedades y a climas extremos.

El cuello es corto y grueso con papada desarrollada. Los cuernos son cortos medianamente gruesos, dirigidos hacia atrás y afuera; la giba es arriñonada mediana bien implantada, dirigida hacia atrás apoyándose en el dorso. Las costillas son arqueadas, el vientre voluminoso denotando una gran capacidad corporal (Ver figura 4).

El tronco es cilíndrico con caderas amplias y musculosas, ancas ligeramente inclinadas y su inserción con la cola es alta y fina. El patrón de peso establecido para el animal macho adulto es de 800 a 1000 kg.

3.3 Ganado doble propósito

El ganado doble propósito, en Nicaragua es predominante, por ser apto al clima del país. Se conoce como doble propósito a los bovinos que son producto de cruces de razas especializadas para carne y razas lecheras, en donde la raza de carne le da la resistencia a fin que estas vacas puedan sobrevivir, producir y reproducirse en condiciones más adversas. (Mendieta, 2007).

La ganadería nicaragüense prácticamente se encuentra en manos de pequeños y medianos productores y en la actualidad el 85% de la explotación bovina es de doble propósito (MAGFOR, 2010).

Para ganadería de doble propósito el brahmán es recomendable que sea cruzado con vacas lecheras, principalmente con el pardo suizo, Holstein entre otros encastes. Los cruces encontrados en esta investigación fueron: Pardo suizo con Brahman, Pardo suizo con Holstein y Brahman con Gyr (Ver figuras 5,6 y 7).

3.3.1 Pardo suizo con Brahman



Figura 5. Semental con encaste Pardo suizo con Brahman, perteneciente a la finca San Pedro

3.3.2 Pardo suizo con Holstein



Figura 6. Semental con encaste Pardo suizo con Holstein, perteneciente a la finca San José

3.3.3 Brahman con Gyr



Figura 7. Semental con encaste Brahman con Gyr, perteneciente a la finca San Antonio

3.4 Toma de muestra sanguínea

Las muestras de sangre fueron tomadas individualmente de cada semental y se extrajo una muestra de sangre de la vena coccígea previa desinfección del área hasta obtener la cantidad de 5 ml a las que se le agregó EDTA (10.8 mg) para luego ser preservadas en un termo con hielo a 8 °C en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Agraria (anexos 16 y 17).

3.4.1 Extracción del ADN de las muestras de sangre

Para la extracción del ADN se utilizó el kit de extracción QIAGEN, tomando 200 µL de sangre entera y se le agregó 200 µL buffer de unión más 40 µL de Proteinquinasa K2. Se agitó la muestra y se incubó a 70 °C durante 10 minutos. Posterior a la incubación se adicionaron 100 µL de isopropanol se agitó en vortex y la solución se depositó en tubos de 600 µL y se centrifugó por un minuto a 8000 rpm. Después de centrifugada se le agregó 500 µL de tampón de eliminación de inhibidores y se centrifugó nuevamente por un minuto a 8000 rpm.

Seguidamente se descartó el tubo y se depositó en otro tubo al cual se le agregó 500 μL de tampón de lavado se centrifugó por un minuto a 8000 rpm (este procedimiento se realizó dos veces). Se centrifugó nuevamente la solución durante 15 segundos a 13000 rpm. Se descartó el tubo nuevamente y la solución se depositó en los tubos para PCR. A esta última solución que se encontraba en los tubos para PCR, se le agregó 200 μL de tampón de elución y se puso en baño de María por un minuto a 70 $^{\circ}\text{C}$. Pasado este tiempo se centrifugó por un minuto a 8000 rpm. El ADN purificado extraído de cada una de las muestras se mantuvo a una temperatura de -20 $^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

La calidad de ADN se evaluó en geles de agarosa al 2% en TBE 0.5X (0.045 M tris-borato, 0.001 M EDTA, pH 8.0) y se hizo la tinción con 4 μL de Gel Red en 50 ml de gel de agarosa. Se utilizaron 8 μL de producto PCR con 2 μL de buffer de carga. Las muestras se corrieron a 90 Voltios durante una hora y 45 minutos, usando una cámara de electroforesis horizontal, modelo OWI. Los geles se fotografiaron bajo luz ultravioleta usando una cámara digital (Sony). Para la cuantificación de ADN se realizó mediante el equipo Nano Droop modelo, NANODROP 2000.

3.4.2 Amplificación y visualización del gen de la kappa caseína (PCR)

Para amplificar el gen de la kappa caseína se utilizó el par de cebadores BLKC-For 5'-ATT AGC CCA TTT CGC CTT CT- 3' y BLKC-Rev 5'-ATT TAT GGC CAT TCC ACC AA- 3' amplificando fragmentos de 351 pb. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 μL que contenía 2 μL de ADN, 2 μL de cada cebador, 12,5 μL de master mix (PROMEGA) y 6.5 μL de agua libre de nucleasas. El desarrollo de la PCR se realizó en un termociclador Eppendorf bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos, 35 ciclos a 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 45 segundos, 52.4 $^{\circ}\text{C}$ por 45 segundos, 72 $^{\circ}\text{C}$ durante un minuto y extensión final 72 $^{\circ}\text{C}$ por 7 minutos y se refrigeró a 4 $^{\circ}\text{C}$ por varias horas. Para visualizar los fragmentos se colocaron 8 μL del producto PCR con 2 μL del colorante de carga 6X en un gel de agarosa al 1% teñido con Gel red. El gel se colocó en una cámara de electroforesis horizontal con tampón TBE al 1X. La electroforesis se llevó a cabo por un período de 45 minutos a 90 voltios y luego se visualizó en el trans iluminador, modelo BENCHZUP 2UV, registrándose los resultados fotográficamente.

3.4.3 Determinación de los genotipos del gen kappa caseína por PCR- RFLP

El producto de PCR fue digerido con la enzima de restricción *Hinf I*. El procedimiento consistió en adicionar 8 μ L del producto PCR y 2 μ L de la enzima de restricción. Posteriormente se incubo a 37 °C durante una hora, Después de la incubación se procedió a realizar la separación de los fragmento en un gel de agarosa al 1.5% en solución de Tris-Borato-EDTA (TBE) buffer 0.5X (0.75 g de agarosa en 50 ml de TBE 0.5X).

3.4.4 Diseño experimental

Se realizó un muestreo no probabilístico por selección intencionada de las fincas donde estaban los sementales en monta natural y en edad reproductiva, hasta muestrear un total de 50 sementales. Donde se propusieron los siguientes parámetros de inclusión:

- ✓ Toros en edad reproductiva (3-7 años de edad)
- ✓ Clínicamente sanos: No hay alteración de la traída clínica
- ✓ Sementales en monta natural.
- ✓ Que estén libres de brucelosis y tuberculosis

3.4.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, mediante el procedimiento frecuencia de SAS, se calcularon las frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas de los resultados obtenidos, utilizando también las fórmulas planteadas por Falconer y Mackey, (2001), para el cálculo de ambas frecuencias. Para determinar si la población se encontraba en equilibrio Hardy Weinberg, se calculó la extensión de la Prueba Exacta de Fisher de 2x3 columnas, con probabilidades iguales o menores que 0.05.

Frecuencia genotípica $P + H + Q = 1$

Frecuencia alélica $p = P + 1/2H$

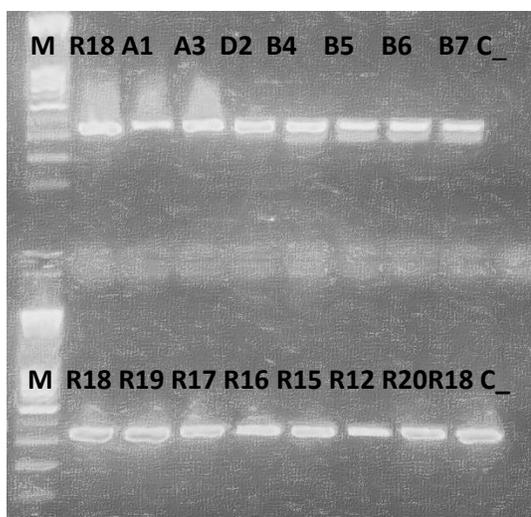
Frecuencia alélica $q = Q + 1/2H$

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Patrones de restricción a 351 pb

La figura ocho muestra la integridad del ADN de las muestras obtenidas y los patrones de restricción amplificados a 351 pb, utilizando un gel de agarosa al 1.5% donde M es el marcador de peso molecular alto DNA λ . Todas las muestras presentaron buena calidad del ADN genómico obtenido lo cual significa que estaban aptas para ser digeridas por la enzima de restricción *Hinf I*.

Figura 8. Integridad del ADN de las muestras obtenidas



4.2 Identificación molecular del gen de kappa caseína

En la figura número nueve se muestran los patrones de restricción a 351 pb, donde fueron amplificados los fragmentos del gen kappa caseína en los sementales muestreados, utilizando cebadores específicos. Después de la amplificación con PCR, se usó la enzima de restricción *Hinf I* y un gel de agarosa al 1.5% para correr la electroforesis horizontal, observándose los siguientes resultados:

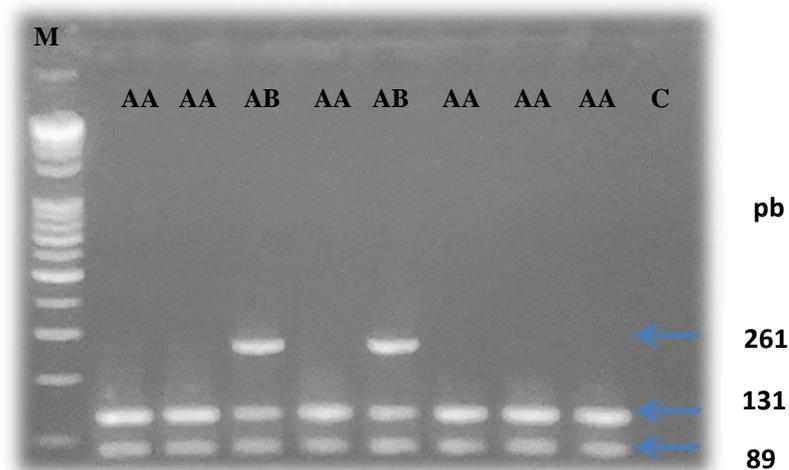


Figura 9. Bandas generadas en gel de agarosa al 1.5% a partir de la digestión de la enzima *Hinf I* donde se muestran los patrones de restricción de 351 pb de los genotipos, AA, AB y BB del gen de kappa caseína. La enzima de restricción cortó el producto PCR en dos fragmentos 261/89 pb para el genotipo homocigótico BB, en tres fragmentos de 131/131/89 pb para el genotipo homocigótico AA y para el genotipo heterocigoto AB, es una combinación de ambos alelos A y B lo cual la enzima de restricción lo cortó el producto PCR en cuatro fragmentos 261/131/131/89 pb.

De los cincuenta sementales bajo estudio en esta investigación, se encontraron 30 individuos homocigóticos (AA), 19 individuos heterocigóticos (AB) y un individuo homocigótico (BB). Estos resultados son similares a los encontrados por Naranjo *et al.*, (2007) los cuales encontraron 17 individuos homocigóticos AA, 15 individuos heterocigóticos AB y 4 individuos homocigóticos BB. Así mismo Cortés López *et al.*, (2012) encontró 37 individuos homocigóticos dominantes (AA), 70 heterocigóticos (AB) y 1 individuo homocigótico recesivo (BB).

El genotipo BB del gen de Kappa caseína estudiada en bovinos, presenta un contenido proteico más alto, posee mayor estabilidad al calor y a la congelación, menor tiempo de coagulación y un cuajo más consistente, trayendo consigo un rendimiento quesero entre el 5 y el 10%. (Requena y Agüera, 2007; Uffo *et al.*, 2006; Benavides; 2003, Barroso *et al.*, 1998; Horne y Muir, 1994)

De acuerdo con Heck *et al.*, (2009) el genotipo homocigótico BB, ha mostrado ser superior en porcentaje de grasa y proteínas. En cambio el genotipo heterocigótico AB es mejor para las características de producción láctea sugiriendo un efecto de heterosis.

Según López, (1998) la variante B del gen de kappa caseína está asociada al porcentaje de proteína total de la leche e influye significativamente en el tiempo de coagulación del cuajo, la firmeza y el rendimiento quesero, mostrando valores superiores en la leche de vacas con el genotipo BB en relación con los genotipos AA.

La mayor frecuencia del alelo A ha sido una característica común en la mayoría de las poblaciones de ganado productor de leche que se ha estudiado (Osta, 1994; Zardowny y Kühnlein, 1990), específicamente en la raza Holstein, donde el alelo A es más frecuente (Viana *et al.*, 2001; Bonvillani *et al.*, 2000). En la investigación de un total de 50 sementales muestreados 15 sementales pertenecientes a la raza Holstein mostraron el alelo A.

En diferentes estudios de caracterización de razas bovinas se ha observado que el alelo B presenta mayores frecuencias en razas *Bos taurus* en comparación con razas *Bos indicus* (Golijow *et al.*, 1999; Kemenes *et al.*, 1999; Tambasco, 1998; Del Lama y Zago, 1996; 2002, Backer y Manwell, 1980).

4.2.1 Distribución de frecuencia de los genotipos de kappa caseína

En el Cuadro número 1 se muestran las frecuencias de los alelos A y B fueron 0.79 y 0.21 y para los genotipos AA, AB y BB fueron 0.6, 0.38 y 0.02 respectivamente (Cuadro 1). La frecuencia del alelo B del gen de CSN3 en diferentes razas de sementales varía en un rango que va desde 0.06 a 0.057 (Medrano, 1990; Cowan *et al.*, 1992; Ron *et al.*, 1994; Golijow *et al.*, 1999; Tsiaras *et al.*, 2005 y Sulimova *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas y esperadas de los sementales en estudio

Observado			Esperado (p^2 $2pq$ q^2)			
Genotipo	N° de Individuos	Frecuencias Genotípicas	N° de individuos	Frecuencias Genotípicas	Alelos	Frecuencia Alélica
AA	30	0.6	31.205	0.624	A	A(0.79)
AB	19	0.38	16.59	0.332	B	B (0.21)
BB	01	0.02	2.205	0.044		

Heterocigosidad 0.38

Estos resultados son similares a los obtenidos por Cortés López *et al.* (2012) quienes trabajaron con bovinos de doble propósito, encontrando una frecuencia genotípica de 0.34, 0.01 y 0.65 para los genotipos AA, BB y AB, respectivamente. Asimismo resultados parecidos encontraron Fámula y Medrano (1994); Medrano y Aguilar (1990) y Ng-Kwai-Hang *et al.* (1986) trabajando con ganado lechero colombiano.

El aumento de la frecuencia alélica de la variante B de Kappa caseína es una de las alternativas para mejorar el rendimiento en queso. Para una determinada raza que presente una frecuencia alélica de 0.25 para el alelo B, es posible incrementar la frecuencia alélica si se utilizaran sementales con el genotipo BB. La frecuencia de este alelo ascendería al 60% en la primera generación (Prinzenberg *et al.*, 1996).

El índice de heterocigosidad encontrada en esta investigación (0.38) indica que la muestra en este estudio es heterogénea debido a la mezclas de razas que existen en nuestro país. Este resultado es similar a los encontrado por Cervantes *et al.*, (2007) los cuales obtuvieron un índice de heterocigosidad de 0.6481.

En esta investigación predominó el alelo A sobre el B, 0.79 y 0.21 y aunque solo un individuo presentó el alelo BB, también los animales que resultaron heterocigotos (AB) poseen la variante alélica dado estos resultados, es posible que la calidad de la leche tenga un mayor contenido de sólidos totales, incluyendo proteína, en comparación con los individuos que presentaron la variante alélica A (Cortes López, 2012).

Los resultados obtenidos del cuadro número 2, son similares a los obtenidos por Viana *et al.*, (2001), quienes encontraron una frecuencia de los alelos A y B de 0.90 y 0.10 en la raza Holstein; Cervantes *et al.*, (2007) encontraron una frecuencia de los alelos A y B en la raza Pardo Suizo de 0.43 y 0.57 y en la raza Jersey encontraron una frecuencia para los alelos A y B de 0.23 y 0.77 (Grosclaude, 1998; Van Eenennaam y Medrano, 1991; McLean *et al.*, 1984).

Cuadro 2. Distribución del genotipo CSN3 y frecuencia de los alelos en las diferentes razas de sementales y cruces de estas encontradas en el estudio

Raza y cruces	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica		
	Indiv	AA	AB	BB	A	B
Holstein	15	0.67	0.33	0	0.83	0.17
Pardo suizo	11	0.36	0.55	0.09	0.64	0.36
Brahman gris	6	0.50	0.50	0	0.75	0.25
Pardo suizo con Braman	10	0.70	0.30	0	0.85	0.15
Pardo suizo con Holstein	3	0.67	0.33	0	0.83	0.17
Brahman con Gyr	4	0.75	0.25	0	0.87	0.13

Los resultados de las frecuencias alélicas de la raza Brahman encontrados en esta investigación son muy similares a los resultados encontrados por Cervantes *et al.*, (2007) los cuales determinaron una frecuencia alélica de 0.74 y 0.26 para los alelos A y B respectivamente. Otros resultados encontrados en la raza Gyr por Kemenes *et al.*, (1999) obtuvo una frecuencia alélica de 0.93 y 0.07.

Para el alelo A en esta investigación se encontraron frecuencias alélicas promedias elevadas, en las razas con encaste cebuino (0.82), estas frecuencias son similares a las reportadas por Biase *et al.*, (2005), en Brasil con valores promedios elevados para el alelo A de kappa caseína (0.82) en una población cebuina.

Finalmente el cálculo de la extensión de la Prueba Exacta de Fisher se obtuvo una probabilidad de $P_a=0.000052$ dando altamente significativo con un nivel de significancia del 0.05, lo que significa que la población muestreada no se encuentra en Equilibrio Hardy Weinberg.

V. CONCLUSIONES

- ✓ El genotipo de mayor rendimiento queso BB es poco frecuente, se registró un caso perteneciente a la raza Pardo suizo entre los 50 sementales muestreados.
- ✓ Predominó el alelo A sobre el alelo B. El alelo A está presente en un 79%, y el alelo B en un 21% de los gametos de esta población muestreada.
- ✓ La frecuencia de genotipos homocigotos (BB) y genotipos heterocigotos (AB), resultaron bajas. En el primer caso y relativamente alta en el segundo caso, con valores de 0.02 y 0.60, respectivamente. Posibilitando realizar mejoras genéticas, seleccionando sementales según el alelo B y posteriormente ir descartando hembras homocigóticas para el alelo A.
- ✓ A pesar de la baja frecuencia alélica y genotípica, estos sementales son promisorios para programas de selección., ya que en el primer caso el alelo se heredaría en un 100% y en el caso de los heterocigotos en un 50%, considerando hatos con hembras con genotipo BB, y con genotipo AB, la frecuencia del alelo B incrementaría más rápidamente.
- ✓ La proporción de la población muestreada en esta investigación no se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg.

VI. RECOMENDACIONES

- ✓ Llevar a cabo una mejora genética del ganado existente en la zona, utilizando a los sementales heterocigóticos AB encontrados en esta investigación a través del retrocruzamiento.

- ✓ Determinar los genotipos de los sementales en estudio para la proteína de Lactoglobulina y así realizar un mejoramiento genético integral en cuanto a la determinación de ambas proteínas.

- ✓ Muestrear a los terneros y terneras descendientes de estos sementales para determinar en qué proporción se encuentran los alelos A y B y los genotipos AA, AB y BB para el gen de la kappa-caseína.

VII. LITERATURA CITADA

- Abdel Dayem AMH, Mahmoud KGM, Nawito MF, Ayoub MM, Darwish SF. 2009. Genotyping of kappa-casein gene in Egyptian buffalo bulls. *Livestock Science*. 122(2-3):286-289.
- Alvarado C, Meléndez B, Clavijo M, Coronado M, Armas S, Gimenez O. 2006. Efecto de la Variante Genética de la k-Caseína sobre la Producción y Composición de la Leche de un Rebaño Holstein en el Trópico *Rev Fac Cienc Vet*. 2006; 47(1).
- Alexander, L. J., A. F. Stewart, A. G. Mackinlay, T. V. Kapelinskaya, T. M. Tkacit and S. I. Gorodetsky. 1988. Isolation and characterization of the bovine k-casein gene. *Eur. J. Biochem*. 178: 395-401.
- Barker, A.C.M., Manwell, C. 1980. Chemical classification of cattle. I breed groups. *Animal Blood Groups Biochemistry Genetic*. 11:127-150.
- Barroso, A; Dunner, S; Cañón, J. 1998. Technical note: Detection of Bovine Kappa-casein variants A, B, C, y E by Means of Polymerase Chain Reaction-single strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). *J. Anim. Sci*. 76:1535-1538.
- Biase, H.F.; Del Garnero, V.A.; Becerra, A.F.L.; Rosa, J.M.A.; Lôbo, B.R. y Martelli, M. 2005: Analysis of restriction fragment length polymorphism in the kappa-casein gene related to weight expected progeny difference in Nellore cattle. *Gen. Mol. Biol*. 28(1): 84-87.
- 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 Pregrado Ing Alimentos. Valdivia Chile.
- Bonvillani, A.G.; Di Renzo, M.A.; Tiranti, I.N. 2000. Genetic polymorphism of milk protein loci in Argentinian Holstein cattle. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4, 819-823.
- Bustamante de Jesús Guerrero. 2004. Razas y mejoramiento bovinos de doble propósito. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Tepic, Nayarit, México.
- Cervantes, P., M. Luna, M. Hernández, F. Pérez-Gil, P. Ponce y O. Uffo. 2007. Polimorfismo genético del *locus* de la kappa-caseína, en vacas de diferentes razas y cruces en el trópico mexicano. *Rev. Salud Anim*. 29 (2): 78-84.
- Cortés-López, N.G, S. del Moral., José A. Rueda., C. Luna-Palomera., Meza-Herrera. C.A. y Abad-Zavaleta. J. 2012. Allelic and genotypic frequency of kappa casein gene in double purpose cattle. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15 (2012): 47-55.

- Cowan, C. M., M.R. Dentone y T. Coyle. 1992. Chromosome substitution effect associated with β casein and κ lactoglobulin in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.*, 75:1097_1104.
- Del Lama S.N y Zago M.A. 2002. Identification of kappa casein and beta lactoglobulin genotype in Brazilian *Bos indicus* and *Bubalus bubalis* population. *Braz J. Genet.* 19:73_77.
- Del Lama, S.N., Zago, M.A. 1996. Identification of κ -casein and β -lactoglobulin genotypes in Brazilian *Bos indicus* and *Bubalus bubalis* population. *Brazilian Journal of Genetics.* 19:73-77.
- Falconer, D. S. y Mackay, T. F. C.2001.Introducción a la genética cuántica. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España.
- Fámula, T. y J.F. Medrano. 1994. Estimation of genotype effects for milk proteins with animal and sire transmitting ability models. *J. Dairy Sci.* 77.3153-62.
- FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2001. Informe sobre el estado de los recursos zoogenéticos de Nicaragua. Consultado en línea el martes 15 de octubre 2013. Disponible en [www://ftp.fao.org/DOCREP/FAO/010/a1250e/annexe/Nicaragua.pdf](http://ftp.fao.org/DOCREP/FAO/010/a1250e/annexe/Nicaragua.pdf).
- Golijow, C. D., Giovambattista G., Ripoli M.V., Dulout F.N y Lojo M.M. 1999. Genetic variability and population structure in *loci* related to milk production traits in native Argentine Creole and commercial Argentine Holstein cattle. *Braz. J. Genet.* 22: 395-398.
- Grosclaude F. 1998. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relation avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait. *INRA. Prod. Anim.* 1(1): 5-17.
- Heck J. M. L.; Schennink A.; Van Valenberg H. J. F.; Bovenhuis H.; Visker M. H. P. W.; Van Arendonk J. A. M. y Van Hooijdonk A. C. M. 2009. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 92:1192-1202.
- Horne DS y Muir DD. 1994. Genetic polymorphism of κ -casein and rennet coagulation time. Effects of serum phase components. *Milchwissenschaft*; 49:446-449.

- INETER (Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales). 2017. Extensión territorial de Nicaragua por departamento y municipio. Consultado el 24 de febrero del 2017. Disponible en www.ineter.gov.ni.
- Kemenes P.A., L.C.A. Reginato, A.J.M. Rosa, I.V. Parker, G.A. Razook, L.A. Figueiredo, N.A. Silva, M.A.L. Etchegaray y L.L. Coutinho. 1999. κ -casein, β -Lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzará, Camcu, Charolais, Canchin and Santa Gertrudis cattle. *Genet. Mol. Biol.* 22: 539-541.
- López Benavides, M. 1998. Correlación entre la constitución genética kappa-caseína y características de producción en vacas Holstein de primer parto en la sabana Bogotá. Primer Simposio de Investigación en la Universidad de la Salle. Colombia.
- López R y Vásquez N. 2004. *Rev Col Cienc Pec.* 17(3): 231-240.
- MAGFOR (Ministerio Agropecuario y Forestal). 2010. Manual de los técnicos y las técnicas del programa productivo alimentario. Nicaragua.
- MAGFOR (Ministerio Agropecuario y Forestal). 2012. Perfil del Programa de Reconversión Competitiva de la Ganadería Bovina. Consultado el 14 octubre 2013. Disponible en www.magfor.gob.ni/prorural/IIMesa2012/ResumenEjecutivo.pdf.
- McLean, D. M.; Graham, E. R. B.; Ponzoni, R. W. y McKenzie, H. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J. Dairy Res.* 51:531-546.
- Medrano, J. F. y Aguilar-Cordova, E. 1990: Polymerase chain reaction amplification of bovine b-lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Animal Biotechnol.* 1: 73–77.
- Medrano, J.F. y E. Aguilar-Cordova. 1990. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Btotechnology.* 8. 144-6.
- Mendieta, B. G. 2007. Sistema de Producción Ganadera. Managua, Nicaragua.
- Naranjo Julián; Posso Andrés; Cárdenas Heiber y Jaime E. Muñoz F. 2007. Detección de variantes alélicas de Kappa caseínas en Bovino Hartón del Valle.

- Ng-Kwai-Hang, K.F. 1998. A review of the relationship between milk protein polymorphism and milk composition / milk production. International Dairy Federation, 9702: 22–37.
- NG-Kwai-Hang, K.F., J.F. Mayes, J.E. Moxley y H.G. Monardes. 1986. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. J. Dairy Sci. 69. 22-6.
- Osta, R. 1994. Caracterización genética de proteínas lácteas y sexaje de embriones en ganado vacuno mediante la aplicación de la biotecnología al análisis del DNA. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.
- Postiglioni, A., G. Rincón, L. Kelly, S. Llambí, G. Frenández, M. Angelo, G. Gagliardi, J. Trujillo, M. DE Bethencourt, K. Guevara, A. Castellano y Arruga M. V. 2002. Biodiversidad genética en bovinos criollos del Uruguay. Análisis con marcadores moleculares. En: Arch. Zootec. Vol. 51; p.195-202.
- Prinzenberg, E; Hiendleder, S; Ikonen, T y Erhardt, G. 1996. Molecular genetic characterization of new bovine kappa_casein alleles CSN3F, CSN3G, and genotyping by PCR_RFLP. Animal gen.; 27:347_349.
- Requena, F.D., E.I. Agüera y F. Requena. 2007. Genética de la caseína de la leche en el bovino Frisón (Milk of casein of genetic in the Frison bovine). REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. VIII (1): 1695-7504.
- Ripoli, M.V., Corva, P.M., Antonini, A., De Luca, J.C., Rojas, F., Dulout, F.N. y Giovambattista, G. (2003). Asociación entre cinco genes candidatos y producción de leche en la raza criolla Saavedreña. Archivos de Zootecnia, 52: 89–92.
- Robitaille G.; Britten M.; Morisset J. y Petitcler D. 2005. Polymorphism in the bovine k-casein (CSN3) gene and the 5'-flanking region: sequence analysis of CSN3 A and B alleles. En: International Society for Animal Genetics, Animal Genetics, 36, 160–190.
- Román Ponce, H., E. Cabello F. y C. J. Wilcox. 1978. Producción de vacas Holstein, Suizo Pardo y Jersey en clima tropical. Tec. Pec. Mex. 34:21.
- Ron, M., E. Yoffe, E. Ezra, J.F. Medrano y J.I Weller. 1994. Determination of effect of milk protein genotype on production trait of Israeli Holsten. J. Dairy Sci., 77:1106_1113.

- Sulimova, G.E., M.A. Azari, J. Rostamzadeh, M.R.M Abadi y O.E. Lazebny .2007. κ Casein gen (SCN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker. Russian J. Genet., 43: 73_79. DOI: 10.1134/S1022795407010115.
- Tambasco, M.D. 1998. Detecao de polymorphism dos genes de κ -casina, β -lactoglobulina em animais da raza Jersey. Monografia: Universidad Federal de Sao Carlos. S.P.
- Tsiaras, A.M., G.G. Bargogouli, G. Banos y M. Boscos. 2005. Effect of κ casein and β lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein caws. J. Dairy Sci., 88:327_334.
- Uffo, O.; Martín-Burriel I.; Martínez S.; Ronda R.; Osta R.; Rodellar C. y Zaragoza P. (2006). Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. En: AGRI, 39: 15-24.
- Van-Eennaan A. y Medrano J. F. 1991. Milk Protein Polymorphisms in California Dairy Cattle. En: J Dairy Sci. Vol. 74; p.1730-1742.
- Viana, J. L.; Fernández, A.; Iglesias, A.; Sánchez, L.; Becerra, J. 2001. Análisis de los genotipos más frecuentes de la kappa caseína en la raza vacuna rubia gallega mediante PCR/RFLPs. Archivos de Zootecnia 50:91-96.
- Zardowny D y U. Kühnlein. 1990. The identification of the κ -casein genotype in Holstein

VII

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de los materiales para la toma de muestras.



Anexo 2. Toma de muestra de sangre.



Anexo 3. Extracción del ADN.



Anexo 4. Centrifugación de las muestras de sangre.



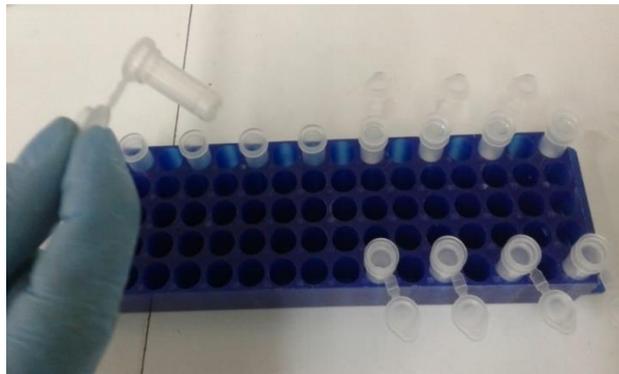
Anexo 5. Muestras puestas en baño de María.



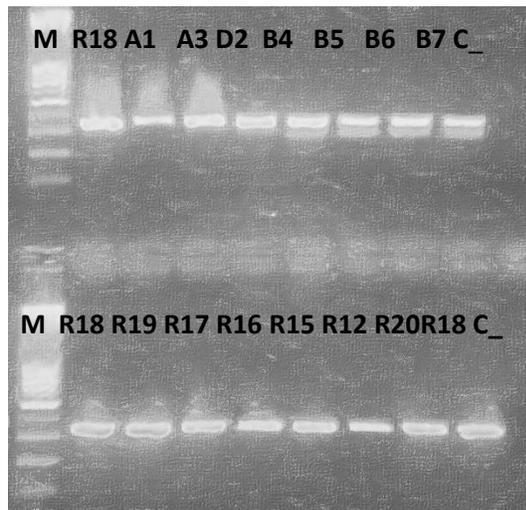
Anexo 6. Aplicación de solución de lavado.



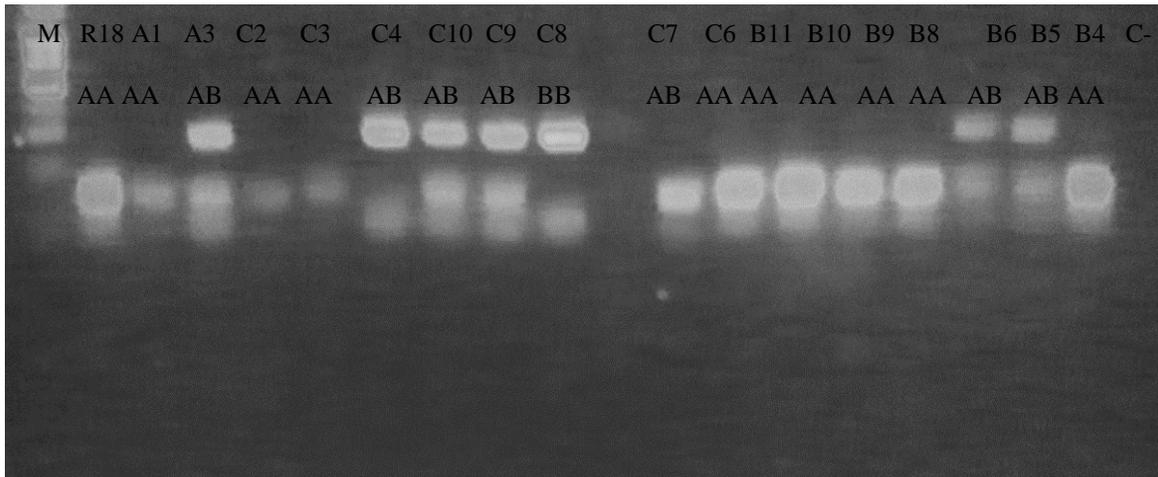
Anexo 7. Cambio del micro tubo de las muestras.



Anexo 8. Evaluación de la calidad del ADN.



Anexo 9. Identificación de las variantes alélicas del gen CSN3 de kappa caseína



Anexo 10. Distribución del genotipo CSN3 y frecuencia de los alelos en los sementales de la raza Holstein

Genotipo	n	Frecuencia	Alelos (frecuencia)
AA	10	0.67	A(0.83)
AB	5	0.33	B (0.17)
BB	0	0.00	
Total	15	1.0	1.0

Anexo 11. Distribución del genotipo CSN3 y frecuencia de los alelos en los sementales de la raza Pardo suizo

Genotipo	n	Frecuencia	Alelos (frecuencia)
AA	4	0.36	A(0.64)
AB	6	0.55	B (0.36)
BB	1	0.09	
TOTAL	11	1.0	1.0

Anexo 12. Distribución del genotipo CSN3 y frecuencia de los alelos en los sementales con el cruce de pardo suizo con braman

Genotipo	n	Frecuencia	Alelos (frecuencia)
AA	7	0.70	A(0.85)
AB	3	0.30	B (0.15)
BB		0.00	
TOTAL	10	1.0	1.0

Anexo 13. Distribución del genotipo CSN3 y frecuencia de los alelos en los sementales de la raza Brahman gris

Genotipo	n	Frecuencia	Alelos (frecuencia)
AA	3	0.50	A(0.75)
AB	3	0.50	B (0.25)
BB		0.00	
TOTAL	6	1.0	1.0

Anexo 14. Distribución del genotipo CSN3 y frecuencia de los alelos en los sementales con el cruce de pardo suizo con Holstein

Genotipo	n	Frecuencia	Alelos (frecuencia)
AA	2	0.67	A(0.83)
AB	1	0.33	B (0.17)
BB		0.00	
TOTAL	3	1.0	1.0

Anexo 15. Distribución del genotipo CSN3 y frecuencia de los alelos en los sementales con el cruce de Braman con Gyr

Genotipo	n	Frecuencia	Alelos (frecuencia)
AA	3	0.75	A(0.87)
AB	1	0.25	B (0.13)
BB		0.00	
TOTAL	4	1.0	1.0

Anexo 16. Datos de las muestras recolectadas para el estudio

N0	Propietario	Finca	Comunidad	Nombre del Toro	Identificación	Edad	Raza	Haplotipo
1	Jimmy Orozco Salazar	Orosal	Piedra Sembrada	Timo	7036-00194	3.5	Holstein	AA
2	Jorge Duarte Día	El Milagro		Pinto	0002-24640	4	Holstein	AA
3	Nicolás Bodan Sandoval	La Unión	Mombachito	Frontino	00183-4055	3	Holstein	AA
4	Maira Sotelo Flores	San Martín	Piedra Sembrada	s/n	MSY	3	Ps/Br	AA
5	Cruz de Jesús Martínez	San Jerónimo	Tesorero	El Palomo	00194-5936	5	Br/Gyr	AA
6	Guillermo Marengo	El Tesoro	Tesorero	s/n	0030-5722	3	Rey/Br	AA
7	José María Obregón	San Martín	San Isidro	El Muñeco	00194-6830	3	Pardo Suizo	AA
8	Isabel Rguez Rguez	El Amparo	San Isidro	Zanate	00137-128	5	Holstein	AA
9	Felipe Borges Fernández	El Aguacate	San Isidro	Julito	55800-119884	7	Ps/Holt	AA
10	Julio Fargas Herrera	El Carmen	Las Lajas	Las Lajas	00194-6028	3	Holstein	AA
11	Francisco Zeledón Rguez.	La casita	Cofanchigue	s/n	002-38798	5	Holstein	AA
12	Valentina Ojeda Espinoza	San Francisco	Yalgua	Penacho	1	3	Pardo Suizo	BB
13	Juan Díaz Farga	Peña de Agua	Tesorero	Calulo	00194-5972	3	Brahman Gris	AB
14	Andrés Rojas Guzmán	Buena Vista	Yalguas	Muñeco	00194-5911	3	Holstein	AB
15	Candelaria Suárez	Divino Niño	Arenitas	Muñeco	1946246122	4.5	Br/Gyr	AB
16	Mercedes Obregón Rguez	El pijibay	El Mono	Robleto	00194-7175	3.5	Pardo Suizo	AA
17	Josefa Hurtado Ojeda	San José	Ca�a Brava	s/n	00194-6247	5	Holstein	AA
18	Rigoberto Días	El J�caro		s/n	002-21102	5	Pardo Suizo	AA
19	José Hernández Obregón	Las Mercedes	Ca�a Brava	Arnoldo	002-21525	4	Pardo Suizo	AA
20	Ervin Fernández Robleto	Santa Elena	El Mono	Elpendejo	002-405886	3	Pardo Suizo	AB

Anexo 17. Datos de las muestras recolectadas para el estudio

Nº	Propietario	Finca	Comunidad	Nombre del Toro	Identificación	Edad	Raza	Haplotipo
21	Ervin Fernández Robleto	Santa Elena	El Mono	Toro Congo	002-405895	3	Pardo Suizo	AB
22	Aleyda Duarte Díaz	La esperanza	La Calamidad	El Aragan	0024-05803	4	Holst rojo	AA
23	Samuel Guevara	La Ceibita	Bijaguita	Cntinfla	0094-2000	8	Braman Gris	AB
24	Reyna Ortega Marengo	San José	La Calera	s/n	s/n	4	Ps/Holt	AB
25	Eulogio Rodríguez Miranda	San Pedro	La Calera	Ronald	001-947246	6	Br/Ps	AA
26	Lorenzo González Arróliga	Los Arbolitos	Tierra Blanca	El Cubero	s/n	4	Ps/Br	AA
27	Marvin Guerrero Díaz	La Esperanza	Roblar	El Artista	001-946798	6.5	Braman Gris	AA
28	Nardo Espinoza Sequeira	Las Delicias	Mombacho	El Suizo	s/n	4	Ps/Br	AB
29	Paula Díaz			Tornado	001-946099	6	Holtein	AB
30	Rosa Elena Duarte Benites	San Jerónimo	Trincheras	Ojo Rojo	81945888	5	Holtein Rojo	AB
31	Danilo Antonio Glez	Las Delicias	Bijaguita	Reyno	003-05508	3	Pardo Suizo	AB
32	José Duarte Rojas	s/n	Bijaguita	Muñeco	s/n	3.5	Holstein	AA
33	Lourdes Taleno Ortega	Divino Niño	La Embajada	s/n	003-005182	3.5	Pardo Suizo	AB
34	Jonathan Sequeira Guerrero	Yeniba	Quisaura	El Indio	7045407	3.5	Ps/Br	AA
35	José Esteban Sánchez	Lucitania	Saino	s/n	ni003297724	3	Pardo Suizo	AB
36	José Esteban Sánchez	Lucitania	Saino	Muñeco	000-3007753	3.5	Braman Gris	AA
37	José Esteban Sánchez	Lucitania	Saino	s/n	003-297747	4.5	Ps/Holt	AA
38	José Esteban Sánchez	Lucitania	Saino	s/n	R792	3	Braman Gris	AA
39	María Duarte Martínez	La Flor	La Embajada	s/n	001-947141	4	Br/Gyr	AA
40	Sista Aragón Borges	Quinta Fátima	Arenitas	Toro Pinto	003-307778	4	Holtein	AA
41	Mirna Toledo López	San Jerónimo	Arenitas	Conejo	001-946382	4.5	Ps/Br	AB
42	Fredy Sándigo Sánchez	San Antonio	Arenitas	s/n	0021-75799	3	Holtein	AA
43	Fredy Sándigo Sánchez	San Antonio	Arenitas	s/n	00-2046100	3	Br/Gyr	AA
44	Lucrecia Huete Amador	Lindavista	Masigue	Congo	50	3.5	Ps/Br	AA
45	Eduardo Rivas Huete	Santa Rita	Bijaguita	Sombbrero	ni0095-2363	5	Ps/Br	AA
46	Eduardo Rivas Huete	Santa Rita	Bijaguita	Gavilan	0010-48513	3	Braman Gris	AB
47	Anastasia Álvarez Espinoza	La Lucha	Salgado	Cola Blanca	00194-6141	2.5	Holtein	AA
48	Isabel Obando Dávila	El Pochote	Yalgua	Perfume	003-05937	3.5	Br/Ps	AB
49	Ramón Duarte Huete	Hossana	San Antonio	El Pavo	00095-0503	5	Pardo Suizo	AB
50	Noelia González Álvarez	Esquipulas	Salgado (Lajas)	Muñeco	s/n	5	Br/Ps	AA