

VARIABILIDAD POLIMÓRFICA DEL *LOCUS* CSN3 EN BOVINO CRIOLLO DEL GOLFO, EN VERACRUZ, MÉXICO

POLYMORPHIC VARIABILITY OF THE CSN3 *LOCUS* IN GULF CREOLE CATTLE IN VERACRUZ, MEXICO

Gómez-Boucrin F.¹, Cervantes P.^{1*}, Hernández A.¹, Domínguez B.¹, Barrientos M.¹

¹Universidad Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Veracruz México. *pcervantes@uv.mx.

Keywords: Native breeds; Milk yield; ARMS-PCR; Genetic variability.

Palabras clave: Razas autóctonas; Rendimiento lácteo; ARMS-PCR; Variabilidad genética.

ABSTRACT

In order to understand the productive potential in native bovine populations it is essential to study genes of interest such as those of milk proteins, which are important in the expression of milk composition, yield and processing potential. The aim of this research was to identify the polymorphism of the Kappa-Casein gene (CSN3), (GenBank: X14908). Individual DNA samples from 40 cattle from the Gulf Creole breed were used, from the Coastal Plains and Los Tuxtlas regions in Veracruz state, Mexico. Through the ARMS-PCR-tetra-primer method, a 350 bp fragment of the outer oligonucleotides and 246 bp (Allele A) and 163 bp (Allele B) of the internal oligonucleotides were amplified. The frequency of allele B was 0.35 with predominant heterozygous AB genotype (0.60) and low homozygous BB (0.05). The frequency of allele A was higher (0.65) and the homozygous genotype AA was common (0.35). We found a significant difference between the frequencies of alleles ($P = 0.0438$), attributed to the occurrence of directed or controlled matings, relatedness or migration between geographically close herds. Due to the excess of heterozygosis no equilibrium was found in the Hardy-Weinberg analysis. The information on the CSN3 gene and its relationship with productive characteristics will allow for the development of marker-assisted breeding schemes, ensuring the maintenance of the genetic variability of these local populations, which are characterized by reduced censuses and the constant threat of breeding with improved or commercial breeds in an effort to increase the volume of milk production but to the detriment of its compositional quality.

RESUMEN

Para comprender el potencial productivo en poblaciones bovinas Criollas es esencial el estudio de genes de interés como los de las proteínas lácteas, importantes en la expresión de la composición, rendimiento y procesabilidad de la leche. El objetivo de esta investigación fue identificar el polimorfismo del gen Kappa-Caseína (CSN3) (GenBank: X14908). Se utilizó ADN individual de 40 bovinos de la raza Criollo del Golfo, provenientes de las regiones Llanuras Costeras y de Los Tuxtlas en el estado de Veracruz, México. A través del método ARMS-PCR-tetra-primer, se amplificó un fragmento de 350 pb de los oligonucleótidos externos, y de 246 pb (Alelo A) y 163pb (Alelo B) de los internos. La frecuencia del alelo A fue 0.65 y la del homocigoto AA fue 0.35. La frecuencia del alelo B fue 0.35, predominando el genotipo heterocigoto AB (0.60) sobre el BB (0.05). Estos resultados se atribuyen a la ocurrencia de apareamientos dirigidos o

controlados, individuos emparentados o migración entre rebaños cercanos geográficamente. Debido al exceso de heterocigosis no se encontró equilibrio en el análisis de Hardy-Weinberg. La información del gen CSN3 y su relación con caracteres productivos permitirán llevar a cabo planes de mejoramiento asistido por marcadores, garantizando el mantenimiento de la variabilidad genética de estas poblaciones locales, que se caracterizan por censos reducidos y la amenaza constante por cruzamientos con razas mejoradoras o comerciales, que buscan incrementar el volumen de producción de leche en detrimento de su calidad composicional.

INTRODUCCIÓN

La leche y derivados lácteos se consideran entre los principales ingredientes de la dieta de los mamíferos, ya que las caseínas y las proteínas del suero cumplen funciones reguladoras positivas al aportar nutrientes esenciales y fisiológicas como la protección inmune (Sharma *et al.*, 2013), así también, la producción de leche y de sus componentes es parte insoluble de los mecanismos biológicos de la reproducción y supervivencia de los mamíferos, cuya evolución se puede seguir a través de las características de la síntesis y secreción de dichos componentes en la escala biológica de cada especie, desde los monotremas, marsupiales y euterios (95 % de los mamíferos), hasta la vaca, humano y cetáceos (Mustafa, 2001). La variación polimórfica de las proteínas lácteas se refiere a los diferentes tipos de la misma molécula, las cuales difieren en su composición de aminoácidos expresados por diferentes alelos y por ello la variabilidad existente en los genes de las lactoproteínas influye en parte de las propiedades de dichas proteínas mejorando las características fisicoquímicas y queseras de la leche (Martin *et al.*, 2002). La lactoproteína kappa caseína (CSN3) tiene una estructura claramente distinta a las otras caseínas: está formada por 169 aminoácidos, representa entre 12 y 15 % del total de la caseína de la leche, se encuentra en la superficie de la micela, posee un peso molecular de 19 kDa junto con la β -caseína se encarga de la estabilidad de la molécula, además su hidrólisis modifica las características fisicoquímicas de la leche. El gen de CSN3 se localiza en el cromosoma bovino (BTA6), con un tamaño de 13.1 Kilobases (Kb) dispuestas en cinco exones y cuatro intrones, la mayor parte de las secuencias de codificación para la proteína madura CSN3 está contenida en el cuarto exón (Martin *et al.*, 2002). CSN3 tiene una influencia fundamental en la composición proteica de la leche bovina, en las características de pH, estabilidad térmica, tiempo de coagulación y sobre el rendimiento quesero (Aleandri *et al.*, 1990; Grosclaude, 1998). Cada alelo confiere características específicas al comportamiento químico de la leche. El alelo A otorga una mayor producción de leche, mayor tiempo de coagulación y en asociación con el alelo B se ha reportado una menor edad al primer parto en las vaquillas que los poseen. Las dos formas comunes, CSN3 A y CSN3 B difieren en los codones 136 y 138 (Neelin, 1964; Farrell *et al.*, 2004). El alelo B proporciona características como mayor rendimiento en el procesamiento de la leche, llegando a presentar rendimiento hasta 10 % mayor en leche proveniente de animales con genotipo BB, comparado con otras combinaciones de polimorfismos (Zepeda, 2013; Ju *et al.*, 2009). El genotipado molecular del *locus* de esta lactoproteína, se traduce en la selección temprana, de posibles holotipos deseados en ambos sexos (Tornadijo *et al.*, 1998). La elevada especialización productiva obtenida en diferentes razas de bovinos es producto del trabajo genético y de manejo, dirigidos por el ser humano con fines productivos, pero que induce a su vez problemas de comportamientos biológicos anormales como el estrés y enfermedades asociadas (Thompson, 2005). La estrategia del desarrollo lechero en las condiciones del trópico debe tener en cuenta estos elementos en la búsqueda de genotipos y sistemas de manejo, que logren integrar los mejores indicadores bioproductivos y no ir solo a la búsqueda de altos rendimientos lecheros

(Brian y Spencer, 2000). La diversidad del trópico incluso dentro de un mismo país, así como el ganado lechero que se cría en esta región, requieren un trabajo de investigación constante para mejorar el criterio de desempeño, sin límite a solo aspectos referidos a la producción lechera, sino cambiar el paradigma de una sola solución y buscar respuestas más ajustadas a cada condición en particular en las condiciones del trópico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 40 vacas que reunían características del grupo racial Bovino Criollo del Golfo (BCG), la cual posee una variabilidad del color de capa que sugiere un origen racial diverso, pero con características morfométricas y fanerópticas que los colocan como bovinos con fenotipo BCG (Gómez-Boucrin, 2016), de forma individual se obtuvo muestra sanguínea para extracción de ADN y análisis molecular del *locus* CSN3 (Genbank: X14908). La extracción de ADN genómico fue a partir de sangre completa con el método de “precipitación salina” propuesto por Kanai *et al.* (1994). La determinación del genotipo de CSN3 se desarrolló por la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa-Sistema de Mutación Refractario a Amplificación (PCR-ARMS), con 4 cebadores, dos externos y dos internos, en una sola reacción, de acuerdo al protocolo de Rincón y Medrano (2003), con las secuencias propuestas de cebadores externos JK5: 5'ATCATTATGGCCATTCCACCAAAG3',

JK3:5'GCCATTTTCGCCTTCTCTGTAACAGA3';

Internos 5'AGTAGAGAGCACTGTAGCTACTCTAGAGGA

3' 5'AGGTGGGCTCTCAATAACTTCTGGAGGAG 3'.

La mezcla de reacción PCR fue en un volumen final de 25µL, con el kit comercial (PCR Master Mix, Promega®), de acuerdo a las indicaciones del fabricante, adaptado al protocolo de Rincón y Medrano (2003), los cebadores en concentración final de 10 pmol de cada cebador interno y 10 pmol de cada cebador externo. El protocolo de amplificación fue un ciclo de desnaturalización a 94°C/2 minutos, 30 ciclos de desnaturalización 94°C/30 segundos, hibridación 60°C/30 segundos, extensión 72°C/30 segundos y finalmente una extensión adicional de 72°C/5 minutos. La verificación de la amplificación y el polimorfismo del *locus* fue en gel de Acrilamida-Bis-Acrilamida (29:1, 40 %) al 8 %. En la corrida del gel se utilizó marcador de peso molecular DNA Step Ladder 50 bp, (PROMEGA®), 3µl del buffer de carga (EDTA [0.5M pH 8.0] 4 %, Azul de bromofenol 0.05 %, Xylene Cyanol 0.05 % y agua desionizada estéril); se colocaron 15 µl de cada producto de ARMS-PCR del amplicon. La corrida fue en cámara de electroforesis vertical VE-10 (ENDURO® Electrophoresis Systems), en solución buffer TBE 1X, a 200 Volts durante 90 minutos a temperatura de 15°C. La tinción de los geles de poliacrilamida bis (2.5 %) se realizó en solución de plata (0.02 %) siguiendo las indicaciones del protocolo desarrollado por Benbouza (2006). La visualización de las bandas características esperadas fue directa en un transiluminador de luz blanca. El análisis de las bandas amplificadas del *locus* se realizó con el software GeneSnap y GeneTools (Syngene®), respectivamente. De acuerdo al protocolo de amplificación propuesto por Rincón y Medrano (2003), el tamaño de los fragmentos a obtener fue: Fragmento del gen no alélico de 350 pares de bases (pb), Alelo específico Homocigoto A 246 pb, Alelo específico Homocigoto B 163 pb, la obtención de individuos con fragmento de 350, 246 y 163 pb se refiere a individuos heterocigotos AB.

El análisis del Equilibrio de Hardy-Weinberg de la población se realizó por comparación de las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas mediante una prueba de Chi cuadrada (X^2) ($p < 0.05$). A partir de los genotipos se obtuvieron las frecuencias alélicas, la heterocigosidad

estimada por conteo directo y no sesgada, así como el porcentaje del polimorfismo del *locus*, cuando la frecuencia del alelo más común fue menor que 0.95.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resultado del análisis electroforético del locus CSN3 en los 40 bovinos estudiados mostró que es dialélico con los 3 genotipos esperados homocigotos AA y BB y heterocigoto AB. Las frecuencias génicas del locus CSN3 con el método PCR-ARMS, distinguieron los alelos A y B (figura 1). La frecuencia del alelo A fue 0.65 y la del homocigoto AA fue 0.35. La frecuencia del alelo B fue 0.35, predominando el genotipo heterocigoto AB (0.60) sobre el BB (0.05) (tabla I).

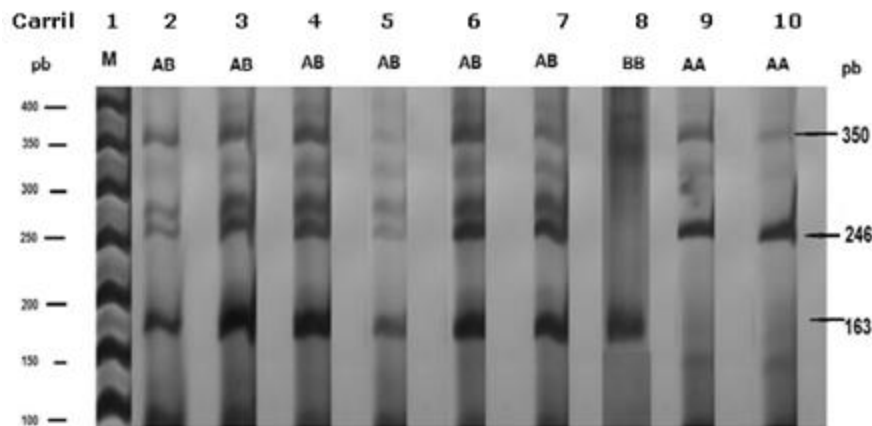


Figura 1. Separación electroforética en gel de Acrilamida–Bis Acrilamida al 8 % teñido con nitrato de plata [0.02 g/L], de los fragmentos amplificados por el método ARMS-PCR del locus CSN3. Carril 1: Marcador de peso molecular 50 bp Promega®; carril 9 y 10, fragmentos de 350 y 246 pb correspondientes al polimorfismo AA; carril 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, fragmentos de 350, 246 y 163 pb correspondientes al polimorfismo AB; carril 8 fragmentos de 350 y 163 pb correspondientes al polimorfismo BB (*Electrophoretic gel separation of Acrylamide-Bis 8 % acrylamide stained with silver nitrate [0.02 g/L] of the fragments amplified by the ARMS-PCR method of CSN3 locus. Lane 1: 50 bp molecular weight marker Promega®; lane 9 and 10, fragments of 350 and 246 bp corresponding to the AA polymorphism; lane 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7, fragments of 350, 246 and 163 bp corresponding to the AB polymorphism; lane 8, fragments of 350 and 163 bp corresponding to the BB polymorphism.*

En el análisis de las posibles desviaciones para las condiciones de EHW del *locus* y con un grado de libertad, se encontró que, en las diferencias del valor en la prueba de X^2 ($p < 0.05$) entre las frecuencias observadas y las frecuencias esperadas, existe un defecto de heterocigosidad máxima y debido a este exceso de heterocigosis en el análisis X^2 ($p < 0.05$) no se encontró equilibrio de Hardy Weinberg (tabla II). Esta falta de equilibrio puede deberse a la ocurrencia de apareamientos dirigidos o controlados (no aleatorio), individuos emparentados o migración entre rebaños diferentes cercanos geográficamente (Suárez *et al.*, 2001; Toro y Caballero, 2005).

Tabla I. Distribución de Frecuencias Genotípicas y Alélicas y prueba de significación X² del locus CSN3, de vacas de la raza BCG (*Distribution of Genotypic and Allelic Frequencies and X² significance test of the CSN3 locus in cows of the BCG breed*).

Frecuencias Genotípicas	
AA	0.35
AB	0.60
BB	0.05
Frecuencias Génicas	
A	0.65
B	0.35
X ²	4.06*
P	0.0438

n = número de animales; X² = NS: No significativo; *P<0.05.

La influencia de la selección artificial ejercida sobre este *locus* parece estar relacionada con algún carácter productivo a favor del cual se está seleccionando, ya que la caracterización del ganado de doble propósito adquiere relevancia debido a que los genotipos leche y carne son los más utilizados por los productores en regiones tropicales y subtropicales, a pesar de las condiciones ambientales adversas que implican alta temperatura y humedad (Cervantes *et al.*, 2007; Cortés-López *et al.*, 2012).

Tabla II. Prueba de Chi cuadrada del locus CSN3 para el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) del locus CSN3, de vacas de la raza BCG (*Chi-square test of the CSN3 locus for the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in cows of the BCG breed*).

Clase	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	X ²	EHW
AA	14	17		
AB	24	18		
BB	2.0	5.0	4.06	No hay equilibrio
Total	0.5826	0.4047		
D.E.	(± 0.0551)	(± 0.0549)		

X² = *P<0.05; D.E. Desviación estándar. Un *locus* se considera polimórfico si la frecuencia del alelo más común no excede a 0.95.

La domesticación de las diversas especies de ganado de granja posee una larga historia de migración, selección y adaptación, lo que acarrió la creación de gran variedad de razas. La conservación de los recursos genéticos inicia con su caracterización demográfica, el registro datos eficaz en el entorno productivo, aunado a estudios de genética molecular para realizar comparaciones de la diversidad genética dentro y entre las razas con el objetivo de reconstruir la historia de estas razas y las poblaciones ancestrales (Groeneveld *et al.*, 2010). El mantenimiento de la variación genética es un requisito importante en las futuras estrategias para la cría de animales, debiendo esta coincidir con el tipo de animales, la gran variedad de sistemas de

producción y la capacidad de adaptación a los cambios ambientales, lo expuesto permite apreciar que la diversidad genética de las especies de ganado es de interés científico para la comprensión de la variación fenotípica y reconstrucción de la historia ganadera (Lenstra *et al.*, 2012).

Debido a que las poblaciones de los bovinos que formaron parte de este estudio son de tamaño finito, el muestreo tuvo como resultado que las frecuencias génicas que componen a cada animal no son una muestra representativa de la población total de los hatos, se encontraron fluctuaciones debidas al azar, tanto en las frecuencias génicas como las genotípicas entre los bovinos analizados. Se puede entonces definir deriva génica como cambios en las frecuencias génicas por error de muestreo en poblaciones finitas según Caponi (2015).

Las variaciones estocásticas de las frecuencias alélicas y genotípicas dependen del tamaño poblacional. Las variaciones esperadas de las frecuencias en las poblaciones descendientes se incrementan con descensos en el tamaño de la población parental. En poblaciones pequeñas, puede haber fluctuaciones amplias e impredecibles de las frecuencias génicas debido a eventos aleatorios, de una generación a otra. Estos eventos ocurren cuando se muestrean genes del pool génico a fin de producir los cigotos de la generación siguiente (Gómez-Romano, 2015; Rodríguez-Ramilo *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

El *locus* CSN3 resultó dialélico y se encontraron los 3 genotipos esperados, homocigotos AA y BB y heterocigoto AB. El resultado del polimorfismo del *locus* se puede atribuir a la deriva genética, dada por el origen y dispersión geográfica de los bovinos en las poblaciones analizadas. La presencia del alelo A en estas poblaciones se atribuye generalmente al mestizaje del ganado analizado con animales *Bos indicus*, probablemente de la raza Cebú. Debido al exceso de heterocigosis no se encontró equilibrio en el análisis de Hardy-Weinberg. El componente genético que distingue a las poblaciones bovinas Criollas del continente americano, ha mostrado en algunos de ellos, la baja presencia de características propias del ganado *Bos indicus*, lo cual indica que la introgresión de las razas cebuinas en el ganado Criollo no logran influir de una manera determinante su constitución genética.

BIBLIOGRAFÍA

- Aleandri, R., Butazzoni, L.G., Schneider, J.C., Caroli, A., & Davoli, R. 1990. The effects of milk protein polymorphisms on milk component and cheese-producing ability. *J Dairy Sci*, 73:241-255.
- Brian, H.R. & Spencer GCW. 2000. Animal Biotechnology: Convergence of Science, Law and Ethic. Livestock, Ethic and Quality of Life. Edit. CAB International, UK.
- Caponi, G. 2015. Causas sin ley y leyes sin causa en la explicación biológica. Principios: *Revista de Filosofia* (UFRN), 20(34), 19-54.
- Cervantes, P., Luna, M., Hernández, A., Pérez-Gil, F., Ponce, P., & Uffo, O. 2007. Polimorfismo genético en el *locus* de la kappa-caseína, en vacas de diferentes razas y cruces en el trópico mexicano. *Revista de Salud Animal*, 29:2 78-84.
- Cortés-López, N.G., del Moral, S., Rueda, J.A.C., Luna- Palomera, C., Meza-Herrera, A., & Abad- Zavaleta, J. 2012. Allelic and genotypic frequency of kappa casein gene in double purpose cattle. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15: 47-55.
- Farrell, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., & Creamer, L.K. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk – sixth revision. *J Dairy Sci*, 87: 1641-1674.

- Gómez-Boucrin, F. 2016. Caracterización morfológica y variabilidad polimórfica del *loci* CSN3 y LAA en ganado criollo del golfo en Veracruz, México Tesis Maestría en Ciencia Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Veracruz, México.
- Gómez-Romano, F. 2015. Gestión de la diversidad genética en programas de conservación utilizando datos de genotipado masivo. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Genética.
- Groeneveld, L.F., Lenstra, J.A., Eding, H., Toro, M.A., Scherf, B., Pilling, D., Negrini, R., Jianlin, H., Finlay, E.K., Groeneveld, E., Weigend, S. & the GlobalDiv Consortium. 2010. Genetic diversity in livestock breeds. *Animal Genetics*, 41 (suppl. 1): 6-31.
- Grosclaude, F. 1998. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines, *INRA. Prod. Anim.* 1: 5-17.
- Ju, Z., Li, Q., Wang, H., Li, J., An, O., Yang, W., Zhong J., & F, W. 2009. Polymorphisms of κ -casein gene exon4 and exon 5 and its Association with milk production traits in Chinese Holsteins cattle. *Scientia Agric Sin* 9, 3279-87.
- Kanai, N., Fujii, T., Saito, K., & Tokoyama, T. 1994. Rapid and simple method for preparation of genomic DNA from easily obtainable clotted blood. *Journal of Clinical Pathology*, 47(11), 1043-1044.
- Lenstra, J.A., Groeneveld, L.F., Eding, H., Kantanen, J., Williams, J.L., Taberlet, P., Nicolazzi, E.L., Sölkner, J., Simianer, H., Ciani, E., Garcia, J.F., Bruford, M.W., Ajmone-Marsan, P., & Weigend, S. 2012. Molecular tools and analytical approaches for the characterization of farm animal genetic diversity. *Anim Genet.* 43(5):483-502.
- Martin, P., Szymanowska M., & Zwierchowski Leroux, C. 2002. The impact of genetic polymorphism on the protein composition of ruminant milks. *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 433-459.
- Mustafa, A.F. 2001. Lactation Biology. Lectures of Courses on Line. Department of Animal Science. Mc Donald of McGill University, Ca.
- Neelin, J.M. 1964. Variants of [kappa]-Casein Revealed by Improved Starch Gel Electrophoresis1. *J Dairy Sci*, 47, 506-9.
- Rincon, G., & Medrano J.F. 2003. Single nucleotide polymorphism genotyping of bovine milk protein genes using the tetra-primer ARMS-PCR *J. Anim. Breed. Genet.* 120:331–337.
- Rodríguez-Ramilo, S.T., Fernández, J., Toro, M.A., Hernández, D., & Villanueva, B. 2015. Genome-wide estimates of coancestry, inbreeding and effective population size in the Spanish Holstein population. *PLoS One*, 10(4), e0124157.
- Sharma, V., Sharma, N., Jawed, B., & Nautiyal, S.C. 2013. High resolution melt curve analysis for the detection of A1, A2 β -casein variants in Indian cows. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 3: 144-148.
- Suárez, M., Pérez, C., & González, A. 2001. Fundamentos de la mejora animal. Ed. Félix Valera – La Habana. 13-45 pp.
- Thompson, P.B. 2005. Research ethics for animal biotechnology. *Frontis*, 5, 105-120.
- Tornadijo, M.E., Marra, A.I., Fontán, M.G., Prieto, B., & Carballo, J. 1998. La calidad de la leche destinada a la fabricación de queso: calidad química milk quality for cheese production: chemical quality a qualidade da leite destinada á fabricação de queixo: qualidade química. *CYTA-Journal of Food*, 2(2), 79-91.
- Toro, M.A., & Caballero A. 2005. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 360:1367–1378.
- Zepeda-Batista, J., Alarcón-Zúñiga, B., Ruíz-Flores, A., Núñez-Domínguez, R., & Ramírez-Valverde, R. 2015. Polymorphism of three milk protein genes in Mexican Jersey cattle. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 1-4.