

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**Facultad de Ciencia Animal**

**(FACA)**

**Departamento de Medicina Veterinaria**



## **Trabajo de Graduación**

**Frecuencias alélicas y genotípicas de variantes de kappa-caseínas en toros reproductores de la raza pardo suizo y cruces de esta con cebú, en el departamento de Boaco Nicaragua**

### **AUTORES:**

**Br. Emiliano Joaquín Duarte Flores**

**Br. Carolina María López Sánchez**

### **ASESORES:**

**D.M.V. Julio Omar López Flores**

**Ing. Pasteur Parrales García**

**Managua, Octubre del 2017**



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**Facultad de Ciencia Animal**

**(FACA)**

**MEDICINA VETERINARIA**

## **Trabajo de Graduación**

**Frecuencias alélicas y genotípicas de variantes de kappa-caseínas en toros reproductores de la raza pardo suizo y cruces de esta con cebú, en el departamento de Boaco Nicaragua**

Sometida a la consideración del consejo de Investigación y Desarrollo (CID), de la Facultad de Ciencia Animal (FACA) de la Universidad Nacional Agraria (UNA), para optar al título profesional de:

**MÉDICO VETERINARIO**

**AUTORES:**

**Br. Emiliano Joaquín Duarte Flores**

**Br. Carolina María López Sánchez**

**ASESORES:**

**D.M.V. Julio Omar López Flores**

**Ing. Pasteur Parrales García**

**Managua, Octubre del 2017**



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA**

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el comité examinador designado por la decanatura de la Facultad de Ciencia Animal (FACA) de la Universidad Nacional Agraria (UNA) como requisito parcial para optar al título profesional de:

**MÉDICO VETERINARIO**

**En grado de Licenciatura**

**MIEMBROS DEL COMITÉ EXAMINADOR:**

---

Dr. Omar Navarro Reyes

Presidente

---

Ing. Luís Toribio Sequeira. MSc.

Secretario



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA**

**Asesores:**

---

D.M.V. Julio Omar López Flores

---

Ing. Pasteur PARRALES GARCÍA

**Sustentantes:**

---

Br. Emiliano Joaquín Duarte Flores

---

Br. Carolina María López Sánchez

Managua, Octubre del 2017

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	<b>v</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Objetivo general</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. Objetivo específicos</b> .....	<b>3</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>4</b>
<b>3.1. Ubicación del área del estudio</b> .....	<b>4</b>
<b>3.2. Diseño experimental</b> .....	<b>4</b>
<b>3.2.1. Parámetros de inclusión de los reproductores</b> .....	<b>4</b>
<b>3.3. Estandarización del método</b> .....	<b>5</b>
<b>3.3.2. Amplificación y genotipificación</b> .....	<b>6</b>
<b>3.4 Análisis estadístico</b> .....	<b>6</b>
<b>3.5 Materiales y equipos</b> .....	<b>6</b>
<b>3.5.1 Identificación del genotipo de los reproductores seleccionados a través de la utilización de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)</b> .....	<b>7</b>
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	<b>13</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>14</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>15</b>
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	<b>19</b>

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de tesis primeramente a **DIOS** por haberme regalado lo más valioso de este mundo “La vida”, por la fortaleza, perseverancia y sabiduría que me dio durante este largo periodo para poder concluir mi carrera.

A mi madre, Martha Isabell Flores Téllez y a mi padre, Evelio Alberto Duarte Sandoval por darme su apoyo, comprensión, ternura y amor. A mi madre muy en especial, por ser la madre más tierna y cariñosa, por estar conmigo en los momentos más difíciles y felices de mi vida, por ser una mujer trabajadora, triunfadora que con mucho esfuerzo y sacrificio logró que esta meta fuera una realidad, gracias madre.

A mi hermana Eveling María Duarte Flores por sus sonrisas y cariño que alimentaban mi vida día a día, dándome fuerzas para continuar mi meta.

A mi tío Armel Antonio Duarte Sandoval y mi tía Melania Duarte Sandoval por brindarme su apoyo en los momentos más difíciles de mi carrera y por ser parte de este gran logro.

A mis abuelos Francisca Sandoval, Victorina Téllez Flores y Justo Flores Flores que siempre me dieron su apoyo y motivación para salir adelante.

A mi novia Wendy Rivera Ramos por brindarme su apoyo en los momentos más difíciles.

**Que DIOS les bendiga.**

**Emiliano Joaquín Duarte Flores**

## **DEDICATORIA**

Primeramente, a Dios por darme la sabiduría, la paciencia y la constancia para la culminación de este proyecto.

A mis padres, por su incondicional apoyo y tan sabios consejos en los momentos que más lo he necesitado.

A mis hermanas que siempre me alentaron a prepararme y continuar con mis estudios

A mi esposo Walter Alejandro Castillo, por ser mi confidente y consejero de tiempo completo, además de la gran ayuda que me brindó durante el desarrollo de esta investigación.

A mi hija Ashley Castillo López, por ser una gran bendición en mi vida y ser mi motivo de superación.

A mi asesor D.M.V. Julio López por la orientación y ayuda que nos brindó en la realización de este proyecto el cual nos permitió adquirir nuevos conocimientos

**Que DIOS les bendiga.**

**Carolina María López Sánchez**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos al proyecto ADA genética el cual fue coordinado por el Dr. Roldan Corrales que nos apoyó durante todo el proceso de esta investigación.

Al Dr. Lázaro Morejón Aldama por su apoyo incondicional en el transcurso de la carrera y por sus buenos consejos.

Al profesor Ing. Pasteur Parrales García por brindarnos su tiempo y habernos ayudado en la parte estadística.

Al profesor D.M.V. Julio Omar López Flores por brindarnos su conocimiento y apoyo en la elaboración de este proyecto.

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1. Frecuencias Genotípicas .....</b>	<b>8</b>
<b>Gráfico 2. Frecuencias Alélicas .....</b>	<b>9</b>
<b>Gráfico 3. Frecuencias genotípicas de las principales razas .....</b>	<b>10</b>
<b>Gráfico 4. Frecuencias alélicas por raza.....</b>	<b>11</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1. Mapa físico del municipio de Camoapa.....</b>	<b>19</b>
<b>Anexo 2. Mapa físico del departamento de Boaco.....</b>	<b>20</b>
<b>Anexo 3. Imagen de la kappa caseína.....</b>	<b>21</b>
<b>Anexo 4. Examen de aptitud reproductiva potencial y funcional del toro.....</b>	<b>22</b>
<b>Anexo 5. Extracción de sangre de la vena coccígea.....</b>	<b>23</b>
<b>Anexo 6. Pesaje de reactivos.....</b>	<b>24</b>
<b>Anexo 7. Materiales para la extracción del ADN.....</b>	<b>25</b>
<b>Anexo 8. Extracción de ADN.....</b>	<b>26</b>
<b>Anexo 9. Montaje de muestras en cámara de electroforesis.....</b>	<b>27</b>
<b>Anexo 10. Lectura de las muestras en cámara de Rayos UV.....</b>	<b>28</b>
<b>Anexo 11. Equipo electroforético.....</b>	<b>29</b>
<b>Anexo 12. Método de electroforesis con gel de agarosa.....</b>	<b>30</b>
<b>Anexo 13. Métodos de amplificación genética.....</b>	<b>31</b>
<b>Anexo 14. Ciclos del PCR.....</b>	<b>32</b>
<b>Anexo 15. Cálculo de la frecuencia genotípica.....</b>	<b>33</b>
<b>Anexo 16. Cálculo de las frecuencias alélicas.....</b>	<b>33</b>
<b>Anexo 17. Frecuencia genotípica y alélica por raza.....</b>	<b>34</b>
<b>Anexo 18. Frecuencia genotípica y alélica por raza (continuación).....</b>	<b>35</b>
<b>Anexo 19. Test exacta de Fisher 2x3.....</b>	<b>36</b>

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del gen kappa-caseína ( $\kappa$ -CN) en ganado de la raza Pardo Suizo y los cruces de esta con Cebú para determinar planes de mejoramiento genético en base al genotipo BB, el cual favorece el rendimiento en queso. Se recolectaron 50 muestras de sangre en toros reproductores del departamento de Boaco. A partir del material genético extraído a través de la metodología establecida por (Morillo *et al.*, 2014), las muestras de ADN fueron amplificadas utilizando los cebadores BLKC-For 5`\_ ATT AGCCCATTTTCGCCTTCT-3` y BLKC-Rev 5`\_ ATT TATGGCCATTCCACCAA-3`, amplificando fragmentos de 351 pb mediante la utilización de la técnica de PCR. Las frecuencias genotípicas encontradas fueron de 0.60, 0.38 y 0.02 para los genotipos AA, AB y BB, respectivamente, en tanto que las frecuencias alélicas resultaron ser de 0.79 y 0.21 para los alelos A y B, respectivamente. Finalmente, con 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. Se concluye que los animales evaluados presentan una baja proporción de individuos con el genotipo deseado BB, genotipo que favorece la producción de queso.

**Palabras clave:** Reproductores bovinos, gen kappa-caseína, PCR-RFLP

## ABSTRACT

The present study aimed to determine the genotypic and allelic frequencies of the kappa-casein gene ( $\kappa$ -CN) in cattle of the Swiss Brown breed and the crosses of this with Cebu to determine genetic improvement plans based on the BB genotype. Fifty blood samples were collected from breeding bulls of the department of Boaco. From the genetic material extracted through the methodology established by (Morillo *et al.*, 2014), the DNA samples were amplified using primers BLKC-For 5`\_ ATT AGC CCA TTT CGC CTT CT-3` y BLKC-Rev 5`\_ ATT TAT GGC CAT TCC ACC AA-3` by amplifying 351 bp fragments using the PCR technique. The genotype frequencies found were 0.60, 0.38 and 0.02 for the AA, AB and BB genotypes respectively, while the allele frequencies were 0.79 and 0.21 for the A and B alleles respectively, Finally, with the calculation of the Exact Fisher Extent, a probability of  $P_a = 0.000052$  was obtained giving highly significant with a level of significance of 0.05, which means that the population sampled is not found in Hardy-Weinberg Equilibrium. It is concluded that the evaluated animals present a low proportion of individuals with the desired BB genotype, a genotype that favors cheese production.

**Key words:** Bovine reproducers, kappa-casein gene, PCR-RFLP

## I. INTRODUCCIÓN

La leche es considerada como uno de los principales productos de primera necesidad en el hogar al igual que la carne y el huevo. El volumen de la producción de leche a nivel mundial alcanzó cifras de 619 millones de toneladas (FAO, 2006).

Según CETREX (2007) en Centroamérica, Nicaragua es el mayor productor de leche. Para el 2007, se produjo un total de 181.2 millones de galones de leche y los destinos de exportación de sus productos lácteos fueron principalmente El Salvador (52 %), Guatemala (24 %), Honduras (18 %) y Estados Unidos (6 %).

Los países de la región centroamericana son importadores netos de productos lácteos, siendo Nicaragua un gran potencial de desarrollo del sector lácteo. Nicaragua se ha posicionado como el primer exportador de quesos al mercado centroamericano. El queso fresco es la forma de consumo de aproximadamente el 87 % de los lácteos producidos en Centroamérica. Uno de los procesos de cambio más generalizados en la cadena ganadera en los últimos diez años, ha sido la separación entre la producción de leche en finca y la transformación quesera.

Las queserías surgieron masivamente y se han consolidado como pequeñas y medianas empresas especializadas en la producción de queso. Hoy en día, solo el 8 % de la leche acopiada en las queserías proviene de los propietarios de la quesería (Nitlapan, 2004).

El sector lácteo de Nicaragua en los últimos años ha demostrado un dinamismo importante, tanto en evolución de la producción de leche fluida a nivel interno como un acelerado crecimiento de las exportaciones de productos lácteos. En el 2003, las exportaciones de queso representaron casi un 90 % del volumen total de lácteos exportados y un 44 % de la producción total de leche cruda. Estas exportaciones han experimentado un crecimiento consistente, pasando de 6 millones de dólares en 1995 a 12 millones en el 2001 (Nitlapan, 2004).

El hato ganadero en Nicaragua no es especializado en producción de leche, mayormente es de “Producción de doble propósito”, que independientemente de la tendencia racial del ganado, se practica el ordeño de vacas paridas para venta de leche fluida, y a su vez se cría el ternero para la venta al destete o un poco más de un año de edad (IICA, 2004).

Existe suficiente evidencia que cuanto más alto el precio de la leche y la aparición de los centros de acopio, la calidad de los terneros al destete es menor. Ello ocurre porque los productores se motivan para sacarle algo más de leche a la vaca y dejar menos para el ternero. Esta es una contradicción importante, ya que hay demanda creciente de leche para el consumo, pero también existe demanda por carne (Pomareda & Montero, 2008).

Debido a esto se hace necesario buscar nuevas alternativas de razas lecheras que mejoren la calidad y productividad del queso a través de la comparación de los catálogos de los sementales que brindan el servicio de monta natural e inseminación artificial, determinando en qué relación se encuentran las proteínas como las Kappa-caseínas y beta lacto globulinas que favorecen el rendimiento en queso ya que mejoran la coagulabilidad del mismo.

Así mismo para la industria quesera es importante determinar el genotipo de los animales en producción en base a las K-caseínas y beta lacto globulinas, para de esta manera determinar un plan de mejoramiento genético que permita una adecuada selección de estos genotipos, trayendo consigo un incremento en la calidad y rendimiento del queso. Con este proyecto de investigación se pretende beneficiar a los pequeños y medianos productores del país trayendo consigo mejora de la calidad de vida, a través de mayores ingresos en la venta de la leche y del queso que producen.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

- Estimar las frecuencias alélicas y genotípicas de variantes de kappa-caseínas en toros reproductores de la raza Pardo suizo y cruces de esta con cebú, en el departamento de Boaco-Nicaragua.

### **2.2. Objetivo específicos**

- Determinar las frecuencias genotípicas en las razas bovinas Pardo suizo, Holstein, Brahmán y Pardo suizo con Brahmán.
- Determinar las frecuencias alélicas en las razas bovinas Pardo suizo, Holstein, Brahmán y Pardo suizo con Brahmán.
- Identificar las variantes genotípicas de Kappa-Caseína en los toros reproductores seleccionados a través de la utilización de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).
- Determinar si la población de los toros reproductores se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación del área del estudio**

La presente investigación se llevó a cabo en las fincas de pequeños y medianos productores pertenecientes al departamento de Boaco, el cual se localiza en las coordenadas geográficas 12° 25' n y 85° 48' o, donde están ubicados los reproductores con fenotipo Pardo suizo y sus cruces con ganado cebú en monta natural (INETER, 2014).

#### **3.2. Diseño experimental**

Se realizó un muestreo no probabilístico por selección intencionada de las fincas, donde estaban los reproductores dobles propósitos pertenecientes a la raza Pardo suizo y los cruces de esta con ganado cebú en edad reproductiva, hasta muestrear un total de 50 reproductores; El muestreo se realizó entre los meses de Marzo a Agosto del 2016

A los reproductores seleccionados bajo los parámetros establecidos se les tomó 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 K3EDTA (10.8 mg) para luego ser preservadas en un termo a una temperatura de 5 grados Celsius y después obtener el plasma y conservarlo a -20 grados Celsius en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria (UNA).

##### **3.2.1. Parámetros de inclusión de los reproductores**

- Edad de los reproductores (2.5 -7.0 años de edad)
- Clínicamente sanos
- Características fenotípicas de la raza Pardo suizo y sus cruzamientos con ganado cebuino
- Que no presenten patologías heredables
- Libres de Brucelosis y Tuberculosis

### **3.3. Estandarización del método**

Previo a la extracción de la muestra de ADN genómico se realizó la respectiva estandarización del método (protocolos y procedimientos) a utilizar.

#### **3.3.1. Extracción del ADN de muestras de sangre**

Para la extracción del ADN genómico de las muestras de sangre obtenidas en el campo, se utilizó la metodología establecida por (Morillo *et al.*, 2014) que consta de los siguientes pasos:

- Tomar 300  $\mu$ l de sangre más 430  $\mu$ l de solución SDS 20%
- Incubar por 6 minutos a 65 °C
- Agregar 300  $\mu$ l de cloroformo y aplicar Vortex durante 10 segundos
- Agregar 260  $\mu$ l de acetato de potasio 5 M y Vortex durante 10 segundos
- Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos
- Recuperar aproximadamente 500  $\mu$ l del sobrenadante
- Precipitar con isopropanol de 800  $\mu$ l
- Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos
- Realizar 2 lavados con etanol al 70 % utilizando 600  $\mu$ l
- Secar y diluir en TE1X entre 20-25  $\mu$ l

Se realizó la evaluación de la calidad e integridad del ADN obtenido en un Gel de Agarosa al 0.8 % en TBE 0.5 X utilizando Gel Red como tinción. Las muestras se corrieron a 70 Volt durante 45 minutos, usando electroforesis horizontal. Los geles se fotografiaron bajo luz ultravioleta usando una cámara digital. La cuantificación de ADN se realizó por comparación de ADN con concentración conocida del bacteriófago Lambda.

### **3.3.2. Amplificación y genotipificación**

El cebador específico de kappa caseína que se utilizó para amplificar un fragmento de 351 bp en reproductores fue: BLKC-For 5`\_ ATT AGCCCATTTTCGCCTTCT-3` y BLKC-Rev 5`\_ ATT TATGGCCATTCCACCAA-3`. La reacción de amplificación se realizó con un volumen final de 25 µl que contenía 100 ng de ADN, 1 µM de cada cebador, un buffer de 10 X PCR, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de dNTPs y 0,5 U de Taq ADN polimerasa. La reacción se sometió a 94 °C durante 5 minutos (desnaturalización inicial), 30 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, 60 °C por 45 segundos seguido de 72 °C durante 7 minutos.

El producto de PCR fue digerido con una enzima de restricción llamada Hinf I en 20 µl de la mezcla de reacción separadamente. La mezcla de reacción comprendió 15 µl de la reacción de PCR, 2 µl de buffer de enzima, 5 U de enzima de restricción y 2.8 µl de H<sub>2</sub>O grado biología molecular. La digestión de la reacción se incubó a 37 °C durante toda la noche, después de la digestión, el producto digerido se resolvió en un gel de agarosa al 3 % a 45 V durante 2.5 h, el gel se visualizó bajo luz ultra violeta una vez teñido con gel rojo.

Las frecuencias alélicas de CSN3 se determinaron mediante el conteo de genes utilizando el programa informático de Excel, haciendo uso de las fórmulas establecidas para la genética de poblaciones.

### **3.4 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de la variabilidad genética se calcularon las frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas de los resultados obtenidos. Para establecer si la población se encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg, se calculó la extensión de la Prueba Exacta de Fisher de 2x3 columnas con un nivel de significancia de 0.05.

### **3.5 Materiales y equipos**

- Alcohol 70 % 2 L
- Algodón 1 Lb
- Tubos de ensayo para 8 ml con k3EDTA paq./100 unidades
- Agujas para vacutainer 20 g x 1 ½ caja de 100 unidades

- Guantes de nitrilo talla M paq/100 unidades

### 3.5.1 Identificación del genotipo de los reproductores seleccionados a través de la utilización de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

#### Metodología:

- Gel Red Tinción para ácido nucleico 0,5 ml (500 uL), 10.000 X en agua, Sustituye EtBr. Excita a 302/312 nm
- Agarosa, grado Biología Molecular, Cristales blancos o polvo cristalino, 200 g.
- BLKC-Rev; Secuencia: ATTTATGGCCATTCCACCAA; Concentración: 50 nmol, pureza: libre de sal; estado: Liofilizado
- BLKC-For, Secuencia: ATTAGCCCATTTTCGCCTTCT; Concentración: 50 nmol, pureza: libre de sal; estado: Liofilizado
- Enzima de restricción Hinf I; Sitio de corte: 5'-G↓A NTCCC-3' 3'-CTNA↑GGG-5'; Concentración: 50 U/μL; 1000 unidades; Fuente: Haemophilus influenzae Rf; Incluye: 2 x 1 mL de 10 X Buffer R y 1mL de 10 X Buffer Tango Almacenaje: -20 °C
- Mezcla dNTP, 10 mM cada uno (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0.2 ML Almacenaje: -20 °C
- Taq AND Polimerasa, 200 U, concentración: 5 U/ML Almacenaje: -20 °C
- Buffer de carga 5 x Para gel de agarosa Fco/5ml
- Tris HCl 1M, grado biología molecular, pH 7.00, libre de proteasa, DNasa y RNasa; 500 mL
- Buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 10 x, libre de proteasa, DNasa y RNasa, grado electroforesis; 1L
- Ácido Bórico, grado electroforesis 500 g
- Punta de pipeta de 10 uL, con filtro, Libre de RNasa, DNasa, estériles, Baja retención; color natural; HRS: 10 x 96; PK/96
- Punta de pipeta de 20 μL, con filtro; Libres de DNasa, RNasa y pirógeno, Estériles; Baja retención; color natural; HRS: 10 x 96 PK/960
- Punta de pipeta de 100 uL, con filtro, libre de RNasa, DNasa, estériles; Aerosol Barrier; color: natural; HRS: 10 x 960; PK/960

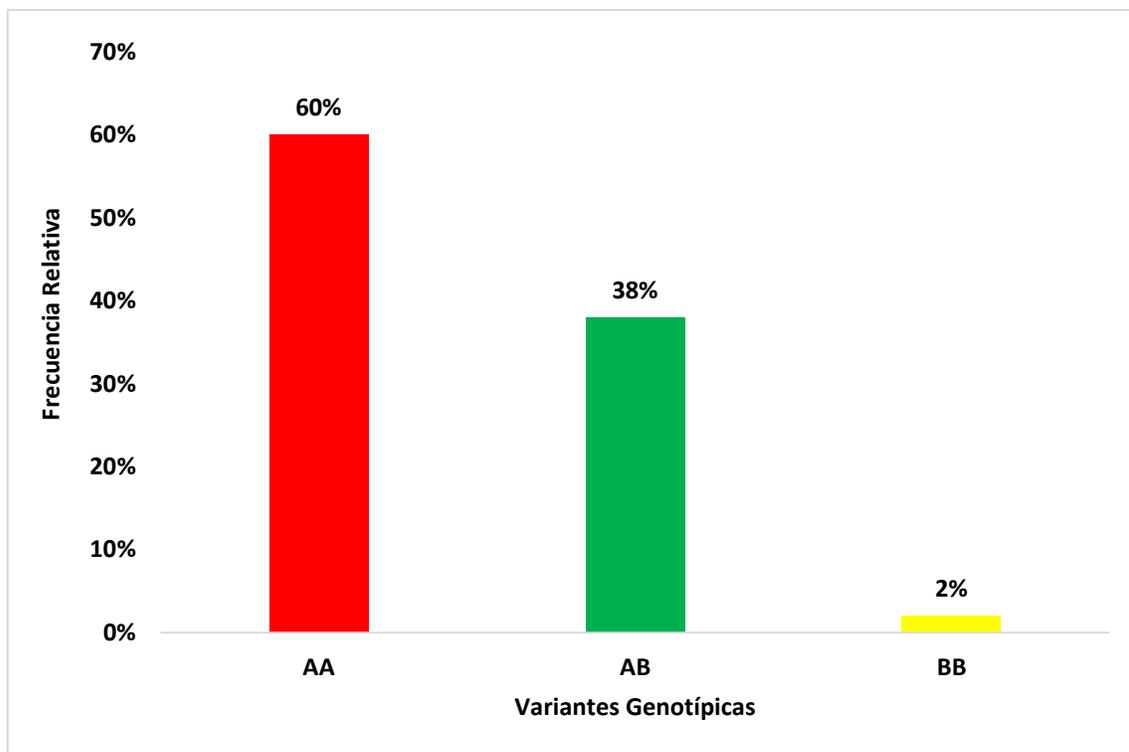
- Punta de pipetas de 200  $\mu$ L; con filtro, Estériles; Baja retención; color: natural, HRS: 10 x 960; PK/960

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó el genotipo de los animales muestreados mediante recuento simple (conteo directo) (ver anexo 17). Luego se procedió al cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas y por último se determinó si los animales muestreados estuvieron en equilibrio Hardy-Weinberg, mediante la prueba exacta de Fisher 2x3.

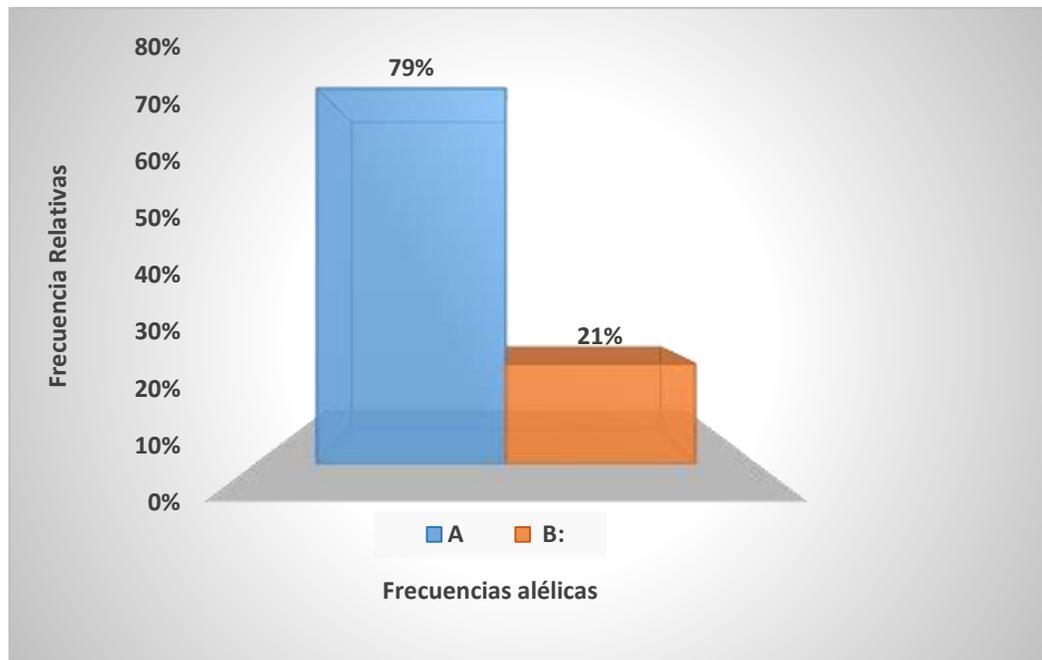
El gráfico 1 muestra las frecuencias genotípicas de los cincuenta reproductores muestreados, encontrándose que el 38 % (19/50) pertenecieron al genotipo AB, 60 % (30/50) al genotipo AA y 2 % (1/50) al genotipo BB.

**Gráfico 1. Frecuencias relativas de los genotipos**



El gráfico 2 muestra las frecuencias Alélicas encontradas en base a las frecuencias genotípicas las cuales fueron de 79 % (0.79) para el alelo A y de 21 % (0.21) para el alelo B.

**Gráfico 2. Frecuencias alélicas**

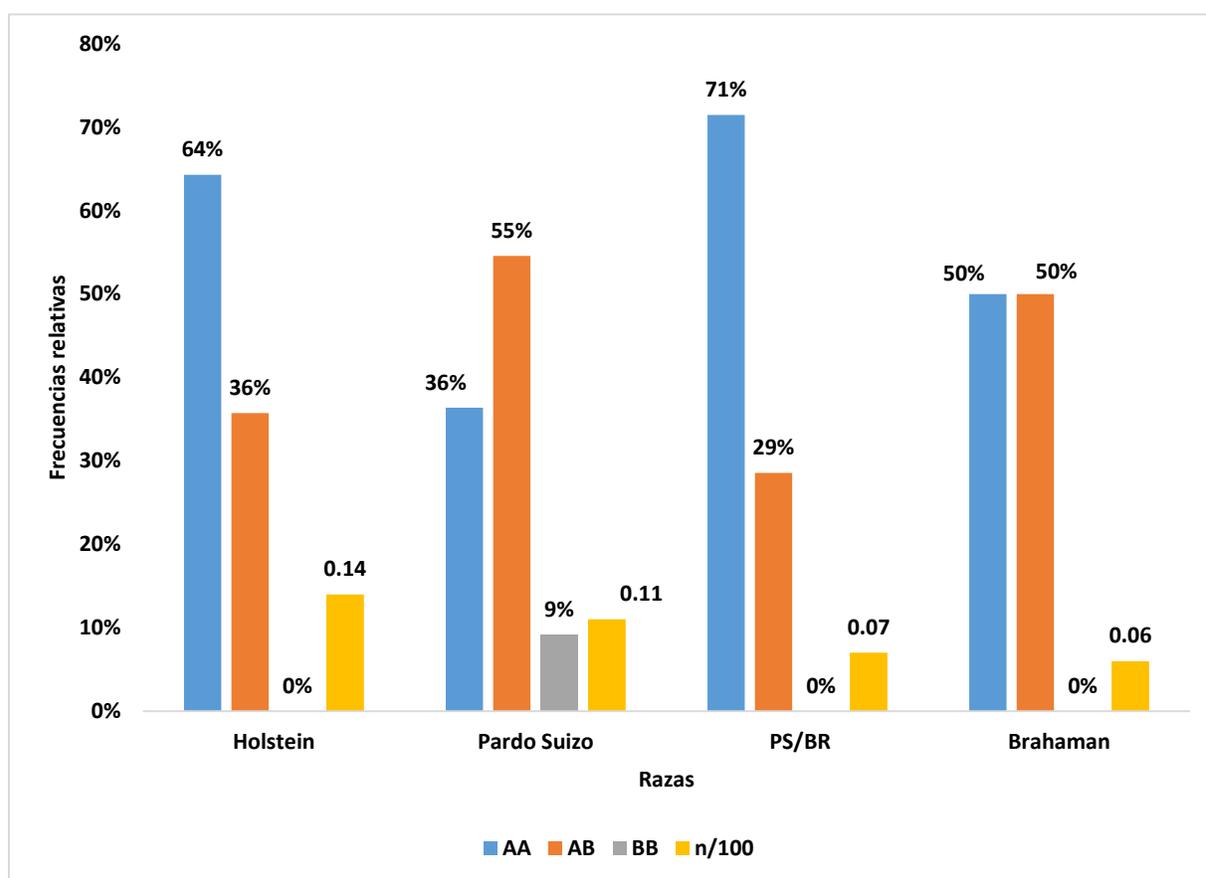


Las frecuencias genotípicas y alélicas de las muestras evaluadas en la raza Holstein resultaron similares a las encontradas en los Holstein de Colombia (Usme-Ciro *et al.*, 2004), resultaron superior a las frecuencias reportadas en el Holstein, Pardo suizo y Pardo suizo con Cebú de México, pero similar en la raza Cebú (Cervantes *et al.*, 2007).

Las frecuencias alélicas de las muestras evaluadas en Pardo suizo resultaron similares a las reportadas en bovinos criollos colombianos (Naranjo *et al.*, 2007).

El gráfico 3 muestra las frecuencias genotípicas de las razas más representativas encontrándose en la raza Holstein un 36 % (5/14) del genotipo AB, 64 % (9/14) del genotipo AA y 0 % (0/14) del genotipo BB, en el Pardo suizo se encontró 55 % (6/11) del genotipo AB, 36 % (4/11) del genotipo AA y 9 % (1/11) del genotipo BB, en el Pardo suizo con Brahmán se encontró 29 % (2/7) del genotipo AB, 71 % (5/7) del genotipo AA y 0 % (0/7) del genotipo BB y en la raza Brahmán se encontró 50 % (3/6) del genotipo AB, 50 % (3/6) del genotipo AA y 0 % (0/6) del genotipo BB.

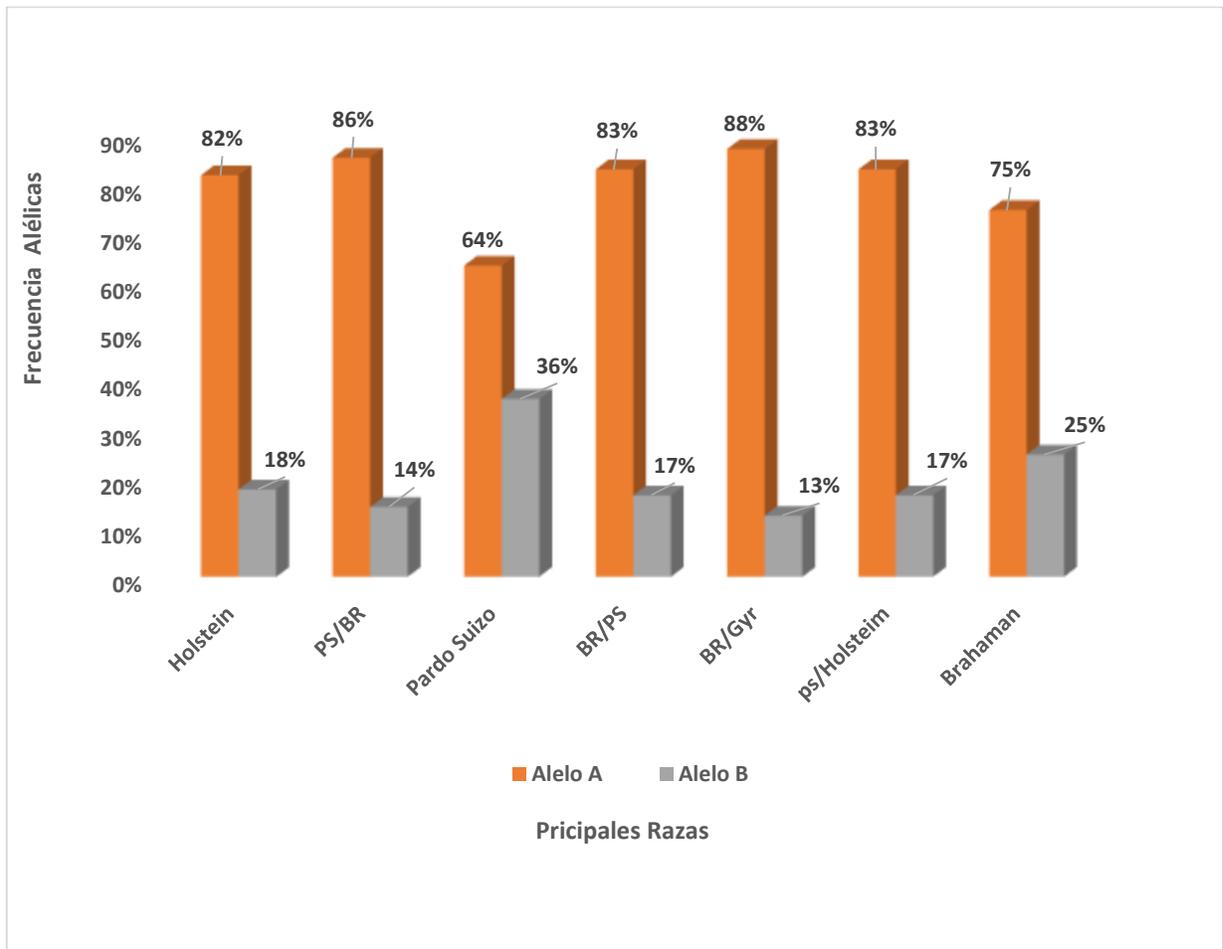
**Gráfico 3. Frecuencias genotípicas de las principales razas**



Desde el punto de vista de estos resultados, se debe esperar que la leche con más actitud para el procesamiento industrial de queso provenga de los animales Pardo Suizo y los menores rendimientos están en el Holstein, PS/BR y Brahaman son los menos favorecidos (Cervantes *et al.*, 2007).

El gráfico 4 muestra las frecuencias alélicas de las razas más representativas encontrándose en la raza Holstein 82 % (0.82) para el alelo A y 18 % (0.18) para el alelo B. En el Pardo suizo 64 % (0.64) para el alelo A y 36 % (0.36) para el alelo B, en el Pardo suizo con Brahmán 86 % (0.86) para el alelo A y 14 % (0.14) para el alelo B y en la raza Brahmán 75 % (0.75) para el alelo A y 25 % (0.25) para el alelo B.

**Gráfico 4. Frecuencias alélicas por raza**



En relación a la raza Brahaman, los resultados no concuerdan con lo descrito por (Escoda *et al.*, 1981) y (Uffo 2003), quienes reportan frecuencias elevadas del alelo A de CSN3 en ganado cebú venezolano (0.90) y cubano (0.84). En este estudio, las frecuencias son semejantes a lo presentado (Kemenes *et al.*, 1999) para ganado cebú brasileño;

La técnica de PCR-RFLP permitió determinar el genotipo de la  $\kappa$ -CN en todas las muestras (50/50), de manera similar a otros reportes (Trujillo *et al.*, 2000; Darshan *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2009) donde se utilizaron diferentes cebadores, pero con resultados similares a nuestra investigación.

La aparente baja frecuencia del genotipo BB en los animales muestreados indicaría que la selección de estos animales ha ido favoreciendo al alelo A y, por consiguiente, generando el incremento del número de animales con genotipo AA, posiblemente como consecuencia de endogamia o de selección de otra característica relacionada al rendimiento quesero, como la producción de litros de leche (Trujillo *et al.*, 2000).

Los animales muestreados no se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg (hay diferencia significativa entre los valores observados) con un valor de Fisher  $2 \times 3 = 0.00005245364$  con 1 grado de libertad ( $p < 0.05$ ) (ver Anexo 19).

## V. CONCLUSIONES

- El genotipo AA de la  $\kappa$ -CN fue el más frecuente (60 %) y el alelo A de la  $\kappa$ -CN el más elevado (79 %) en el estudio realizado.
- La técnica de PCR-RFLP permitió identificar las variantes genóticas de la  $\kappa$ -CN3 en todas las muestras (50/50) encontrándose el genotipo AA en mayor proporción que el BB.
- La población de los reproductores muestreados no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (hay diferencia significativa entre los valores observados) con un valor de Fisher  $2 \times 3 = 0.00005245364$  con 1 grado de libertad ( $p < 0.05$ )
- De todos los animales muestreados en este estudio se encontró que los reproductores con encaste Pardo Suizo son los que presentan la variante genotípica BB.

## VI. RECOMENDACIONES

- Ampliar el estudio en la raza Pardo suizo debido a que presento mayor porcentaje de genotipo AB y BB.
- Muestrear a los hijos de los reproductores que resultaron con genotipo AB para ver la transmisión del gen de la kappa caseína.
- Realizar estudio en otras razas como la raza Jersey para comprobar la alta presencia de genotipo BB reportados en estudios similares a nuestra investigación.
- Hacer investigaciones para determinar la proteína Lacto-globulina para comparar ambas proteínas.

## VII. LITERATURA CITADA

Alfred Pühler (1995), Ingeniería genética de los animales, Amplificación genética, Zaragoza (España) Editorial Acribia, S. A, pág. 60, 65.

Almeyda, M., Rosadio, R., & Maturrano, L. (2016). Genotipos del gen Kappa-Caseína en ganado bovino criollo del distrito de Bambamarca, Cajamarca, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27 (1), 82-90.

Caroli, A., Chessa, S., Chiatti, F., Rignanese, D., Meléndez, B., Rizzi, R., & Ceriotti, G. (2008) Short communication: Carora cattle show high variability in  $\alpha_{s1}$ -casein. *Journal of Dairy Science*. 91:354–359.

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

Corasco. (2010, Noviembre). Diagnóstico de la Infraestructura Terciaria de Transporte en los Municipios Jinotega, Matagalpa, Boaco y Chontales. Recuperado 10 de agosto de 2017, a partir de <https://es.scribd.com/document/314098741/MAPAS-DE-CAMOAPA-pdf>

Darshan, R, Swathi, S, Govindaiah, M, Nagaraja, C, Byregowda, S, Jayashankar, M. 2008. Molecular characterization of kappa-casein gene in buffaloes. *Science Asia* 34: 435-439. doi:10.2306/scienceasia1513-1874.2008.34.435

Denicourt, D., Sabourt M., & McAllister A. (1990). Detection of bovine K-casein genomic variants by the polymerase chain reaction. *Animal Genetics* 21:215-216.

Escoda AB, Alvarez LO, Yerez S. Estudio de los polimorfismos genéticos de las proteínas de la leche producida en algunas haciendas de la zona de Carora. *Rev Facultad Agronomía (LUZ)*. 1981;6(2):714-716.

Fisher 2x3. (s. f.). Recuperado 11 de agosto de 2017, a partir de <http://vassarstats.net/fisher2x3.html>

Gil, Adriana. (2012). Enzimas de Restricción y Electroforesis. Copyright: Attribution Non-commercial, Categories: Types, School Work, Study Guides, Notes, & Quizzes.

Guevara-Garay, L. A., Cuartas-Castaño, D. A., & Llano-Naranjo, F. (2014). Kappa casein of milk: productive, molecular, biochemical and nutritional aspects. *Revista Médica de Risaralda*, 20 (1), 29-33.

Kemenes, PA, Reginato, LCA, Rosa, AJM, Parker, IU, Razook, GA, Figueredo, LA. et al k-casein, b-lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzerá, Caracu, Charolais, Canchin and Santa Gertrudis cattle. *Gen Mol Biol*. 1999; 22:539-541.

Liza, J. (2010) Electroforesis (en línea) consultado el 23 de julio 2015 <http://es.slideshare.net/angelito290184/electroforesis>

Luna, M. (2003). Evaluación de las enzimas de restricción Hind III, Hinf I y Hae III en productos de PCR, para genotipificación alélica de Kappa-caseína en sangre de bovinos. Veracruz (México). Universidad Veracruzana. Pág. 51

Marini, D., Vega, I., & Maggion, L. (1993). Genética Agraria. Enzimas de restricción. Managua (Nicaragua), Universidad Nacional Agraria (UNA-CENIDA), Pág. 209-211.

Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragosa, P., Osta, R., & Rodellar, C. (2016). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista Aquatic* (15).

Morillo, M., Acosta, A., & Uffo, O. (2014). Determinación de las frecuencias alélicas de tres lacto proteínas en bovinos Criollo Limonero y Carora de Venezuela. *Revista de Salud Animal*, 36 (3), 178-188.

Naranjo J, Posso A, Cardenas H, Muñoz J. (2007). Detección de variantes alélicas de la kappa caseína en bovinos Hartón del Valle. Acta Agronómica 56 (1): 43-47.

Nicholas, F.W. (1998). Introducción a la genética veterinaria. Enzima de restricción. Zaragoza (España) Editorial Acribia, S.A. Pág. 49, 60.

Oliva, R. (2004). Genética Médica. Extracción de ADN; Enzimas de restricción; Electroforesis. 3ra Ed. Barcelona, España. Editorial de la Universidad de Barcelona. Pág. 61, 64.

Palma, G., (2001). Biotecnología de la Reproducción, 1era ed. Gustavo Palma. Argentina.

Rivera, O., & Maldonado, I. (2003). Enzimas de restricción y Electroforesis de DNA. Obtenido de <http://academic.uprm.edu/~jvelezg/EnzimasDNA.htm>

Rojas, I., Aranguren-Méndez, J., Portillo, M., Villasmil-Ontiveros, Y., Valbuena, E., Rincón, X. (2009). Polimorfismo genético de la kappa-caseína en ganado criollo Limonero. Rev Cient (Maracaibo)19: 645-649.

Rosero, J. (2009). Polimorfismo de los genes k-caseína,  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina en razas bovinas criollas colombianas. Tesis de Maestría. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 105 p.

Smith, C., Wood, E. (1998). Biología molecular y biotecnología. Enzimas de restricción, Endonucleasas de restricción y sus orígenes. México, Addison Wesley Longman. Pág. 187-188.

Sierra, C (s. f.). Genética de poblaciones. Recuperado a partir de <https://es.scribd.com/document/133791740/GENETICA-DE-POBLACIONES>

Solarte, C., Rosero, C., Cárdenas, H., Burgos, W., Eraso, J., & Zambrano, G. (2009). Identificación de polimorfismos del gen de la Kappa caseína bovina: Nariño-Colombia. *Revista Lasallista de investigación*, 6(2).

Stryer, L. (1988). *Bioquímica*. Tercera edición. Editorial Reverté venezolana, S. A. Venezuela.

Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Novena edición. Madrid, España. Editorial Médica panamericana. Pág. 258-261.

Trujillo, E., Noriega, D., Camargo, M. (2000). Genotipificación de kappa-caseína bovina y evaluación de las frecuencias genotípicas y alélicas de sus polimorfismos en cuatro razas. *Actual Biol* 22: 145-152.

Tsiaras, A., Bargouli, G., Banos, G., & Boscos, C. (2005). Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. *Journal of dairy science*, 88(1), 327-334.

Uffo, O., Martín-Burriel, I., Martínez, S., Ronda, R., Osta, R., Rodellar, C., Zaragoza, P. (2006). Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. *Anim Genet Resource Inf* 39: 15-24. doi: 10.1017/S1014233900002108

Uffo O. *Aplicación de los marcadores moleculares al estudio de la biodiversidad del ganado bovino cubano*. Tesis Doctoral, CENSA, 2003. Cuba.

Ureche, A. (Octubre de 2014). *Electroforesis*. Recuperado de [http://angelicaureche23.blogspot.com/2014\\_10\\_01\\_archive.html](http://angelicaureche23.blogspot.com/2014_10_01_archive.html)

Usme-Ciro, J., Restrepo, F., & Trujillo-Bravo, E. (2004). Kappa-Caseína Bovina y su asociación con el recuento de células somáticas en ganado Holstein. *Actual Biol*, 26 (80), 17-22.

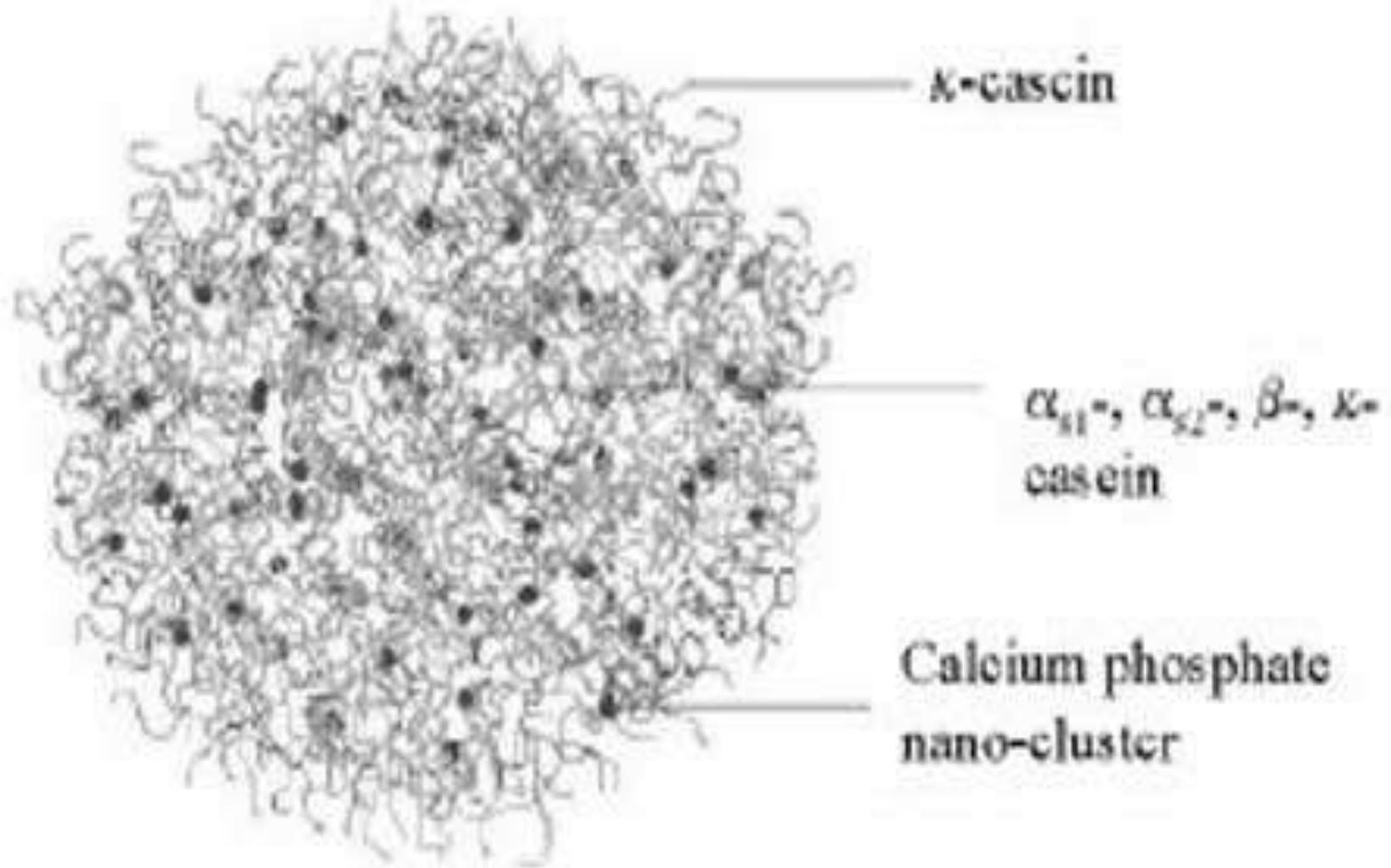
## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Mapa físico del municipio de Camoapa





### Anexo 3. Imagen de la kappa caseína



#### Anexo 4. Examen de aptitud reproductiva potencial y funcional del toro

<b>EXAMEN DE APTITUD REPRODUCTIVA POTENCIAL Y FUNCIONAL DEL TORO</b>						Examen NO.:
					Hora:	Fecha:
Propietario:			Nombre:		Señal: 	
Establecimiento:			Identificación:			
Dirección:			Raza:		Nacimiento:	
Depto:		Sec. Jud.:	Sec. Pol.:		Cond. Corporal:	
Paraje:			Dentición:		Peso:	
Uso:						
<b>EXAMEN GENERAL</b>						
Est. carnes:	Conf. esq.:	Est. gen.:	Unif. con lote.:	Comport.:	Temper.:	Marcha:
Desplazam.:	Ap. Loc.:	Aplomos:	Columna:	Piel:	Obs.	
<b>EXAMEN PARTICULAR</b>						
Est. Dientes:	Boca:	Encías:	Lengua:	Ojo Der.:	Pig. 	Ojo Izq.:
Pecho:	Manos:	Patas:	Escáp. Hum.:	Carpo:	Coxo Fem.:	Rodilla: Tarso:
Pezuñas Manos:	Espacio interdigital manos:		Pezuñas Patas:		Espacio interdigital patas:	
Observaciones:						
					Circunferencia Escrotal (CE) cm:	
<b>GENITALES</b>			Pene:		Escroto:	
Prepucio:					Tono Testicular:	
<b>Testículo Izquierdo</b>			<b>Testículo Derecho</b>			
Desliz:	Dolor:	Temp.	Tamaño:	Desliz:	Dolor:	Temp. Tamaño:
Observaciones:						
<b>Epididimo Izquierdo</b>			<b>Epididimo Derecho</b>			
Cabeza:	Cuerpo:	Cola:	Tono:	Cabeza:	Cuerpo:	Cola: Tono:
Observaciones:						

## Anexo 5. Extracción de sangre de la vena coccígea



## Anexo 6. Pesaje de reactivos



Balanza electrónica



Pesaje de 430 ul de SDS



Pesaje de 260 ul de acetato de potasio



Pesaje de 430 ul de SDS

## Anexo 7. Materiales para la extracción del ADN



Reactivos para la extracción de ADN



Sangre entera con EDTA



Sangre entera con EDTA



Mescla de 300 ul de sangre y 430 de SDS

## Anexo 8. Extracción de ADN



Vortex



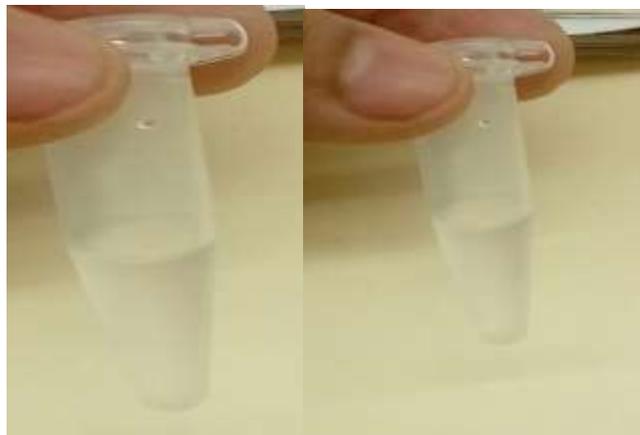
Vorteo de la muestra que se le agrego cloroformo



Centrifuga



Proceso de centrifugación a 12000 rpm

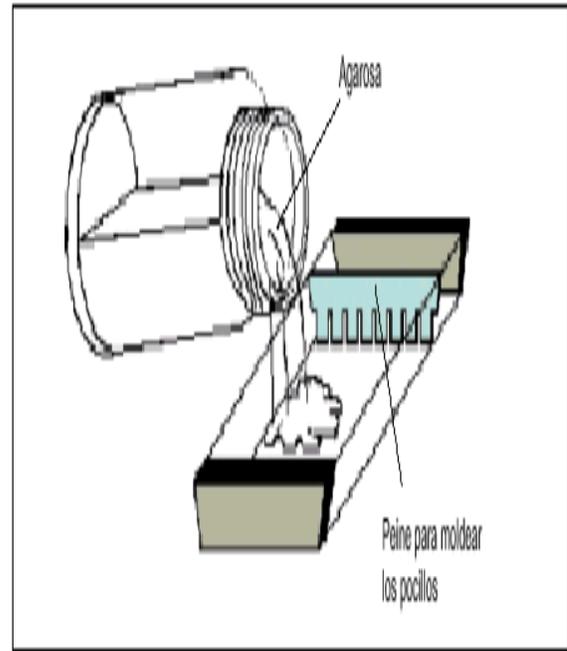


Realización de dos lavados con etanol al 70 %

## Anexo 9. Montaje de muestras en cámara de electroforesis



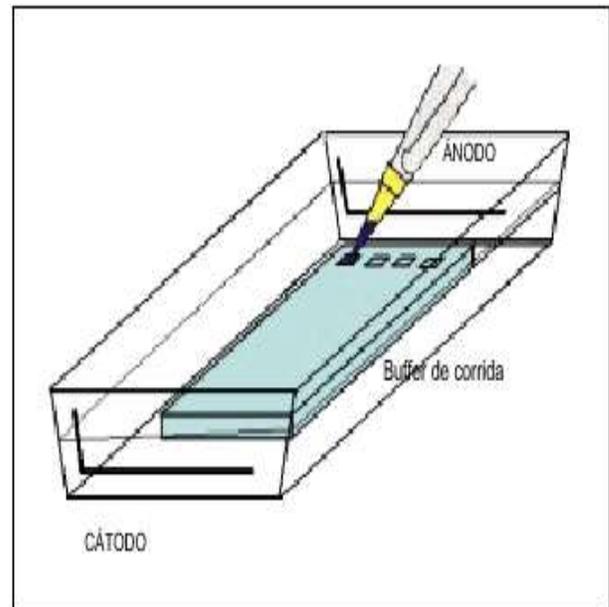
Electroforesis horizontal



Preparación de la cámara de electroforesis para ADN en geles de agarosa



Mescla del ADN con GEL RED



Detalle de la muestra de ADN ingresando en el pocillo de la cámara de electroforesis

## Anexo 10. Lectura de las muestras en cámara de Rayos UV



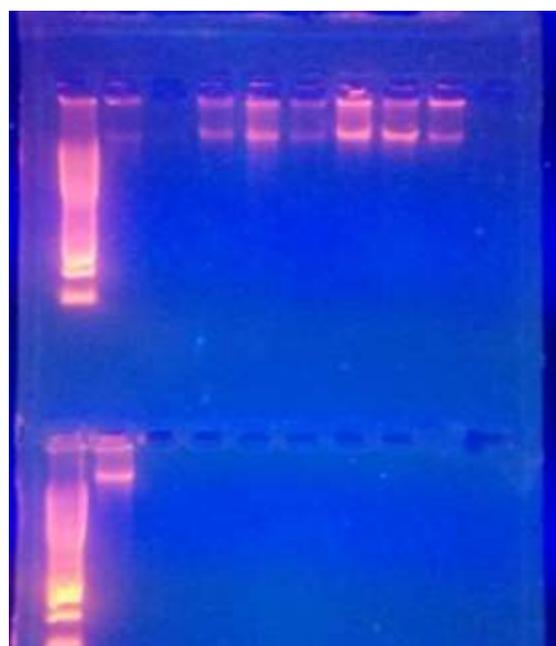
Cámara de electroforesis



Corrida de la muestra a 70 V durante 45 minutos

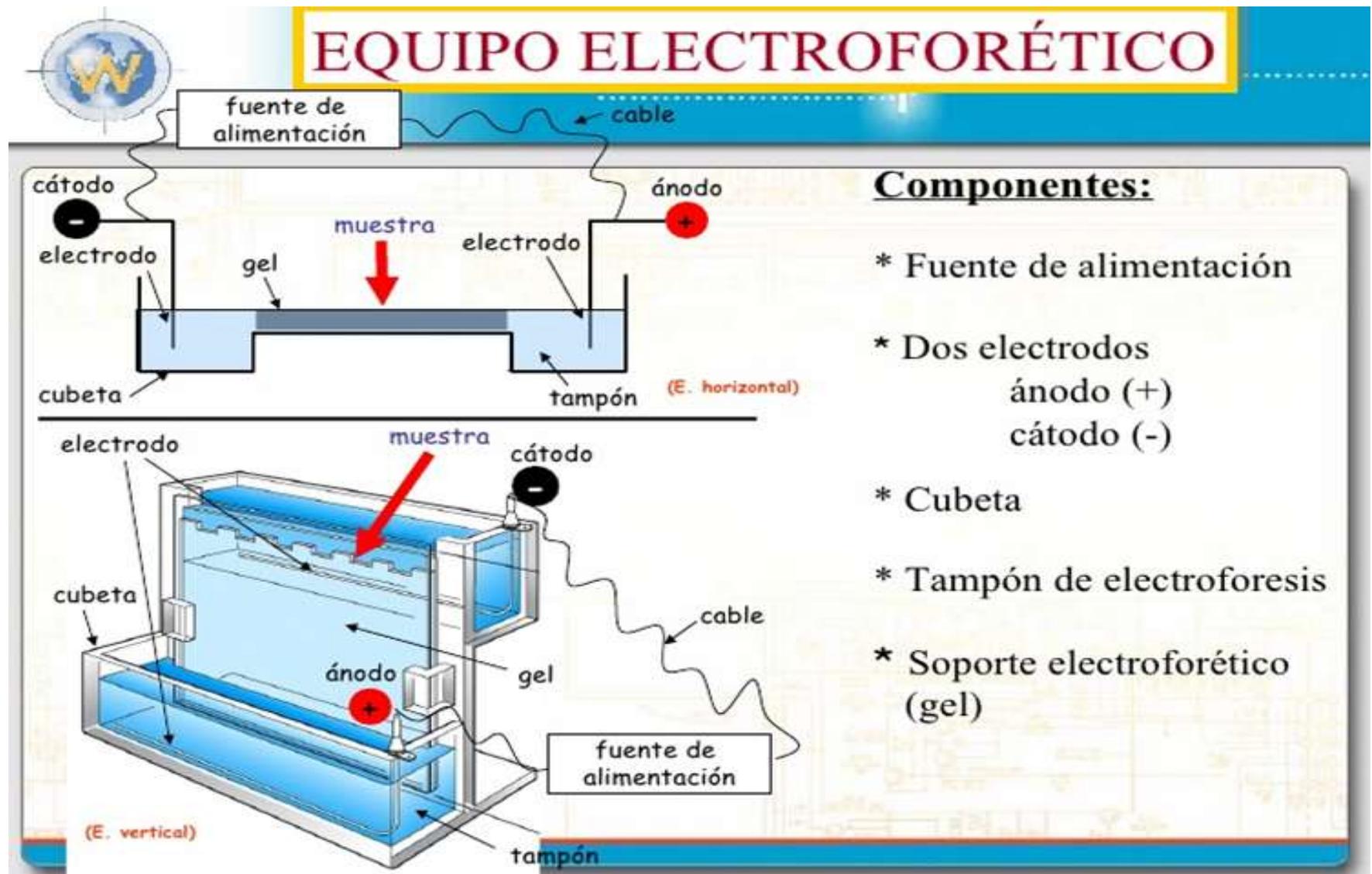


Lectura de las muestras en cámara de Rayos UV

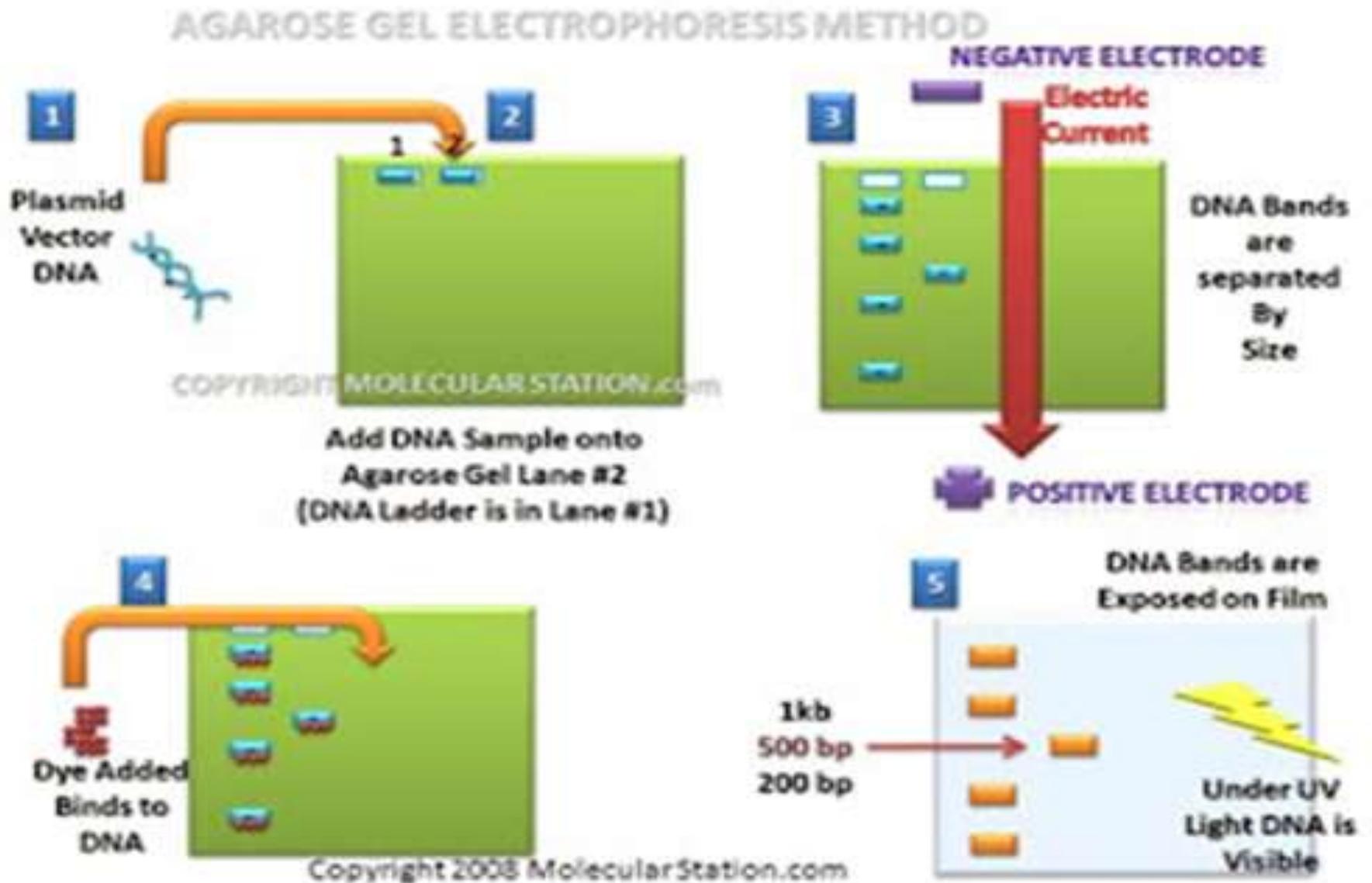


Lectura de las muestras en cámara de Rayos UV

## Anexo 11. Equipo electroforético

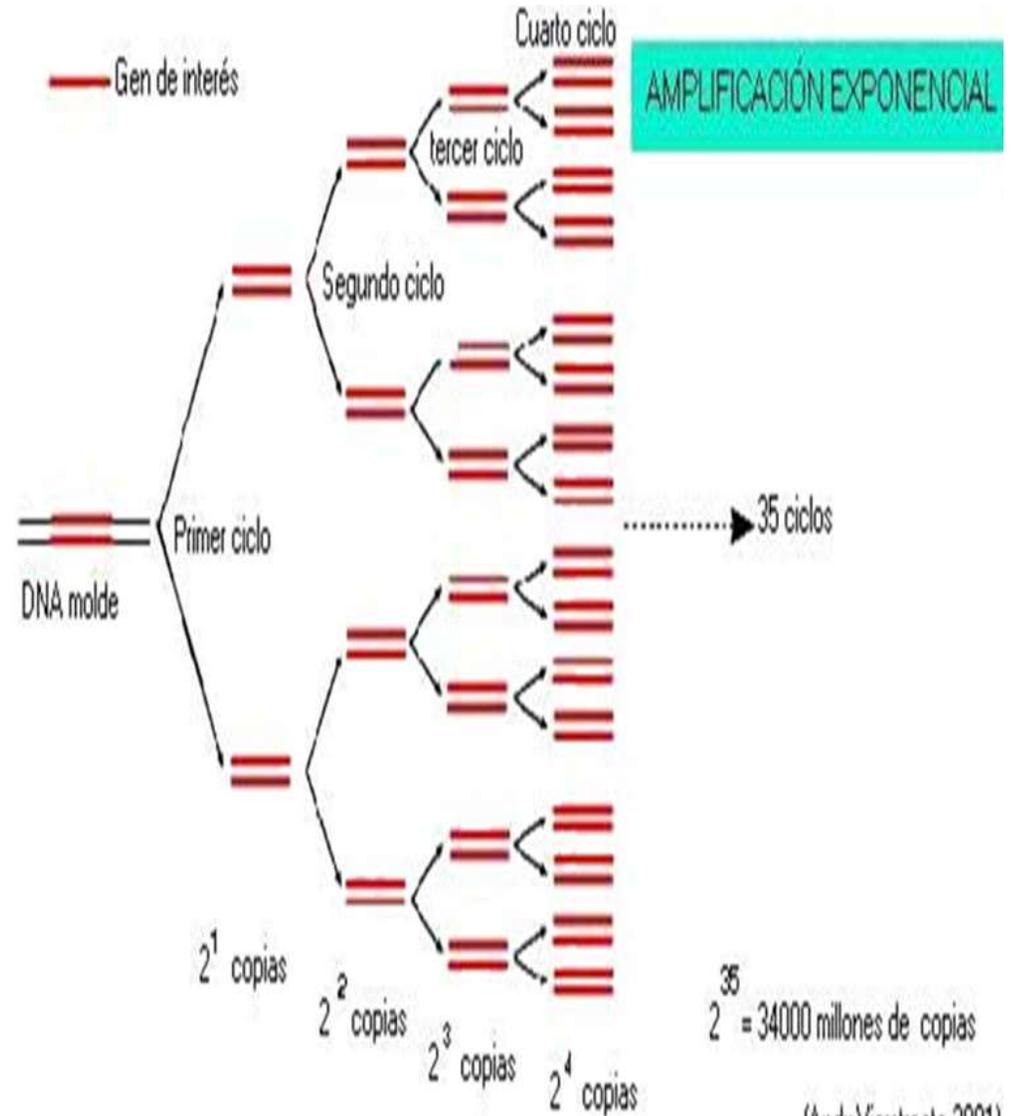
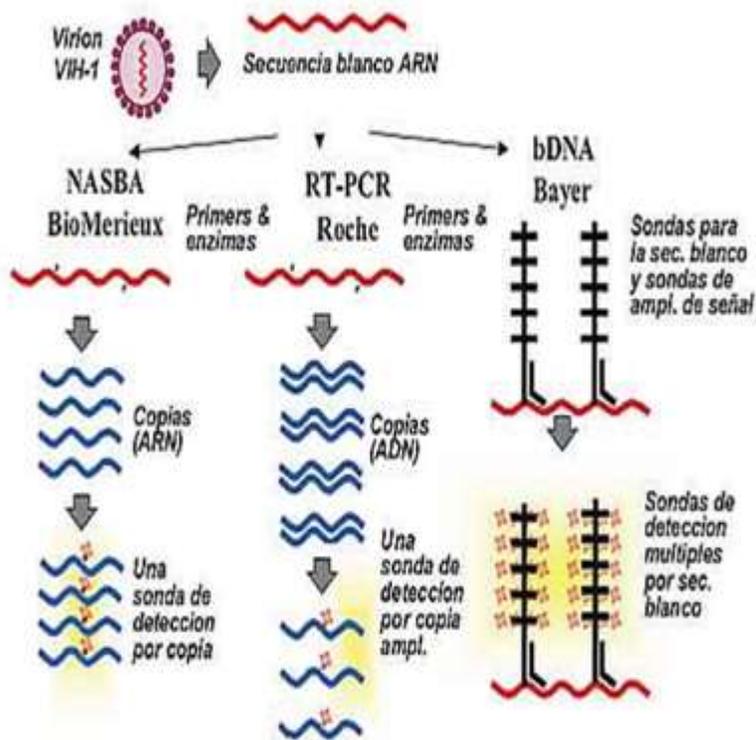


## Anexo 12. Método de electroforesis con gel de agarosa



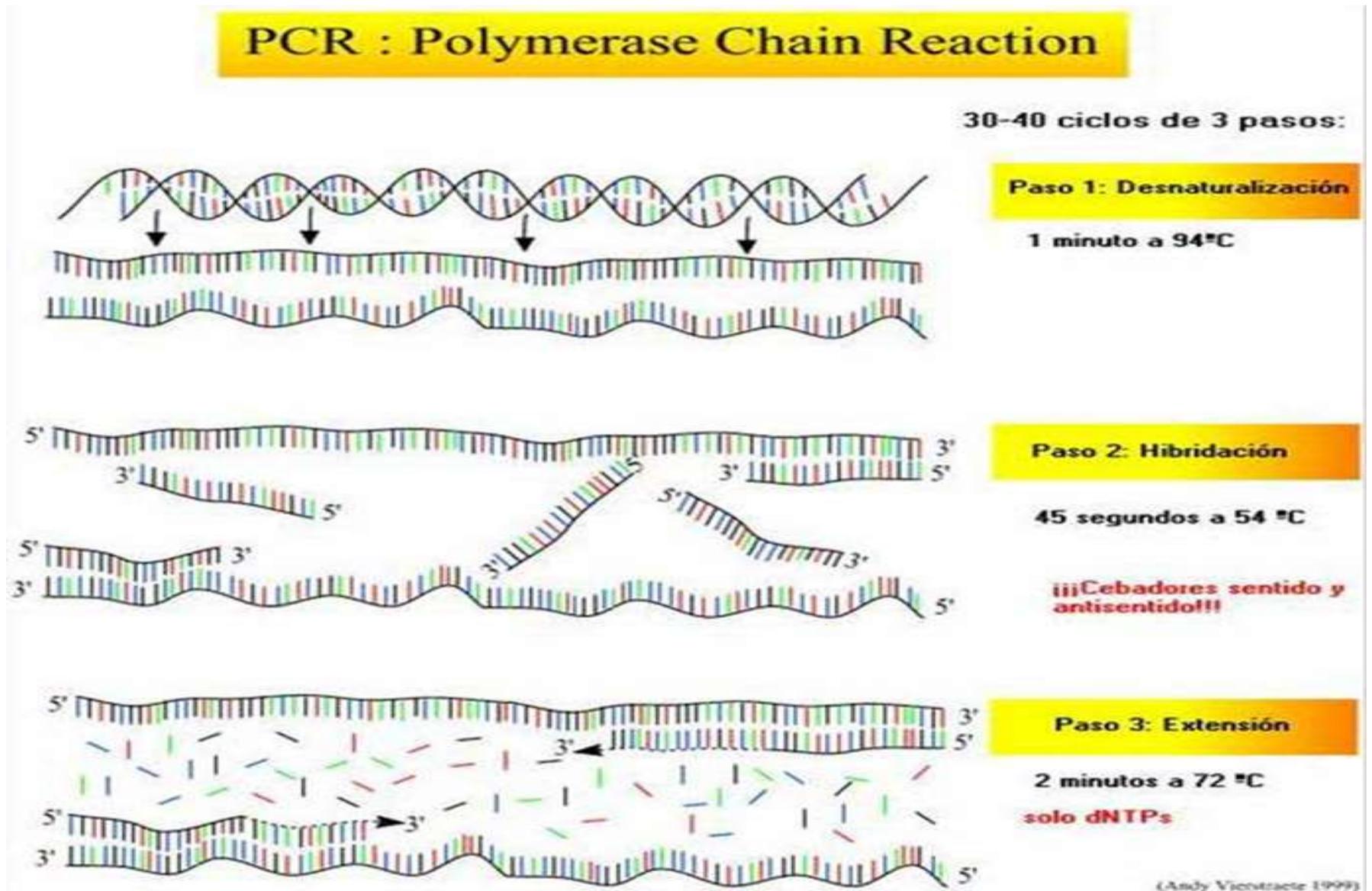
## Anexo 13. Métodos de amplificación genética

### Métodos de amplificación



(Andy Vierstracte 2001)

## Anexo 14. Ciclos del PCR



### Anexo 15. Cálculo de la frecuencia genotípica

Frecuencias Genotípicas				
Genotipos	No. de individuos	Frecuencia Genotípica		
AA	30	30/50 = 0.6	60%	D
AB	19	19/50 = 0.38	38%	H
BB	1	1/50 = 0.02	2%	R
<b>Total</b>	50	1	100%	

$$\text{Frecuencias Genotípicas} = \frac{\text{Número de individuos de un genotipo}}{\text{Número total de individuos}}$$

### Anexo 16. Cálculo de las frecuencias alélicas

Frecuencias alélicas				
No. De individuos	Genotipos	No. de genes		
		A	B	
30	AA	60	0	
19	AB	19	19	
1	BB	0	2	
<b>50</b>		<b>79</b>	<b>21</b>	<b>100</b>

<b>Frecuencia alelo A: 79/100 = 0.79</b>
<b>Frecuencia alelo B: 21/100 = 0.21</b>
<b>1</b>

<b>P=D+1/2H</b>	<b>Q=R+1/2H</b>
<b>P=0.6+0.5(0.38)</b>	<b>Q=0.02+0.5(0.38)</b>
<b>P=0.6+0.19</b>	<b>Q=0.02+0.19</b>
<b>P=0.79</b>	<b>Q=0.21</b>

## Anexo 17. Frecuencia genotípica y alélica por raza

Frecuencia genotípica por razas				Frecuencia alélica
Raza	Genotipo	No. de individuos	Frecuencia Genotípica	
Holstein	AA	9	0.64	0.82
	AB	5	0.36	0.18
<b>TOTAL</b>		14	1.00	
PS/BR	AA	5	0.71	0.86
	AB	2	0.29	0.14
<b>TOTAL</b>		7	1.00	
Pardo Suizo	AA	4	0.36	0.64
	AB	6	0.55	0.36
	BB	1	0.09	
<b>TOTAL</b>		11	1.00	
BR/PS	AA	2	0.67	0.83
	AB	1	0.33	0.17
<b>TOTAL</b>		3	1.00	
BR/Gyr	AA	3	0.75	0.875
	AB	1	0.25	0.125
<b>TOTAL</b>		4	1.00	
Reyna/BR	AA	1	1.00	
<b>TOTAL</b>		1	1.00	

### Anexo 18. Frecuencia genotípica y alélica por raza (continuación)

Frecuencia genotípica por razas				Frecuencia alélica
Raza	Genotipo	No. de individuos	Frecuencia Genotípica	
ps/Holsteim	AA	2	0.67	0.83
	AB	1	0.33	0.17
<b>TOTAL</b>		<b>3</b>	<b>1.00</b>	
Brahaman	AA	3	0.50	0.75
	AB	3	0.50	0.25
<b>TOTAL</b>		<b>6</b>	<b>1.00</b>	
Jersy/PS	AA	1	1.00	
<b>TOTAL</b>		<b>1</b>	<b>1.00</b>	

### Anexo 19. Test exacta de Fisher 2x3

Alelos	Genotipos			Resultado del Test de Fisher
	AA	AB	BB	
A	60	19	0	<b>0.00005245364</b>
B	0	19	2	