

ARTÍCULO ORIGINAL

Determinación de las frecuencias alélicas de tres lactoproteínas en bovinos Criollo Limonero y Carora de Venezuela

Milangela Morillo^I, Atzel Acosta^{II}, Odalys Uffo^{II*}

^IInstituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Estación Coro, Venezuela. ^{II}Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: La caracterización genética del ganado autóctono supone conocer la situación de las poblaciones para su conservación. Aunque en Venezuela se han realizado estudios de caracterización de ganado Carora y Criollo Limonero, estos han sido aislados y no se han efectuado con la intención de esclarecer si la estructura genética para los genes de las tres principales proteínas lácteas, en dichas razas bovinas venezolanas, Criollo Limonero y Carora, refleja su variabilidad genética. Por dicha razón se determinaron los genotipos para las tres principales proteínas lácteas: κ -caseína, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina en rebaños controlados. Para la caracterización de dichas razas se calcularon las frecuencias alélicas, las heterocigosidades por *locus* para cada población y se determinaron los parámetros de equilibrio de Hardy Weinberg, así como las relaciones entre ellas. Se identificaron los alelos más frecuentes para cada proteína en los rebaños y se utilizó, como población de referencia, el Siboney de Cuba. Se comprobó que existe alta variabilidad en las dos poblaciones venezolanas analizadas, herramienta importante para el diseño y control de programas de mejoramiento. Está disponible un banco de ADN de ambas razas, así como la metodología de análisis de marcadores moleculares para la caracterización del ganado bovino venezolano, como base para futuros estudios de asociación con caracteres de interés productivo a ser evaluados como indicadores de selección o conservación, u otras aplicaciones de interés económico.

Palabras clave: bovino, Carora, Criollo Limonero, proteínas lácteas, PCR-RFLP.

Determination of allelic frequencies of three lactoproteins in Limonero Creole and Carora cattle in Venezuela

ABSTRACT: The genetic characterization of the autochthonous livestock requires to know the situation of populations for its conservation. Although characterization studies of Carora and Limonero Creole Cattle studies have been conducted in Venezuela, they have been isolated, not being carried out to determine whether gene structure for the genes of the three main milk proteins in these cattle breeds, Venezuelan Limonero Creole and Carora reflects its genetic variability. For this reason, the genotypes for the three main milk proteins were determined: κ -casein, α -lactalbumin and β -lactoglobulin in controlled herds. The allelic frequencies and heterocigosities per *locus* were calculated for the characterization of these breeds per *locus* and for each population and Hardy Weinberg equilibrium parameters, as well as the relationships between them were determined. The most frequent alleles for each protein were identified in each herd and the Siboney de Cuba population was used as reference. It was found that there is a high variability in the two Venezuelan populations analyzed, which is an important tool for the design and control of the breeding programs. There is an available DNA bank of both breeds as well as the methodology of molecular marker analysis for the characterization of the Venezuelan cattle as a basis for future studies of association with characters of productive interest to be evaluated as selection or conservation indicators, or other applications of economic interest.

Key words: cattle, Carora, Limonero Creole, milk proteins, PCR-RFLP.

*Autor para correspondencia: Odalys Uffo. Correo electrónico: uffo@censa.edu.cu

INTRODUCCIÓN

Por estar adaptadas al medio, las razas propias de cada localidad tienen un gran potencial para incrementar su producción. El éxito en la conservación de las razas de interés en producción animal dependerá finalmente, tanto del desarrollo de las políticas de conservación en países individuales, como de la filosofía de las agencias internacionales para el desarrollo. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (1) ha desarrollado un programa integrado para el manejo global de los recursos genéticos. El éxito de esta iniciativa y otras similares tendrá una importancia vital para la conservación de los recursos biológicos que iniciaron y sostienen la civilización humana (2).

En Venezuela, aproximadamente el 70% de la producción láctea nacional lo aporta la ganadería de doble propósito (3), donde se cuenta con una raza de gran valor como lo es el Criollo Limonero, orientado hacia la producción de leche, la cual registra producciones de 2.195 Kg de leche por lactancia de 297 días, e intervalos entre partos de 399 días (4); posee características atractivas como: resistencia a enfermedades, alta eficiencia reproductiva, docilidad de manejo y alta calidad de leche y carne (5).

El ganado Criollo Limonero es un *Bos taurus* tropical, oriundo de la península Ibérica, introducido a tierras venezolanas por Cristóbal Colón, entre los años 1520 y 1560. Esta raza se ha adaptado a las condiciones ambientales tropicales, altamente resistente a plagas y enfermedades, con alta eficiencia reproductiva y docilidad, gran facilidad de las hembras al parto, así como cualidades de termorregulación y longevidad, por lo que constituye un material genético a considerar en los planes de desarrollo de la ganadería de doble propósito y en la especializada en leche para las zonas bajas tropicales (6).

La raza Carora es originaria de la región de Carora, al occidente de Venezuela, en una zona con clima árido y con una tradición quesera consolidada y formada en las primeras décadas del siglo XX, a partir de los ganados Criollo y el Pardo Suizo, que dieron lugar a un tipo de animal capaz de adaptarse a las adversas condiciones tropicales (clima y forrajes) y que presenta, con un adecuado manejo, niveles productivos comparables a los de las razas europeas que actúan en las mismas condiciones (7).

Ambas poblaciones han sido objeto de diferentes investigaciones con la finalidad de actualizar y completar la información de la que se dispone, para contri-

buir tanto al mejoramiento genético utilizando técnicas de reproducción asistida, como a su conservación en calidad de ganado autóctono venezolano (8, 9, 10, 11). En la región centro occidental del país, específicamente Anzoátegui y en la región central (Aragua), se plantea la introducción del ganado Criollo Limonero y Carora para la Inseminación Artificial y la transferencia de embriones.

Sin embargo, aún es insuficiente la información disponible sobre la estructura genética en estas poblaciones para los genes de las principales proteínas lácteas asociadas con caracteres de calidad de la leche. En el caso particular de los genotipos de la α -lactoalbúmina, la β -lactoglobulina y la κ -caseína bovinas en los ganados Criollo Limonero y Carora, se pudieran incluir como indicadores en los programas de selección y mejoramiento genético, previa verificación de su asociación con los caracteres productivos. Las proteínas de la leche se han investigado ampliamente en países del continente americano, por su gran potencial de uso en este tipo de Selección Asistida por Marcadores, así como para la caracterización y diferenciación de poblaciones (12, 13, 14, 15). Los métodos basados en la identificación de polimorfismos de ADN, para el estudio de los genes que codifican para estas proteínas, se usan en un gran número de investigaciones, pues no dependen del sexo ni del estado de desarrollo fisiológico del individuo a caracterizar.

El objetivo de esta investigación fue determinar la estructura genética de los genes que codifican para la α -lactoalbúmina, la β -lactoglobulina y la κ -caseína bovinas en los ganados Criollo Limonero y Carora de Venezuela, para evaluar la variabilidad genética de ambas poblaciones a través de marcadores PCR-RFLP.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Población y Muestra

Se tomaron muestras de sangre periférica de un conjunto de hembras bovinas de las razas Criollo Limonero (n=70) (Estación Experimental Local Carrasquero-INIA, Zulia) y Carora (n=49), ubicados en la estación INIA-CENIAP en Maracay, Estado Aragua, Venezuela. Se siguieron los métodos convencionales de extracción de sangre (5 a 10 ml por animal) y se usó como anticoagulante EDTA-potásico 1.5 mg/ml de sangre. Conjuntamente, se tomaron muestras de 38 individuos de la raza Siboney de Cuba, provenientes de la misma estación, que fueron utilizados como rebaño control. Las muestras de sangre fueron conservadas a una temperatura de -20°C, hasta su uso.

- Obtención del material genético

El aislamiento y purificación de ADN a partir de sangre total se realizó de acuerdo al método descrito por Dellaporta (16). Se observó la presencia de las bandas de ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1%, en solución tampón TAE 1X, teñidos con SYBR Green I (Invitrogen 10000x; dilución final 1:10 000) y se determinó la concentración y del ADN obtenido por medición de densidad óptica, utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

- Tipificación por PCR/RFLP de los genes que codifican para las proteínas lácteas

Las condiciones de reacción de PCR para todas las proteínas lácteas fueron las descritas por Uffo *et al.* (13). Se preparó una mezcla de reacción 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.5mM MgCl₂, 0.1% de Triton X-100, 0.2 mM de dNTPs, 75 pmol de cada uno de los oligonucleótidos específicos para cada caso (17, 18) y una unidad de *Taq* Polimerasa (Promega), en un volumen final de 50 ml.

Se tomaron 10 µl de cada uno de los productos amplificados y se les realizó digestión enzimática con las endonucleasas de restricción específicas para cada fragmento (*k*-caseína(CSN3)/*Hind* III, α -lactoalbúmina (LAA)/*Msp* I y β -lactoglobulina (LGB)/*Hae* III), en un volumen final de 15 µl, con 1U de cada enzima, 1.5 µl de solución tampón específico, y se completó el volumen con agua libre de nucleasas. Las reacciones de digestión se realizaron incubando las mezclas de reacción a 37°C durante 3h (13) y los resultados se visualizaron en geles de agarosa 2% en solución tampón TBE 0.5X.

- Análisis estadístico de los datos

- Variación dentro de la población

Para el estudio de la variabilidad genética se utilizó el programa Biosys-1 (19). A partir de los genotipos obtenidos se calcularon las frecuencias alélicas, el número medio de alelos por *locus*, la heterocigosidad estimada por conteo directo y no sesgado, así como el porcentaje de *loci* polimórficos, cuando la frecuencia del alelo más común fue menor que 0.95. Con el programa GENEPOP 3.1 (20) se realizaron ensayos de probabilidades para determinar las posibles desviaciones de las proporciones de Hardy-Weinberg.

- Variación entre poblaciones

Para estimar la relación genética existente entre las cinco poblaciones, se aplicó un análisis de componentes principales con el empleo del programa SPSS versión 8.0.0 (SPSS Inc., Chicago), partiendo de la frecuencia genotípica de los tres *loci* estudiados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las muestras de ADN tuvieron la concentración y la calidad requeridas para ser utilizadas como molde para estudios moleculares; lo que demuestra la utilidad del método de extracción empleado, que ofrece garantía para usar el ADN obtenido como molde para la PCR.

Variación intra-raza. Análisis de cada *loci* de manera individual

Las frecuencias de las tres proteínas lácteas (Tabla 1) se calcularon a partir de los genotipos obtenidos para cada individuo.

De manera general, se observa la presencia de los principales alelos descritos para las proteínas estudiadas en las dos poblaciones venezolanas de interés, y se comprueban estos en la población de referencia.

- κ -caseína (CSN3)

En la Figura 1 se muestran imágenes de la amplificación y digestión del amplicón obtenido para el gen de la κ -caseína (CSN3).

Como resultado de la tipificación del *locus* CSN3, se obtiene que los rebaños analizados muestran valores de frecuencias genotípicas intermedios, pero con un ligero incremento en el alelo CSN3^B, cuyos valores de frecuencias fueron de 0.59 en el Criollo Limonero y de 0.57 para el ganado Carora. Estos resultados coinciden con los descritos por Rojas *et al.* (9), quienes hallaron con mayor frecuencia el alelo B en un rebaño de ganado Criollo Limonero del estado del Zulia. No se han encontrado referencias de estudios de esta naturaleza realizados en ganado Carora. Las frecuencias obtenidas para la población control coinciden en comportamiento con las descritas previamente por Uffo *et al.* (13) y Acosta *et al.* (21), quienes describen, como más común para esta proteína, al alelo A en el ganado Siboney de Cuba.

Estos hallazgos en los valores de las frecuencias génicas son bastante similares a los observados en poblaciones Rubia Gallega, Chaqueño Boliviano y al ganado N'Dama Africano (22, 23); sin embargo, son diferentes a los resultados publicados para otros rebaños Criollos estudiados en el continente americano (12, 22, 24,25). Nuestros resultados también difieren de los descritos por Azevedo *et al.* (26) para varias razas brasileras, donde la frecuencia del alelo B se encontraba entre 0.01 y 0.30.

Existen mínimas diferencias en cuanto a la distribución de frecuencias genotípicas encontradas para el rebaño Carora, analizado en este estudio, y lo previamente

TABLA 1. Frecuencias génicas y genotípicas de las principales variantes de las tres proteínas lácteas estudiadas./ *Allelic and genotypic frequencies of the main variants of the three milk protein studied*

Variantes	Población		
	Criollo Limonero	Carora	Siboney de Cuba
Frecuencias génicas			
CSN3	N=70	N=49	N=37
A	0.41	0.43	0.61
B	0.59	0.57	0.39
LAA	N=71	N=48	N=33
A	0.06	0.02	0.12
B	0.94	0.98	0.88
LGB	N=74	N=50	N=37
A	0.21	0.34	0.18
B	0.79	0.66	0.82
Frecuencias genotípicas			
CSN3AA	0.04	0.12	0.08
CSN3AB	0.33	0.43	0.21
CSN3BB	0.3	0.45	0.71
	N=70	N=49	N=33
LAAAA	0	0	0
LAAAB	0.13	0.04	0.24
LAABB	0.87	0.96	0.76
	N=71	N=48	N=33
LGBAA	0.19	0.26	0.38
LGBAB	0.43	0.34	0.46
LGBBB	0.38	0.40	0.16
	N=74	N=50	N=37

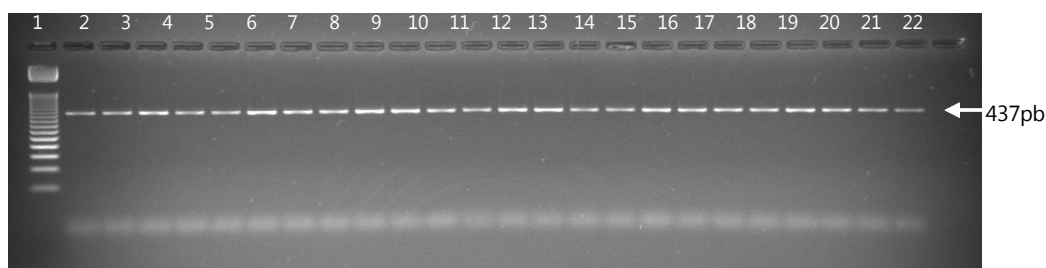


FIGURA 1A. Resultados de la amplificación por PCR del gen CSN3. Línea 1. MWM 50pb. Líneas 2-25: Amplicones para el loci CSN3, Línea 26 control negativo./ *Results of PCR amplification of the CSN3 gene. Line 1: MWM 50 bp. Line 2-25: Amplicons for loci CSN3. Line 26: negative control.*

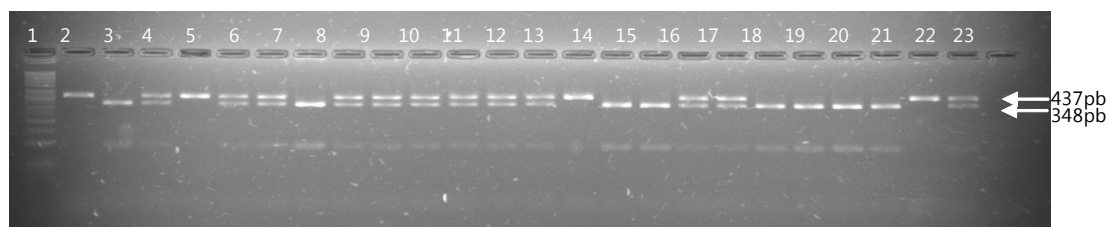


FIGURA 1B. Resultado de la digestión del gen CSN3 con la enzima *Hind III*. Línea 1. MWM 25pb. Línea 2: Producto amplificado sin digerir; líneas 5, 15, 24: muestras con genotipo CSN3^A/CSN3^A; Líneas 3, 8, 16, 17, 20-23: muestras con genotipo CSN3^B/CSN3^B; Líneas 4, 6, 7, 9-14, 18, 19, 25: muestras con genotipo CSN3^A/CSN3^B./ *Results of the enzymatic digestion of the CSN3 gene with Hind III enzyme. Line 1: MWM 25bp. Line 2: Amplified product without digestion. Lines 5, 15, 24: samples with genotype CSN3^A/CSN3^A. Lines 3, 8, 16, 17, 20-23: samples with genotype CSN3^B/CSN3^B. Lines 4, 6, 7, 9-14, 18, 19: samples with genotype CSN3^A/CSN3^B.*

te descrito por Pacheco *et al.* (27) para rebaños de esta raza que muestran valores de 0.11, 0.60 y 0.29 para CSN3^{AA}, CSN3^{AB} y CSN3^{BB}, respectivamente. Esto puede estar relacionado con la presencia de factores propios de los datos analizados, tales como inclusión de muestras provenientes de animales élitos, con características asociadas con una producción eficiente de leche. En ambos estudios se mantiene la proporción de alelo A menos frecuente con respecto al alelo B.

• α -lactoalbúmina (LAA)

En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos para la amplificación de las muestras de ADN (2A) y su digestión (2B) del gen de la α -lactoalbúmina.

Nuestros resultados coinciden con lo publicado por varios autores para el gen LAA bovino, con la identificación de las dos variantes mayoritarias (A y B). En tal sentido, se ha identificado el alelo B como mayoritario en rebaños *Bos taurus*; sin embargo, otros autores (28) han descrito mayor frecuencia del alelo A en gana-

do de Sudáfrica, descendientes de poblaciones europeas. En rebaños cruzados *B. indicus* x *B. taurus* aparecen ambas variantes, mientras que una tercera variante, denominada C, se ha identificado en ganado de Bali (*B. javanicus*).

El comportamiento de las frecuencias génicas para el gen LAA, encontrado en las poblaciones venezolanas estudiadas, es semejante al descrito para ganado autóctono europeo de origen *Bos taurus*, donde esta proteína se comporta como monomórfica para la variante B (29). Los resultados son igualmente similares a los obtenidos para otros ganados bovinos Criollo del continente americano, en los que se ha determinado con evidencias paleontológicas, evolutivas, bioquímicas, citogenéticas y moleculares, que el Criollo argentino no presenta esta característica propia del *Bos indicus*. Esto sugiere que la introgresión de dichas razas en el ganado argentino no tuvo una influencia importante en su constitución genética (30).

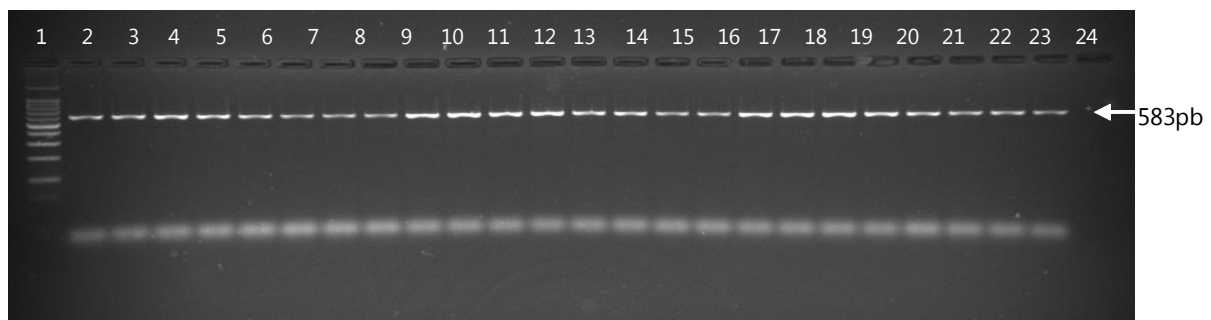


FIGURA 2A. Resultados de la amplificación por PCR del gen LAA. Línea 1. MWM 100pb. Líneas 2-25: Amplicones para el loci LAA, Línea 26 control negativo./ *Results of the PCR amplification of LAA gene. Line 1: MWM 100bp. Lines 2-25: Amplicons for loci LAA. Line 26: negative control.*

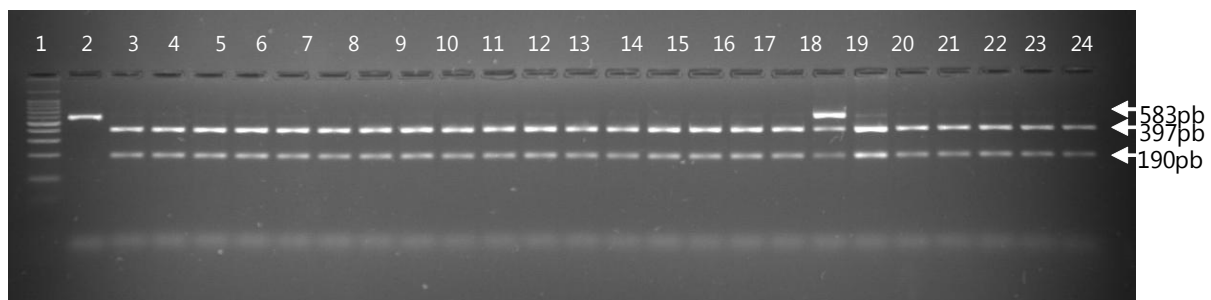


FIGURA 2B. Resultados de la digestión del gen LAA con la enzima *Msp* I. Línea 1. MWM 100pb. Línea 2. Producto amplificado sin digerir; Líneas 3-19, 21-26: muestras con genotipo LAA^B/LAA^B; Línea 20: muestra con genotipo LAA^A/LAA^B./ *Results of the enzymatic digestion of the LAA gene. Line 1: MWM 100bp. Line 2: Amplified product without digestion. Lines 3-19, 21-26: simple with genotype LAA^B/LAA^B. Line 20: Sample with genotype LAA^A/LAA^B.*

En el rebaño de la población utilizada como control, se encontró una frecuencia superior del alelo A con respecto a las poblaciones venezolanas, pero muy inferior a las descritas por Uffo *et al.* (13) y Acosta *et al.* (21) en rebaños Siboney de Cuba. Incluso, en el rebaño importado a Venezuela, no se identificaron individuos homocigóticos para el alelo en cuestión, aunque sí heterocigotos pero no en número abundante. Esto pudiera ser el resultado de la selección al azar en el momento de escoger los animales para ser trasladados de la isla de Cuba a Venezuela.

No se han identificado evidencias de estudios de variabilidad genética que utilicen esta proteína en ganado venezolano.

• β -lactoglobulina (LGB)

La figura 3 muestra los resultados de la amplificación del gen de la LGB y la digestión del fragmento amplificado con la enzima *Hae* III.

El alelo B de esta proteína aparece con mayor frecuencia que LGB^A y con valores semejantes en los rebaños venezolanos analizados (Criollo Limonero: 0.79; Carora: 0.66). Además los resultados coinciden con lo descrito previamente para el ganado Siboney de Cuba (15, 24): 0.80, Cebú: 0.76 y Criollo: 0.70. Este alelo se encuentra ampliamente distribuido en poblaciones *Bos taurus* y *Bos indicus*, como alelo predominante. Ejemplo de ello es que aparece en poblaciones cebuinas brasileñas (31) y en razas nórdicas, donde 20 de estas presentaron frecuencias superiores a 0.5, de un total de 22 razas estudiadas (53). También se observa este comportamiento de altas frecuencias del alelo B en poblaciones *Bos Taurus* y *Bos indicus* incluidas en los estudios de Ceriotti *et al.* (33).

A su vez, los resultados difieren en cuanto a las frecuencias genotípicas al predominar en el presente estudio los individuos heterocigotos (0.43), mientras que en el rebaño de referencia el genotipo más abun-

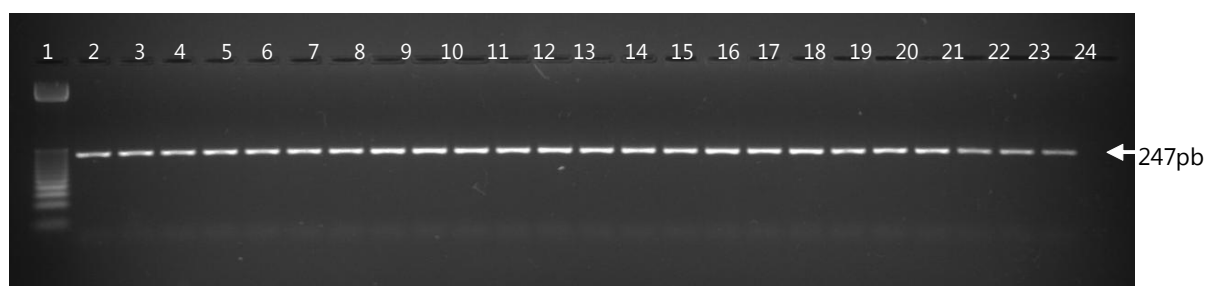


FIGURA 3A. Resultados de la amplificación por PCR del gen LGB. Línea 1. MWM 25pb. Líneas 2-25: Amplicones para el loci LGB, Línea 26 control negativo./ *Results of PCR amplification of LGB gene. Line 1. Line 1: MWM 100bp. Lines 2-25: Amplicons for loci LGB. Line 26: negative control.*

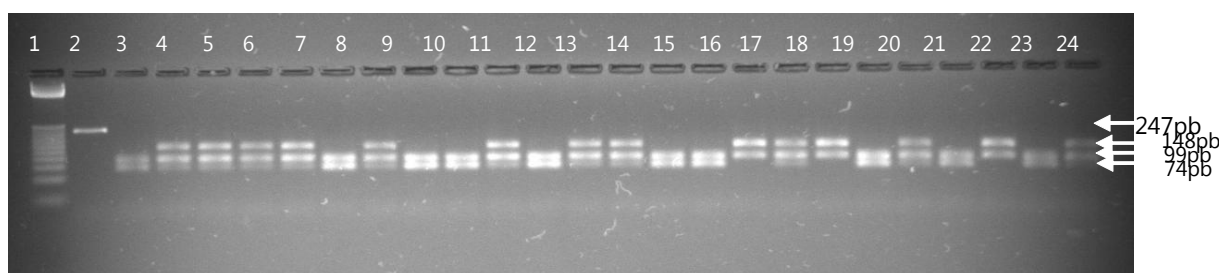


FIGURA 3B. Resultados de la digestión del gen LGB con la enzima *Hae* III. Línea 1. MWM 25pb. Líneas 2. Producto amplificado sin digerir (247 pb); Líneas 18, 20, 24: muestras con genotipo LGB^A/LGB^A; líneas 4-6, 9, 12, 14, 15, 19 y 22: muestras con genotipo LGB^A/LGB^B; Líneas 3, 8, 10, 11, 13, 16, 17, 21, 23, 25: muestras con genotipo LGB^B/LGB^B./ *Results of the enzymatic digestion of the LGA gene (247bp). Line 1: MWM 25bp. Line 2: Amplified product without digestion. Lines 4-6, 9, 12, 14, 15, 19 and 22: sample with genotype LGB^A/LGB^B. Lines 3, 8, 10, 11, 13, 16, 17, 21, 23, 25: Sample with genotype LGB^B/LGB^B.*

dante fue el homocigoto para el alelo B. También se observa un incremento en la aparición del genotipo AA en el rebaño analizado en este estudio, con valores superiores a los previamente descritos para este genotipo (10), que apareció con una frecuencia inferior al 10%.

Aunque en el presente estudio no fue posible establecer asociaciones entre las principales variantes genéticas de la LGB y los caracteres productivos de mayor interés, se conoce que su polimorfismo ha estado asociado con un importante efecto en la composición de la leche y el rendimiento quesero (34). La leche de animales con genotipo AA se ha relacionado con una mayor concentración de proteínas séricas que resulta del incremento en la concentración de LGB (28%), con respecto a los animales con genotipo BB (35).

Se debe tener en cuenta que un elemento importante a considerar de esta proteína, para su empleo como marcador para el mejoramiento, es el efecto que se le atribuye a su variante B sobre la calidad de la leche, aspecto que se considera conveniente comprobar en futuros estudios. No obstante, se refieren investigaciones realizadas previamente por Rojas *et al.* (11),

quienes al evaluar los efectos de los haplotipos más comunes en CSN3 y LGB, identificaron una tendencia importante a favorecer el contenido de sólidos totales, proteínas totales y grasa en aquellos individuos que presentan el alelo B para esta proteína.

Diversidad genética de las proteínas lácteas en las poblaciones estudiadas

En la Tabla 2 se muestra el conjunto de parámetros que miden la estructura genética de estas poblaciones.

De manera general, en las poblaciones venezolanas los valores de H_{obs} son similares a las H_{esp} , con una ligera disminución en *loci* LGB (se encontraron menos heterocigotos de los esperados). Como resultado del análisis AMOVA realizado (para estudiar la variación molecular dentro de la especie en cuestión), se obtuvo el 2.85% de diferenciación entre las poblaciones estudiadas, asociado al valor de F_{ST} igual a 0.029 que representa el grado de diferenciación genética entre dichas poblaciones en función de las frecuencias alélicas determinadas. Esto se debe a que son poblaciones con marcada influencia de genes *Bos taurus* y con muchos años de explotación en el país, lo que ha influido en sus cualidades adaptativas.

TABLA 2. Indicadores poblacionales de variabilidad genética. Valores de heterocigosidades medias observada (H_{obs}) y esperada (H_{esp}), número medio de alelos (A), porcentaje de *loci* polimórficos ($P_{0.95}$) para los *loci* de las proteínas lácteas e índice de diversidad genética (DE) para todos los *loci* en cada población./ *Genetic diversity population indicators. Observed (H_{obs}) and expected (H_{esp}) mean heterocigosity values, mean allele number (A), polymorphic loci percentage ($P_{0.95}$) for the loci of milk proteins and genetic diversity index for all loci in each population.*

	Criollo Limonero	Carora	Siboney de Cuba
H_{obs} (DE)			
CSN3	0.328 (0.165)	0.428 (0.138)	0.211 (0.154)
LAA	0.127 (0.200)	0.042 (0.163)	0.242 (0.092)
LGB	0.433 (0.091)	0.340 (0.097)	0.459 (0.082)
H_{esp} (DE)			
CSN3	0.331 (0.204)	0.451 (0.201)	0.330 (0.201)
LAA	0.119 (0.216)	0.041 (0.250)	0.216 (0.267)
LGB	0.485 (0.183)	0.495 (0.184)	0.483 (0.196)
A			
CSN3	2	2	2
LAA	2	2	2
LGB	2	2	2
$P_{0.95}$			
CSN3	100%	100%	100%
LAA	100%	100%	100%
LGB	100%	100%	100%
Índice de diversidad molecular (DE)			
	0.297 (0.265)	0.322 (0.245)	0.381 (0.314)

Todos los *loci* analizados resultaron ser 100% polimórficos. El número medio de alelos por *loci* igualmente coincide en todas las poblaciones.

En todas estas poblaciones se cumplen las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg, condiciones que se mantienen aún para el *loci* LAA, donde no apareció el genotipo AA en ninguna de las poblaciones. Sumado a esto y debido al control ejercido sobre el material genético que se ha propagado, específicamente el semen para inseminación artificial, no ha sido posible la identificación de consanguinidad en las poblaciones estudiadas a través de los métodos estadísticos utilizados y que la selección ejercida a favor de la producción de leche en nuestra ganadería, puede haber favorecido la presencia de alelos relacionados con los parámetros de calidad de la leche. Sería conveniente comprobar este último aspecto, a través de la realización de estudios de asociación entre los genotipos y las características productivas en nuestro ganado.

Se ha encontrado en equilibrio las poblaciones de Criollo de Uruguay estudiadas con superioridad de heterocigotas en el gen LGB, a diferencia de lo que se puede observar en razas bovinas sujetas a una intensa presión de selección (36, 37).

Los resultados publicados por Veli *et al.* (25) refieren que la frecuencia observada del alelo LGB^A estuvo entre el 22 y 45%, mientras que el alelo B resultó entre 55 y 78%; todas las poblaciones peruanas estudiadas se encontraron en equilibrio de manera similar a lo encontrado en este estudio.

Los valores de los indicadores utilizados para la caracterización poblacional (H_{obs} , H_{esp} , A , $P_{0,95}$ índice de diversidad molecular) evidencian una variabilidad adecuada en las razas estudiadas, lo que permite a los genetistas manejar adecuadamente esta información para ser utilizada al trazar estrategias de cruzamientos y programas de mejora genética, así como en el mantenimiento y conservación de la diversidad genética.

Comparación entre poblaciones

La distribución del agrupamiento obtenido del análisis de componentes principales se muestra en la Figura 4.

Se obtuvo una clara diferenciación entre las tres poblaciones estudiadas, lo que corrobora un origen genético diferente y se pudo agrupar el 98.8% de la variabilidad total en dos componentes (CP-1 y CP-2).

El énfasis en el estudio de las proteínas de la leche se debe a su importancia en los sistemas de producción animal y transformación industrial. Los polimorfismos de las proteínas lácteas tienen efectos sobre algunos rasgos productivos, los que a su vez afectan el rendimiento quesero y, por tanto, se han constituido en rasgos primordiales en los programas de selección. En consecuencia, si se pretende acelerar el progreso genético, la presencia de genotipos deseables es indispensable para ese proceso (38).

El Criollo Limonero, ganado autóctono venezolano, en cuyo genofondo hay valiosa información relativa a los procesos de adaptación al ambiente tropical y de

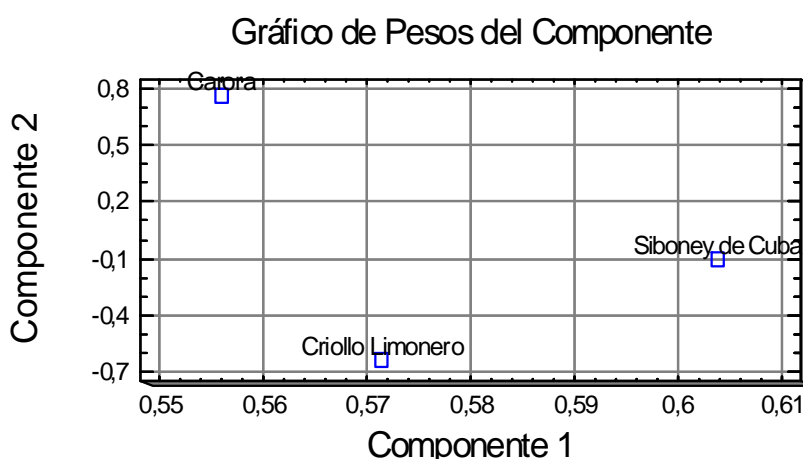


FIGURA 4. Ploteo de las dos principales componentes (CP-1 y CP-2) a partir de la distribución de frecuencia genotípica de tres *loci*. El CP-1 acumula el 89.2% y el CP-2 el 9.65% del total de la variación. / *Plotting of the two main components (CP-1 and CP-2) from the distribution of genotypic frequency of the three loci.*

producción en condiciones difíciles, muestra evidencias de una valiosa riqueza genética que ofrece amplias posibilidades para la mejora genética y el desarrollo de programas de conservación. De igual forma, la raza Carora, oficialmente reconocida por el Ministerio de Agricultura y Cría en la década de los años 80' y declarada Patrimonio Nacional, constituye un recurso autóctono venezolano de alta demanda por los ganaderos, debido a su adaptación a las condiciones ambientales en que normalmente se explota esta raza, teniendo en cuenta la reconstrucción de genealogías para evitar el incremento de la consanguinidad y, por consiguiente, el deterioro genético de la raza.

El hecho de haber introducido en esta investigación una población Siboney de Cuba permitió verificar la eficacia de los métodos y procedimientos empleados en el presente estudio, a los que ya había sido sometida una población del mismo origen. Por otra parte, permitió conocer la composición genética de este rebaño en particular, introducido en Venezuela con el objetivo de que sirva como núcleo fundador de esta raza en el país, que en su momento pueda ser utilizado para introducir sus genes en las poblaciones lecheras venezolanas. Contando con esta información, se pueden dirigir los programas de mejora con esta raza de forma consciente e intencionada.

El estudio realizado permitió corroborar que la estructura genética obtenida para los genes que codifican para la α -lactoalbúmina, la β -lactoglobulina y la κ -caseína bovinas en los ganados Criollo Limonero y Carora, permite verificar que existe elevada variabilidad genética en ambas poblaciones.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Proyecto Doctorado en Biotecnología Agrícola, Mención Animal, del Convenio Cuba-Venezuela por el financiamiento para la ejecución de esta investigación; al MSc. Efraín Salazar por poner a disposición de esta investigación las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Agrícola del CENIAP-INIA, Maracay; así como, a los señores Alexis Marques y Oscar de la Rosa por el apoyo técnico en la ejecución y análisis estadístico de los resultados.

REFERENCIAS

1. FAO. An Integrated Global Program to Establish the Genetic Relations among the Breeds of each Domestic Animal Species (Report of a working group, June 1993), Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1993.
2. Hall SJG; Bradley DG. Conserving livestock breed biodiversity. *Tree*. 1995;10(7):267-270.
3. Aranguren J. Aplicación de la genética molecular para la selección de caracteres de interés en la producción de leche. En: Alcances y Perspectivas: En la Mejora Genética de la Ganadería Doble Propósito. XLIII Reunión del GIRARZ. Maracaibo 24-26/03. Venezuela. 2006. 84-98 pp.
4. Villasmil-Ontiveros Y, Román-Bravo R, Yáñez-Cuellar L, Contreras G, Jordana J, Aranguren-Méndez J. Diversidad genética de la raza criollo limonero utilizando marcadores de ADN microsátélites. *Rev Cientif FCV-LUZ*. 2008;XVIII(4):415-423.
5. Páez L. Comportamiento productivo del rebaño Criollo Limonero en el Piedemonte Barinés. *INIA Divulga*. 2005;6:33-37.
6. Guerra J. Estación local Carrasquero del INIA-Zulia fuente genética del ganado Criollo Limonero. 2012. Disponible on line en: <http://www.inia.gov.ve/index.php/2012-11-05-19-42-09/reportajes/221-estacion-local-carrasquero-del-inia-zulia-fuente-genetica-del-ganado-criollo-limonero>. Consultado el 11 de noviembre de 2013.
7. Cerutti FM, Oropesa MJ, Alvarez JL. Rasa Carora: un logro tropical. *Memorias XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal*, Valera 22-26 Octubre, ULA Trujillo, 2002. 11p.
8. Aranguren-Méndez J, Román-Bravo R, Villasmil-Ontiveros Y, Yáñez F. Evaluación Genética de la Ganadería Mestiza Doble Propósito en Venezuela. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*. 2007;15(Supl. 1):241-250.
9. Rojas I, Aranguren-Méndez J, Portillo M, Villasmil-Ontiveros Y, Valbuena E, Rincón X, et al. Genetic Polymorphism of Kappa-Casein in Creole Limonero Bovine. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2009;IX(6):645-649. <http://www.inia.gov.ve/index.php/2012-11-05-19-42-09/reportajes/221-estacion-local-carrasquero-del-inia-zulia-fuente-genetica-del-ganado-criollo-limonero>. Consultado el 11 de noviembre de 2013.
10. Rojas I, Aranguren-Méndez J, Portillo M, Villasmil-Ontiveros Y, Rincón X, Contreras G. Allelic Frequency of Beta-lactoglobulin in Limonero Creole Cattle. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2010;XX(2):176-180.

11. Rojas I, Aranguren-Méndez J, Portillo M, Rincón X, Martínez Gonzalo, Contreras G. Effect of Polymorphic Milk Protein Genes on Milk Yield and Composition Traits in Limonero Creole Cattle, *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2011;XI(6):517-523.
12. Lara MAC, Gama LT, Bufarah G, Sereno JRB, Celegato EML, de Abreu UP. Genetic polymorphism at the β -casein locus in Panteneiro cattle. *Arch. Zootec*. 2002;51:99-105.
13. Uffo O, Martín-Burriel I, Martínez S, Ronda R, Osta R, et al. Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. *Boletín AGRI-FAO*. 2006;39:15-24.
14. Acosta A, Uffo O, Sanz A, Ronda R, Osta R, Martín I, et al. Genetic diversity and differentiation of five Cuban cattle breeds using 30 microsatellite *loci*. *J Anim Breed Genet*. (doi:10.1111/j-1439-0388.2012.00988.x): 2012; 1-8.
15. Ginja C, Gama LT, Cortes O, Delgado JV, Dunner S, García D, et al. Analysis of conservation priorities of Iberoamerican cattle based on autosomal microsatellite markers. *Genetics Selection Evolution* 2013;45:35.
16. Dellaporta SL, Wood J, Ticks JB. A plant molecular DNA minipreparation version 2. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1983;1:19-21. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02712670>.
17. Osta R. 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. 1994.
18. Medrano JF; Aguilar-Córdova E. Polymerase chain reaction amplification of bovine bLg genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Animal Biotechnology*. 1990;1(1):73-77.
19. Swofford DL, Selander RB. BIOSYS-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1.7. Champaign, IL, Illinois Natural History Survey. 1989.
20. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (ver. 1.2): A population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered*. 1995;86:248-249.
21. Acosta A, Sanz A, Ronda R, Osta R, Rodellar C, Martín-Burriel I, et al. Comparación de la frecuencia alélica de las proteínas lácteas en cinco poblaciones bovinas cubanas. *Animal Genetic Resources*. 2012;51:131-137.
22. Lirón JP, Ripoli MV, De Luca JC, Peral-García P, Giovambattista G. Analysis of genetic diversity and population structure in Argentine and Bolivian Creole cattle using five loci related to milk production. *Genetics and Molecular Biology*. 2002;25(4):413-419.
23. Viana J, Fernández A, Iglesia A, Sánchez L, Becerra J. Análisis de los genotipos más frecuentes de la κ -caseína en la raza vacuna Rubia Galega mediante PCR/RFLPs. *Arch. Zoot*. 2001;50:91-96.
24. Acosta A, et al. Estructura genética de tres poblaciones de ganado bovino autóctono cubano. *Revista INFOVET*. Edición especial, mayo 2010. Año XV. Pag 23-24. ISSN 1515-9892.
25. Veli E, Rivas E, Rivas V, Verastegui M, Pastor S. Evaluación de la variabilidad de genes de κ caseína en poblaciones de bovinos criollos de Ticllos y Huaschao, región Ancash online en <http://genética.gob.pe/genetica/zoogeneticos/Articulo.2004>.
26. Azevedo ALS, Nascimento CS, Steinberg RS, Carvalho MRS, Peixoto MGCD, Teodoro RL, et al. Genetic polymorphism of the κ -casein gene in Brazilian cattle. *Genetics and Molecular Research*. 2008;7(3):623-630.
27. Pacheco VI, Parra GM, Martínez JC, Sifuentes AM. Convenient genotyping of nine bovine κ -casein variants. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2011;14(4). <http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue4-fulltext-10>.
28. Bell K, Hopper KE, McKenzie HA. Bovine alpha-lactalbumin C and alpha S1-, beta- and κ -caseins of Bali (Banteng) cattle, *Bos (Bibos) javanicus*. *Aust J Biol Sci*. 1981;34(2):149-159.
29. Osta R, Marcos S, Martín I, García-Muro E, Zaragoza P. Caracterización genética de proteínas lácteas en ganado vacuno mediante análisis de DNA. VI Jornadas sobre producción animal. 1995; Vol. Extra, N°16, Tomo I.

30. Bouzat JL, Giovambattista G, Golijow CD, Dulout FN, Lojo MM. 1998. Conservation genetics of native breeds: the Argentine Creole Cattle. *Interciencia*. 23: 151-157.
31. Silva IT, Del Lama MA. Milk protein polymorphisms in Brazilian Zebu cattle. *Brazilian Journal of Genetics*. 1997;20(4).
32. Lien S, Kantanen J, Olsaker I, Holm LE, Eythorsdottir E, Sandberg K, et al. Comparison of milk protein allele frequencies in Nordic cattle breeds. *Animal Genetics*. 1999;30:85-91.
33. Ceriotti G, Chessa S, Bolla P, Budelli E, Bianchi L, et al. Single nucleotide polymorphisms in the ovine casein genes detected by Polymerase Chain - Reaction - Single Strand Conformation Polymorphism. *J Dairy Sci*. 2004;87:2606-2613.
34. Ballester M. La α - lactoglobulina y su aplicación en transgénesis. Tesis Doctoral, Univ Autónoma de Barcelona. 2005. 197p.
35. Hill JP. The relationship between beta-lactoglobulin phenotypes and milk composition in New Zealand dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 1993;76:281-286.
36. Postiglioni A, Rincón G, Barrera J, Kelly L, Llambí S, Trujillo J. Distribución diferencial de variantes alélicas de proteínas lácteas (k-caseína, b-lactoglobulina, a-lactoalbúmina) en razas bovinas del Uruguay. XXI Congreso Mundial de Buiatría. 10100/489 (publicación virtual: CD). 2000.
37. Postiglioni A, Rincón G, Kelly L, D'Angelo M, Gagliardi R, de Andrés Cara D. Genetic Characterization of a Sample of Uruguay an Creole Cattle. II. Primer Congreso de Recursos Genéticos en Animales Domésticos. S.E.R.G.A. Córdoba, España. *Arch Zootec*. 1998;47:259-266.
38. Calderón A, García F, Martínez G. Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Revista MVZ Córdoba*. 2006;11(1):725-737.

Recibido: 18-3-2014.

Aceptado: 27-8-2014.