



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL
Carrera de Medicina veterinaria

Trabajo de Graduación

Frecuencias genotípicas y alélicas del Gen de kappa caseína en ganado de la raza Reyna perteneciente a la Facultad de Ciencia Animal, UNA.

Autores

Br. Yorlin Ismael Suárez Quintero

Br. Lester Danilo Jiménez Martínez

Asesores

MSc. Julio Omar López Flores

MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez

Managua, Nicaragua

Septiembre, 2019



“Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL
Carrera de Medicina veterinaria

Trabajo de Graduación

Frecuencias genotípicas y alélicas del Gen de kappa caseína en ganado de la raza Reyna perteneciente a la facultad de Ciencia Animal, UNA.

Autores

Br. Yorlin Ismael Suárez Quintero

Br. Lester Danilo Jimenez Martínez

Asesores

MSc. Julio Omar López Flores

MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez

Managua, Nicaragua

Septiembre, 2019

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable tribunal examinador designado por la decanatura en la Facultad de ciencia animal de la Universidad Nacional Agraria como requisito parcial para optar al título de: Licenciado En Medicina Veterinaria.

Miembros del Tribunal Examinador

Dr. Omar Navarro Reyes

Presidente

Dra. Fredda Ramírez Gutiérrez

Secretaria

Dr. Max Solís Bermúdez

Vocal

Lugar y fecha (día/mes/año) _____

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRAC	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS	4
3.1. Ubicación del área de estudio	4
3.2. Toma de muestra sanguínea	4
3.3. Extracción del ADN	4
3.4. Amplificación del gen de K-caseína	5
3.5. Genotipificación del gen de K-caseína	6
3.6. Cálculo de frecuencia genotípicas y alélicas	6
3.7. Variables evaluadas	7
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
4.1. Amplificación y genotipificación del gen de la kappa caseína	9
4.2. Frecuencia alélica y genotípica del gen de la Kappa caseína	10
V. CONCLUSIONES	12
VI. RECOMENDACIONES	13
VII. LITERATURA CITADA	14
VIII. ANEXOS	17

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, Mayra Luz Quintero Calderón y a mi padre, Ricardo Suarez Galeano por darme su apoyo incondicional, comprensión, amor y ternura.

Que DIOS les bendiga.

Br. Yorlin Ismael Suárez Quintero

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, Felipa Martínez López y hermano Julio Cesar Gómez Martines por darme su apoyo, comprensión, y amor en todo momento. A mis abuelos Faustino Jiménez Escoto y Dina González Dávila por inspirarme en estudiar esta bella carrera y regalarme esos bellos y valiosos consejos.

A mis tíos Rodrigo Salomón Jiménez, Martha Nubia Jiménez, Ricardo Jiménez, por darme siempre su confianza y apoyo incondicional que también fueron parte de mi formación social y profesional.

Hasta el cielo a mi querida tía Juana castillo, por brindarme su apoyo incondicional, creer en mí y regalarme esos buenos consejos que los recordare toda mi vida

A mis primos Larissa Y Leonardo por sus sonrisas y cariño que alimentaban mi vida y motivaban a seguir siempre a delante.

.

Que DIOS les bendiga

Br Lester Danilo Jimenez Martínez

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por regalarme la fuerza necesaria para enfrentar cada circunstancia y la sabiduría para tomar decisiones que me permitieron alcanzar esta meta.

A nuestros padres y familiares por todo su esfuerzo, dedicación, apoyo incondicional y la confianza que nos dieron.

A nuestros asesores: MSc. Lic. Isaías Sánchez Gómez y MSc. Julio Omar López Flores por compartir sus conocimientos y brindarnos confianza en el transcurso este trabajo.

Y A cada uno de los docentes que fueron parte de nuestra formación académica.

Br Yorlin Ismael Suárez Quintero

Br Lester Danilo Jimenez Martínez

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Frecuencia alélica y genotípica para el gen de la Kappa caseína en hembras del ganado bovino de la raza Reyna de la UNA.	11

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Representación gráfica de tamaños de fragmentos después de la digestión con la enzima Hinf I	6
2. Producto PCR amplificado con los cebadores BLKC-delantero/ BLKC-reverso del gen de la K-caseína en muestras de hembras bovinas (1,2,3,4,5,7,8 y 9). Con la letra M se indica el marcador molecular de 100pb	9
3. Patrones de bandas del gen de la kappa caseína obtenidos después de la digestión del producto PCR con la enzima de restricción Hinf I. Con la letra M se indica el marcador molecular de 100pb. Los números 5,9,10,11,13 y 17 corresponden a los genotipos AB, mientras que el número 7 al genotipo AA y el numero 15 al genotipo BB	10

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Población de vacas reinas en corral de la finca santa rosa	17
2. Extracción de sangre en venosa (vena coccígea) en hembras	17
3. Homogenización de muestras en agitador Vortex.	18
4. Colocación de muestras de sangre en la centrifuga.	18
5. Colocación de muestras en termociclador eppendorf	19
6. Colocación del producto PCR en posos del gel de agarosa al 1%.	19
7. Identificación de hembras bovina de la raza Reyna de la UNA	20

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el ganado criollo de la raza Reyna de la facultad ciencia animal. Esta raza ha sido importante en el desarrollo de la ganadería centroamericana, en principio constituyó el hato fundador de la misma. El ganado Reyna, es una raza adaptada a las condiciones tropicales de Nicaragua, seleccionada por Joaquín Reyna en el año de 1920. La proteína κ -caseína está relacionada con características de producción y calidad de la leche, tales como, rendimiento en queso, tiempo de coagulación, firmeza de micela y niveles altos de lactoferina. La leche derivada de animales CAS κ AA tiene menor porcentaje de κ -caseína, por el contrario, la leche de animales CAS κ BB presenta mayor proporción de κ -caseína y micelas más pequeñas. El presente estudio tuvo como objetivo determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del gen kappa-caseína (κ -CN) en ganado de la raza Reyna. Se recolectaron 22 muestras de sangre en hembras reproductoras de la finca Santa Rosa de la Facultad Ciencia Animal de la Universidad Nacional Agraria (UNA). El gen de la kappa caseína fue amplificado mediante la técnica PCR, con los cebadores BLKC-For 5`-ATTAGCCCATTTTCGCCTTCT-3` y BLKC-Rev 5`-ATT TATGGCCATTCCACCAA-3`, obteniendo un amplicón de 351 pb. La identificación de los alelos fue realizada mediante la técnica PCR-FRLP, obteniendo frecuencias genotípicas de 0.090, 0.045 y 0.863 para los genotipos AA, BB y AB, respectivamente. La frecuencia alélica fue de 0.52 y 0.48 para los alelos A y B respectivamente, indicando mayor número de genotipos AB y AA.

Palabras clave: Gen, PCR-RFLP, Genotipos, Cebadores, Kappa Caseína

ABSTRAC

The present work was carried out in the Creole cattle of the Reyna breed of the animal science faculty. This breed has been important in the development of Central American livestock, in principle it was the founding herd of it. The Reyna cattle, is a breed adapted to the tropical conditions of Nicaragua, selected by Joaquín Reyna in the year 1920. The κ -casein protein is related to milk production and quality characteristics, such as, cheese yield, time of coagulation, firmness of micelle and high levels of lactoferin. Milk derived from CAS κ AA animals has a lower percentage of κ -casein, on the contrary, milk from CAS κ BB animals has a higher proportion of κ -casein and smaller micelles. The present study aimed to determine the genotypic and allelic frequencies of the kappa-casein gene (κ -CN) in cattle of the Reyna breed. 22 blood samples were collected in breeding females from the Santa Rosa farm of the Animal Science Faculty of the National Agrarian University (UNA). The kappa casein gene was amplified by PCR technique, with primers BLKC-For 5`-ATTAGCCCATTTTCGCCTTCT-3` and BLKC-Rev 5`-ATT TATGGCCATTCCACCAA-3`, obtaining an amplicon of 351 bp. The alleles were identified using the PCR-FRLP technique, obtaining genotypic frequencies of 0.090, 0.045 and 0.863 for the AA, BB and AB genotypes, respectively. Allelic frequency was 0.52 and 0.48 for alleles A and B respectively, indicating greater number of AB and AA genotypes.

Keywords: Gene, PCR-RFLP, Genotypes, Primers, Kappa Casein

I. INTRODUCCIÓN

El ganado criollo ha sido importante en el desarrollo de la ganadería en Latinoamérica, en principio constituyó el hato fundador de la misma. El ganado Reyna, es una raza adaptada a las condiciones tropicales de Nicaragua seleccionada por Joaquín Reyna, en una finca ganadera ubicada en San Juan del Sur, en el año de 1920. Surgió de bovinos procedentes de España durante la conquista en los años 1500 (Rubio 2008).

Se caracteriza por ser eminentemente un ganado lechero, pero puede ser utilizado como doble propósito, en 1988 por medio de un decreto presidencial fue declarado patrimonio nacional (Núñez, L. 2005). Representan un potencial genético de incalculable valor, sometido a más de 500 años de selección natural, por tal razón es importante conservarlo y multiplicarlo para evitar su reducción poblacional o desaparición. (Baca, 2014)

Las características sobresalientes de esta raza, en relación a índices productivos son, la reducción que sufren los intervalos entre partos cuando estas se cruzan con razas europeas de alta especialización, mejor en la precocidad y fertilidad de las hembras y el fortalecimiento de la productividad de los hatos (Baca, 2014).

En el 2017 Nicaragua experimentó un aumento en las exportaciones de leche en el primer mes del año, con respecto a igual periodo del 2016, según el Centro de Trámites de las Exportaciones. En esa etapa se vendieron al exterior 4.3 millones de kilogramos del producto, los que generaron más de 4.6 millones de dólares (Álvarez 2017). Debido a esto se hace necesario la búsqueda de nuevas razas lecheras y la determinación de proteínas como la kappa caseínas y beta lactoglobulinas que favorecen el rendimiento en el queso, debido a que mejoran la coagulabilidad del mismo.

La proteína κ -caseína está relacionada con características de producción y calidad de la leche, tales como, rendimiento en queso, tiempo de coagulación, firmeza de micela y niveles altos de lactoferrina. La leche derivada de animales CAS κ AA tiene menor porcentaje de κ -caseína, por el contrario, la leche de animales CAS κ BB presenta mayor proporción de κ -caseína y micelas más pequeñas (Requena, et al Agüera, 2007).

La presente investigación tiene por objetivo determinar la frecuencia genotípicas y alélicas del gen de la kappa caseína en el ganado Reyna de la Facultad de Ciencia Animal, los resultados obtenidos serán de utilidad para evaluar en futuras investigaciones la factibilidad de raza Reyna, la producción y rendimiento de leche y sus derivados, así como la selección de genotipos deseados en la población estudiada.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Evaluar las frecuencias genotípicas y alélicas del gen de la kappa caseína en el ganado Reyna de la Facultad de Ciencia Animal.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar los genotipos del ganado Reyna con alelos favorables para el Gen kappa caseína, haciendo uso de la técnica PCR-RFLP.
- Calcular las frecuencias alélicas y genotípicas del gen de la kappa caseína, en el ganado Reyna de la Facultad de Ciencia Animal.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del área de estudio

El estudio para la detección de Frecuencias genotípicas y alélicas del gen de la kappa caseína se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Agraria, Facultad De FAGRO (UNA), ubicado en el km12 carretera norte municipio de Managua con altitud de 56 m.s.n.m coordenadas 86° 09' 36" longitud Oeste y 12° 08' 15" latitud norte (INETER, 2018).

Tipo de estudio

El tipo de estudio fue descriptivo de corte transversal con el objetivo de Evaluar las frecuencias genotípicas y alélicas del gen de la kappa caseína en el ganado Reyna de la Facultad de Ciencia Animal.

3.2. Toma de muestra sanguínea

La unidad de producción de bovinos de la Facultad de ciencia animal cuenta con una población total de 22 bovinos de la raza Reyna a los que se les realizo toma de muestra sanguínea la que consistió en localizar la vena coccígea, luego se desinfecto esta área con alcohol al 70 % y se extrajo 3 ml de sangre total con una jeringa de 5 ml , posteriormente se depositó la sangre en un tubo de ensayo que contenía 50 µl del anti- coagulante EDTA en concentración de 10.8 mg.

Las muestras fueron trasladadas en un recipiente térmico a temperatura de 6-8 °C al laboratorio de microbiología de la facultad de FAGRO. Los criterios de inclusión de los bovinos fueron: hembras bovinas en edades entre 1- 6 años, Clínicamente sanos (No hay alteración de la tríada clínica), hembras en producción y libres de enfermedades como la brucelosis y la tuberculosis.

3.3. Extracción del ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el método CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) descrito por Doyle and Doyle (1990) el cual consiste en calentar el buffer de extracción CTAB por 30 minutos a 65°C. Se coloco 50µl de sangre total con EDTA 10.8 mg en un tubo Eppendorf y se adiciono 500 µl de CTAB 2% (buffer) y 1 µl de RNasa y se incubo 65°C por 30 minutos.

Posterior a la incubación, se adicionaron 400 µl de cloroformo-álcool isoamílico (24:1), se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm.

Se tomó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml, se agregó nuevamente cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml, se adicionaron 200 µl de isopropanol, se incubó por 15 minutos a -20°C, se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante.

Al pellet resultante se le adicionaron 100 µl de etanol mezclando por inversión, se centrifugó a 14,000 rpm por 4 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, el pellet fue suspendido en 100 µl de agua calidad molecular o Tris-EDTA (TE) buffer, se adicionó 1 µl de la ribonucleasa ARN-asa y se incubó por 20 minutos a 37°C. El ADN extraído se mantuvo a una temperatura de -20°C hasta su uso.

3.4. Amplificación del gen de K-caseína

La amplificación del gen de la capa caseína se realizó mediante la técnica de PCR convencional con reacciones de 25 µl de volumen, la que consistió en mezclar 2 µl de la muestra a estudiar 12.5 µl de Master Mix (PROMEGA), 7.5 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl del par de cebadores BLKC delantero 5`- ATT AGCCCATTTTCGCCTTCT-3` y BLKC-reverso 5`-ATT TATGGCCATTCCACCAA-3`, respectivamente que producen un amplicón de 351 pb.

El desarrollo de la PCR se realizó en un termociclador Eppendorf bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial 94 °C durante 5 minutos, 35 ciclos a 94 °C durante 45 segundos 52.4 °C por 45 segundos seguido de 72 °C por 60 segundos y una extensión final a 72 °C durante 7 minutos. Para visualizar los fragmentos se colocaron 8 µl del producto PCR con 1.5µl del colorante de carga 6x loading Dye en un gel de agarosa al 1% teñido con Gel red. El gel se colocó en una cámara de electroforesis con buffer TBE 1X. La electroforesis se llevó a cabo por un periodo de una hora a 80 voltios y luego se procedió a visualizar en el transluminador registrándose los resultados fotográficamente.

3.5. Genotipificación del gen de K-caseína

La genotipificación se realizó mediante la técnica PCR-FRLP usando el producto de la amplificación de la PCR con los iniciadores BLKC delantero y BLKC-reverso. El producto de la PCR se sometió a digestión con la enzima Hinf I en un volumen final de 10 μ l. El procedimiento consistió en adicionar 8 μ l del producto amplificado PCR, 2 μ l de la enzima de restricción. Posteriormente se incubó a 37 $^{\circ}$ C por una hora en un termociclador Eppendorf .

Después de la incubación se procedió a realizar la separación de los fragmentos en un gel de agarosa al 1 % en solución de Tris -Borato-EDTA buffer 1X. Los genotipos AA mostraron dos fragmentos de 134/132 pb y 84 pb, los genotipos BB presentaron dos fragmentos de 266 pb y 84 pb, mientras que los genotipos AB presentaron tres fragmentos de 266 pb 134/132pb y 84 pb (Figura 1).

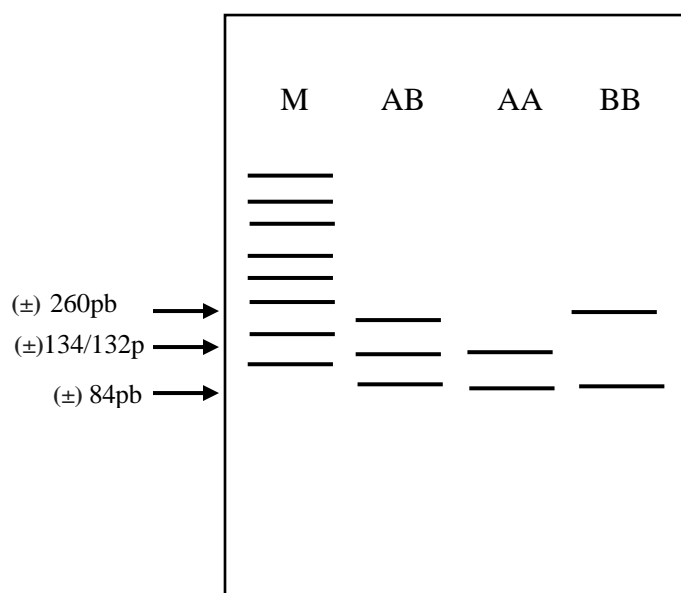


Figura 1. Representación gráfica de tamaños de fragmentos después de la digestión con la enzima Hinf I

3.6. Cálculo de frecuencia genotípicas y alélicas

La frecuencia génica o frecuencia alélica consiste en la proporción de cada alelo en un locus dado en una población específica. La suma de las frecuencias alélicas en una población siempre

es 1 ó 100% (Griffiths, *et al.* 1990). Se calculó la frecuencia genotípica y alélica mediante las fórmulas que se describen a continuación:

Frecuencia genotípica

$$F(\text{Genotípica}) = \frac{\text{No de genotipos}}{\text{No de muestras}}$$

Frecuencia alélica

$$p(A) = \frac{1(AA) + 0.5(AB)}{N}$$

$$q(B) = \frac{1(BB) + 0.5(AB)}{N}$$

$$p + q = 1$$

Donde:

N: Numero de muestra

p(A): Frecuencia del alelo A

q(B): Frecuencia del alelo B

AB: Heterocigotos de los alelos A y B

0.5: Constante de la mitad de cada alelo

3.7. Variables evaluadas

- **Frecuencia alélica o génica**

La frecuencia génica o alélica es la medida de la proporción relativa de alelos de una población dada, expresándose en porcentaje o en la unidad. Se estima contando el número de veces que es observado el alelo de un locus y dividiéndolo entre el número total de alelos estudiados, Hernández y Trejos (2014).

- **Frecuencia genotípica**

Las frecuencias genotípicas se obtienen a partir de dividir cada número de combinaciones observadas (genotipos) entre el número total de las muestras analizadas y posteriormente multiplicando por 100% para obtener el porcentaje de las frecuencia genotípicas, Hernández y Trejos (2014).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Amplificación y genotipificación del gen de la kappa caseína

Mediante la técnica PCR se amplificaron fragmentos de 351pb correspondiente al gen de la K-caseína con el par de cebadores específicos BLKC delantero 5'- ATT AGCCCATTTTCGCCTTCT-3' y BLKC-reverso 5'-ATT TATGGCCATTCCACCAA-3', en veintidós muestras procedentes de hembras bovinos (Figura 2). Las veintidós muestras procesadas, presentaron buena calidad del ADN genómico obtenido, lo cual significa que estaban aptas para ser digeridas por la enzima de restricción *Hinf I*.

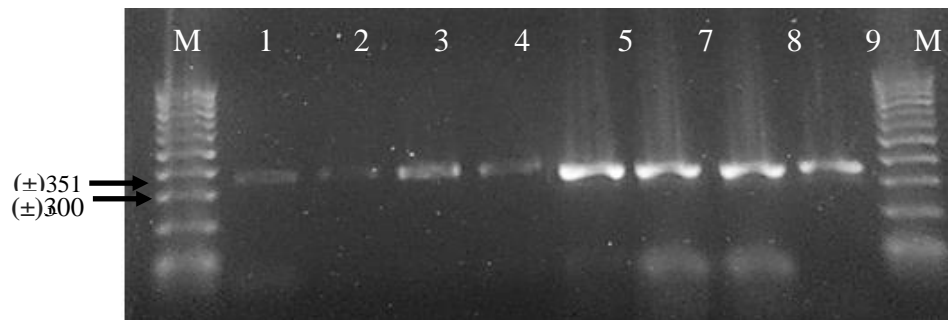


Figura 2. Producto PCR amplificado con los cebadores BLKC-delantero/ BLKC-reverso del gen de la K-caseína en muestras de hembras bovinas identificadas por los numeros (1,2,3,4,5,7,8 y 9). Con la letra M se indica el marcador molecular de 100pb.

El producto PCR de las veintidós muestras amplificadas con los cebadores BLKC-delantero/ BLKC-reverso, para el gen de la K-caseína fueron sometidos a digestión con la enzima de restricción *Hinf I*, determinándose patrones de bandas de 134/132 pb y 84 pb para el genotipo homocigótico AA en dos muestras, dos fragmentos de 266 pb y 84 pb para el genotipo homocigótico dominante BB en una muestra y tres fragmentos de 266 pb 134/132 pb, y 84pb correspondiente al genotipo heterocigótico AB en 19 muestra (Figura 3).

Estos resultados son parecidos a los encontrados por Cortés López *et al.*, (2012) los cuales obtuvieron, 37 individuos homocigóticos dominantes (AA), 70 heterocigóticos (AB) y 1 individuo homocigótico recesivo (BB).

Requena y Agüera, (2007); Uffo *et al.*, (2006) y Benavides; (2003), plantean que el genotipo homocigótico BB del gen de Kappa caseína estudiada en bovinos, presenta un contenido proteico más alto, posee mayor estabilidad al calor y a la congelación, menor tiempo de coagulación y un cuajo más consistente, trayendo consigo un rendimiento quesero entre el 5 y el 10%, lo cual hace que la leche sea más rentable para la industria quesera.

Estudio realizado por Rojas *et al* Yañez (2009), indican que el alelo A es el que prevalece en las razas Holstein, Friesian, Ayrshire, Danés Rojo y Cebú Índico, a diferencia del alelo B que predomina en las razas Jersey, Normando y Cebú Africano.

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

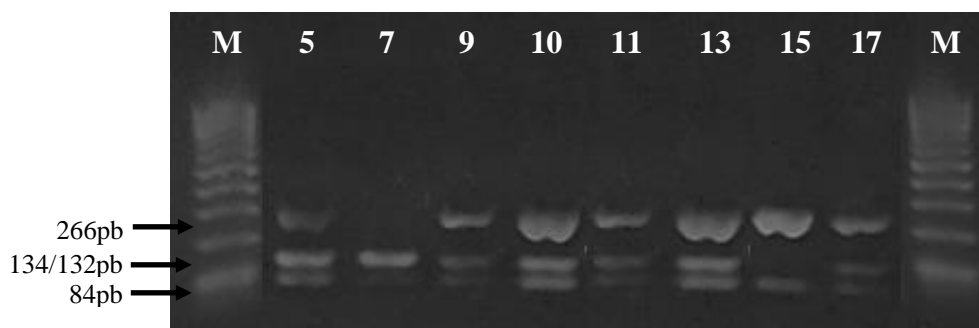


Figura 3. Patrones de bandas del gen de la kappa caseína obtenidos después de la digestión del producto PCR con la enzima de restricción Hinf I. Con la letra M se indica el marcador molecular de 100pb. las muestras números **5,9,10,11,13** y **17** corresponden a los individuos con genotipos AB, mientras que el número **7** al genotipo AA y el numero **15** al genotipo BB.

4.2. Frecuencia alélica y genotípica del gen de la Kappa caseína

En este estudio las frecuencias genotípicas obtenidas fueron 0.090 (2/22), 0.045 (1/22) y 0.0863 (19/22) para los genotipos AA, BB y AB, respectivamente, siendo el genotipo más frecuente el AB seguido del AA y el menos frecuente el BB, mientras que la frecuencia alélica fue 0.52 y 0.48 para los alelos A y B, respectivamente, siendo el más frecuente el alelo A. Estos resultados

son similares a los obtenidos por (Almeyda *et al* Maturrano, L. 2016) los cuales obtuvieron una frecuencia alélica de 0.55 para el alelo A y 0.44 para el alelo B.

La leche producida por bovinos con el genotipo CAS κ BB presentan propiedades de interés para la manufactura del queso por presentar menor tiempo de renina, cuajo más firme y mayor contenido de proteínas y sólidos. Es importante conocer el estatus actual de los alelos de la kappa caseína en la raza estudiada, lo que permitirá determinar los genotipos predominantes y sus frecuencias, para realizar selección de aquellos genotipos deseados en la población. Eenennaam y Medrano (1991).

En este estudio los resultados obtenidos fueron diferentes a los de Dogru (2009), quien estudió bovinos de la raza Pardo Suizo, identificando frecuencias genotípicas de 0.1935, 0.2043 y 0.6022 para los genotipos AA, BB y AB, respectivamente. La frecuencia alélica fue de 0.495 y 0.505 para los alelos A y B respectivamente, indicando mayor número de genotipos AB y BB, mientras tanto la frecuencia de alelos predomino el B.

Cuadro1. Frecuencia alélica y genotípica para el gen de la Kappa caseína en hembras del ganado bovino de la raza Reyna de la UNA.

Raza	Proteína	Frecuencias alélicas		Frecuencias genotípicas		
		A	B	AA	BB	AB
Reyna	Kappa caseína	0.52	0.48	0.090	0.045	0.863

La leche derivada de animales CAS κ AA tiene menor porcentaje de κ -caseína y como consecuencia de esto, una mayor proporción de micelas grandes, por el contrario, la leche de animales CAS κ BB presenta mayor proporción de κ -caseína y micelas más pequeñas. Esta característica explica la formación de un cuajo más firme y una mayor retención de sólidos, lo que resulta en un rendimiento superior durante la producción de queso, comparada con la leche producida por animales con genotipo CAS κ AA. (Requena, *et al*, 2007)

Estudio realizado por Eenennaam y Medrano (1991) demostraron que la leche de los animales con genotipo CAS κ AB contiene una mayor proporción de κ -CN B, esto sugiere que dicho alelo tiene un mayor nivel de expresión con respecto a la variante A en la glándula mamaria de los bovinos.

V. CONCLUSIONES

- El genotipo más frecuente, encontrado en las hembras de la raza Reyna fueron las hembras heterocigóticas AB con 0.863 (19/22). El genotipo de mayor rendimiento quesero BB es poco frecuente, en las hembras muestreadas pertenecientes a la raza Reyna, observándose un caso de las 22 muestras procesadas.
- En esta investigación predominó el alelo A sobre el alelo B. El alelo A está presente en un 0.52 y el alelo B en un 0.48 de los gametos de esta población muestreada. El producto PCR amplificado correspondió a un fragmento de 351 pb del gen de la Kappa caseína del cromosoma 6 en bovino.

VI. RECOMENDACIONES

Recomendamos Continuar realizando estudios sobre frecuencias alélicas relacionados con el gen de la Kappa caseína y Beta globulina, para determinar fines productivos en el ganado Reyna.

Realizar estudios para posibles cruces de selección de los alelos de interés en la población de bovinos de la UNA, con raza Jersey y otras razas europeas.

VII. LITERATURA CITADA

- Almeyda, M. Rosadio, R. Maturrano, L. 2016. Genotipos del Gen Kappa-Caseína en Ganado Bovino Criollo del Distrito de Bambamarca, Cajamarca, Perú. CAJAMARCA, PERU artículo científico. Disponible en <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v27n1/a11v27n1.pdf>.
- Álvarez C. F. 2017. Exportación de leche se recuperó en enero (en línea, sitio web). Consultado 29 ene. 2019. Disponible en: <http://conicyt.gob.ni/index.php/2017/03/13/exportacion-de-leche-se-recupero-en-enero/>.
- Baca, M. H. (2014). Estado poblacional del ganado Reyna en Nicaragua: distribución, manejo, producción y cualidades. La Calera, 38-43.
- Benavides C.T A. 2003. Efecto de las variantes genéticas A y B de k-caseína y β -Lactoglobulina sobre las propiedades de coagulación de la leche. Tesis Pregrado Ing Alimentos. Valdivia Chile.
- Cortés-López, N.G, S. del Moral., José A. Rueda., C. Luna-Palomera., Meza-Herrera. C.A. y Abad-Zavaleta. J. 2012. Allelic and genotypic frequency of kappa casein gene in double purpose cattle. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 15 (2012): 47-55.
- Del Lama S.N y Zago M.A. 2002. Identification of kappa casein and beta lactoglobulin genotype in Brazilian Bos indicus and Bubalus bubalis population. Braz J. Genet. 19:73_77.
- Dogru, U, Ozdemir, M. 2009. Genotyping of kappa-casein locus by PCR-FRLP in Brown Swiss cattle breed. Journal of animal and veterinary advances 8 (4):779-781p.
- Doyle,J.J, and Doyle,J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15p.
- Golijow, C. D., Giovambattista G., Ripoli M.V., Dulout F.N y Lojo M.M. 1999. Genetic variability and population structure in loci related to milk production traits in native Argentine Creole and commercial Argentine Holstein cattle. Braz. J. Genet. 22: 395-398.

- Griffiths, A.J, Miller, J.H, Suzuki, D.T, Lewontin, R.C, Gelbart, W.M. 1990. Genética. 7a Edición, McGraw-Hill, Interamericana, 715p.
- Hernández, A. Trejo, M. (2014). Estudio Genético Poblacional de Frecuencias Alélicas para 15 marcadores STR presentes en la Población del Estado de Zacatecas Aplicado a la Práctica Forense. Revista científica Vol. 10 No. 1:1 Este artículo está disponible en: **www.archivosdemedicina.com**.
- INETER (Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales, NI); Dirección General de Meteorología anual 2018 Resumen meteorológico anual.
- Kemenes P.A., L.C.A. Reginato, A.J.M. Rosa, I.V. Parker, G.A. Razook, L.A. Figueredo, N.A. Silva, M.A.L. Etchegaray y L.L. Coutinho. 1999. κ -casein, β -Lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzará, Camcu, Charolais, Canchin and Santa Gertrudis cattle. Genet. Mol. Biol. 22: 539-541.
- Núñez, L. 2005, 02 de febrero. Ganado Reyna patrimonio nacional. La Prensa. recuperado de <https://www.laprensa.com.ni/2005/02/02/economia/953118-ganado-reyna-patrimonio-nacional>
- Requena, F.D., E.I. Agüera y F. Requena. 2007. Genética de la caseína de la leche en el bovino frisón (Milk of casein of genetic in the Frison bovine). REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. VIII (1): 1695-7504.
- Rojas I, Aranguren, Méndez J, Portillo M, Villasmil O, Yenen V, Emiro R, Contreras X, & Yañez L. (2009). Polimorfismo genético de la kappa-caseína en ganado criollo limonero. Revista Científica, 19(6), 645-649. Recuperado en 29 de septiembre de 2019, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000600012&lng=es&tlng=es.
- Rubio Bryan L. A. (2008) Caracterización técnica y económica de la raza de ganado Reina en la Finca El Pino, Rivas, Nicaragua. Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura, Zamorano, Honduras.

- Tambasco, M.D. 1998. Detecao de polymorphism dos genes de κ -casina, β -lactoglobulina em animais da raca Jersey. Monografia: Universidad Federal de Sao Carlos. S.P.
- Tercero Guerrero, D. V. (2015) Manual: Toma, conservación y envío de muestras representativas al Laboratorio de Diagnóstico Veterinario. Licenciatura thesis, Universidad Nacional Agraria.
- Uffo, O.; Martín-Burriel I.; Martínez S.; Ronda R.; Osta R.; Rodellar C. y Zaragoza P. (2006). Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. En: AGRI, 39: 15-24.
- Van and Medranon, J. F .1991. Milk protein polymorphism in California dairy cattle. Journal of Dairy Science 74 (5):1730-1742p.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Población de vacas reinas en corral de la finca santa rosa



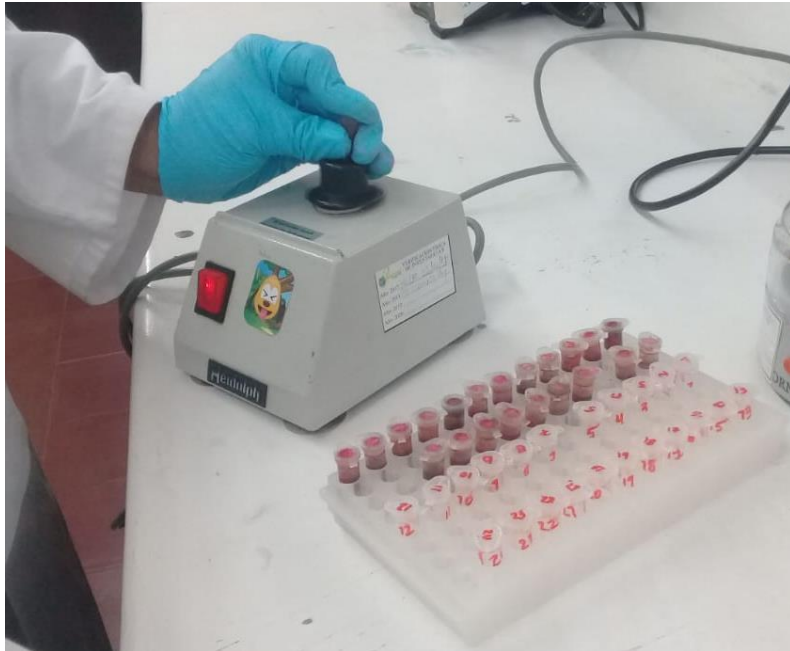
Fuente propia: Jiménez y Suarez 2019

Anexo 2. Extracción de sangre en venosa (vena coccígea) en hembras.



Fuente propia: Jiménez y Suarez 2019.

Anexo 3. Homogenización de muestras en agitador Vortex.



Fuente propia: Jiménez y Suarez 2019.

Anexo 2 .Colocación de muestras de sangre en la centrifuga.



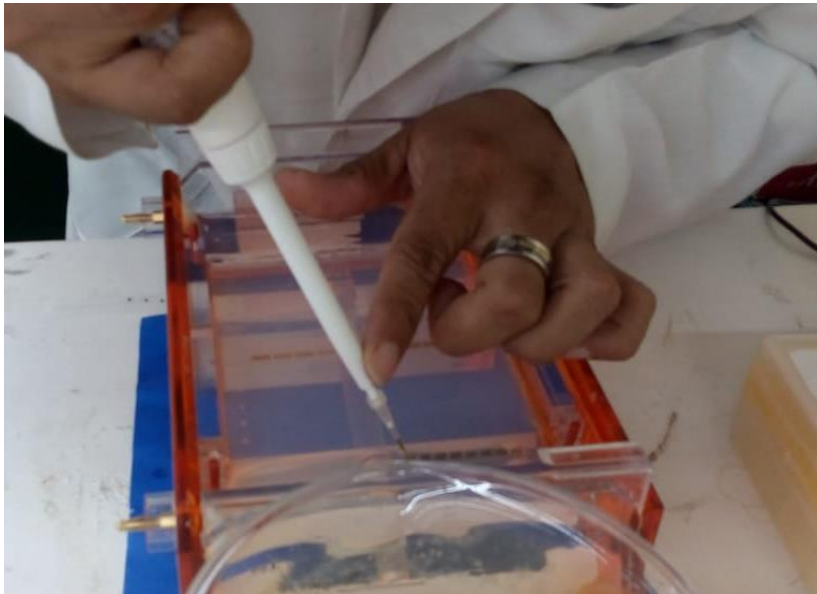
Fuente propia: Jiménez y Suarez 2019.

Anexo 3 . Colocación de muestras en termociclador eppendorf



Fuente propia: Jiménez y Suarez 2019.

Anexo 4 . Colocación del producto PCR en posos del gel de agarosa al 1%.



Fuente propia: Jiménez y Suarez 2019

Anexo 7. Identificación de hembras bovina de la raza Reyna de la UNA.

NUMERACIÓN	NUMERO DE CHAPA IPSA	RESULTADOS DEL PRODUCTO PCR	COLOR DEL ANIMAL	SEXO
1	004301303	AB	Rojo	Hembra
2	004301313	AB	Rojo	Hembra
3	004301266	AB	Rojo	Hembra
4	004301250	AB	Rojo	Hembra
5	004301282	AB	Rojo	Hembra
7	004301306	AA	Rojo	Hembra
8	004301251	AB	Rojo	Hembra
9	004301307	AB	Rojo	Hembra
10	004301308	AB	Rojo	Hembra
11	004301311	AB	Rojo	Hembra
12	004301297	AB	Rojo	Hembra
13	004301302	AB	Rojo	Hembra
15	004301254	BB	Rojo	Hembra
16	004301260	AB	Rojo	Hembra
17	004301318	AB	Rojo	Hembra
18	004301263	AB	Rojo	Hembra
19	004301298	AB	Rojo	Hembra
20	004301258	AB	Rojo	Hembra
21	004301261	AB	Rojo	Hembra
22	006089670	AB	Rojo	Hembra
23	004301265	AB	Rojo	Hembra
24	004301314	AB	Rojo	Hembra

GLOSARIO

Beta lactoglobulina: (β -lactoglobulina) es una proteína que se encuentra en el suero de la leche de vaca y de otras especies de rumiantes, y además en la leche de yegua y de cerda, pero no en la leche humana ni en la de la coneja. Está formada por una cadena de 162 aminoácidos con un peso de 18.4 kDa. Se conocen dos variantes genéticas principales, las llamadas A y B, las cuales difieren en dos aminoácidos en la posición 64 y 118.

Buffer: es una gran mejora al método de lisis de lisosoma que permite extracción de proteínas solubles y concurrente eliminación de ácidos nucleicos (DNA y RNA) durante el proceso de lisis de células.

Caseína: hace parte de las proteínas secretadas en la leche de la mayoría de los mamíferos, es una fosfoproteína producida por cuatro genes que codifican para las caseínas α s1, α s2, β y κ , las cuales se organizan en forma de micelas o unidades solubles.

CAS κ ; caseína

Cebador: Un iniciador o cebador se refiere a un número reducido de nucleótidos del ADN, por lo general de 18 a 24 pares de bases de longitud. Un cebador puede ser utilizado para muchos procesos experimentales diferentes. Se puede utilizar en una reacción de PCR para llegar a un locus determinado y así amplificarlo para su posterior análisis. Es una manera de seleccionar una secuencia muy específica del ADN.

CTAB: (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio es una sal de amonio cuaternario, uno de cuyos grupos alquilo es de gran longitud, con actividad detergente. Se le conoce también por las siglas CTAB, del inglés Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide. Es un surfactante catiónico. Sus usos incluyen la utilización como solución tamponante para la extracción de ADN. Y es uno de los compuestos del antiséptico tópico Cetrimide.

EDTA: El ácido etilendiaminotetraacético, también denominado o con menor frecuencia AEDT, es una sustancia utilizada como agente quelante. se aprovecha en laboratorios bioquímicos y biotecnológicos para desactivar las metal o proteínas.

Enzima de restricción: (o endonucleasa de restricción) es aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto en concreto, llamado sitio o diana de restricción, o en un sitio no muy lejano a este. Los sitios de restricción cuentan con entre cuatro y seis pares de bases, con las que son reconocidos.

Lactoferrina: es una proteína de color rojo debido al hierro al que está unida. Tiene una importante función defensiva antibacteriana y antifúngica.

Mg: que es igual a la milésima parte de un gramo.

Micelas: poliméricas son coloides cuya estructura tiene capacidad de albergar y transportar en fluidos corporales.

PCR:Reacción en cadena de la polimerasa.La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio que permite amplificar pequeños fragmentos de ADN.

RFLP: (Restriction Fragment Length Polymorphism) se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción (también llamadas endonucleasas de restricción) y que varían entre individuos- Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

μl o ml: Microlitro. Unidad de volumen equivalente a la millonésima parte de un litro, representada por el símbolo. También equivale a 1 milímetro cúbico.