

**CARACTERIZACIÓN Y ASOCIACIÓN DE UN POLIMORFISMO DEL GEN
KAPPA CASEINA CON LA CALIDAD DE LECHE EN GANADO HOLSTEIN**

MARÍA DE LOS ÁNGELES GAMBA PAEZ

**UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSE DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACION
PROYECTO CURRICULAR LICENCIATURA EN BIOLOGIA
BOGOTA D.C
2009**

**CARACTERIZACIÓN Y ASOCIACIÓN DE UN POLIMORFISMO DEL GEN
KAPPA CASEINA CON LA CALIDAD DE LECHE EN GANADO HOLSTEIN**

MARÍA DE LOS ÁNGELES GAMBA PAEZ

TRABAJO DE GRADO

**Presentado para optar por el título de
Licenciada en Biología**

Directora

Gloria Patricia Barrera Cubillos. Bacterióloga M. Sc.
Investigadora Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria
CORPOICA

Co-director

Francisco Becerra Galindo M. Sc.
Profesor Asistente. Proyecto Curricular Licenciatura en Biología
Universidad Distrital Francisco José de Caldas

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSE DE CALDAS

FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACION

PROYECTO CURRICULAR LICENCIATURA EN BIOLOGIA

BOGOTA

2009

Nota de aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

*Para María Alejandra De Felipe Gamba, por quien, aun a sabiendas que no soy
la única madre del mundo, decidí ser la mejor de ellas.*

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron con la realización de este trabajo.

A todas aquellas personas que ni de una ni de otra manera colaboraron, pero que cada vez que me veían se unían al deseo colectivo de que terminara pronto.

Al Señor Nelson Gamba, patrocinador oficial del evento, presidente y único miembro de la campaña “Termine bien y rápido eso”

A la Señora Rosmery Paez Tarazona, que me sustituyo como madre, y con ello me facilitó enormemente el trabajo.

A la doctora Gloria Patricia Barrera Cubillos, quien no aceptó este trabajo como uno mas, le cedió amablemente parte de su tiempo y resistió los impulsos de despedir a la tesista. De igual manera a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, por abrirme las puertas de sus laboratorios y permitir el desarrollo del proyecto.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural MADR, por patrocinar el proyecto de leches.

Al profesor Francisco Becerra Galindo, quien pacientemente espero para algún día poder hablar personalmente conmigo, y toleró que le enviara emisarios. Del mismo modo, a la Profesora Carmen Helena Moreno, quien me colaboró con tramites y dudas.

A Fernando, que durante este tiempo se convirtió en mi mano derecha... y en la izquierda, las manos, los pies, los dos hemisferios cerebrales y demás, y que pasó por toda la tramitología universitaria dos veces, por mi causa.

A Catalina, que acepto cederme sus tiempos libres para que yo pudiera ensamblar este trabajo.

A mi hermosa Maria Alejandra, que desde su nacimiento me ha enseñado, solo con su presencia, a ver el mundo con otros ojos y que permitió que la dejara de lado varias veces en aras de alcanzar esta meta.

Nota de la Universidad

“La universidad no se hace responsable de las ideas, ni del contenido del presente trabajo, debido a que estas hacen parte única y exclusivamente de sus autores”

Capítulo XV, Artículo 117, Acuerdo Número 29 de 1988 del Consejo Superior de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas

CONTENIDO

1. DESCRIPCION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
2. JUSTIFICACION	5
3. OBJETIVOS	7
4. MARCO TEORICO	8
4.1 Producción de leche Mundial	8
4.2 Producción de leche en Colombia.....	8
4.2.1 Problemática del sector lechero en Colombia.....	12
4.3 Factores que influyen en la composición de la leche	13
4.4 Composición de la leche	15
4.4.1 Grasa	15
4.4.2 Lactosa	16
4.4.3 Proteínas.....	17
4.4.3.1 Caseínas	17
4.4.3.2 Tipos de Caseínas	19
4.4.3.3 Kappa caseína	20
4.5 Genes de la Caseína.....	22
4.5.1 Variantes Genéticas de la caseína.....	23
4.6 Marcadores Moleculares	26
4.7 Detección de polimorfismos en el ADN.....	27
4.7.1 PCR-RFLP.....	27
4.7.2 Técnica SSCP.....	27
5. ANTECEDENTES	29
5.1. Estudios de asociación entre los polimorfismos de CSN3.....	33
6. MATERIALES Y METODOS	38
6.1 Población de estudio	38
6.1.1 Selección de la población.....	38

6.2	Análisis fenotípico.....	38
6.3	Procesamiento de las muestras	40
6.3.1	Banco de PBL.....	40
6.3.2	Banco de ADN.....	40
6.4	Genotipificación por PCR-RFLP.....	41
6.4.1	PCR.....	41
6.4.2	Digestión del producto amplificado.....	42
6.4.3	Visualización de productos de digestión	42
6.5	Genotipificación por PCR-SSCP	44
6.5.1	PCR.....	44
6.5.2	Geles de SSCP.....	44
6.6	Diseño Experimental	45
6.7	Análisis Estadístico.....	45
7.	RESULTADOS.....	47
7.1	Análisis fenotípico.....	47
7.1.1	Análisis de la leche.....	47
7.1.2	Correlación entre las variables de estudio	48
7.1.3	Efecto de la Finca	49
7.1.4	Efecto del clima	52
7.1.5	Efecto de la lactancia.....	54
7.1.6	Efecto del padre.....	57
7.2	Análisis genotípico.....	58
7.2.1	Geles SSCP.....	60
7.2.2	Análisis de los componentes de varianza	61
8.	DISCUSION	65
8.1.	Análisis fenotípico.....	65
8.1.1	Composición de la leche.....	65
8.1.2	Correlación entre los componentes de la leche	67
8.1.3	Factores que afecta la composición de la leche	68
8.1.3.1	Estado de lactancia	68
8.1.3.2	Época seca o lluviosa.....	70

8.1.3.3 Finca	71
8.1.3.4 Efecto del padre.....	73
8.2 Análisis genotípico.....	74
8.2.1 Genotipo CSN3.....	74
8.2.2 Frecuencias alélicas y genotípicas.....	75
8.3 Aplicación de un programa de mejoramiento genético.....	77
9. CONCLUSIONES	79
10. RECOMENDACIONES	80
11. BIBLIOGRAFIA	81

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Regiones productoras de leche en Colombia	10
Tabla 2. Lípidos presentes en la leche	16
Tabla 3. Caseínas de la leche bovina y algunas de sus propiedades	19
Tabla 4. Variantes Alélicas de las caseínas	24
Tabla 5. Diferencias en la posición de los aminoácidos en las variantes genéticas de la kappa –caseína.	25
Tabla 6. Fincas participantes del proceso de muestreo programado	38
Tabla 7. Genotipos de Kappa-caseína determinados según marcador de peso..	43
Tabla 8: Análisis de contenido de grasa, proteína, lactosa, sólidos no grasos (SNG) y sólidos totales (ST) en muestras de leche de individuos de 6 fincas en la sabana de Bogotá	48
Tabla 9. Prueba de correlación de coeficientes de Pearson para las cinco variables en estudio	49
Tabla 10. Análisis de contenido de Grasa, Proteína, Lactosa, Sólidos no grasos (SNG) y sólidos totales (ST) en muestras de leche de individuos de 6 fincas en la sabana de Bogotá	50
Tabla 11: Prueba de comparaciones múltiples para grasa, proteína, lactosa, SNG y ST por el método de Duncan por finca.....	52
Tabla 12. Análisis del contenido de grasa, proteína, lactosa, SNG y ST según la temporada	53

Tabla 13: Prueba de comparaciones múltiples para grasa, proteína, lactosa, SNG y ST por el método de Duncan por clima	54
Tabla 14. Análisis de contenido de Grasa, Proteína, Lactosa, Sólidos no grasos (SNG) y sólidos totales (ST) en muestras de leche según las edades de los individuos clasificadas en diferentes lactancias.....	56
Tabla 15: Prueba de comparaciones múltiples para grasa, proteína, lactosa, SNG y ST por el método de Duncan por lactancia (edad)	57
Tabla 16. Ranking de padres por componente de la leche estimado	58
Tabla 17. Frecuencias genotípicas observadas y número de animales por frecuencia	60
Tabla 18. Efecto de los genotipos CSN3 sobre los componentes de la leche	62
Tabla 19: Prueba de comparaciones múltiples para grasa, proteína, lactosa, SNG y ST por el método de Duncan para cada genotipo estudiado	62
Tabla 20. Componentes de varianza estimados y efecto de los genotipos de CSN3, finca, Padre, clima y sus interacciones sobre los rasgos de producción de la leche.....	64

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución por establecimiento.....	9
Figura 2. Regiones lecheras de Colombia	11
Figura 3. Cuenca lechera de la sabana de Bogotá.....	12
Figura 4. Micela de caseína	18
Figura 5. Estructura de la kappa caseína	21
Figura 6. Genes de la Caseína Bovino y contexto genómico del gen CSN3	23
Figura 7. El principio del análisis por SSCP.....	28
Figura 8. Fotografías correspondientes al proceso de ordeño	39
Figura 9. Región amplificada del gen kappa caseína	42
Figura 10. Gel de poliacrilamida al 6% teñido con plata para los fragmentos de digestión con <i>Hinf I</i>	43
Figura 11. Región amplificada del gen kappa caseína para SSCP.....	44
Figura 12. Promedios de grasa, proteína, lactosa, Sólidos no grasos SNG y Sólidos Totales ST	48
Figura 13. Composición de grasa, proteína, lactosa, sólidos no grasos (SNG) y sólidos totales (ST) por finca	51
Figura 14. Promedios de los componentes de la leche en dependencia del clima: seco o húmedo	53

Figura 15. Determinación de los promedios de los componentes de la leche según el estado de lactancia (edad)	55
Figura 16. Frecuencias alélicas observadas de la kappa caseína en la población de estudio	59
Figura 17. Frecuencias genotípicas observadas de la kappa caseína en la población de estudio	60
Figura 18. Gel de poliacrilamida teñido con plata para los amplímeros de la metodología SSCP	61

RESUMEN

Polimorfismos relacionados con características productivas han sido ampliamente descritos, como es el caso de los encontrados en el gen CSN3 (κ -caseína), cuyas dos variantes genéticas principales, A y B, se han reportado principalmente. Se ha descrito la variante B como la de mayor influencia en rendimientos de proteína. Este estudio tuvo como objetivo estimar el efecto de las variantes dialélicas de CSN3 en 232 animales de la raza holstein provenientes de la sabana de Bogotá. La evaluación de la composición de la leche cruda se hizo tomando muestras de leche mensualmente, a partir del ordeño total, que se procesaron en el laboratorio de Alpina Productos Alimenticios S.A, para proteína total, grasa, lactosa, sólidos no grasos y sólidos totales. Para el análisis genético, se tomó muestra de sangre periférica y se realizó la extracción de ADN con fenol-cloroformo. Se amplificó un fragmento 271pb y 120pb. Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima *Hinf I*. Los productos de digestión se visualizaron de geles de poliacrilamida al 6% y teñidos con plata para su revelado. Para la identificación del polimorfismo descrito por la técnica RFLP, se desarrollo la metodología de PCR- SSCP buscando las condiciones que demostraron diferenciación entre los tres genotipos buscados, AA, AB y BB. Se evaluaron los resultados obtenidos para cada variable, mediante un diseño completamente Azar con arreglo Factorial. Las frecuencias alélicas en la población fueron de A>B y las frecuencias genotípicas de AA>AB>BB. Existe influencia significativa del alelo B y genotipos AB sobre el porcentaje de proteína en la leche y sobre los porcentajes de sólidos no grasos y sólidos totales. Se encontraron otros factores que afectan significativamente la fracción proteica de la leche, tales como el estado de la lactancia, el manejo del hato y la genética del padre. La técnica SSCP es más económica y accesible para los productores debido a que se evita la digestión de los productos de PCR con enzimas de alto costo. Los resultados obtenidos muestran que la aplicación de programas de mejoramiento asistidos por análisis genético son necesarios para la industria colombiana, dado que las frecuencias reportadas como favorables para los rasgos de interés económico son muy bajas en la nación.

INTRODUCCIÓN

El grupo de Recursos Genéticos y Biotecnología Animal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, se ha posicionado a partir del año 1993 en el área de los marcadores moleculares aplicados al campo de la conservación, caracterización filogenética de las especies domesticas, resistencia genética a enfermedades y, por ultimo, detección de genes candidatos para características de calidad en el ganado criollo colombiano.

Precisamente, uno de los proyectos adelantados en el ámbito molecular es el de la “Identificación de Genes Candidatos asociados con la calidad de la composición de la leche”, del cual hace parte como pequeño proyecto el tema propuesto para el presente trabajo de grado, denominado “Caracterización y Asociación de un polimorfismo del gen kappa caseína con la calidad de leche en ganado holstein”, cuyo aporte al proyecto consiste en el genotipificación del gen candidato mencionado, y correlación de este con los rendimientos de los componentes de la leche.

El proyecto, en su totalidad, pretende realizar una caracterización molecular para los genes de la κ - Caseína, β - lacto globulina y DGAT1 en ganado holstein y determinar el efecto de las diferentes variantes alélicas de estos genes sobre las características de producción de leche, para en un futuro poder ofrecer al productor otra herramienta de selección genética y así mejorar la calidad de la leche en la región. Para ello, se valdrá de muestras de sangre provenientes de los hatos de fincas que le venden la producción de leche a Alpina S.A., y, mediante un estudio del ADN de los animales por medio de la técnica de PCR-RFLP y PCR - SSCP, identificar cada uno de los genes mencionados, y relacionarlos después con la cantidad de sólidos en la leche.

Se espera que el Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología animal, de la mano con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y gracias a

la contribución hecha partir de los resultados obtenidos de esta propuesta pueda prestar un servicio de tipificación genética molecular el cual complemente la labor de evaluación genética de ganaderías interesadas en establecer programas de mejoramiento bien estructurados.

1. DESCRIPCION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción de leche en América se concentra principalmente en Estados Unidos, que participa con el 16% de la producción mundial, mientras que Colombia participa con el 1,2%. La productividad de leche en el país es en promedio de 4.5 litros/vaca/día, inferior a las de Argentina, Uruguay y Norteamérica. De este modo, Colombia es el tercer productor de leche de Sur América, el sexto en el continente americano y el 23 en el mundo (FAO, 2006). A nivel nacional, la producción de leche fresca en el país ha ido adquiriendo una creciente importancia dentro del régimen económico, debido a la progresiva demanda en el mercado interno. La actividad lechera constituye un área fundamental para la dinámica del mercado agropecuario nacional y la recuperación del mismo, dada su participación en el Producto Interno Bruto Sectorial, su aporte a la generación de empleo y su flexibilidad en términos de sistemas de producción, lo que permite adecuarse a todos los espacios agro ecológicos del país. Es así que, los sistemas de explotación especializados y de doble propósito se ubican en diferentes regiones del territorio nacional. En el trópico alto colombiano (mayor a 2500 msnm) se concentra la lechería especializada, donde se encuentra la cuenca lechera de la sabana de Bogotá con predominio de la raza Holstein de origen americano, aunque existen ganaderías de origen europeo. Es también en esta zona donde se encuentran gran parte de las industrias dedicadas al procesamiento.

Debido al crecimiento de la industria láctea nacional en los últimos años y a las perspectivas de transformación y exportación, existe la necesidad de instaurar medidas que mejoren la calidad de la composición de la leche, por ser una variable crucial para aumentar la eficiencia en la industria de derivados lácteos, teniendo en cuenta que el 88% de la producción nacional de leche cruda se dedica al procesamiento. Basados en lo anterior, el gobierno generó un acuerdo con las plantas procesadoras para incentivar a los productores a mejorar la composición de la leche, estableciendo el pago de un bono adicional por mayores contenidos de proteína, grasa y sólidos totales, según resolución del 2007.

A pesar de la importancia que tiene la calidad de la leche, actualmente en Colombia no existen estrategias de manejo genético para mejorar su composición. Tradicionalmente, la selección de hembras se realiza con información productiva, principalmente el volumen de leche y en el caso de reproductores, se compran pajillas de toros que se seleccionan en catálogos internacionales, con valoraciones de calidad y producción registradas en ganaderías de países ubicados en zonas agroecológicas diferentes al trópico. De acuerdo con lo anterior, en Colombia no se dispone de un programa estructurado para la selección de individuos mejorantes, que se base en datos productivos y de calidad bajo las condiciones agroecológicas del país. Lo anterior se refleja en baja calidad de la leche producida en la cuenca de la sabana de Bogotá, que posee niveles de grasa y proteína por debajo de la raza en el ámbito mundial.

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo de grado plantea la cuestión acerca de si las frecuencias encontradas de un polimorfismo del gen kappa caseína en la población seleccionada de ganado holstein, sugieren la necesidad de la implementación de un programa de selección, teniendo en cuenta la asociación reportada entre este marcador molecular y el alto porcentaje de sólidos de la leche.

2. JUSTIFICACIÓN

La producción de leche en el ámbito mundial se ha ido optimizando debido a los grandes avances en el campo de la genética, la tecnología, la sanidad y la nutrición. Maximizar el producido y la calidad de la leche, además de reducir los costos, se ha constituido en el mayor objetivo de la industria. En Colombia, una de las problemáticas de la cadena láctea se encuentra en la composición de la leche, principalmente por el contenido de proteína y grasa que se esperan como indicadores de calidad en la misma. Para contribuir al respecto, es necesario generar estrategias que propendan a incrementar el nivel de sólidos en la leche.

Una estrategia consiste en identificar toros con mérito genético superior, no obstante, animales con idéntico pedigrí pueden tener un amplio rango de variación en la calidad de sus hijas. Otra estrategia que puede apoyar las falencias de la primera, consiste en la utilización de marcadores moleculares para la determinación de genes que se encuentran relacionados con propiedades de producción, esto contribuye a hacer más eficientes los programas de selección de animales y optimizar el rendimiento. Mediante la utilización de diferentes técnicas moleculares es posible determinar el genotipo de todos los animales de una población sin distinción de sexo, edad o estado fisiológico. Esto supone una gran herramienta, pues genera información acerca del potencial genético de un animal desde su nacimiento, antes de alcanzar su vida productiva o incluso en estado embrionario (Osta, 1994). El uso de estas técnicas es de gran provecho por la posibilidad que brindan de identificar alelos deseables heredados dentro de la descendencia, valiéndose de muestras de sangre, de tejidos o de semen como fuente de ADN.

Existen reportes recientes donde se identifican polimorfismos asociados con características productivas. Varios de ellos, asocian algunos SNP con contenidos de proteína en leche de vacas Holstein, tal es el caso de CSN3 (Kappa caseína), en la cual hay dos variantes genéticas que afectan la composición de la leche bovina. Las variantes principales A y B poseen un cambio de los aminoácidos

treonina (ACC) y Asparagina(GAT) en las posiciones 136 y 148 respectivamente(variante A), por isoleucina (ATC) y alanina (GCT) (variante B).

Este tipo de trabajos, no han sido realizados en animales de producción lechera en condiciones de trópico de altura, lo cual es de gran importancia para su validación y uso en estrategias de selección. El desarrollo de iniciativas que contribuyan a la validación e implementación de metodologías de este tipo, en Colombia, constituirá beneficios tanto para ganaderos como para la industria láctea, pues existirá la posibilidad de apoyar programas estructurados de mejoramiento genético, mediante la selección de animales que porten la variante de ADN asociada con valores deseados de la composición en leche.

El presente trabajo tiene por objetivo estimar el efecto de variantes dialélicas en el gen de CSN3 (kappa caseína), en la composición de la leche de 232 hembras de la raza Holstein, mantenidas en condiciones agroecológicas del trópico de altura.(>2500msnv). Este es un paso inicial para la utilización de este tipo de metodologías a las que se puede recurrir para apoyar las estrategias de mejoramiento de calidad de leche en Colombia.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar un polimorfismo del gen kappa caseína y su asociación con características fenotípicas relacionadas con la calidad de la leche, en una población de ganado Holstein de la sabana de Bogotá.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Generar un banco de ADN para la población de ganado Holstein seleccionada de la Sabana de Bogotá.
- Estimar las frecuencias genotípicas y alélicas de dos variantes genéticas en el gen kappa de la caseína por medio de la técnica PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa- Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción)
- Diseñar una técnica de PCR-SSCP, para la identificación del polimorfismo del gen descrito por PCR RFLP.
- Realizar estudios de asociación entre el marcador genético identificado y el porcentaje de proteína y grasa en la leche de la población seleccionada mediante el análisis de componentes de varianza para la determinación de la proporción del efecto del gen sobre la variación de las características.

4. MARCO TEORICO

4.1 PRODUCCIÓN DE LECHE MUNDIAL

Dentro de la producción mundial de alimentos de origen animal, la leche se encuentra catalogada como uno de los principales, al igual que la carne y el huevo. La producción proviene principalmente de ganado bovino, ya sea bajo sistemas especializados o de doble propósito. Otros orígenes de la leche son las provenientes de oveja, cabra, camello y demás. Si bien la estructura fisicoquímica y la apariencia de la leche son similares, independientemente del tipo de animal, sus componentes poseen niveles de concentración diversos. De acuerdo con la información de la FAO, para el año 2006 el volumen de la producción mundial de leche alcanzó la cifra de los 619 millones de toneladas, de los cuales un poco más del 85% provino del ganado bovino. De esta fuente de origen, el principal continente productor fue Europa con el 40% del total mundial, seguido por América, 28%, y Asia con el 22%.

Los países de América Latina y Suramérica no son grandes productores y algunos de ellos son importadores netos de lácteos, sin embargo, la mayor parte del consumo se obtiene de la producción interna, la cual crece a tasas positivas. El principal productor en esta región es Brasil con 23,3 millones de toneladas, Argentina con 8.1 millones de toneladas y Colombia con 6 millones en el 2004 (1,24%).

4.2 PRODUCCION DE LECHE EN COLOMBIA

En Colombia, el total de la producción para el año 2007 fue, según cifras de FEDEGAN, de 6.176 millones de litros, de los cuales cerca de un 88% se dedican a la industria láctea y el restante 12% destinado al sostenimiento de novillos en sistemas de producción de doble propósito (carne y leche) o para comercialización

en la modalidad de cantinas en zonas rurales, poblaciones de menor tamaño o en los estratos 1 y 2 de las principales ciudades del país.

Los productos derivados de la leche tienen diferentes características físico-químicas, como resultado de los distintos tipos de procesamientos a la cual es sometida la leche cruda. Ellos son, principalmente leche pasteurizada, leche ultrapasteurizada, leche en polvo, leche condensada, mantequilla, queso, yogur y lactosuero. En cuanto a la distribución de los productos de la industria láctea colombiana, el mayor número se encuentra en las actividades de pasteurización, homogenización y embotellado de leche líquida que equivale al 48% (Figura 1). Le siguen los sub-sectores dedicados a la preparación de helados y postres a base de leche y fabricación de quesos.

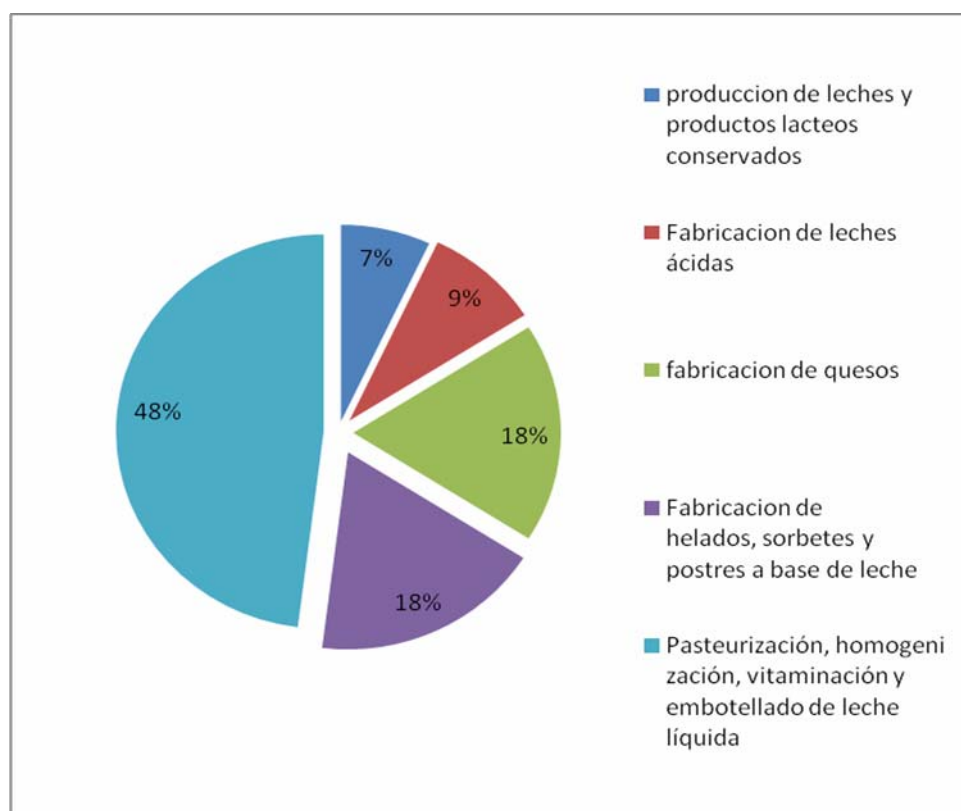


Figura 1. Distribución por establecimiento. Fuente: EAM, 2000. Cálculos observatorio Agrocadenas.

La producción lechera de Colombia tiene su asiento en cuatro regiones, que fueron establecidas a partir de la resolución 000012 de enero de 2007 del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (Tabla 1).

Tabla 1. Regiones productoras de leche en Colombia, según resolución 000012 de enero de 2007 MADR

Regiones productoras de Leche en Colombia	
Región 1	Cundinamarca, Boyacá
Región 2	Antioquia, Risaralda, Caldas, Quindío, Chocó
Región 3	Atlántico, Bolívar, Sucre, Córdoba Guajira, Magdalena, Cesar, Santander, Norte de Santander
Región 4	Valle, Cauca, Nariño, Putumayo Tolima, Huila, Caquetá Meta, Casanare, Arauca, Vichada, Guainía, Guaviare, Vaupés, Amazonas

La clasificación de las cuatro regiones se basa en la vocación ganadera de cada una, sus condiciones agroclimáticas y los canales de comercialización que presentan dentro de estos distritos lecheros, los cuales se indican en la figura 2. Las dos principales regiones, por su participación en la producción nacional, son la atlántica y la Central con el 40 y 34% respectivamente. Estas regiones poseen cuencas lecheras ubicadas en trópico de altura, que se caracteriza por sistemas de ganadería especializada, con un uso mas intensivo de los factores de capital (tierra) en comparación de los sistemas de doble propósito, y consecuentemente con mayor utilización de suplementos alimenticios En la ganadería especializada, las razas utilizadas son principalmente europeas.

En la región Central hay dos cuencas importantes: La cuenca lechera del Valle de Ubaté y Chiquinquirá y la cuenca lechera de la Sabana de Bogotá.

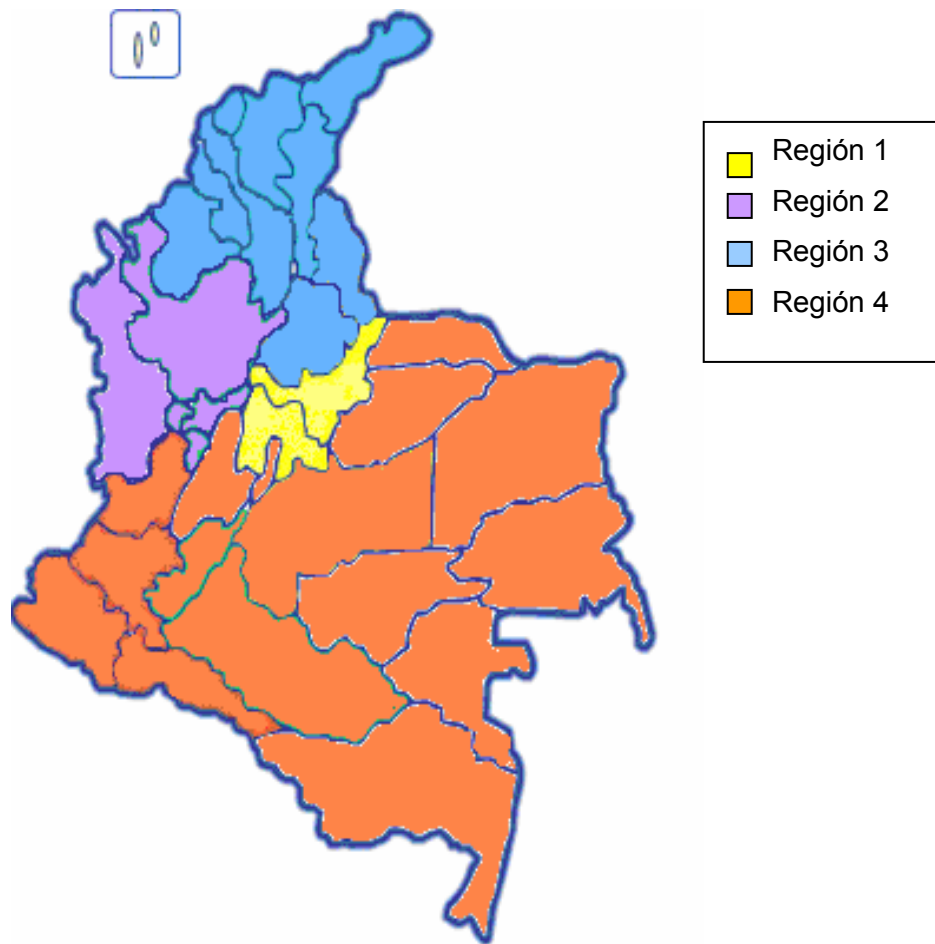


Figura 2. Regiones lecheras de Colombia, según Resolución 000012 de enero de 2007 MADR.

La cuenca lechera de la Sabana de Bogotá (figura 3), comprende varias zonas: la Zona sur (municipios de Mosquera, Fontibón, Albán, Funza, Bojacá, Soacha, Sibaté, Bosa y Madrid), la zona occidental (municipios de Facativá, Siberia, Subachoque, Tabio, Tenjo, Cota, El Rosal, Chía, Cajicá y la Pradera), la Zona Norte (municipios de Tocancipá, Suesca, Chocontá, Gachancipá, Sesquilé, Zipaquirá, El Sisga y la zona de autopista entre Chocontá y Villapinzón) y la Zona de Sopó. En esta cuenca el costo de oportunidad de la tierra es el más alto del país. El tamaño promedio por finca en la zona es de 166 hectáreas. Las razas

predominantes son Holstein mestizo, Holstein colombiano y Holstein puro. La productividad media por animal en la zona es de 14 litros/día.

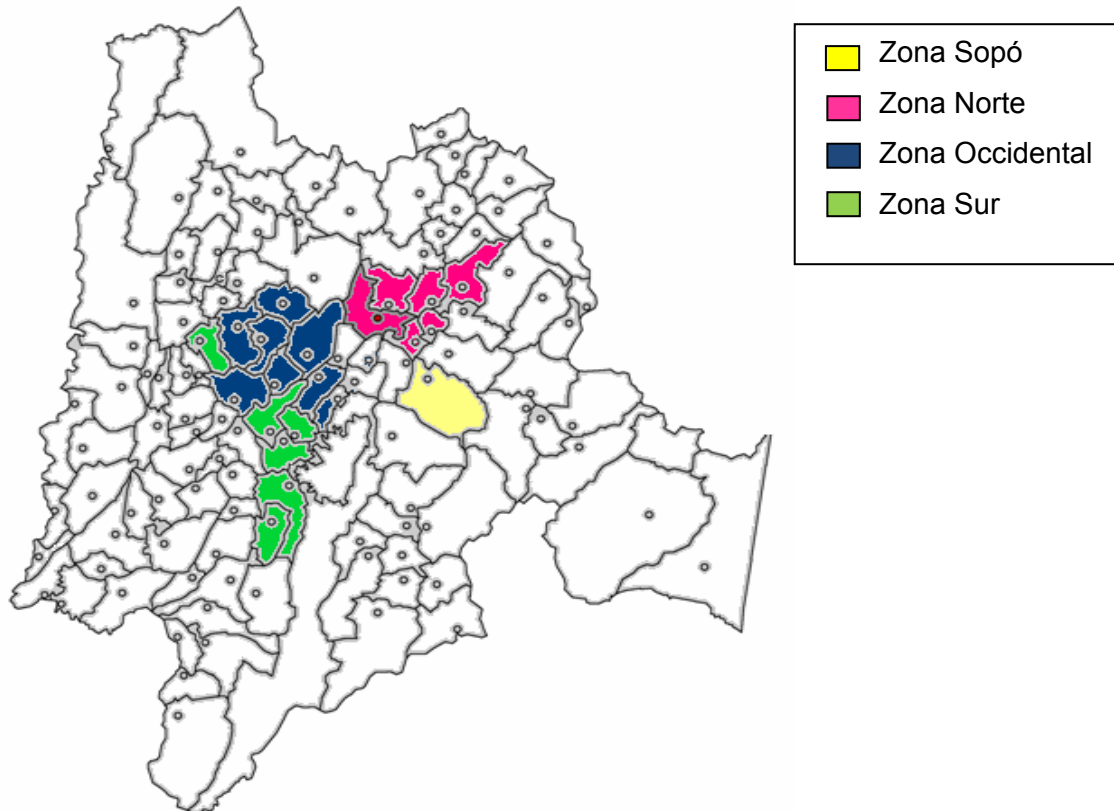


Figura 3. Cuenca lechera de la sabana de Bogotá, según el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Agropecuario, 2007.

4.2.1 Problemática del sector lechero en Colombia

Uno de los principales problemas que enfrenta el desarrollo tecnológico de la cadena Láctea colombiana, es la calidad de la composición de la leche, la cual es un factor importante en la determinación de la competitividad del sector nacional y es una variable importante para la producción de derivados lácteos, ya que se puede obtener una mayor eficiencia en su producción.

En Colombia, existe un escaso mejoramiento genético que contribuya en la obtención de óptimos niveles de producción y calidad de la composición de la leche. Este factor es de gran importancia en el proceso agroindustrial para el manejo de la leche y derivados, pues influye directamente sobre la manufactura. La calidad higiénica corresponde al contenido de bacterias y organismos

patógenos en la leche y a la presencia de residuos de medicamentos. La calidad de la composición se refiere al contenido de sólidos grasos y no grasos de la leche, determinado principalmente por factores genéticos y nutricionales.

Un reporte del Ministerio de Agricultura del primer semestre de 2007, indica que la leche producida en la región Atlántica, presenta los contenidos más altos de proteína, grasas y sólidos totales. Los niveles más bajos, se reportan en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño, Valle del Cauca, Cauca, Tolima, Meta y Casanare. Lo anterior, evidencia la necesidad de realizar programas de mejoramiento, que aumenten los niveles de proteína y grasa en cuencas lecheras como la de la Sabana de Bogotá, donde se ubican importantes colonias lecheras y grandes industrias.

4.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICION DE LA LECHE Y MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD

Actualmente, las industrias alimenticias han enfocado su interés en encontrar una estrategia que permita mejorar la composición de la leche para que tanto esta como sus derivados se constituyan en productos de mayor calidad, puesto que es así como lo demandan los consumidores. La táctica para conseguir esta mejoría implica incrementar la concentración de proteína en la leche, especialmente en la caseína, que es catalogada como la de mayor calidad, que además es un factor importante en la fabricación de quesos. En la producción de caseínas de un animal intervienen varios factores, como la alimentación, la edad del animal, número de lactación, número de ordeños, genética del animal, etc. Por lo tanto la producción de caseína se ajusta a un carácter cuantitativo genético en el que intervienen factores ambientales, genéticos y la interacción de ambos. Asimismo, el rendimiento lechero, entendiendo éste como producción de leche y calidad lechera (traduciendo la calidad en este caso en incremento de proteína en leche) está influido por la composición genética del animal y por los efectos del medio

ambiente. La genética le da a la vaca la oportunidad de producir leche de una determinada calidad y el medio ambiente provee las condiciones para producirla.

Esto indica que conociendo los genes (locus, estructura, transmisión) y los genotipos, se puede analizar la correlación con caracteres cuantitativos como cantidad de proteína y grasa, para elaborar un programa de mejora genética en una determinada población bovina.

Teniendo en cuenta el manejo, aunque una apropiada alimentación es esencial para obtener una producción de leche máxima y para limitar la variación estacional de la composición de la misma, la manipulación de la dieta no es el único factor que interviene, también lo hace la genética. Basada en ella, se han empleado programas de reproducción que han usado una selección genética establecida en las pruebas de progenie, y los resultados han sido, un pequeño pero acumulativo mejoramiento de la producción y composición de la leche, así como también se han llevado a cabo estudios con marcadores genéticos para identificar genes que aumentan la calidad de la leche.

Para el mejoramiento, se utilizan programas tradicionales de selección que se basan en el uso de medidas fenotípicas registradas para el individuo candidato a selección o en parientes suyos. Es así, que las pruebas de progenie identifican los toros con mérito genético superior para las características de producción de interés y la selección se basa en la información de pedigrí. Sin embargo, animales con idéntico pedigrí pueden tener un amplio rango de variación en la calidad de sus hijas. La utilización de marcadores moleculares para la identificación de genes que se encuentran relacionados con las características de producción, ha contribuido para hacer más eficientes los programas de selección de animales y optimizar la producción. Se ha definido a los genes candidatos como aquellos, que por su funcionalidad participan en la expresión de un carácter cuantitativo y por lo tanto podrían explicar un porcentaje de su varianza fenotípica.

El uso de técnicas moleculares para identificación de genes candidatos es de gran utilidad, por la posibilidad que proveen para identificar los alelos deseables heredados dentro de la descendencia, utilizando muestras de sangre, semen o tejido como fuente de DNA. Basados en esta información se pueden seleccionar animales para reproducción o si fuese el caso para pruebas de progenie.

4.4 COMPOSICIÓN DE LA LECHE

La leche es un líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, compuesta por agua, grasas, proteínas, azúcares (lactosa), minerales, vitaminas y algunas sustancias presentes en menor concentración, como son: enzimas, nucleótidos, lecitinas y gases disueltos. (Ruvalcaba, 1994).

4.4.1 Grasa

Normalmente, la grasa constituye desde el 3,5 hasta el 6,0% de la leche bovina, con variación entre razas y prácticas de alimentación. La grasa se encuentra presente en pequeños glóbulos suspendidos en agua, rodeados de una capa de fosfolípidos, que evitan que los glóbulos se aglutinen entre sí repeliendo otros glóbulos de grasa y atrayendo agua. Siempre que esta estructura se encuentre intacta, la leche permanece como una emulsión. La grasa de la leche contiene principalmente ácidos grasos de cadena corta, (cadenas de menos de ocho átomos de carbono) producidos de unidades de ácido acético derivadas de la fermentación ruminal, lo cual es una característica única de la grasa de la leche bovina comparada con otras clases de grasas animales y vegetales. Los ácidos grasos de cadena larga en la leche son principalmente los insaturados (deficientes en hidrógeno), siendo los predominantes el oleico (cadena de 18 carbonos), y los polinsaturados linoléico y linolénico. Los grupos de lípidos presentes en la leche son triacilglicéridos, diacilglicéridos, monoacilglicéridos, (todos estos constituidos

por gran cantidad de ácidos grasos) fosfolípidos, ácidos grasos libres, esteroides y sus ésteres, y algunos carbohidratos. (Tabla 2)

Tabla 2. Lípidos presentes en la leche. Tomado de McGee, 2004.

Lípido	Porcentaje del total de lípidos ⁴⁰	Concentración (g/L)
Triacilglicéridos	96-98	31
Diacilglicéridos	2,10	0,72
Monoacilglicéridos	0,08	0,03
Fosfolípidos	1,1	0,35
Ácidos grasos libres	0,2	0,08
Colesterol	0,45	0,15
Hidrocarburos	rastros	rastros
Esteres de esteroides	rastros	rastros

4.4.2 Lactosa

La lactosa es un glúcido libre que existe en cantidad importante en todas las leches; es también el componente más abundante, el más simple y el más constante de proporción. La lactosa parece ser el factor que limita la producción de leche; es decir, que la cantidad de leche producida depende de las posibilidades de síntesis de la lactosa en la mama; es el elemento soluble más abundante y su actividad osmótica global es mucho más elevada que la de los otros componentes.

La lactosa no es simplemente un glúcido energético para los seres humanos y para numerosos animales, la lactosa es, en la práctica la única fuente de galactosa que es un componente de los tejidos nerviosos. En la leche de vaca el contenido de lactosa varía poco, entre 48-50 g/l. El factor más importante de la variación es la infección de la mama, que reduce la secreción de lactosa. Debido a

la regulación osmótica, el contenido en lactosa de la leche es aproximadamente inversamente proporcional al contenido de sales.

4.4.3 Proteínas

Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%). La concentración de proteína en la leche bovina varía de 3.0 a 4.0% (30-40 gramos por litro). El porcentaje varía con la raza de la vaca y en relación con la cantidad de grasa en la leche.

4.4.3.1 Caseínas

Las caseínas se sintetizan exclusivamente en la glándula mamaria y son las principales proteínas de la leche, con un contenido de 25 a 28 gramos por litro.

Las caseínas se encuentran conjugadas a grupos fosfato, por uniones covalentes a algunos residuos de serina y ocasionalmente a residuos de treonina, por lo cual son denominadas fosfoproteínas. Entre sus propiedades se cuenta la precipitación a temperatura ambiente en pH 4.6 a 20°C.

En la leche, las caseínas forman agregados multimoleculares conocidos como “micelas de caseína”, que se mantienen en suspensión coloidal, debido a su tamaño reducido. Para su separación, se utiliza la ultra centrifugación o la precipitación salina. En la ultra centrifugación se puede observar que toda la caseína no está en estado de micelas sedimentables, de modo que es posible obtener una fracción soluble (5-10%), que aumenta con el descenso de la temperatura. La micela de caseína está formada por varias subunidades (α , β y κ) unidas entre ellas, en diferentes proporciones (1- κ : 3- β : 5- α) y en presencia de calcio. Se puede suponer, que la micela de caseína tiene una forma más o menos esférica. Se le atribuye una estructura esponjosa no rígida en donde las caseínas alfa y beta forman cadenas de copolímeros unidas por la kappa caseína como si se tratara de una cadena (Figura 4)

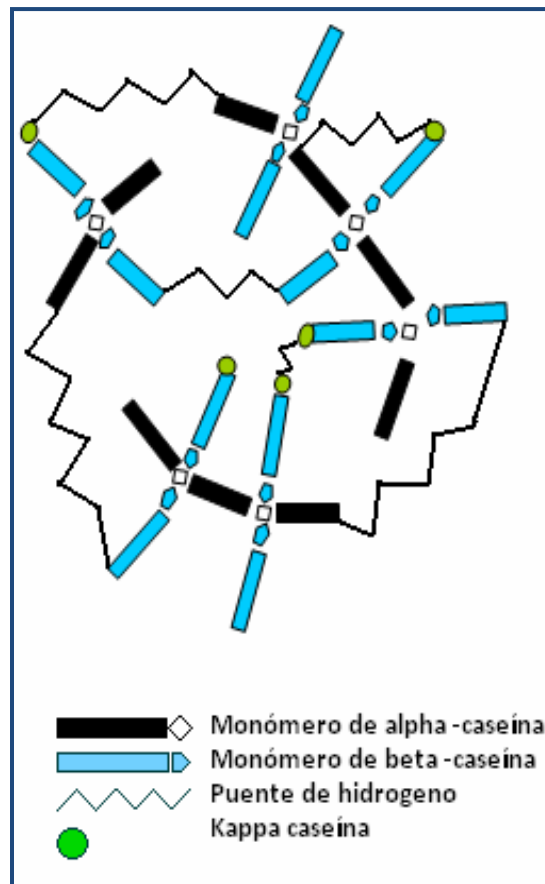


Figura 4. Micela de caseína. Tomado de: **REDVET** Rev. Electrón. Vet. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://www.redvet.es>

Las moléculas están además unidas entre ellas por puentes de PO_4 y calcio. Además de fosfato cálcico, también se encuentran minerales de la leche (Mg, Na, K) y los citratos coloidales, cuyas formas de unión no se conocen bien pero que probablemente contribuyen a la estabilidad de la micela.

En la industria quesera, se utiliza la técnica de coagulación enzimática de la caseína, la cual genera la ruptura de la micela formándose fosfo-paracaseinato cálcico. Las micelas de caseína y los glóbulos grasos le dan a la leche la mayoría de sus características físicas, además le dan el sabor y olor a los productos lácteos tales como mantequilla, queso, yogurt, etc.

4.4.3.2 Tipos de caseínas

Los estudios basados en la movilidad molecular (cromatografía, electroforesis, filtración, ultra centrifugación) han puesto en evidencia la heterogeneidad de la caseína. En la leche bovina se distinguen cuatro tipos de caseína, de acuerdo con su estructura: alfa s1 (α s1), alfa s2 (α s2), beta (β), y Kappa (κ). Las caseínas de la leche y algunas de sus características se relacionan en la tabla 3.

Tabla 3. Caseínas de la leche bovina y algunas de sus propiedades. Adaptado de Farrell, 2004

Caseína	Composición en gramos	Peso molecular	Punto Isoiónico	Punto Isoeléctrico
α s1-caseína	12-15	23,615	4.92-5.05	4.44-4.76
α s2-caseína	3-4	25,266
β - caseína	9-11	24,023	5,41
k-caseína	2-4	19,037	5,77	5,45-5,77

El sufijo “s” de las caseínas alfa, indica que son “sensibles” al calcio, es decir, que se pueden precipitar al asociarse con él. Estas caseínas alfa s1 y s2 poseen un peso molecular de 23.600 y 25.150 D, respectivamente

Entre las proteínas de la leche de vaca, la α s1 es una de las que se encuentra en mayor cantidad, pues constituye cerca del 40% de la fracción de caseínas. La variante más común tiene 199 aminoácidos en su secuencia, con 8 ó 9 grupos fosfato, y su estructura está conformada por un componente principal y un componente menor. Ambas componentes son polipéptidos de cadena sencilla con la misma secuencia de aminoácidos (Mercier *et al.*, 1971; Grosclaude *et al.*, 1973) y difieren solo en sus puntos de fosforilación.

La caseína α s2 constituye cerca del 10% de la fracción de caseína en la leche bovina, consiste en dos componentes principales y varios componentes menores,

exhibiendo varios niveles de fosforilación postranscripcional (Swaisgood, 1992). La proteína de referencia para esta familia es α_2 -CN A-11P, un polipéptido de cadena simple que consta de 207 residuos de aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 25,2 Kd (Hoagland *et al.*, 2001)

La caseína β constituye cerca del 45% de la leche bovina. La proteína de referencia para esta familia, β -CN A²-5P, es un polipéptido de cadena simple sin residuos de cisteína que contiene 209 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 23,9 Kd. Esta es la caseína más hidrofóbica, y presenta además estructura particular, con una clara división en dos zonas. La que corresponde al extremo C-terminal es particularmente hidrofóbica, mientras que los aminoácidos más hidrofílicos, y todos los grupos fosfato unidos a serinas, se concentran en el extremo N-terminal. La caseína beta puede clivarse por acción de la plasmina, que es una proteasa nativa de la leche (Eigel *et al.*, 1984), dando origen a la formación de los tipos de caseína gama, gama1 y gama2, los cuales son considerados fragmentos de la variante beta caseína.

4.4.3.3 Kappa caseína

Las kappa caseínas son proteínas solubles en presencia de una alta concentración del Ion calcio y son el sustrato específico de la acción proteolítica del cuajo en el proceso de fabricación quesera. Estas proteínas, están constituidas por un segmento terminal aminado que es la para-kappa-caseína, caracterizada por residuos hidrófobos de carácter básico (electropositivo) y un segmento terminal carboxilo glicopeptídico, muy hidrófilo, de carácter ácido (electronegativo).

La proteína reportada como CASK_Bovin (caseína kappa bovina), consiste de un componente principal libre de carbohidratos y un mínimo de seis componentes menores. Los seis componentes menores representan varios puntos de fosforilación y glicosilación. Adicionalmente, posee una estructura primaria

formada por 169 aminoácidos, que la diferencia de las otras caseínas, por su menor tamaño.

La caseína kappa posee solamente un grupo fosfato, lo cual la hace una proteína poco fosforilada (0,2). Esta característica, hace que interaccione con el ión calcio mucho menos que las otras caseínas. Sin embargo, comparte con la caseína β la propiedad de tener zonas predominantemente hidrofílicas e hidrofóbicas bien marcadas y separadas. La caseína κ se rompe fácilmente por proteólisis en el enlace situado entre la fenilalanina 105 y la metionina 106 (Delfour, 1965; Jollés, 1968), en una región rica en restos de prolina y probablemente fácilmente accesible (Figura 5). Cuando esta proteólisis se produce, el fragmento N-terminal 1-105 (para κ -caseína), que es fundamentalmente hidrofóbico, queda unido a las otras caseínas en la micela, mientras que el fragmento C-terminal 106-169 (caseína macro péptido), muy hidrofílico, y en el que está situado el resto glucídico en las moléculas glicosiladas, queda libre en solución.

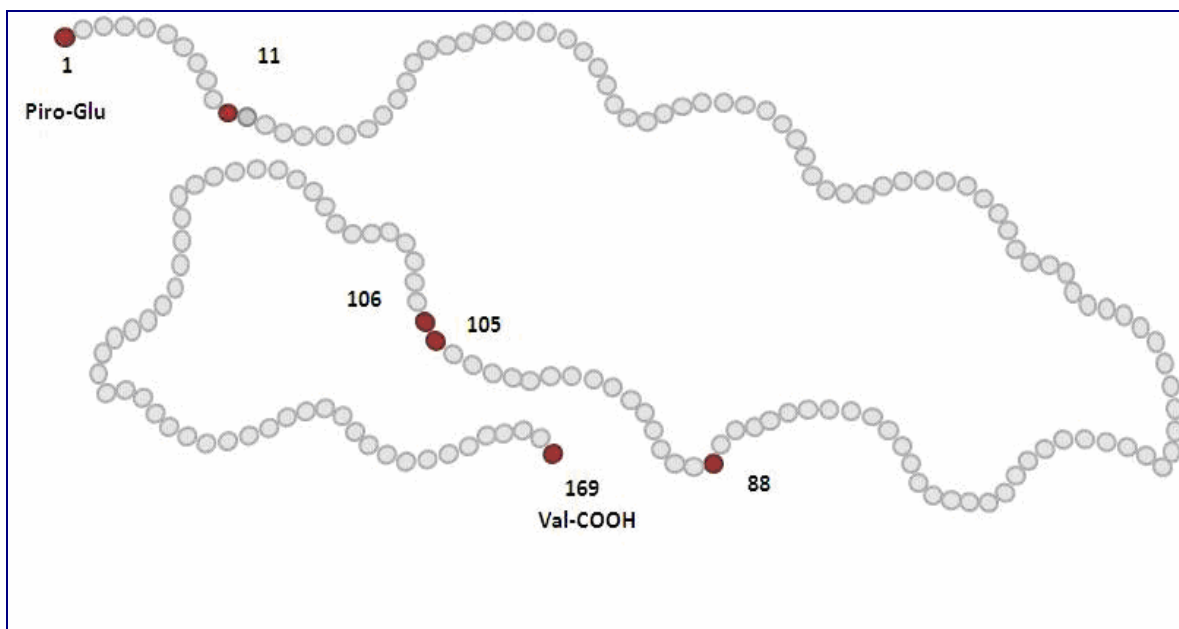


Figura 5. Estructura de la kappa caseína. a) Los aminoácidos 11 y 12 son cisteínas muy reactivas b) La zona de aminoácido 1 a 105 son hidrofobas c) El macro péptido que se encuentra de los aminoácidos 106 a 169 es una fosfoserina, es decir, 10 carboxilos ionizados y un trisacarido. d) El enlace de fenilalanina y metionina (105 y 106) es ionizada por la renina y produce para caseinato y el macro péptido hidrófilo e) El paracaseinato es hidrófilo, por lo que precipita en agua. *En: Rev. Electrón. Vet. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://www.redvet.es>*

La ruptura de la caseína kappa produce la desestabilización de la micela, y (a temperaturas por encima de 20° C) su agregación. Este proceso es el que se produce en la fabricación de la gran mayoría de los quesos.

El componente mayor (cerca del 40%) de todas las variantes de la kappa caseína esta generalmente relacionado con ser el componente libre de carbohidratos. Generalmente, los componentes menores son formas multiglicosiladas y/o multifosforiladas de los componentes mayores. La caseína κ es la única caseína que tiene parte de las moléculas glicosiladas. El grupo glucídico está formado o bien por un trisacárido o bien por un tetrasacárido unido a un resto de treonina.

4.5 GENES DE LA CASEINA

Actualmente, el 95% de las proteínas de la leche bovina han sido caracterizadas y clasificadas de acuerdo a sus propiedades bioquímicas. La caseína ha sido la más estudiada y es la proteína de mayor importancia para la industria lechera. Los genes que codifican las 4 variedades o tipos de caseínas se encuentran en el cromosoma 6 (concretamente en la región 6q31) del ganado bovino, en un locus de aproximadamente 250 kilobases (kb) y organizados uno tras otro en el siguiente orden: α S1, β , α S2 y κ (figura 6). Los genes de las tres primeras se encuentran dentro del locus en una región de unas 140 kb, mientras que el gen de la κ -caseína se encuentra en una región de unas 95.12kb.

Las caseínas poseen estructuras genéticas similares. En general, contienen muchos exones pequeños. También cabe destacar que poseen múltiples copias de repetición denominadas transposones.

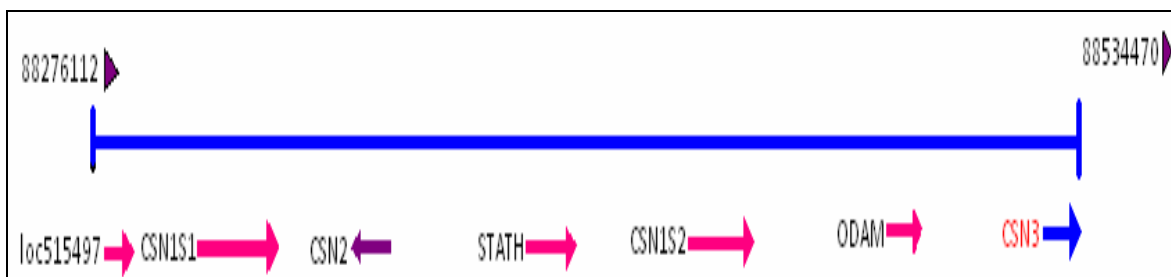


Figura 6. Genes de la Caseína Bovino y contexto genómico del gen CSN3 (Kappa caseína)
Adaptado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=search&term=kappa+casein>

4.5.1 Variantes genéticas de la caseína

Todas las caseínas poseen variantes genéticas, transmitidas por herencia mendeliana sin dominancia, las cuales se producen por sustitución de aminoácidos y en algunos casos por delección, lo cual constituye la base del polimorfismo genético (Tabla 4). Estas variantes pueden ser evidenciadas por métodos electroforéticos. Adicionalmente, existen variaciones post transcripcionales debidas a otros procesos tales como fosforilación y glicosilación (Mc Lean, 1987).

En el gen alfa s1 (α_{S1}) se conocen actualmente la variante A, encontrada en las razas Holstein, Holstein roja y alemana roja (Ng-Kwai-Hang, 1984; Grosclaude, 1988; Erhardt, 1993); la variante B, la cual se ha establecido como la predominante para las razas de la especie *Bos Taurus* (Eigel *et al.*, 1984); la variante C en *Bos indicus* y *Bos grunniens* (Eigel *et al.*, 1984); la variante D en numerosas razas francesas (Grosclaude, 1988) En cuanto a la proteína alfa s2 (α_{S2}) las variantes genéticas reportadas son A, B, C y D. La variante A es la mas frecuente en razas occidentales; la variante B fue reportada con una baja frecuencia en ganado cebú de Sudáfrica y, la variante C fue observada en yaks en la República de Mongolia (Grosclaude *et al.*, 1976; Grosclaude *et al.*, 1982). En la proteína beta caseína, la variante mas común es la A². Existen reportes de siete variantes genéticas, A¹, A², A³, B, B_Z, C, D, E. (Eigel *et al.*, 1984). Adicionalmente, han sido reportadas, dos nuevas variantes F, y H.

Tabla 4. Variantes Alélicas de las caseínas

Caseínas	Variantes Alélicas
Caseína α s ¹	A, B, C, D.
Caseína α s ²	A, B, C, D.
Caseína β	A ¹ , A ² , A ³ , B, B _Z , C, D, E, F, H.
Caseína κ	A, B, C, E F,G.

En el gen CSN₃, las variantes más frecuentes han sido designadas como la A y B (Neelin, 1964; Woychik, 1964), que además se han reconocido como las más importantes y difieren en los aminoácidos en la posición 136 y 148. En la posición 136, el aminoácido treonina (ACC) de la variante A, se cambia por Isoleucina (GCT) en la variante B. Adicionalmente, en la posición 148, el aminoácido asparagina (GAT) de la variante A, se sustituye por alanina (GCT) en la variante B. El cambio en la posición 148 elimina el sitio de corte de la enzima *Hinfl* en la variante B, que sí está presente en la variante A (Medrano y Aguilar-Córdova, 1990). La variante A ha sido la predominante en la mayoría de las razas de ganado lechero, con la excepción del ganado Jersey (Thompson y Farrel, 1974; Bech y Kristiansen, 1990; Ng-Kwai-Hang y Grosclaude *et al.*, 2003).

Además, otras variantes genéticas han sido reportadas, además de la posición y aminoácidos que involucra el polimorfismo (Tabla 5). Las variantes C y E fueron caracterizadas por digestión con cyanogenbromida, la variante C difiere de la A por una substitución de His 97 por Arg 97; la E difiere de la variante A por la substitución de Gly 155 por Ser 155. La variante C fue confirmada por PCR (Shcelee y Rottman, 1992). La variante D fue descrita como nueva por análisis con geles de poliacrilamida, pero luego se encontró que esta variante era idéntica a la CSN₃ C (Erhardt, 1993). La variante F fue descubierta por análisis de PCR en individuos de las razas cebú y ganado híbrido Blanco y Negro (Sulimova *et al.*, 1992) Este análisis reveló dos nucleótidos que cambian en las caseínas A y F: una G por una T en la segunda posición codificada por Thr 145 (que no implica un

cambio en la proteína) y una T por una G en la segunda posición de Asp 148 (que cambia a Val 148 en la variante F). Posteriormente, se describió por análisis de PCR una segunda variante F, que contenía el cambio A-B (residuos 136, 148) así como una substitución de una A por una G, que implica un cambio de Arg 10 a His 10 (Prinzenberg *et al.*, 1996). Esta variante (Arg10His) fue considerada como F², como los mismos investigadores (Prinzenberg *et al.*, 1996) llamaron después a la variante G. Esta nueva variante fue reportada en razas de los Alpes (Erhardt, 1993)

Tabla 5. Diferencias en la posición de los aminoácidos en las variantes genéticas de la kappa – caseína. Adaptado de Farrell, 2004

Proteína	Variante	Posición y amino ácidos en la proteína						
		10	97	104	135	136	148	155
K-CN (169)	A	Arg	Arg	Ser	Thr	Thr	Asp	Ser
	B					Ile	Ala	
	C		His					
	E							Gly
	F ¹						Val	
	F ²	His				Ile	Ala	
	G ¹		Cys			Ile	Ala	
	G ²						Ala	
	H					Ile		
	I			Ala				
	J					Ile	Ala	Arg

Se ha encontrado que la variante B del gen CSN3 se encuentra asociada con una mayor producción de proteína en la leche (Stewart, 1984), la cual es importante en la estructura y el tamaño de las micelas de caseína. Las micelas pequeñas y uniformes contienen mayor proporción de kappa caseína que las grandes.

La leche de las vacas cuyo genotipo es CSN₃ BB, posee características en cuanto a formación de un coágulo firme y denso que retiene más sólidos e incrementa el rendimiento en la elaboración de quesos (Medrano, 1992). Esta característica explica la formación de un cuajo más estable, lo que resulta en un rendimiento superior durante la producción de queso, comparada con la leche producida por animales con genotipo CSN₃ AA. Esto sugiere que dicho alelo tiene un mayor nivel de expresión con respecto a la variante A en la glándula mamaria de los bovinos. De este manera, la proporción de CSN₃ en la leche depende del genotipo del animal (BB > AB > AA).

4.6 MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son fragmentos específicos del ADN que pueden ser identificados dentro del genoma. Estos marcadores se encuentran en lugares determinados y se usan para “marcar” la posición de un gen o de un polimorfismo específico asociado con una característica particular. Por lo tanto, se pueden seleccionar los individuos en los que esté presente el marcador molecular, ya que el marcador indica la presencia de la característica deseada. Es por esto que para realizar estudios de polimorfismo genético en bovinos, relacionados con características productivas, se utilizan técnicas moleculares muy sensibles, capaces de detectar pequeñas variaciones en los genes, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), entre otras. La combinación de estas dos técnicas permite identificar exactamente los polimorfismos que portan los marcadores en estudio (Sánchez y Medrano, 1994). Estas técnicas, especialmente la PCR, han abierto el camino en la industria lechera para utilizar, de forma práctica los marcadores a nivel genético, como asistencia en los programas de selección. Es así, que con la técnica de PCR–RFLP (Medrano y Córdova, 1990) es posible genotipar las variantes del gen CSN₃, sin importar sexo, edad o estado fisiológico

4.7 DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL ADN.

4.7.1 PCR-RFLP

La sigla RFLP viene del inglés *Restriction Fragment length Polymorphisms*. Para esta técnica se hace uso de endonucleasas de restricción bacterianas, llamadas enzimas de restricción. Estas fueron descubiertas por Arber en 1974 y Nathans & Smith en 1975 y se usan cuando se desea hacer un análisis parcial de una secuencia de ADN. (Puertas, 1992). Las endonucleasas de restricción reconocen una secuencia de oligonucleótidos cortos específicos en el ADN, generalmente de tres a seis bases, cortándolo en un sitio definido y dando lugar a varios fragmentos que se pueden separar y cuantificar por electroforesis en gel. Cuando esta técnica se combina con PCR, se conoce como PCR-RFLP.

4.7.2 Técnica SSCP

La técnica de PCR-SSCP ha sido favorable como alternativa de uso en el estudio de marcadores moleculares. Se ha demostrado su eficiencia y bajo costo con respecto al análisis por RFLP (Orita *et al.*, 1989).

La movilidad electroforética de una partícula en un gel es sensible al tamaño y a la forma de la misma. La hebra simple de ADN tiene una estructura enrollada que esta determinada por las interacciones intramoleculares, y por consiguiente, con su secuencia. En el análisis por SSCP, una secuencia mutada se detecta por un cambio en la movilidad durante la electroforesis en el gel de poliacrilamida causada por estas alteraciones en la estructura enrollada (Figura 7). Se ha encontrado que por su alto poder de resolución, las electroforesis en geles de poliacrilamida pueden distinguir la mayoría de los cambios conformacionales causados por diferencias sutiles en las secuencias. Actualmente, no es posible predecir las variaciones en la movilidad electroforética inducidas por la mutación. El tamaño del fragmento amplificado, es el parámetro más importante para considerar en el análisis experimental por SSCP. La sensibilidad máxima se obtiene con fragmentos pequeños de alrededor de 150 pares de bases.

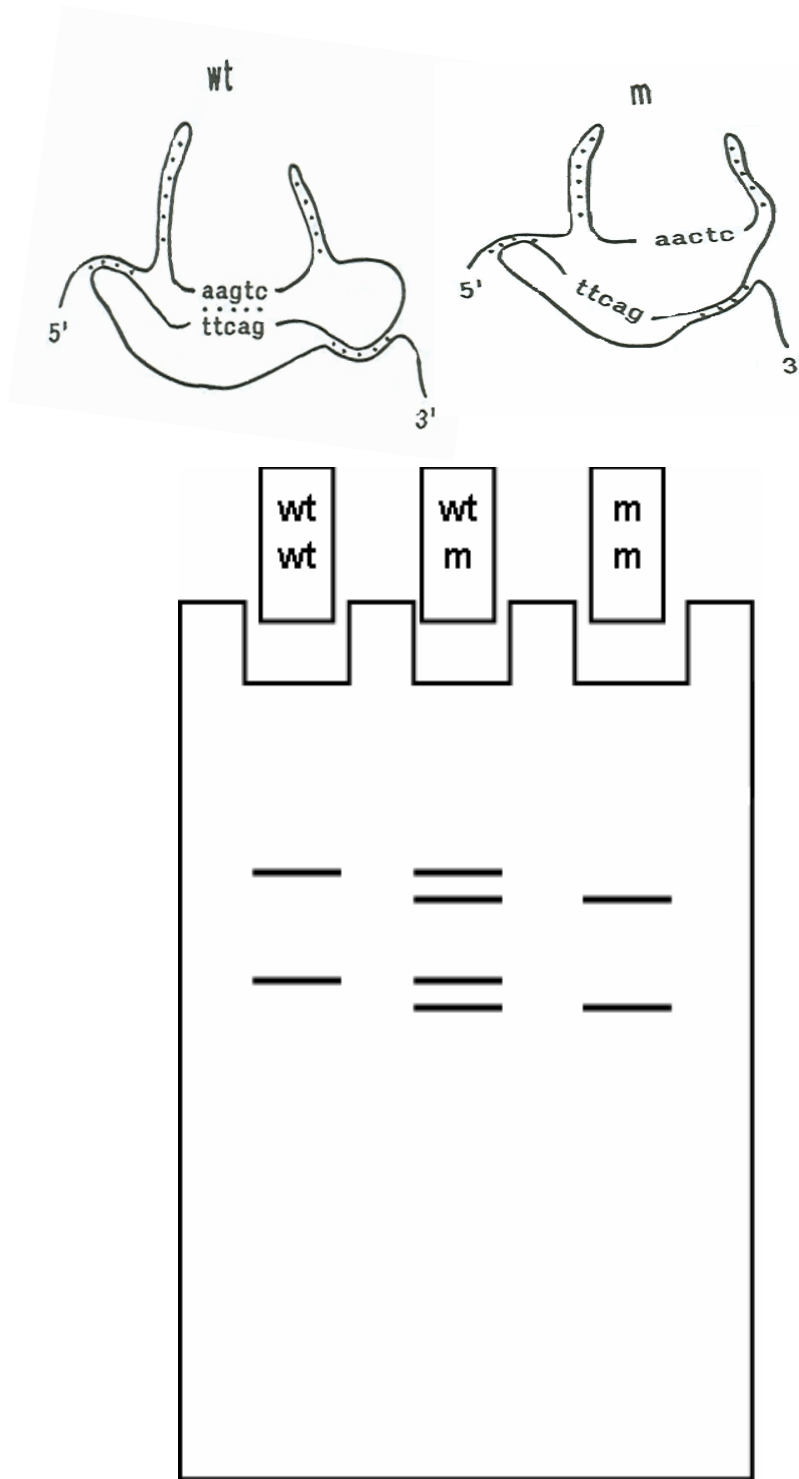


Figura 7. El principio del análisis por SSCP. Una hebra simple de tipo natural (wt) y una secuencia mutada (m) se ilustran. Cuando la hebra simple de ADN se somete a electroforesis a través de un gel, tres patrones de migración diferentes pueden observarse, dependiendo del genotipo de estudio.

5. ANTECEDENTES

Se ha reportado una cantidad considerable de estudios acerca de la caracterización de cada uno de los polimorfismos para genes implicados en la calidad de la leche.

Para el análisis de las secuencias polimórficas del ADN se han desarrollado varios métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), tales como RFLP, SSCP, SNP; todos dirigidos a buscar estrategias de mejoramiento genético para las razas de ganado lechero.

Los polimorfismos genéticos de las caseínas de la leche y de las proteínas del suero en las razas europeas están bien documentados. Estos polimorfismos, primero estudiados solo a nivel de las proteínas se relacionaron luego directamente con la información genética. La asociación entre las variantes CSN₃ y la producción y composición de la leche han sido investigadas en numerosos estudios, pero los resultados no han sido siempre concluyentes. En general, la variante B de la κ -caseína ha sido reconocida como superior para la calidad en razas lecheras europeas. (Lunden *et al.*, 1997).

De este modo, en países del norte de Europa como Lituania se establecieron las diferencias genéticas entre las razas lecheras nativas y modernas de este país, basados en los polimorfismos genéticos de las proteínas de la leche, mediante la determinación de cuatro marcadores genéticos, entre ellos CSN3. De acuerdo con los resultados que se obtuvieron, los tipos más comunes de alelos, el A y el B fueron encontrados en una frecuencia muy alta en todas las razas estudiadas. (Peciulaitiene *et al.*, 2007).

En Rusia se analizaron los alelos polimórficos de la CSN₃ en razas lecheras y su valor informativo como un marcador genético (Sulimova *et al.*, 2006). En este estudio se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas en cinco razas rusas utilizando PCR – RFLP. Las frecuencias del alelo B fueron de 0.16 a 0.50 y se presentó con mayor frecuencia en el genotipo AB que en el BB. Una de las

razas estudiadas (Yaroslavi) mostró una alta frecuencia del alelo B y el genotipo BB, resultado sobresaliente por estar este genotipo asociado con la característica deseable para una mayor calidad lechera. Este mismo autor evaluó la variabilidad de genotipos CSN₃ en razas sintéticas, determinadas por los cruces Jersey x Negro y Blanco x Holstein, usando varias endonucleasas, entre otras, Hind III. De este modo determino los genotipos AA, AB y BB, donde concluyo, al igual que en el estudio anterior que las frecuencias del alelo B y del genotipo BB fueron significativas.

De otro lado, en el mismo país se genotipificaron ganado de las razas Berrenda, originarias de Rusia para los genotipos de CSN₃ mediante el análisis por PCR-RFLP (Alipanah *et al.*, 2008). Las frecuencias génicas estimadas fueron 0,83 y 0,69 para el alelo A y 0,17 y 0,31 para el alelo B de k-caseína. Se encontró una diferencia significativa entre las frecuencias de los alelos A y B de la k-caseína para el ganado Berrendo en Negro y Berrendo en Rojo. La leche de las vacas con el genotipo BB de la k-caseína en las dos razas ha mostrado mayor porcentaje de proteína que la de los individuos AA y AB. De igual modo, los genotipos de CSN₃ contribuyeron satisfactoriamente al contenido de grasa y proteínas en la leche, en un 13.96% y 9.14% respectivamente.

En Norteamérica, investigaciones en hatos de Holstein Friesian de la Universidad de Iowa, confirmaron que los genotipos de CSN₃ afectan la composición proteica de la leche y contribuyen con más del 50% de la heredabilidad y mas del 25% de la repetibilidad de la proporción de las caseínas α 1 y kappa de la proteína total de la leche. (Bobe, 2004). En este país, las poblaciones de ganado Holstein presentaban predominancia de la variante alélica A sobre la variante alélica B de la k-caseína (Gonyon *et al.*, 1987), situación modificada más adelante gracias al uso de selección asistida por marcadores moleculares.

Por su parte, en el área de Centroamérica y el Caribe existe abundante información referente a la caracterización por técnica molecular de rebaños autóctonos. Últimamente se han publicado trabajos de caracterización de

diferentes ganados criollos de Latinoamérica que contribuyen al conocimiento del potencial genético de los mismos y brindan la posibilidad de realizar estudios de comparación con sus ancestros europeos (Bonvillani *et al.*, 2000; Veli *et al.*, 2004)

En Cuba se caracterizó los genes codificantes de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. La tipificación del *locus* CSN₃ mostró dos alelos en las tres razas estudiadas (Uffo *et al.*, 2006). El alelo predominante fue A, con valores de frecuencias de 0,70 en Criollo, 0,78 en Siboney y 0,84 en Cebú. Según los resultados, la mayor frecuencia del alelo A ha sido una característica común en la mayoría de las poblaciones de ganado de leche estudiada (Zardowny y Kuhnlein, 1990; Osta, 1994). En distintos estudios de caracterización de razas bovinas se ha observado que el alelo CSN₃ B presenta mayores frecuencias en razas originadas de *Bos indicus* que en las de *Bos taurus* (Golijow *et al.*, 1996; Del Lama y Zago, 1996; Tambasco, 1998; Kememes, 1999; Del Lama, 2002).

En Chile, se evaluaron las frecuencias alélicas del marcador CSN₃ bovina en un rebaño Frison negro por PCR – RFLP (Felmer, 1998). las frecuencias genotípicas obtenidas correspondieron a un 65.8 % para el genotipo AA, 33.1 % para el genotipo AB y 1.1 % para el genotipo BB, que se compararon con resultados obtenidos en Estados Unidos y Dinamarca, que resultaron siendo similares pero diferentes para los tres genotipos posibles respecto a los valores emanados en Chile. En cuanto a las frecuencias alélicas, el alelo A representó un 82.4 % y el B un 17.6%, que de igual manera son semejantes con las frecuencias estadounidenses y daneses.

En Brasil, donde se han realizado un número considerable de estos estudios, se determino los genotipos de CSN₃ en siete razas lecheras brasileras. En este trabajo se reporto que en las razas europeas el alelo A esta asociado con una mayor producción de leche, en las razas en estudio no fue así, puesto que este alelo no tuvo mayor significancia con el nivel de producción obtenido. (Kemenes *et al.*, 1999)

Posteriormente, se estudiaron los polimorfismos genéticos en el locus de CSN₃ en ganado bovino de la raza Pantaneira, una raza brasileña (Lara *et al.*, 2002). Para esto, seleccionaron 117 muestras de ADN que fue analizado mediante la técnica PCR – RFLP. Las frecuencias para los alelos A y B fueron de $+/- 0.78 +/- 0.02$ y $0.21 +/- 0.02$ respectivamente. Estas frecuencias fueron intermedias entre aquellas obtenidas en razas de origen *Bos taurus* y *Bos indicus*, de igual forma que en el trabajo realizado en Cuba

En países como Perú, a su vez, se han implementado proyectos de caracterización de recursos zoo genéticos en función a caracteres utilitarios desde el año 2003. En esta Nación, se desarrolla específicamente el proyecto de “Evaluación de la diversidad asociada a rendimiento quesero en bovinos criollos”, que busca analizar la variabilidad para los genes de kappa-caseína y beta-lacto globulina (LGB) en poblaciones de bovinos criollos de la sierra peruana, utilizando principalmente la técnica de PCR-RFLP. En esta investigación se encontraron genotipos correspondientes a AA, AB y BB en bovinos criollos de las regiones de Ticllos y Huaschao, donde se concluyó que no se presentaron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de las dos poblaciones (Veli *et al.*, 2004)

En Colombia, la Universidad Nacional, sede Antioquia, llevó a cabo una investigación donde se detectaron las variantes alélicas de la kappa caseína en bovinos de la raza Hartón del Valle (Naranjo *et al.*, 2000). En este estudio, se utilizó ADN de 2 machos y 34 hembras de la raza de ganado criollo Hartón del Valle para detectar polimorfismos en el gen que codifica para la kappa-caseína (κ -CN) mediante PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) y PCR-SSCP (Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo en la Conformación de ADN de cadena única). Se identificaron 17 individuos homocigotos AA, 15 heterocigotos AB y 4 homocigotos BB. Al igual que la raza Holstein, la raza objeto de indagación en este estudio es altamente productiva en el mercado de la leche, a pesar de ser ganado de doble propósito. La frecuencia del alelo B (0.319) en Ganado Hartón del Valle fue mayor

que en Holstein en EEUU (0.18) (Van Eenennaan y Medrano, 1991), similar a Bovinos Criollos de Argentina (0.30) (Poli, 2002) y menor a los Bovinos Criollos de Uruguay (0.47) (Postiglioni *et al.*, 2002), Bovinos Criollos de Argentina (Liron *et al.*, 2002) y a Criollo de la Patagonia (0.395) y Bolivia (0.645) (Liron *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta los estudios nombrados anteriormente, y en resumen, los alelos A y B de la κ -caseína son los más comunes, encontrándose en la mayoría de las razas bovinas en proporciones variables. El alelo A es el más frecuente en las razas Holstein, Friesian, Ayrshire, Danés Rojo y Cebú Índico. La variante B, en cambio, es más frecuente en las razas Jersey, Normando y Cebú Africano. Lo anterior plantea un reto para la ganadería colombiana debido a que la base de la producción lechera es 70% la raza Holstein, 20% Holstein x Cebú, 8 % Jersey y 2% con razas criollas. Las poblaciones de ganado Holstein en Colombia (Antioquia) y Polonia presentan frecuencias genotípicas de κ -caseína similares (AA>AB>BB), mientras que las frecuencias génicas de las condiciones homocigóticas son mayores (BB>AA>AB) en la población estadounidense, esto último logrado mediante cruces dirigidos mediante la selección asistida por marcadores (López, 2004). A partir de estas diferencias, en Colombia se ha venido despertando el interés por la selección genética en el sector ganadero, para mejorar sus índices de competitividad.

5.1 ESTUDIOS DE ASOCIACION ENTRE LOS POLIMORFISMOS DE CSN₃ Y LAS CARACTERISTICAS DE CALIDAD DE LA LECHE.

Numerosos estudios realizados han puesto de manifiesto correlaciones estadísticamente significativas entre marcadores genéticos y caracteres de producción lechera (Zwiauwer, 1980; Soller, 1990; Beattie, 1994; Haley, 1995; Georges y Andersson, 1996).

Existen evidencias bien documentadas que permiten correlacionar algunas de las variantes de las proteínas de la leche con el rendimiento y la composición del producto obtenido (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1990; Boland *et al.*, 1992; Braunschweig

et al., 2000; Strzalkowska *et al.*, 2002; Thuy, 2005; Alvarado *et al.*, 2006; Braunschweig, 2008). Sin embargo, diferentes investigadores han llegado a resultados contradictorios. Así por ejemplo, para cierto locus, algunos autores han reportado una alta correlación entre un alelo o genotipo particular de la proteína de la leche y los caracteres de producción lechera; mientras que otros han hallado una bajo nivel de asociación. Las diferencias observadas pueden deberse al método estadístico empleado, al reducido número de marcadores y animales analizados, y al efecto de la recombinación (Strzalkowska *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en las últimas décadas, han concluido que la leche producida por animales de genotipo BB contiene mayores niveles de proteínas, grasa y sólidos totales (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1990; Boland *et al.*, 1992; Braunschweig *et al.*, 2000; Thuy, 2005; Alvarado *et al.*, 2006; Braunschweig, 2008; Vlaic *et al.*, 2005). Además este genotipo se ha correlacionado con un mayor rendimiento en litros de leche (Lin *et al.*, 1986). Se calcula que esta variante puede ofrecer un promedio de 2.000 Kg más de leche durante toda la vida productiva del animal (Fuente: Genmark, USA, 2007). Estas observaciones fueron confirmadas en diferentes razas como Holstein, Friesian, Jersey, Ayrshire, Guemeys y otras.

Los estudios de asociación que se han llevado a cabo son mas frecuentes para razas europeas. En Suiza se estimaron los efectos de los haplotipos de la caseína en la fracción proteica de la leche y evaluaron estos mismos sobre los rasgos de rendimiento en la producción de leche. Para esto, seleccionaron descendencia de siete toros Castaño Suizo que tuvieran los haplotipos B-A-B-A y B-A-B-B, para, entre otros, el gen CSN₃. La leche de las hijas con el haplotipo paterno B-A-B-A se asoció con un bajo contenido en proteína (caseínas) y contenidos superiores en proteínas del lacto suero comparados con los del haplotipo B-A-B-B. Finalmente, se concluyó que el contenido real de proteína no se ve afectado por los haplotipos paternos. En contraste, los efectos de los haplotipos maternos fueron significativos

sobre el contenido real de proteína y el volumen de caseínas pero no sobre el contenido de las proteínas del lacto suero. (Braunschweig *et al.*, 2000)

En Finlandia se realizó una asociación entre los haplotipos de la caseína y los rasgos de producción lechera en vacas de primera lactancia en razas de este país. (Ikonen *et al.*, 2000). En este estudio, los haplotipos de CSN₃ fueron deducidos usando la información de los genotipos de vacas y sus toros para 16,976 hembras que tuvieran por lo menos nueve medias hermanas paternas. Las diferencias en los rasgos de producción de leche fueron estimadas entre combinaciones de haplotipos A₁A + A₁B y A₁B + A₂A dentro del genotipo CSN₃ y entre las combinaciones A₁E + A₂A y A₁A + A₂E dentro del genotipo A₁A₂AE. Los haplotipos A₂A y A₂B resultaron asociados con un alto contenido en proteína y bajo contenido de grasa en la leche. Se concluyó que el contenido proteico se ve afectado por el locus CSN₃; el haplotipo A₁B fue asociado con un alto contenido de proteínas y A₁E fue asociado con un bajo contenido. La combinación de los haplotipos A₁A + A₂B fue asociada con un rendimiento de 140 kg mas de leche y un 0.03% menos de contenido proteico que la combinación A₁B + A₂A y la combinación A₁A + A₂E mostró un 0.02% de contenido en proteínas mayor que la combinación A₁E + A₂A.

En Polonia se evaluaron los efectos del polimorfismo del gen CSN₃, la edad del ganado, el estado de lactación y el conteo de células somáticas en los rendimientos diarios de leche y composición de la misma en ganado blanco y negro de esa nación (Strzalkowska *et al.*, 2002). Se determinaron los efectos simples o combinados de los genes y condiciones en estudio en 102 ejemplares. Se concluyó que los efectos de la combinación de los genes CSN₃/LGB aparentemente no fueron significativos, considerando estos de manera individual. Comparado con los demás efectos, los genotipos de CSN₃ y LGB contribuyen solo moderadamente con los rasgos de producción lechera estudiados. La jerarquía de la contribución de todos los factores (efectos) analizados sobre los rasgos de producción lechera se presentaron como sigue: Estado de lactación> numero de lactación> conteo de células somáticas>CSN₃> CSN₃/LGB> LGB.

Vlaic *et al.*, (2005) llevaron a cabo una investigación preliminar acerca de la asociación entre los genotipos de CSN3 y rasgos industriales de la leche en diferentes razas europeas. Los genotipos del locus estudiado se establecieron por PCR-RFLP. El ADN fue aislado de la raíz del cabello de 30 vacas y del semen de 42 toros. Se detectó una frecuencia alta del alelo B en una de las razas (Schwitz) y una frecuencia alta del alelo A en los toros de las diversas castas. Se concluyó que el alelo B estaba asociado con un contenido elevado de grasa en la leche.

Thuy (2005) analizó la correlación entre los polimorfismos del gen CSN₃ y la calidad y productividad de la leche en las razas Jersey y Holstein por medio de la técnica PCR-RFLP, utilizando la endonucleasa Hind III. Se detectaron los genotipos AA, AB y BB, con una alta frecuencia del genotipo AA, seguido AB y finalmente, con una muy baja frecuencia el genotipo BB. Los resultados mostraron que las vacas con el genotipo AA dieron un mayor rendimiento lechero pero con un volumen de proteína bajo. En contraste, las vacas con el tipo BB presentaron un rendimiento lechero muy bajo pero con un contenido proteico mas alto que en el tipo AA. En el caso de la leche de los ejemplares AB, la cantidad de la leche y el porcentaje de proteína se presento en un término medio comparado con los otros dos tipos.

Alvarado *et al* (2006) evaluó el efecto del polimorfismo de la *k*-caseína sobre la producción y composición química de la leche, en un rebaño de raza Holstein ubicado en la zona central de Venezuela, donde determinó la distribución de las variantes genéticas de la *k*-caseína en el rebaño utilizando la técnica de isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida. En este trabajo se analizaron 294 muestras de leche, recolectadas de 62 vacas en producción durante un período de siete (7) meses. Los resultados fueron analizados mediante diseño estadístico de bloques al azar con arreglo factorial 2³. El alelo A de la *k*-caseína se encontró en 92% de las vacas en producción, mientras que el alelo B se encontró en el 52%. Al comparar estadísticamente los niveles de producción de leche de cada uno de estos animales se observó un mayor volumen de producción diaria en las vacas

con el alelo A de la *k*-caseína. El análisis estadístico de los resultados sobre la composición de estas muestras de leche demostró que el polimorfismo de la *k*-caseína encontrado en este rebaño Holstein no tiene efecto sobre el contenido de los principales componentes de la leche.

Braunschweig (2008) Investigó la asociación entre los haplotipos de la caseína y los rasgos de rendimiento lechero en la descendencia de cinco toros de un tipo de raza suiza. El análisis se llevo a cabo utilizando un diseño de medias hermanas, las cuales cada una debía haber heredado cualquier de estos haplotipos paternos: B-A¹-A-A o B-A²-A-A para las variantes alfa s1, alfa s2, beta y Kappa caseína. La principal conclusión radicó en un efecto significativo de los haplotipos de la caseína paternos.

En Colombia, solo se ha llevado a cabo un estudio de asociación, además de los ya realizados para detectar frecuencias alelicas y genotípicas. López-Benavides (1998) realizó una correlación entre los polimorfismos de la kappa caseína y los rasgos de producción de la leche. El estudio se llevo a cabo con novillas de primer parto de la raza Holstein pertenecientes a diversas fincas de la sabana de Bogotá. Se analizo los contenidos de proteína cruda, caseínas, grasa, lactosa, sólidos no grasos y sólidos totales, y se relacionaron con los alelos obtenidos, que resultaron ser A y B. Sin embargo, no se analizaron parámetros como la influencia del padre, gracias a que no se hizo el estudio por individuo sino por finca, y solo se llevó a cabo un muestreo de leche en una población pequeña. El genotipo mas frecuente fue el AA con 57.41%, y el menos frecuente el BB con 5.55%, y se encontró relación significativa entre este ultimo y las variables analizadas antes mencionadas.

Con la realización de este trabajo de grado se esta dando el primer paso a nivel nacional frente a la asociación entre los polimorfismos de CSN3 y las características de calidad de la leche.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 POBLACION DE ESTUDIO

6.1.1 Selección de la población

Se analizó una población perteneciente a seis fincas ubicadas en el departamento de Cundinamarca (Tabla 6). La zona de estudio fue la sabana de Bogotá, ubicada a una altura en promedio de 2.600 metros sobre el nivel del mar. Las temporadas secas y lluviosas en ésta se alternan durante todo el año; los meses más secos son diciembre, enero, febrero y marzo; durante los meses más lluviosos, abril, mayo, septiembre, octubre y noviembre la temperatura es más estable, con oscilaciones entre los 9°C y los 20°C. Junio, julio y agosto son los meses de fuertes vientos y mayor oscilación de la temperatura. Sin embargo, las precipitaciones durante la época de estudio muestran que todos los meses fueron lluviosos. (Anexo 1)

Se seleccionaron 231 individuos de primera a sexta lactancia, pertenecientes a 25 familias de medias hermanas paternas de la raza Holstein.

Tabla 6. Fincas participantes del proceso de muestreo programado.

FINCA	UBICACIÓN	Numero de Animales
ARGOVIA (<i>ARGO</i>)	SOPO	77
GUASUCA (<i>GUAS</i>)	SUESCA	34
ALBANIA (<i>ALBA</i>)	SOPO	48
SALITRE (<i>SALI</i>)	SOPO	29
CUATROVIENTOS (<i>CUATR</i>)	SUESCA	21
LOUISIANA (<i>LUISI</i>)	NEMOCON	27

6.2 ANALISIS FENOTIPICO

Para la evaluación de la calidad de la composición de la leche cruda producida por cada individuo, se tomaron muestras de leche mensualmente, intercalando entre el ordeño de la mañana y la tarde, durante 15 meses a partir de febrero de 2007.

Para la toma de muestra, se tomaron 50 ml de leche en bolsa plástica estéril marca NASCO, a partir del ordeño total de cada individuo, mezclando previamente con un homogenizador de acero inoxidable (Figura 8). Las muestras recogidas para el análisis no tenían agentes de conservación ni inhibidores. Siempre se verificó que los animales del estudio no presentaran mastitis, ya esto podría afectar los resultados finales en el análisis de los componentes de la leche. Los recipientes se marcaron con el número del registro del animal, se taparon cuidadosamente y se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis que se realizó el mismo día de la toma. Estas muestras se procesaron en el laboratorio de Alpina Productos Alimenticios S.A, para diferentes componentes como proteína total, grasa, lactosa, sólidos no grasos y sólidos totales, utilizando el MilkoScan de Foss Electric. El porcentaje de sólidos totales para cada muestra de leche fue obtenido al sumar los valores de grasa, proteína total y lactosa.



Figura 8. Fotografías correspondientes al proceso de ordeño. Arriba, la homogenización de la toma con un instrumento de acero inoxidable. Abajo, toma de 50 ml de muestra obtenidos a partir del ordeño total y el almacenamiento en bolsa NASCO.

De acuerdo con la edad del animal, las muestras de leche fueron divididas en seis grupos:

- Lactancia 1: 43 a 61 meses (39 individuos)
- Lactancia 2: 43 a 83 meses (59 individuos)
- Lactancia 3: 52 a 85 meses (43 individuos)
- Lactancia 4: 60 a 103 meses (39 individuos)
- Lactancia 5: 78 a 105 meses (21 individuos)
- Lactancia 6: 95 a 105 meses (7 individuos)

6.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

A la población seleccionada (231 hembras) se le tomó muestra de sangre periférica en tubos Vacutainer con EDTA al 13%. El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de genética molecular animal del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA.

6.3.1 Banco de PBL

Para la extracción de ADN, inicialmente se creó un banco de PBL (Peripheral Blood Lymphocytes) el cual se conservó a -80°C . Para lo anterior, las muestras de sangre fueron transferidas a tubos falcón, y se adicionó de Sucrosa-Triton 2x, en proporción 1:1 para la lisis de los eritrocitos. Los PBL se obtuvieron centrifugando a 2500 rpm, durante 20 minutos a 4°C . El anterior procedimiento se repitió hasta recuperar un precipitado libre de células rojas. Se dividieron dos alícuotas, en solución PBS, una para ser almacenada a -80°C y la segunda alícuota se utilizó para extracción de ADN.

6.3.2 Banco de ADN

La extracción de ADN se desarrolló de acuerdo con los protocolos estándar (Sambrook., 1989), utilizando digestión con Proteinasa K (SIGMA®) con una concentración final de $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ a 56°C por 3 horas. Posteriormente se realizó la extracción de ADN mediante la adición de $500\ \mu\text{l}$ de fenol: cloroformo: isoamil

alcohol 25:24:1 (SIGMA P2069). Se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos y se recogió el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces. Finalmente, se precipitó el ADN con 16 µl de acetato de sodio 3 M y 1 ml de etanol absoluto frío (-20°C). El precipitado final se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en buffer TE pH 8.0. Las muestras se almacenaron a -20°C.

Las muestras fueron montadas en un gel de agarosa al 1% con Syber-safe (INVITROGEN) para evaluar su calidad, siguiendo el protocolo estandarizado por el Laboratorio de Genética Molecular Animal de Corpoica. Adicionalmente las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría a 260 y 280 nm de longitud de onda, en un equipo Nanodrop 500 de BioRad. Posteriormente, se realizaron diluciones de DNA para una concentración final de 10 ng/µl, el cual se utilizó como template para la reacción en cadena de la polimerasa.

6.4 GENOTIPIFICACION POR PCR – RFLP

6.4.1 PCR

Mediante la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa, se amplificó un fragmento de 271 pares de bases. La región amplificada se encuentra localizada entre el Exón IV y parte del Intrón adyacente IV del gen CSN3. Los cebadores utilizados, fueron los reportados por Kaminski (1993)

Cebadores	
Directo	5´ GAA ATC CCT ACC ATC AAT ACC 3´
Reverso	5´ CCA TCT ACG CTA GTT TAG ATG 3´

Se realizaron diferentes reacciones de PCR, para la optimización de las condiciones, variando temperatura de anillamiento y concentraciones de Cloruro de magnesio (MgCl₂). Finalmente, se definieron las siguientes condiciones de amplificación: 50 ng de ADN genómico bovino, 200 µM de dNTP (Pharmacia Biotech 27-1850, 1860, 1870, 1880), 0.5 µM de cada uno de los iniciadores directo

y reverso, 2U de Taq ADN polimerasa (Promega M1665) y 2.25 mM de MgCl₂ (Promega) para un volumen total de 25 µl de reacción.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC 100 (MJ Research, INC) programado para iniciar con una denaturación a 94°C por 3 min., seguido por 35 ciclos definidos así: denaturación a 95°C por 1 minuto, anillamiento a 62°C por un minuto y extensión a 72 °C por un minuto. Se realizó un paso final de extensión a 72 °C por 15 minutos. Los productos de amplificación fueron verificados en un gel de agarosa al 2% teñidos con Syber-safe (invitrogen)

6.4.2 Digestión del Producto Amplificado

Para la evaluación del polimorfismo, se utilizaron 8 µl de producto de PCR, los cuales fueron digeridos con 2U de la endonucleasa de restricción *Hinf I* de Fermentas® (cat. 1310), utilizando buffer con BSA (Albúmina sérica bovina), según recomendaciones de la casa comercial. La reacción se incubó por 3 horas a 37°C, con condiciones de desactivación enzimática de 65°C por 20 minutos.

La enzima *HinfI* reconoce el sitio 5'GANTC3'. En el fragmento amplificado se reconocen dos sitios de corte, uno en el sitio del polimorfismo que separa las variantes A y B y el otro que no hace diferencia entre variantes. (Figura 9)

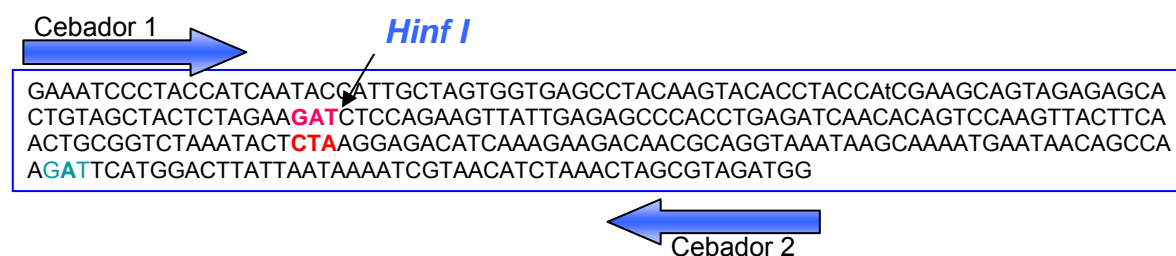


Figura 9. Región amplificada del gen kappa caseína correspondiente a x14908 a 5345c, exón 4.

6.4.3 Visualización de productos de digestión

La separación de los productos se llevó a cabo en geles de acrilamida 29:1. corridos a 800 voltios por 2 horas. La visualización se realizó mediante tinción de nitrato de plata según protocolo estandarizado del Laboratorio de Genética Molecular Animal del CBB. La lectura de geles se llevo a cabo calculando el

tamaño de alelos tomando como referencia la migración de fragmentos de un marcador de 100pb (Fermentas®). Para la lectura de los genotipos se tomaron en cuenta la formación de fragmentos así: El genotipo AA correspondió el corte de la enzima de todo el producto de amplificación, indicando el reconocimiento del sitio GAT. Por el contrario el genotipo BB correspondió a la ausencia de corte de la enzima en el mismo sitio. El genotipo AB incluyó fragmentos de los tipos. (Tabla 7)

Tabla 7. Genotipos de Kappa-caseína determinados según marcador de peso.

Numero de pares de Bases (pb)	Genotipos			Producto de amplificación sin digerir.
	AA	AB	BB	
271 pb				—————
221 pb		—————	—————	
132/134 pb	—————	—————		
92 pb	—————	—————	—————	

En la siguiente figura se puede observar la fotografía de un gel, que incluye individuos con los tres genotipos AA, AB y BB generados en el gen de CSN3.

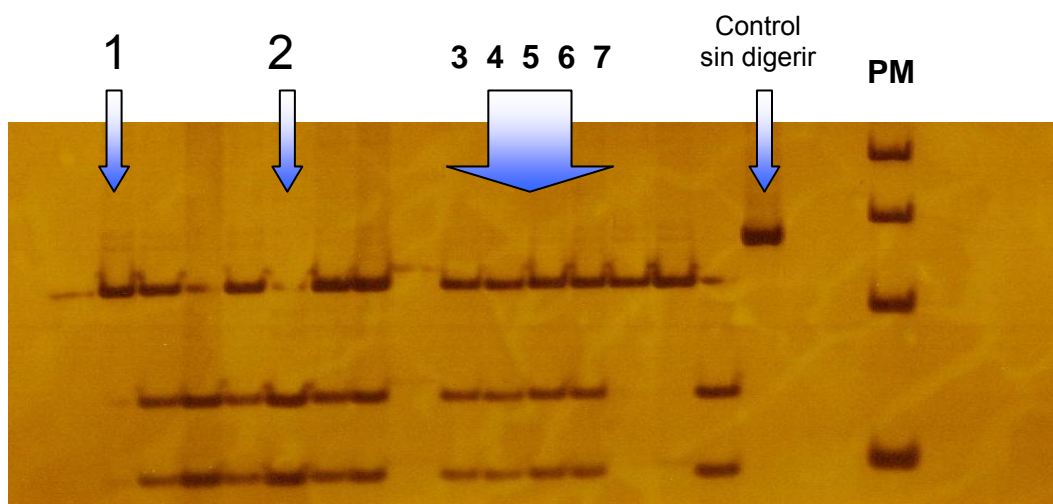


Figura 10. Gel de poliacrilamida al 6% teñido con plata para los fragmentos de digestión con *Hinf I*. Se observa el marcador de peso molecular de 100pb y la muestra control (producto de PCR sin cortar). En el carril numerado 1 se observa el genotipo BB, en el carril 2 se puede identificar el genotipo homocigoto AA y en los carriles 3, 4, 5, y 6 se observa el genotipo AB.

6.5 GENOTIPIFICACION POR PCR – SSCP

6.5.1 PCR

Para la identificación del polimorfismo descrito por la técnica RFLP, se desarrolló la metodología de PCR- SSCP. Esta metodología implicó el diseño de un cebador reverso haciendo uso del programa Jellyfish® versión 3.3 usando el panel que designa, selecciona o modifica cebadores para PCR. Para esto se seleccionó un cebador de 20 bases con características de no complementariedad en si mismo ni con su pareja y con temperatura de anillamiento en un rango similar al cebador directo. El cebador directo fue el mismo utilizado en la metodología de PCR-RFLP. En la figura 11 se muestra la región amplificada y la región complementaria al cebador reverso.

```
GAAATCCCTACCATCAATACCATTGCTAGTGGTGAGCCTACAAGTACACCTACCAtCGAA  
GCAGTAGAGAGCACTGTAGCTACTCTAGAAGATCTCCAGAAGTTATTGAGAGCCACCT  
GAGATCAACACAGTCCAAGTACTTCAACTGCGGTTCTAAATACTCTAAGGAGACATCAA  
AGAAGACAACGCAGGTAATAAGCAAAATGAATAACAGCCAAGGATTCATGGACTTATT  
AATAAAATCGTAACATCTAAACTAGCGTAGATGG
```

Figura 11. Región amplificada del gen kappa caseína para SSCP. La zona en azul corresponde a la región complementaria del cebador reverso diseñado

La reacción de PCR se optimizó con una temperatura de anillamiento de 65°C. La mezcla para PCR incluyó, 50 ng de ADN genómico bovino, 200 µM de dNTP (Pharmacia Biotech 27-1850, 1860, 1870, 1880), 0.5 µM de cada uno de los iniciadores directo y reverso, 2U de Taq ADN polimerasa (Promega M1665) y 2.0 mM de MgCl₂ (Promega) para un volumen total de 20 µl de reacción.

6.5.2 GELES DE SSCP

Para la detección de los polimorfismos, los amplímeros fueron separados directamente en geles de acrilamida mediante la técnica de SSCP. Los productos de PCR se mezclaron con buffer de carga (95% Formamide, 0.6% bromophenol blue and 0.6% xylene cyanole) y denaturados a 94°C por 5 min. Inmediatamente después del proceso de denaturación, las muestras se

colocaron en hielo, para montarlas en un gel de acrilamida al 8%, con proporción 29:1 acrilamida: bisacrilamida. Adicionalmente, se probaron diferentes concentraciones de glicerol en la preparación del gel, así como diferentes condiciones de voltaje y tiempo para el corrido de la electroforesis. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata y revelados con una solución de hidróxido de sodio. Finalmente, se seleccionaron las condiciones que demostraron diferenciación entre los tres genotipos buscados, AA, AB y BB.

La lectura de los geles se llevo a cabo teniendo en cuenta la comparación de individuos con genotipos diferentes determinados por PCR-RFLP, que posteriormente fueron genotipados utilizando el método de SSCP.

6.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio se hizo con un diseño completamente al azar con arreglo factorial, en donde la unidad experimental fue la novilla de la raza Holstein. Se estimó el efecto de algunas interacciones entre factores y se consideró la edad como covariable.

6.7 ANALISIS ESTADISTICO

Utilizando el paquete estadístico SAS, se evaluaron los resultados obtenidos para cada variable (contenido de grasa, caseína, proteína, sólidos no grasos y sólidos totales) mediante un diseño completamente Azar con arreglo Factorial.

Los factores considerados en el ensayo fueron: el genotipo de CSN3, la finca, el padre, el número de lactancia y el clima. Las variables observadas fueron: % de materia grasa, % de proteína, % de lactosa, % de SNG y % de ST. Se considero la edad como covariable.

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ijk} = m + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l + \varepsilon_m + (\gamma^*\delta)_{kl} + (\gamma^*\alpha)_{ki} + (\alpha\beta)_{ij} + \rho_k + \zeta_{ijklm}$$

Donde:

Y_{ijk} : variable aleatoria observada (proteína, grasa, lactosa, SNG ó ST)

M: media general

α_i : efecto del i-ésimo nivel del número de lactancias.

β_j : efecto de la j-ésima nivel de variante genética de CSN3

γ_k : efecto de la k-ésima nivel de la finca

δ_l : efecto del la l-ésima nivel del padre

ε_m : efecto de la m-ésima nivel de clima

$(\gamma^*\delta)_{kl}$: efecto de la interacción finca y padre.

$(\gamma^*\alpha)_{ki}$: efecto de la interacción finca y número de lactancias.

ζ_{ijklm} : error experimental

6.8 HIPOTESIS

Ho: No existe asociación entre el polimorfismo del gen kappa caseína caracterizado para la población de estudio.

Hi: Existe asociación entre el polimorfismo del gen kappa caseína caracterizado para la población de estudio.

7. RESULTADOS

De acuerdo con los análisis llevados a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular Animal del Centro de Biotecnología y Bioindustria perteneciente a Corpoica para las muestras de sangre y los Laboratorios de Alpina Productos alimenticios S.A para las muestras de leche, se presentan a continuación los resultados obtenidos.

7.1 ANALISIS GENOTÍPICO

Se genotipificó un polimorfismo en el gen kappa caseína, en 231 individuos de la raza Holstein pertenecientes a 25 familias distribuidas en seis fincas lecheras de la Sabana de Bogotá. El análisis de la variante CSN₃ en la población estudiada evidencia la presencia de los alelos más frecuentes en la mayoría de las poblaciones bovinas. La tipificación de este polimorfismo mostró la presencia de dos alelos, A y B siendo predominante el alelo A.

Para calcular la frecuencia genética de cada alelo se utilizó el método de conteo directo de genes (Sabour *et al.*, 1993) cuya formula es:

$$F_B = (n_{AB} + 2n_{BB}) / 2n$$

$$F_A = (n_{AB} + 2n_{AA}) / 2n$$

Donde n es el tamaño de la población, n_{AB} , n_{BB} y n_{AA} son los números de los genotipos AB, BB y AA respectivamente. Se encontraron en los animales seleccionados aleatoriamente para este estudio 176 individuos homocigotos AA, 52 individuos heterocigotos AB y 3 individuos con el genotipo homocigoto BB. La frecuencia del alelo B fue de 0.125, presente en 29 animales y del alelo A fue de 0.87, presente en 202 animales en total. (Figura 12)

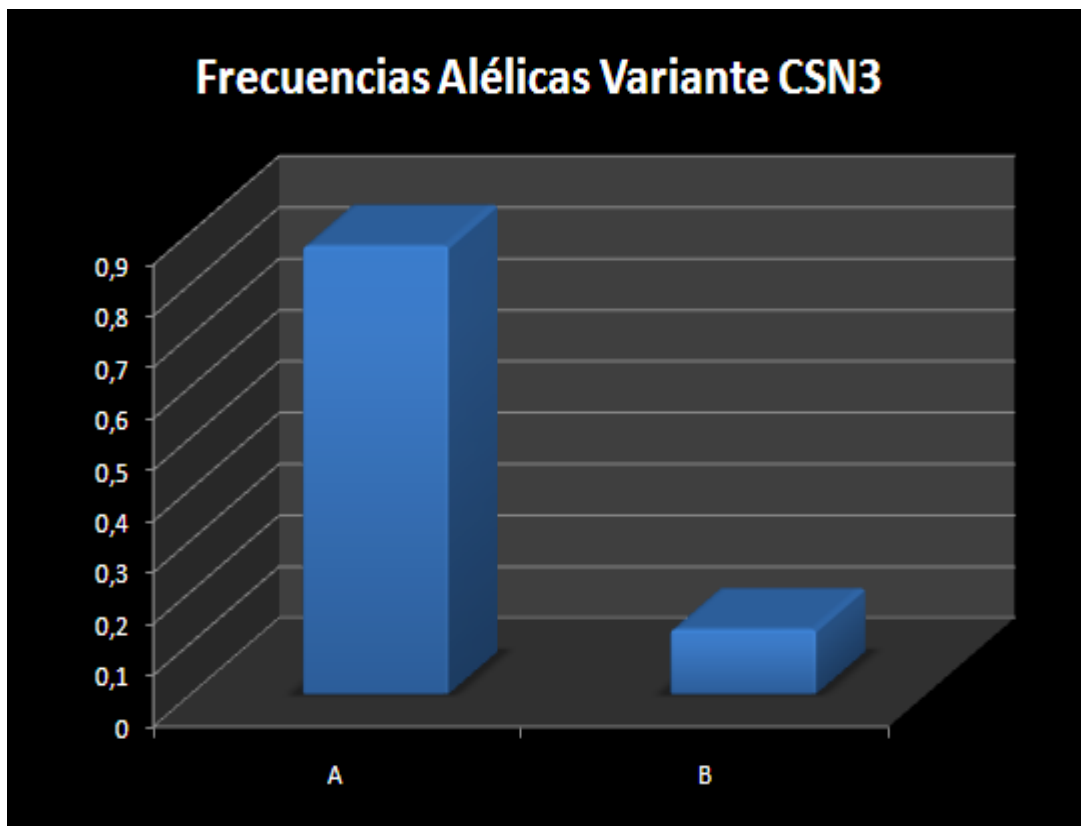


Figura 12. Frecuencias alélicas observadas del gen kappa caseína en la población de estudio.

En cuanto a los genotipos obtenidos, la frecuencia observada de la kappa caseína fue de 0.76 para el genotipo AA, 0.22 para el genotipo AB y 0.012 para el genotipo BB. (Tabla 8)

Tabla 8. Frecuencias genotípicas observadas y número de animales por frecuencia.

Locus	Genotipo	No.de animales (Frecuencia)
CSN3	AA	176 (0.76)
	AB	52 (0.22)
	BB	3 (0.012)

El genotipo más predominante fue el AA, con 76.19% de la población, y el genotipo BB presentó el porcentaje más bajo, de tan solo 1.29, siendo poco significativa su presencia en la población de estudio (Figura 13).

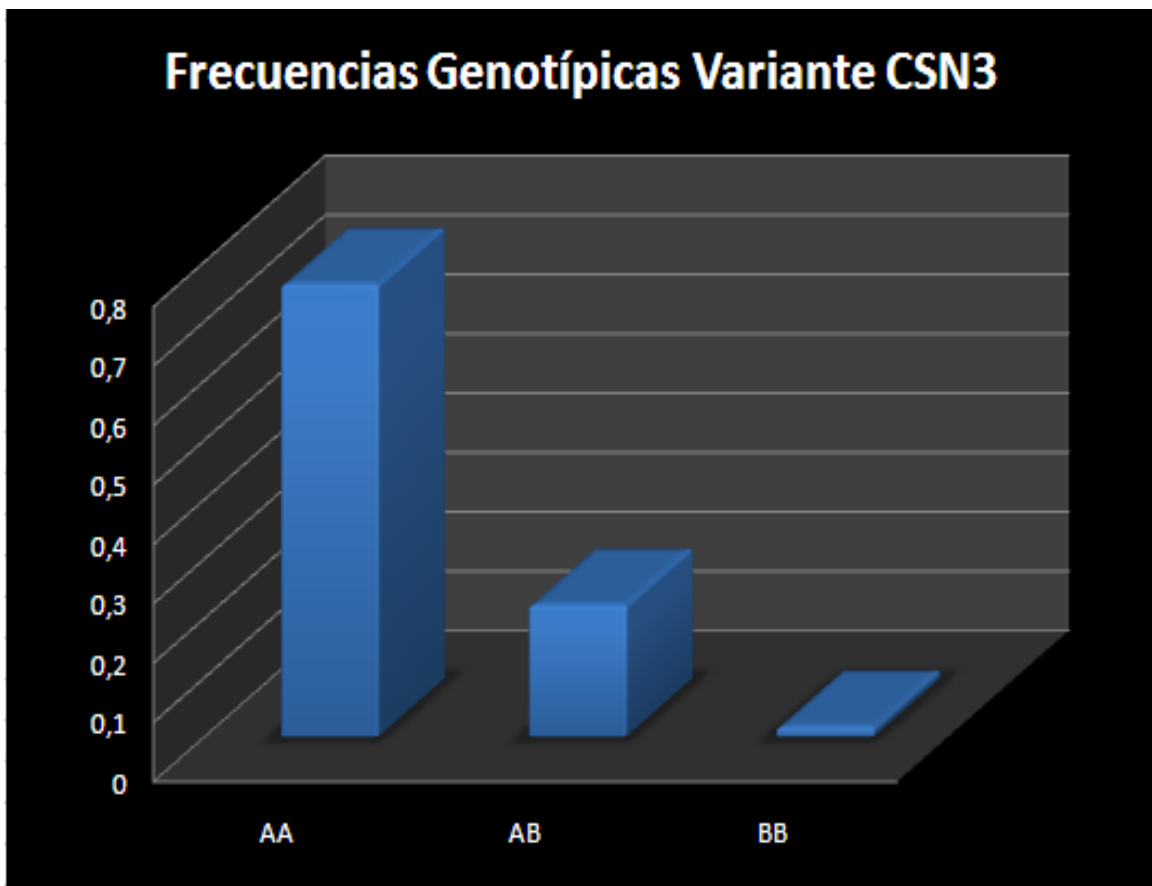


Figura 13. Frecuencias genotípicas observadas del gen kappa caseína en la población de estudio.

7.1.1 Geles SSCP

Los genotipos determinados mediante la técnica SSCP fueron comparados y verificados mediante el uso de la técnica RFLP, asegurándose de que coincidieran por los dos métodos, para lo que se hizo necesario el ensayo de estandarización de las dos técnicas. La figura 14 muestra un gel de poliacrilamida obtenido.

De este modo, se determinó que el genotipo AA correspondía a tres bandas, el genotipo AB correspondía a 4 bandas y el genotipo homocigoto BB correspondía a 3 bandas de corrido que diferían a las del genotipo AA por el patrón de corrido en el gel.

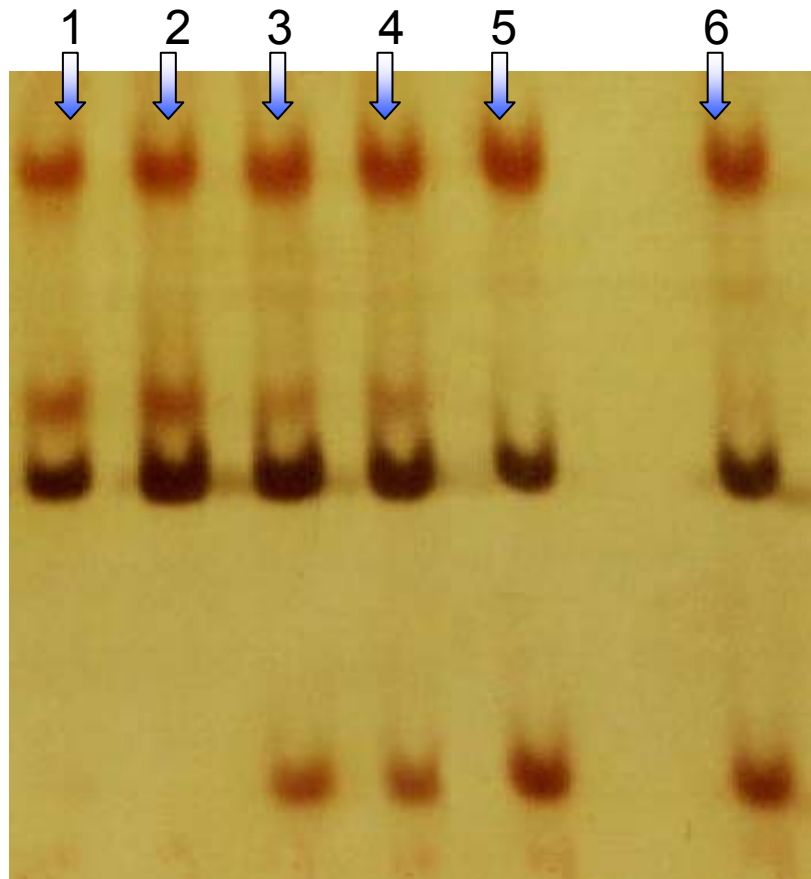


Figura 14. Gel de poliacrilamida teñido con plata para los amplimeros de la metodología SSCP. En los carriles numerados 1, 2, se observa el genotipo AA, en el carril 3 y 4 el genotipo AB y en el carril 5 y 6 el genotipo BB.

7.1.2 Efecto del genotipo en los componentes de la leche

El análisis de varianza permitió observar que el genotipo tiene una influencia significativa ($Pr < 0.001$) con respecto al contenido de proteína en la leche, y de manera característica teniendo en cuenta las demás variables. (Tabla 9). El mismo efecto significativo del genotipo se dio para los sólidos no grasos y en un menor grado, para los sólidos totales. El componente de la leche menos relacionado con el genotipo CSN3 fue el porcentaje de lactosa.

Tabla 9. Efecto de los genotipos CSN3 sobre los componentes de la leche.

Rasgo	Coefficiente de Variación	Media	Valor de p
			Gen CSN3
Grasa	19.17165	3.535846	0.2643
Proteína	12.45615	3.163018	<.0001*
Lactosa	5.827225	4.712511	0.2644
SNG	4.583385	8.591876	<.0001*
ST	7.123746	12.13762	0.0008*

Se determinó por medio de la prueba de Duncan el nivel de influencia del genotipo sobre la fracción proteica y demás contenidos de la leche. Así, se estableció que el genotipo AB esta asociado con un mayor rendimiento en proteína, sólidos no grasos y sólidos totales. Para la grasa y la lactosa las diferencias entre un genotipo y otro no fueron estadísticamente significativas, pero, al igual que para los demás componentes, la leche proveniente de genotipos AB mostró mayor concentración de estos. (Tabla 10)

Tabla 10. Prueba de comparaciones múltiples para grasa, proteína, lactosa, SNG y ST por el método de Duncan para los genotipos obtenidos

Genotipo	Grasa	Proteína	Lactosa	SNG	ST
CSN3	Media	Media	Media	Media	Media
AA	3.52474 A	3.14276 A	4.70834 A	8.56761 A	12.09989 A
AB	3.57133 A	3.22776 B	4.72583 A	8.66942 B	12.25818 B

Letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes (P<0,05)

7.2 ANALISIS DE LA COMPOSICION DE LA LECHE

En el laboratorio de Alpina se analizaron 1980 muestras correspondientes a 231 animales de 6 fincas. La población muestreada en principio fue depurada debido a factores como la aparición de mastitis, venta del animal y sacrificio. Además, se tomaron individuos que tuvieran más de seis repeticiones de muestras. Después de analizar los resultados obtenidos en el laboratorio (control de calidad interno, según controles de cada prueba) se incluyeron los datos de 1830. Utilizando el

programa estadístico SAS se realizó el análisis de los datos de composición de la leche de las muestras seleccionadas en el estudio para las variables grasa, proteína, lactosa, sólidos no grasos (SNG) y sólidos totales (ST) (Tabla 11).

En la población total el análisis para la fracción de grasa en las muestras de leche mostró una media de 3.53, con una desviación estándar de 0.45. Para la fracción de lactosa en las muestras de leche, el promedio fue de 4.71, con una desviación estándar de 0.30.

Después de analizados los datos para la fracción proteica, se encontró que la media de porcentaje de proteína es de 3.16 con una desviación estándar de 0.77. En cuanto a los sólidos no grasos (SNG), estos presentaron un promedio de 8.59 con una desviación estándar de 0.50. Los sólidos totales (ST) tuvieron un promedio de 12.1 con una desviación estándar de 1.04. Aquí se encontró la mayor variación con valores desde 9 hasta 17.5. Esto es un reflejo de la diversificación encontrada en el contenido de grasa y proteína.

Tabla 11: Análisis de contenido de grasa, proteína, lactosa, sólidos no grasos (SNG) y sólidos totales (ST) en muestras de leche de individuos de 6 fincas en la sabana de Bogotá.

Variable	N	MEDIA	DS	MINIMA	MAXIMA
Grasa	1893	3.53609	0.74549	0.78000	7.90000
Proteína	1893	3.16320	0.45685	2.16000	9.83000
Lactosa	1893	4.71259	0.30630	2.93000	5.47000
SNG	1893	8.59213	0.50363	7.07000	14.72000
ST	1893	12.13811	1.04596	9.26000	17.51000

En la figura 15 se representan las medias registradas para cada componente:

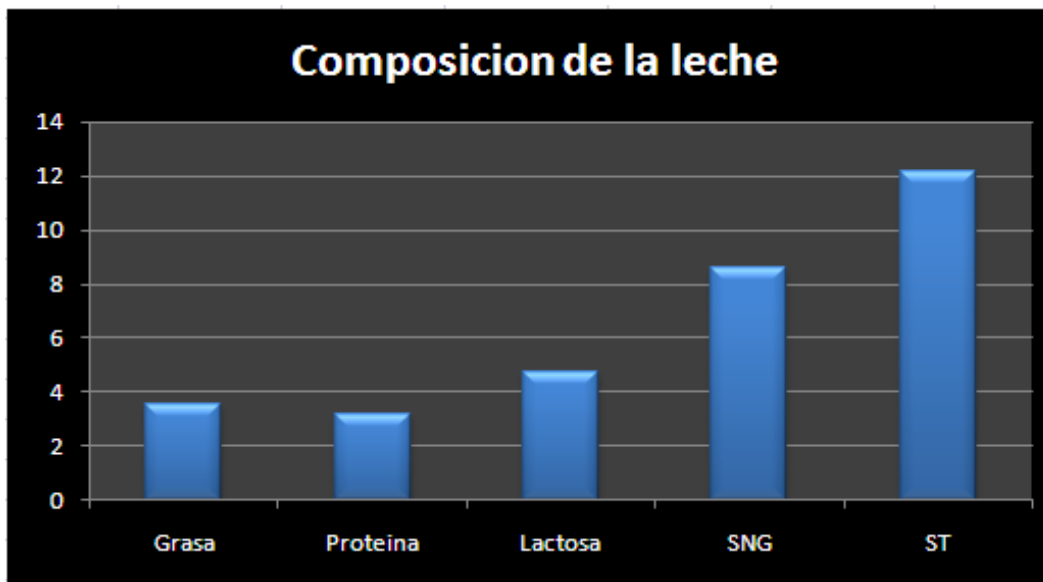


Figura 15. Promedios de grasa, proteína, lactosa, Sólidos no grasos SNG y Sólidos Totales ST

7.2.1 Correlación entre los componentes de la leche.

Mediante la prueba de correlación de Pearson, se analizó las relaciones establecidas entre las variables de estudio. Se determinó que la mayoría de las variables se encuentran relacionadas (Tabla 12). La variable grasa se encuentra significativamente relacionada con la proteína y los SNG. Además, la relación entre la grasa y los sólidos totales es fuerte y positiva, de manera tal que cuando las cantidades de grasa son notorias, se espera la misma tendencia para los ST. Se determinó, del mismo modo, que la grasa tiene una relación negativa e inversa con el porcentaje de lactosa

La proteína se encuentra relacionada, al igual que la grasa, con las demás variables. Según el análisis, la relación proteína-SNG es más evidente que para las demás variables. La proteína se encuentra relacionada de forma inversa y negativa con la lactosa.

La lactosa presenta coeficientes de correlación relativamente menores a los observados para las demás variables. La lactosa se encuentra en relación inversa con la grasa y la proteína, y no se encuentra relacionada con los sólidos totales.

Con respecto a los sólidos no grasos (SNG), la correlación es fuerte y positiva con la proteína y menor con respecto a la grasa. Todas las relaciones establecidas entre los SNG y las demás variables fueron positivas.

Finalmente, para los Sólidos totales (ST) se determinó su relación con la grasa, proteína y SNG, pero no se encontró correlación entre este y la lactosa.

Tabla 12. Prueba de correlación de coeficientes de Pearson para las cinco variables en estudio.

	Grasa	Proteína	Lactosa	SNG	ST
Grasa	1.00000	0.49691*	-0.17634*	0.34424*	0.86549*
Proteína	0.49691*	1.00000	-0.18503*	0.79315*	0.73917*
Lactosa	-0.17634*	-0.18503*	1.00000	0.43746*	0.07493
SNG	0.34424*	0.79315*	0.43746*	1.00000	0.71696*
ST	0.86549*	0.73917*	0.07493	0.71696*	1.00000

*p < 0.05

7.3. ANALISIS DE FACTORES NO GENETICOS QUE AFECTAN LA COMPOSICION DE LA LECHE

En cuanto a factores no genéticos que afectan la composición de la leche (Tabla 13), el análisis estadístico demostró que el porcentaje de grasa se ve influenciado significativamente por factores tales como la Finca (valor de F 4.53, Pr > F 0.0004) y el número de lactancia del animal (valor de F 4.68, Pr > F 0.0003).

No obstante, no se evidenció diferencias significativas por efecto del padre (valor de F 1.88, Pr > F 0.0060). Al analizar las interacciones entre los factores del ensayo y el porcentaje de grasa, se encontró que todas presentan un efecto significativo. De este modo, se puede establecer que la grasa se ve influenciada por las interacciones finca-padre, finca-numero de lactancia, y finca-padre-numero de lactancia.

Tabla 13. Componentes de varianza estimados y efecto por finca, padre y clima sobre los rasgos de producción de la leche

Rasgo	Coeficiente de Variación	Media	Valor de p			
			Finca	Padre	No. Lact	Clima
Grasa	19.17165	3.535846	0.0004*	0.0060	0.0003*	<.0001*
Proteína	12.45615	3.163018	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.4037
Lactosa	5.827225	4.712511	0.0017*	<.0001*	0.3295	0.0004*
SNG	4.583385	8.591876	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.2071
ST	7.123746	12.13762	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0001*

*p < 0.05

En referencia a la lactosa, solo se encontró influencia significativa de la finca (valor de F 3.87, Pr >0.0017), el padre (valor de F 5.85, Pr <.0001) y para los Sólidos totales se estableció relación significativa entre éstos y la finca (valor de F 9.78 Pr <.0001), el padre (valor de F 3.96, Pr <.0001), el clima (valor de F 14.87 Pr > 0.0001), el genotipo CSN3 (Pr > 0.008) del mismo modo que la lactosa. Además, se presentó significancia entre los ST y el número de lactancia (valor de F 9.55 Pr <.0001). Se determinó que las interacciones finca-padre y finca-padre-número de lactancia influyen significativamente frente a los ST (Pr < 0.001) En cuanto a los sólidos no grasos los análisis demostraron relaciones significativas con todos los factores y las interacciones (Pr <.0001), menos con el clima. (Valor de F 1.59 Pr > 0.2071). Se encontró relación entre esta variable y el genotipo (Pr < 0.001).

A continuación, se analizan uno por uno los factores medioambientales que influyen la composición de la leche

7.3.1 Análisis de los componentes de la leche por fincas

Se determinó las medias por finca de cada componente de la leche (Tabla 14), lo que permitió diferenciar las cantidades de cada uno de estos por hato.

Cuando se realizó el análisis de promedio de porcentaje de grasa por finca, la media más alta se presentó en Argovia, (3.82) y la más baja en Albania (3.27). El

Tabla 14. Análisis de contenido de Grasa, Proteína, Lactosa, Sólidos no grasos (SNG) y sólidos totales (ST) en muestras de leche de individuos de 6 fincas en la sabana de Bogotá.

	ALBANIA	ARGOVIA	CUATROVIENTOS	GUASUCA	LUISIANA	SALITRE	
Grasa	Media	3.2752163	3.8270395	3.4225137	3.3691961	3.5661654	3.5373554
	DS	0.4806110	0.8381258	0.7321969	0.7118692	0.7650725	0.6644459
	Máx.	4.7100000	7.9000000	5.6200000	7.8900000	4.9400000	5.8600000
	Min	1.0300000	1.4400000	1.4100000	1.5800000	0.7800000	1.8600000
Proteína	Media	2.9954087	3.4476645	2.9968852	3.0171061	3.0426316	3.1166942
	DS	0.5017510	0.4076292	0.3052681	0.3707916	0.3190656	0.4147806
	Máx.	9.8300000	5.1000000	4.1600000	5.2600000	3.9100000	5.7200000
	Min	2.1600000	2.2800000	2.2900000	2.3000000	2.3100000	2.2800000
Lactosa	Media	4.6658654	4.7613980	4.7101093	4.6138907	4.8033083	4.7491736
	DS	0.2293631	0.3303433	0.3194741	0.3241714	0.2670822	0.3025180
	Máx.	5.2000000	5.4700000	5.3500000	5.3500000	5.3900000	5.4100000
	Min	3.8400000	2.9300000	3.5200000	3.4200000	4.1100000	3.2400000
SNG	Media	8.3930048	8.9199671	8.4279781	8.3445659	8.5651880	8.5678512
	DS	0.5125644	0.4685200	0.3906809	0.3504160	0.3913818	0.4344314
	Máx.	14.7200000	10.3200000	9.4600000	9.9300000	9.4000000	9.9900000
	Min	7.3200000	7.1300000	7.3800000	7.0700000	7.3300000	7.5000000
ST	Media	11.6678846	12.7729934	11.8666667	11.7136334	12.1321053	12.1054132
	DS	0.7738951	1.0975029	0.9307998	0.8732113	0.8910507	0.8750611
	Máx.	17.1800000	17.5100000	14.1800000	17.4300000	14.0100000	15.2600000
	Min	9.4400000	9.7300000	9.2600000	9.6400000	9.3900000	10.2800000

valor máximo observado fue de 7.90 en Argovia. El valor mínimo fue de 4.71 en Albania.

La evaluación del porcentaje de proteína mostró que la media más alta se obtuvo en Argovia (3.44) y las más bajas en Albania y Cuatrovientos (2.99). El valor máximo observado fue de 9.83 en Albania y el valor mínimo registrado fue de 3.91 en Luisiana. La lactosa presentó los mayores promedios en Luisiana (4.80) y el menor en Guasucá (4.61). El valor máximo encontrado fue de 5.47 (Argovia) y un mínimo de 5.20 (Albania).

Por su parte, los sólidos no grasos mostraron el mayor promedio en Argovia (8.91) y el menor promedio en Guasucá (8.34). El valor máximo se registró en Albania (14.72) y el valor mínimo se dio en Guasucá (7.07). En cuanto a los sólidos totales el promedio de finca más alto se observó en Argovia (12.77) y el menor promedio en Albania (11.66). El valor máximo se registró en Argovia (17.51) y el mínimo en Cuatrovientos (9.26) En general, se puede observar que los mejores promedios para contenido de grasa y proteína se obtuvieron en la población de la finca Argovia. (Figura 16)

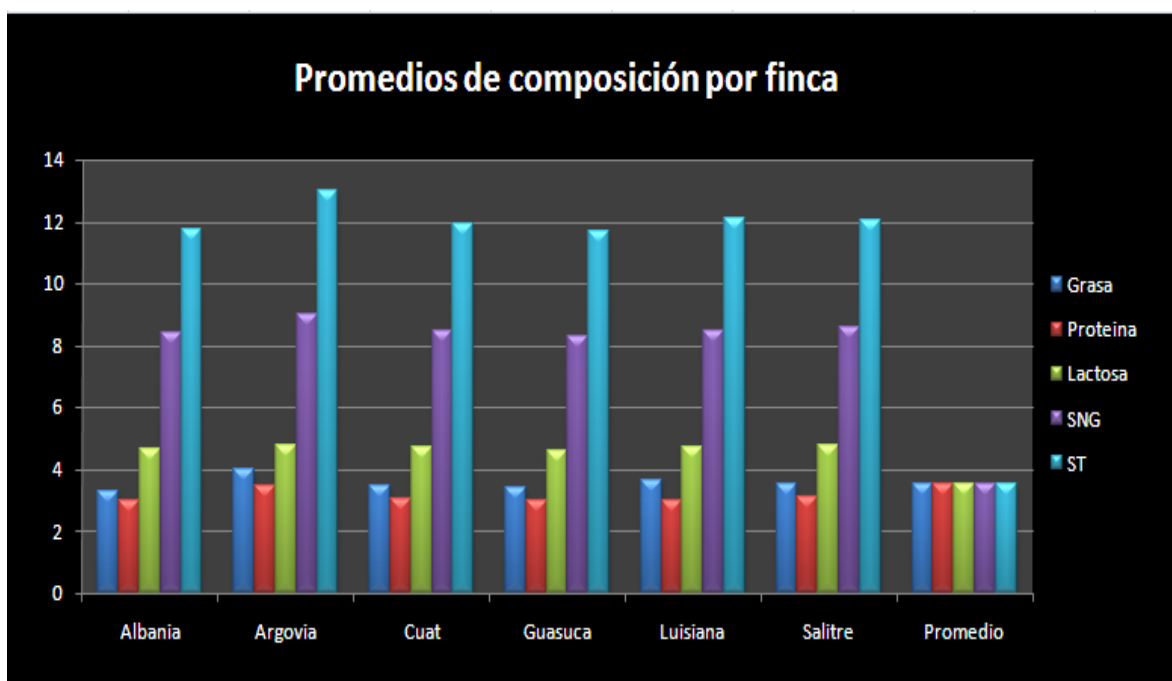


Figura 16. Composición de grasa, proteína, lactosa, sólidos no grasos (SNG) y sólidos totales (ST) por finca.

Los agrupamientos de Duncan más heterogéneos se presentaron en cuanto a las fincas. (Tabla 15) En cuanto a la grasa, las diferencias más significativas se presentaron en la finca Argovia, el resto de las fincas se agruparon de modo tal que el promedio de grasa fue más o menos uniforme. De otro lado, estadísticamente la proteína mostró diferencias en las fincas Albania y Salitre, y el resto de las fincas reveló un comportamiento semejante.

Las diferencias en la lactosa se dieron a lo largo de todas las fincas, presentando el comportamiento más variado dentro de las variables de análisis. Los sólidos no grasos y totales tuvieron una respuesta similar para las fincas Salitre y Luisiana, y fueron significativamente diferentes en la finca Argovia.

Tabla 15. Prueba de comparaciones múltiples por finca para grasa, proteína, lactosa, SNG y ST por el método de Duncan

FINCA	Grasa		Proteína		Lactosa		SNG		ST	
	Media		Media		Media		Media		Media	
Argovia	3.82704	A	3.44766	C	4.76140	A,B	8.91997	A	12.772	A
Albania	3.27522	E	2.99541	A	4.66587	C	8.39300	C,D	11.667	D
Guasucá	3.36719	D,E	3.01555	C	4.61306	D	8.34223	D	11.709	C,D
Salitre	3.53736	B,C	3.11669	B	4.74917	B	8.56519	B	12.105	B
Luisiana	3.56617	B	3.04263	C	4.80331	A	8.56519	B	12.132	B
Cuatv.	3.42251	C,D	2.99689	C	4.71011	B,C	8.42798	C	11.866	C

Letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes ($P < 0,05$)

7.3.2 Análisis de los componentes de la leche por clima

Cabe recordar que la temporada húmeda fue la predominante durante la época de muestro, con solo un mes considerado como seco. Después del análisis del efecto del clima sobre los rasgos de la composición de la leche se encontró que para la grasa, proteína, sólidos no grasos y sólidos totales los promedios fueron más altos durante la temporada seca, al igual que los valores máximos y mínimos registrados. (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis del contenido de grasa, proteína, lactosa, SNG y ST según la temporada

Variables	Estado del clima							
	HUMEDO				SECO			
	Media	DS	Min	Máx.	Media	DS	Min	Máx.
Grasa	3.5141652	0.7522387	0.78000	7.90000	3.7512717	0.6393461	2.140000	5.350000
Prot.	3.1599593	0.4670071	2.16000	9.83000	3.1934104	0.3402264	2.520000	4.270000
Lact	4.7200349	0.3080318	2.93000	5.47000	4.6377457	0.2791476	3.640000	5.460000
SNG	8.5874520	0.5025182	7.07000	14.7200	8.6358382	0.5140978	7.070000	10.13000
ST	12.112513	1.0506748	9.26000	17.5100	12.387109	0.9665780	9.640000	14.76000

Las diferencias entre el comportamiento de los componentes de la leche por clima no son significativas, como se observan en la figura 17:

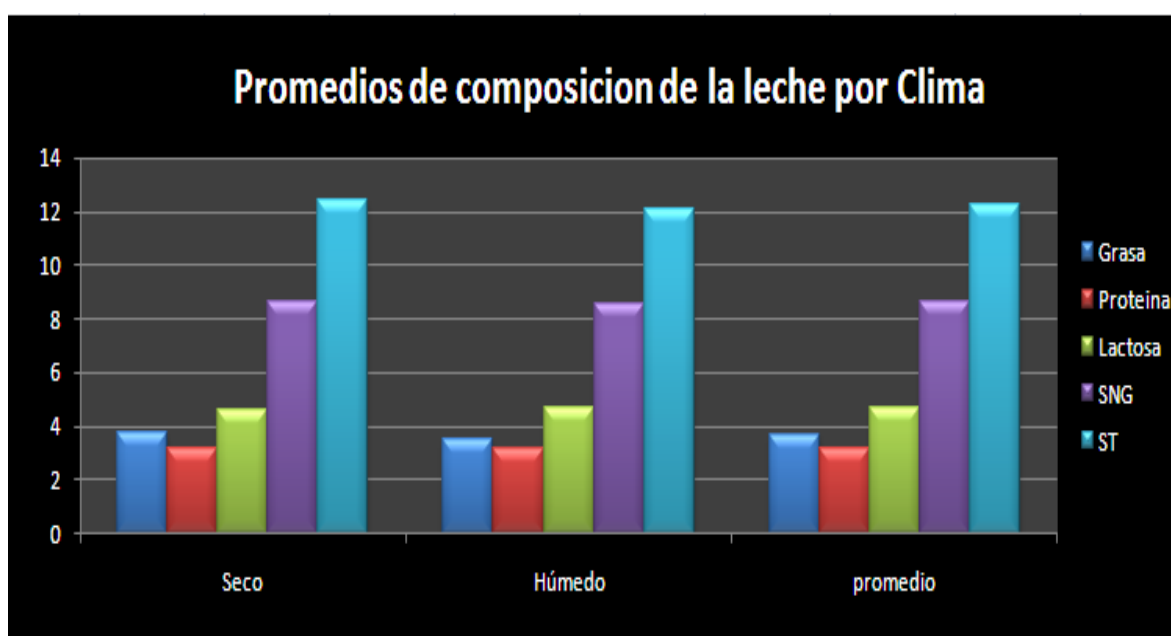


Figura 17. Promedios de los componentes de la leche en dependencia del clima: seco o húmedo

La prueba de comparaciones múltiples para el clima mostró diferencias en su efecto para la grasa, la lactosa y los sólidos totales, y la proteína y los SNG no presentaron influencia por este factor. (Tabla 17)

Tabla 17. Prueba de comparaciones múltiples por clima para grasa, proteína, lactosa, SNG y ST.

CLIMA	Grasa		Proteína		Lactosa		SNG		ST	
	Media		Media		Media		Media		Media	
Seco	3.75127	A	3.19341	A	4.63775	A	8.63584	A	12.387	A
Húmedo	3.51417	B	3.15996	A	4.72003	B	8.58745	A	12.112	B

Letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes ($P < 0,05$)

7.3.3 Análisis de los componentes de la leche según el estado de lactancia.

Se registraron 208 individuos de primera a sexta lactancia, cuyas edades fluctuaban entre los 43 a 105 meses, para las variables grasa, proteína, lactosa, sólidos no grasos y sólidos totales. (Tabla 18).

El promedio de grasa mas alto se registro en la primera (3.68) y sexta lactancia (3.76), al igual que los valores registrados máximos y mínimos (7.90 y 7.89 respectivamente). Los valores disminuyeron hacia la mitad de las lactancias.

El análisis del promedio de proteína mostró la media más alta en la sexta lactancia (3.25). El valor máximo se registró en el intervalo de 52 a 85 meses (lactancia 3) con un valor de 9.83. El valor mínimo se observó en las edades de 43 a 83 meses (lactancia 2). Al igual que la grasa, los contenidos de proteína son altos para las vacas de edad temprana, hacia la tercera lactancia la fracción proteica disminuyó notablemente, para volver a aumentar el nivel hacia el final de la lactancia.

La media más elevada para la lactosa fue de 4.77 (primera lactancia), y en la lactancia 6 se observó el promedio más bajo (4.60), El valor máximo registrado se dio en la lactancia 1 (5.47) y el valor mínimo en la lactancia en las edades de 60 a 103 meses, correspondientes a la lactancia 4 (2.93).

La lactosa presentó un comportamiento diferente al resto de los componentes. Los contenidos fueron superiores en la primera lactancia, para disminuir periódicamente en las lactancias posteriores.

El promedio de sólidos no grasos más elevado se obtuvo durante la primera lactancia (8.69) y el más bajo durante la cuarta lactancia (8.49). El valor máximo

Tabla 18. Análisis de contenido de Grasa, Proteína, Lactosa, Sólidos no grasos (SNG) y sólidos totales (ST) en muestras de leche según las edades de los individuos clasificadas en diferentes lactancias

	Lactancia 1 43 a 61 meses	Lactancia 2 43 a 83 meses	Lactancia 3 52 a 85 meses	Lactancia 4 60 a 103 meses	Lactancia 5 78 a 105 meses	Lactancia 6 95 a 105 meses
Grasa						
Media	3.6820489	3.5384232	3.4110740	3.4413953	3.4932540	3.7633333
DS	0.7609107	0.6941921	0.7067146	0.7689829	0.6907964	1.1716539
Máx.	7.9000000	5.7500000	6.1000000	7.5800000	5.2200000	7.8900000
Min	1.5800000	1.4400000	0.7900000	0.7800000	1.5900000	2.0400000
Proteína						
Media	3.1914850	3.1779668	3.1153222	3.1325581	3.1953175	3.2560606
DS	0.4071682	0.4304279	0.5370989	0.4375276	0.4957478	0.4616610
Máx.	4.9200000	4.4300000	9.8300000	5.7200000	5.2000000	5.2600000
Min	2.3100000	2.1600000	2.2800000	2.3200000	2.2800000	2.6800000
Lactosa						
Media	4.7785714	4.7194398	4.6950835	4.6526246	4.6380952	4.6027273
DS	0.3043270	0.2678960	0.3065313	0.3290726	0.3176406	0.3865494
Máx.	5.4700000	5.4500000	5.3800000	5.3900000	5.3100000	5.0900000
Min	3.6800000	3.6100000	3.4300000	2.9300000	3.4200000	3.5800000
SNG						
Media	8.6912030	8.6195436	8.5193079	8.4996678	8.5411905	8.5569697
DS	0.4914306	0.4885405	0.5722705	0.4441365	0.4762077	0.3547665
Máx.	10.3200000	10.1200000	14.7200000	9.9100000	9.7900000	9.5400000
Min	7.3200000	7.5200000	7.0700000	7.1300000	7.5000000	7.7200000
ST						
Media	12.3913910	12.1590664	11.9377804	11.9573754	12.0372222	12.3260606
DS	1.0560132	1.0388788	0.9995004	0.9922782	0.9984000	1.3421507
Máx.	17.5100000	15.6400000	17.1800000	15.4600000	14.5500000	17.4300000
Min	9.8000000	9.7300000	9.3900000	9.2600000	9.9100000	10.7600000

se presentó en la lactancia 3 (14.72) y el valor mínimo en la lactancia 3 (7.07). Al igual que la materia grasa y la fracción proteica, los contenidos de SNG disminuyeron hacia la tercera y cuarta lactancia, para recuperarse luego, pero de manera sutil en comparación con los demás componentes.

Los sólidos totales mostraron una media de 12.39 durante la primera lactancia, siendo la más alta y una media baja de 11.93 en la lactancia 3. El máximo registrado fue de 17.51 en la lactancia 1 y el mínimo en la lactancia 4 (9.26).

En general se pudo observar mayor rendimiento de los individuos en los componentes de la leche durante la primera lactancia, como se ilustra en la figura 18.

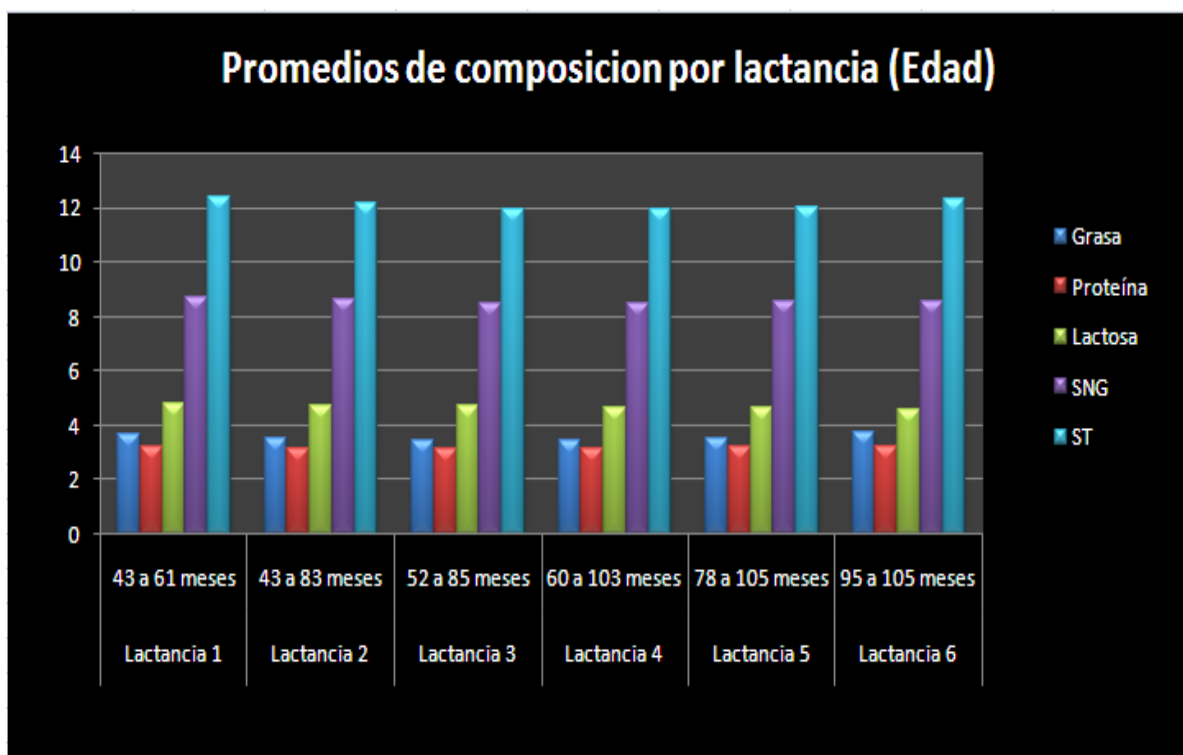


Figura 18. Promedios de los componentes de la leche según el estado de lactancia (edad)

Las diferencias que se presentaron a nivel de las lactancias se encuentran en las dos primeras y la última lactancia. (Tabla 19). Durante la tercera, cuarta y quinta lactancia, es decir en edades que oscilan de 52 a 90 meses no se dieron cambios

significativos, y estos se caracterizaron por un declive en el rendimiento de los componentes.

Tabla 19. Prueba de comparaciones múltiples por lactancia para grasa, proteína, lactosa, SNG y ST.

No. De lactancia	Grasa		Proteína		Lactosa		SNG		ST	
	Media		Media		Media		Media		Media	
Lac. 1	3.68205	A,B	3.19148	A,B	4.77857	A	8.69120	A	12.391	A
Lac. 2	3.53842	B,C	3.17797	A,B	4.71944	A,B	8.61954	A,B	12.159	A,B
Lac. 3	3.41107	C	3.11532	B	4.69508	B,C	8.51931	B,C	11.937	B
Lac. 4	3.44140	C	3.13256	B	4.65262	B,C,D	8.49967	C	11.957	B
Lac. 5	3.49325	C	3.19532	A,B	4.63810	C,D	8.54119	B,C	12.037	B
Lac. 6	3.75625	A	3.24844	A	4.59438	D	8.54094	B,C	12.303	A

Letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes ($P < 0,05$)

7.3.4 Análisis de los componentes de la leche según la familia paterna

Las 25 familias de medias hermanas paternas se agruparon según el toro, y se analizó el rendimiento de cada componente en las hijas de los 25 diferentes sementales. (Anexo 2) Esto mostro agrupamientos Duncan grandes, donde el mismo toro se ubicaba hasta en tres grupos iguales. Debido a ello se realizó un ranking de toros por componente, teniendo en cuenta los tres mejores machos para cada uno. (Tabla 20)

La familia de hermanas paternas que ofreció mejores componentes de la leche fue la perteneciente al toro Justy, con medias considerables para cada rasgo. La familia del toro Basar también fue sobresaliente, con rendimientos en segundo o tercer puesto para proteína, lactosa, ST y SNG. Las otras dos familias con rendimientos aceptables fueron las de Stormatic (para grasa y ST) y Phippen (para Lactosa y SNG)

Tabla 20. Ranking de padres por componente de la leche estimado (Tomado de un total de 25 familias paternas)

Rasgo	Padre	Medias
Grasa	Justy	4.2823
	Stormatic	3.9658
	Eddie	3.9078
Proteína	Justy	3.60427
	Toro 19	3.52808
	Basar	3.50485
Lactosa	Justy	4.96093
	Pippen	4.90411
	Basar	4.89515
Sólidos Totales	Justy	13.6249
	Stormatic	13.0301
	Basar	13.0173
Sólidos Grasos	Justy	9.29787
	Basar	9.11424
	Pippen	9.00603

8. DISCUSIÓN

El presente trabajo se desarrolló con el fin de evaluar un polimorfismo del gen kappa caseína y su asociación con características fenotípicas relacionadas con la calidad de la leche, en una población de ganado Holstein de la sabana de Bogotá.

Según la literatura consultada, este trabajo es el primero en el país en el que se estudia la asociación del genotipo con las características fenotípicas usando una población significativa de individuos y teniendo en cuenta otros factores que afectan la composición de la leche. Aunque existen trabajos en los que se reportan frecuencias de alelos y genotipos, estos no han incluido hasta ahora correlación, y en otros solo se ha estudiado individuos con solo una medición, sin presentarse la integración que se dio en este estudio, lo que se constituye en una herramienta con una amplia proyección de trabajo, teniendo en cuenta que el rendimiento lechero es el resultado de la interacción entre la genética y el medio ambiente.

Es importante tener en cuenta que en esta tesis se utilizó una técnica de análisis genético más económica que la que se ha llevado a cabo en otros estudios. Según Naranjo *et al.* (2000) la detección de los alelos de la k-caseína utilizando PCR-SSCP tiene la ventaja con relación a la técnica PCR-RFLP de evitar la digestión del fragmento amplificado con enzimas de restricción, como *Hinfl*, proceso costoso por el alto precio de las enzimas y porque cada digestión debe hacerse de manera independiente. Además se diseñó un cebador que mas adelante se constituirá como una herramienta accesible para que los productores puedan hacerse parte de programas de selección.

El efecto significativo del genotipo CSN3 sobre el contenido de proteína encontrado en este estudio coincide con varios reportes (Braunschweig *et al.*, 2000; Bonvillani *et al.*, 2000; Ikonen *et al.*, 2000; Stzalkowska *et al.*, 2002; Tsiaras *et al.*, 2005; Alipanah *et al.*, 2008; Braunschweig, 2008;), donde se ha concluido que los contenidos de proteína se ven afectados principalmente por el

locus CSN3 por encima de otros factores como la alimentación, el manejo y el clima.

Según Ikonen *et al* (2004) el genotipo AB esta asociado con un alto contenido de proteína. La asociación entre el alelo B y el alto contenido proteico observado en este estudio se ha reportado además por otros autores (Stzalkowska *et al.*, 2002; Tsiaras *et al.*, 2005 Alipanah *et al.*, 2008). El alelo B determina una calidad superior en la leche, ya que la leche que proviene de animales que portan este alelo es mejor para la manufactura del queso debido a su gran contenido de materia seca, lo cual refleja un alto contenido de proteína y grasa. (Bonvillani *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la leche de los animales con genotipo CSN3 AB contiene una mayor proporción de proteína. Esto sugeriría que dicho alelo tiene un mayor nivel de expresión con respecto a la variante A en la glándula mamaria de los bovinos. La diferencia en la expresión de los alelos, explicaría las observaciones hechas previamente, que evidencian que la proporción de kappa caseína en la leche depende del genotipo del animal.

En cuanto a la materia grasa, los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Tsiaras *et al.*, (2005), en donde el contenido de grasa para individuos heterocigotos fue mayor que para individuos homocigotos AA, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La mayoría de los estudios de asociación han reportado este mismo resultado. Sin embargo, Ikonen *et al.*, (2000) y Stzalkowska *et al.*, (2002) reportan un alto contenido de grasa en leches derivadas del genotipo AB, de manera significativamente diferente comparada con los individuos homocigotos.

Según Tsiaras *et al* (2005), el contenido de lactosa en la leche no se ve estadísticamente influenciado por el genotipo, sin diferencias importantes en contenido de lactosa entre individuos AA y AB, pero con $AB > AA$. Estos resultados son concordantes con los obtenidos. Sin embargo, Stzalkowska *et al.*, (2002), informa un efecto significativo entre el genotipo y la lactosa y un alto rendimiento de esta en individuos con el genotipo AA.

Los estudios de asociación en los que se contemplan los sólidos no grasos y sólidos totales son escasos. Stzalkowska *et al.*, (2002), informo que el contenido

de sólidos no grasos se ve afectado principalmente por el alelo A y el genotipo homocigoto AA. Asimismo, este autor reportó que los genotipos CSN3 afectan el contenido de sólidos totales, específicamente por el genotipo BB. Los resultados concuerdan con los obtenidos para los sólidos totales, en cuanto a que la presencia del alelo B influye en un mayor contenido, pero difiere de los resultados obtenidos para los sólidos no grasos.

Los alelos determinados por PCR-RFLP y SSCP fueron los que se encuentran más frecuentemente en gran cantidad de razas bovinas. Según Bonvilliani *et al.*, (2000), del locus CSN3 se han reportado mayoritariamente estos dos alelos, el A y el B. En general, el alelo A y el genotipo homocigoto AA de la población de estudio fue el predominante, y se presentó en frecuencias algo más elevadas que en otros reportes. La alta frecuencia del alelo A ha sido una característica común en la mayoría de las poblaciones de ganado de leche estudiadas (Zardwiny y Kohnlein, 1990; Osta, 1994; Uffo, 2004); En Holstein el alelo A es más frecuente (Viana *et al.*, 2001; Poli y Antonioni, 1991; Bonvilliani *et al.*, 2000) Por su parte, la frecuencia del alelo B registrada fue muy baja. Stzalkowska *et al.*, (2002) afirma que la frecuencia de CSN3 B en ganado holstein es baja y usualmente no excede frecuencias mayores de 0.3.

La frecuencia alélica obtenida coincide con los resultados reportados por Viana *et al.* (2001), correspondientes a 0.9 para el alelo A y 0.1 para el alelo B en la raza Holstein de una población española; y con lo registrado por Alipanah *et al.*, (2008) para las razas rusas berrenda negra y roja, con 0.83 y 0.17 para el alelo A y B respectivamente. Las frecuencias también son similares a las obtenidas en otras razas, como Santa Gertrudis, con 0.85 y 0.15 para A y B respectivamente (Kemenes *et al.*, 1999)

De igual modo los resultados son comparables con los obtenidos en Norteamérica. De este modo, la frecuencia del alelo A fue de 0.8 y del alelo B fue de 0.1 para poblaciones de ganado Holstein (Kiddy *et al.*, 1968; Medrano *et al.*, 1990; Eenennaam y Medrano, 1991) y las frecuencias genotípicas también eran similares. Sin embargo, ahora las frecuencias génicas homocigotos son las

predominantes (BB > AA > AB) en la población estadounidense, efecto logrado mediante cruces dirigidos intensivos por medio del desarrollo de selección asistida por marcadores moleculares –MAS- (López, 2004).

El alelo A tuvo mayor frecuencia y el alelo B menor frecuencia comparada con otros estudios. Así, Strzalkowska *et al.*, (2002) encontró para razas polacas frecuencias alélicas $f(A) = 0.77$ y $f(B) = 0.23$. Cervantes *et al.*, (2007) determinaron $f(A) = 0.70$ y $f(B) = 0.29$ y Naranjo *et al.*, (2000) reportaron $f(A) = 0.68$ y $f(B) = 0.31$. El estudio de correlación realizado por López- Benavides en una población similar a la de estudio (1998), observó una frecuencia de 0.795 para la variante A y de 0.24 para la variante B.

En cuanto a las frecuencias genotípicas, la correspondiente al genotipo AA está por encima de los valores reportados y las frecuencias de los genotipos que portan el alelo B (AB y BB) por debajo. López Benavides (1998) reporta 0.57 para AA, 0.37 para AB y 0.05 para BB; Viana *et al.*, (2001) reportó para el genotipo AA una frecuencia de 0.22, para el genotipo AB una frecuencia de 0.48 y para el BB una frecuencia de 0.28; Strzalkowska *et al.*, (2002) reportó frecuencias de 0.57, 0.39 y 0.04 para AA, AB y BB respectivamente, Alipanah *et al.*, (2008) observó frecuencias genotípicas de 0.68 (AA), 0.28 (AB) y 0.02 (BB). Debe tenerse en cuenta que según Strzalkowska *et al.*, (2002) los individuos homocigotos B dentro de una población de estudio presentan frecuencias bajas, por lo general de 0.04, valor por encima de lo obtenido en este estudio. Sin embargo, las frecuencias genotípicas de este estudio son similares a las determinadas por Beck y Kristiansen (1990) en ganado danés, con frecuencias para el genotipo AA de 0.735 y para el genotipo BB de 0.229.

Dados los resultados, la selección artificial que se ha desarrollado para el incremento de la producción de leche, se expresa en elevadas frecuencias del alelo CSN3A, el cual se corresponde con leche de mejor calidad para venta/proceso como leche fluida que para uso en la obtención de quesos (Cervantes, 2007). La frecuencia baja del alelo B para CSN3 se asocia a un

control de apareamientos que reduce la posibilidad de afectar esta frecuencia en la raza Holstein (Kamiński, S. 2000).

De otra parte, teniendo en cuenta los factores no genéticos que influyen en la composición de la leche, se puede mencionar que, en general, los contenidos de la leche registrados en este trabajo se presentan en menor cantidad que los reportados en países y razas europeas. Esto se debe al enorme interés que se ha dado en otras naciones por desarrollar programas de selección y la gran cantidad de informes obtenidos en este campo, además de diferentes tecnologías aplicadas, estrategias de manejo, programas de alimentación y condiciones climáticas.

Los resultados obtenidos en este estudio para el contenido de grasa y proteína son similares a los informados por Ron *et al* (1994) en individuos de Israel, quien reportó una media de 3.16 y 3.04 para materia grasa y fracción proteica respectivamente. De igual modo, según Morales (2003) en Norteamérica se han reportado valores para grasa de 3.6, proteína 3.2 y lactosa 4.7. Los porcentajes obtenidos en Venezuela también son semejantes, ya que se reporta promedios de grasa que oscilan entre 3.1 y 3.3, proteína 2.7 y 3.0 y Sólidos totales 10.9 y 11.6. (Alvarado *et al.*, 2006). Para otra población suramericana, Pérez *et al.*, (2007) obtuvo para grasa un promedio de 3.71 y para proteína 3.21 en individuos Holstein de Chile. En Colombia, López (1998) reportó valores por debajo de los informados en este estudio, correspondientes a 3.4 para grasa, 2.9 para proteína, 4.94 para lactosa, 8.4 para SNG y 11.84 para sólidos totales con una población de la Sabana de Bogotá.

En cuanto a Europa, los datos son significativamente diferentes. Bovenhuis *et al.*, (1992) reportó un contenido de grasa de 4.56 y de proteína de 3.46 en los Países bajos. Posteriormente, Ikonen *et al* (2001) encontró para la grasa un valor similar al anterior, de 4.54 y para proteína de 3.28, en razas Holstein-Fresian en Finlandia. En razas polacas, Strzalkowska *et al* (2002) estudio los contenidos en la leche de grasa, proteína, sólidos no grasos y sólidos totales correspondientes a 5.01, 3.58, 832 y 13.41 respectivamente. En 2004 Ikonen *et al*, considero de

nuevo el estudio de asociación, y registro un aumento ligero en el porcentaje de proteína (de 3.28 en 2001 a 3.39 en 2004). En Holstein de Grecia, Tsiaras *et al* (2005) reportó valores de 4.45, 3.28, y 4.82 para grasa, proteína y lactosa en la segunda lactancia.

La diferencia entre los contenidos de la leche que presenta la raza Holstein de Colombia con las de otros países, plantea una debilidad en la ganadería Colombiana, debido a que la base de la producción lechera es 70% la raza Holstein (Trujillo, 2000) y la competitividad de esta industria esta dada por la calidad de la composición de la leche frente a otros mercados. Las condiciones favorables en cuanto a la implementación formal de manejo integral de ganado que presenta el continente europeo posiblemente explica las diferencias encontradas entre éste con respecto a América

En cuanto a la relación establecida entre las variables de este estudio, la alta correlación de los sólidos totales con los contenidos de grasa, proteína y sólidos no grasos coincide con lo reportado por Pinto *et al* (1998). De igual forma, este autor informa una correlación negativa entre la lactosa y los contenidos de grasa y proteína, que también están de acuerdo con los datos obtenidos. Páez *et al* (2002), reporto correlaciones fuertes y positivas entre los sólidos totales y el contenido de grasa, y los sólidos totales con los sólidos no grasos.

Los sólidos totales miden en conjunto el contenido de grasa y sólidos no grasos en la leche (Mamani, 2007), lo que explica las relaciones fuertes y positivas (cercanas a 1.000) encontradas entre los sólidos totales, los no grasos y la grasa. Como lo muestran los resultados del contenido de grasa, SNG Y ST, van en aumento proporcional.

Los sólidos no grasos conforman el contenido de minerales, lactosa y proteínas presentes en la leche (INIA, 2001), lo que explica la correlación directa encontrada entre los SNG y el porcentaje de proteína. Con respecto a la lactosa en relación con los SNG, esta interacción no fue fuerte, pero fue positiva. Según Mamani (2007), tanto la Proteína, SNG y los Sólidos Totales tienen una tendencia similar en 365 días, y dado que la proteína es un componente de los Sólidos no grasos,

esta influye notablemente en el contenido de éstos y consecuentemente en los Sólidos Totales.

Ikonen *et al* (2004) reportó correlación de 0.63 entre la grasa y la proteína, en relación mayor de la que se muestra en este trabajo (0.49). Existe una correlación directa entre el nivel de proteína y el nivel de grasa. Leche con mucha grasa también tiene mucha proteína, y la leche con poca proteína también tiene poca grasa (Instituto Babcock, 1995). Esto podría explicar las marcadas diferencias entre los contenidos de estos dos contenidos en razas europeas frente a Colombia, donde la correlación es menor.

Las correlaciones fuertes y negativas presentadas por la lactosa frente a la proteína y la materia grasa se da gracias a que la lactosa presenta una proporción constante, tanto que sus variaciones son limitadas, menos de dos veces entre una leche pobre en lactosa. De tal modo, la cantidad de grasa o proteína, por mayor que sea, no va a afectar significativamente la fracción de lactosa de la leche. Otra de las razones para este resultado es que la lactosa se obtiene por la extracción del contenido de grasa de la leche y la precipitación de la caseína.

Numerosos estudios han reportado que las variantes de las proteínas bovinas, en especial la de la Kappa caseína están asociados con el desempeño durante la lactancia y tienen una alta influencia en la composición de la leche y las propiedades de procesamiento de estas, especialmente de la fabricación del queso (Kastonina *et al.*, 2004, Denisenko y Kalashnikova, 2004, Konovalova *et al.*, 2004, Romonasova, 1999, Marziali y Ng-Kwai- Hang *et al.*, 1986; Aleandri *et al.*, 1990).

Los resultados obtenidos en este estudio confirman lo reportado por numerosos estudios resumidos por Walstra *et al* (2000), según los cuales la curva de la lactación se caracteriza por incremento marcado en el rendimiento dentro de los primeros 60 días, luego de lo cual se estabiliza y después de los 140 días comienza a disminuir hasta el momento del secado. Ikonen *et al* (2004) informaron que el volumen de grasa y proteína fue mas alto al principio de la lactancia,

alcanzado sus valores más bajos durante el primero tercio de esta y que durante el último tercio de lactación, los volúmenes de grasa y proteína aumentaron empinadamente.

En cuanto al contenido de grasa, se ha reportado que al inicio de la lactancia, es decir cuando se está produciendo calostro, se encuentran altas concentraciones de esta (principal fuente de energía en las primeras etapas de vida del ternero) y luego la materia grasa disminuye durante los primeros 2 meses de lactancia y tiende a aumentar nuevamente en forma gradual y lenta conforme la lactancia progresa (Morales, 1999).

A su vez, los resultados concuerdan con lo informado por Alvarado *et al* (2006), según el cual en el caso de la proteína total, se obtuvo un contenido porcentual significativamente mayor en las muestras de leche provenientes de vacas en la etapa final de lactancia. Además, según Morales (1999) la proteína total cae abruptamente en pocos días, en la transición de calostro hacia leche y alcanza el mínimo alrededor de la 5 a 10 semanas de lactancia, correspondiendo con la máxima producción de leche, posteriormente el contenido de proteína tiende a aumentar gradualmente conforme progresa la lactancia o bien aumentar cuando la vaca queda gestante.

Existen otras investigaciones en las cuales se le atribuye un alto porcentaje de proteína a la primera lactancia, tal vez debido a que la mayoría de dichos estudios solo se llevan a cabo con vacas de primera y segunda lactancia (Sandrucci *et al.*, 2007; Tsiaras *et al.*, 2005; Ikonen *et al.*, 2004; Ikonen *et al.*, 2001; Bobe, 2004).

Con respecto a los sólidos no grasos y totales, Stzalkowska *et al.*, (2002), concluyeron que la leche proveniente de animales que se encontraban en estados de lactancias superiores a los 210 días presentaban rendimientos superiores de SNG y ST, como efectivamente se muestra en este estudio. Sin embargo, los resultados de este autor no coinciden con los logrados en cuanto a la lactosa, pues según él este componente presenta un mejor comportamiento durante las lactancias tardías, caso contrario al obtenido.

Como puede observarse, la dinámica de todas las variables fue semejante a lo largo de las lactancias. Según Calderón *et al* (2006) el comportamiento de los

componentes de la leche observados en una lactancia es similar a los que se observan en las subsecuentes lactancias.

En la literatura se ha reportado en general que los componentes de la leche tienden a ser mayores durante la temporada húmeda o de lluvias (Villoch *et al.*, 1991; DePeters y Ferguson, 1992; Gallardo *et al.*, 1996; Ramírez y Bravo, 1999; Moreno, 1999; Hernández, 2005;). Aunque los resultados mostraron mayor rendimiento en la época seca, esta diferencia fue muy sutil, y además debe tenerse en cuenta que durante el muestreo solo se dio un mes seco, con humedad en el resto del tiempo. (Anexo 1)

No obstante, en el estado de Sao Paulo (Brasil), se encontró que no hay efectos significativos entre los meses del año y la producción de leche, excepto para el porcentaje de proteína bruta en la leche y que la estacionalidad en la producción y el rendimiento de leche no se presentó por la suplementación y por una mayor calidad y disponibilidad forrajera. (González *et al.*, 2004.). Quizás esto explique los resultados obtenidos, dado que en las fincas estudiadas se suplementa a los individuos con semilla algodón, levadura líquida, maíz molido y silo trigo además del forraje. (Anexo 3)

Se ha demostrado que para disminuir el efecto de la época del año sobre la concentración de los sólidos totales, se debe manipular la proporción de los forrajes con el concentrado, el nivel de fibra en la ración y la frecuencia de la alimentación (Looper *et al.*, 2001). La suplementación pudo haber mantenido constante la producción en el mes seco y además aumentar discretamente los niveles de grasa, proteína y demás contenidos de la leche en esta temporada. Del mismo modo hay que tener en cuenta que el muestreo en esta época fue muy pequeño contrastado con la temporada lluviosa, lo que afecta las comparaciones. En la mayoría de las áreas tropicales existe la necesidad de suplementar, ya que las lluvias son periódicas y se concentran sólo en algunos meses del año. Esto afecta la disponibilidad del forraje y, consecuentemente, la producción animal (Reaño, 1993), que no fue el caso para este muestreo, dadas las constantes precipitaciones. El éxito en la alimentación de los rumiantes durante la época

seca depende del suministro de una adecuada cantidad de los nutrientes apropiados y en el momento oportuno (Garmendia *et al.*, 1991), como ocurrió en este caso.

El análisis por finca mostró efecto significativo de esta para cada variable. Como no se encontró diferencias en los genotipos por hatos, ya que estos se encuentran distribuidos en las diferentes haciendas, no se puede identificar las fincas solo por las frecuencias alelicas o genotípicas obtenidas (Bonvillani *et al.*, 2000), y se puede atribuir estas influencias significativas a los procedimientos de manejo en cada una, pero no al manejo alimentario por hato, pues se dio de una misma manera, debido a que pertenecen a un dueño común, donde el ganado se alimenta principalmente de semilla de algodón, levadura líquida, maíz molido, forraje búfalo y pasto mezcla.

La finca más sobresaliente, Argovia, maneja además el sistema de semiestabulación, consistente en el confinamiento de las vacas en establos separados, sólo con salida a pastoreo, lo que marcó la diferencia entre la producción de esta finca con respecto a las demás. Según Jiménez (2007) estabular rebaños de vacas en ordeño es una de las variantes más efectivas para dar respuesta a la necesidad de incrementar la producción de leche, debido a que el ganado está controlado, comiendo forraje, vigilándose la aparición de enfermedades y sin gastar energías para buscar el alimento, excepto por el mediano pastoreo. Se afirma que al semiestabular vaquerías se produce el doble de litros por vaca sin dejar de lado el importante aporte del forraje (vaquerías de la CPA Cuba Nueva, 2007).

Las condiciones no alimentarias de manejo si son notables en cada finca, y esto se refleja en los resultados, como valores bajos de producción en Cuatrovientos, donde las circunstancias de tamaño del hato, ordeño, establo, higiene y tecnología se diferencian de las de Argovia.

Aunque Argovia mostro los valores mas altos de producción, las cantidades de grasa fueron cambiantes en las fincas en comparación con proteína y lactosa, que se mantuvieron mas bien constantes. Según Morales (1999) la grasa es el

componente lácteo más fácil de modificar a través de las prácticas de manejo, especialmente mediante la manipulación de la dieta, mientras que, la proteína láctea es más difícil de modificar de modo que el manejo genético aparece como la vía más concreta para mejorarla. Otra explicación podría consistir en el especial uso de suplementación con semilla de algodón en las fincas, que ha demostrado que aporta en un 13.4 % a la producción de grasa, mientras que no aporta en gran medida a la producción de proteína. (Martínez y Sánchez, 2007)

La suplementación utilizada en la población estudiada se ha reportado como favorable, especialmente en el caso del germen de maíz, el cual posee cerca de 22% de proteína cruda y 10% de grasa, mejorando la producción de leche (Miranda, 2002). En general, se ha concluido que la utilización de concentrados comerciales incrementa ciertos componentes químicos de la leche en sistemas de doble y único propósito (Razz y Clavero, 2007)

Se observó que existe un grupo mejor de padres y en general una familia paterna con mejores rendimientos lecheros. La genética es el principal factor que explicaría esta diferencia entre toros. La mayor parte del mejoramiento genético proviene de la selección de sementales, donde puede señalarse que el 76% de la mejora genética en el hato proviene del semental (Ochoa, 1991). Sin embargo, existen otros factores como la genética de la madre que podría influir sobre las variables.

Los resultados demostraron efecto significativo del genotipo paterno sobre los porcentajes de proteína, lactosa, SNG y ST, en detrimento con algunos estudios reportados que han concluido que el contenido real de proteína no se ve afectado por la genética paterna. En contraste, los efectos de la genética materna fueron significativos sobre el contenido real de proteína y el volumen de caseínas pero no sobre el contenido de las proteínas del lacto suero (Braunschweig *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos muestran que la aplicación de programas de mejoramiento asistidos por análisis genético son necesarios para la industria de la

leche en Colombia, dado que las frecuencias reportadas como favorables para los rasgos de interés económico son muy bajas en la nación, y mas aun en zonas como la Sabana de Bogotá donde los promedios de proteína y grasa de la raza Holstein, están por debajo de parámetros en relación con vacas de la misma raza de otras latitudes (Cervantes *et al.*, 2007).

El valor de mercado de la leche es un factor importante para incluir al definir las metas de selección. En Colombia, el precio competitivo de un litro de leche cruda de agosto de 2007 a enero de 2008 en la región lechera 1 (Región Cundboyacense) fue de \$30.96 por gramo de proteína cruda, con una bonificación por gramo adicional de \$14.99, equivalente a un valor agregado de la mitad del precio corriente. (Resolución 000012 de 2007, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural) La bonificación por regiones es una de las más altas en Cundinamarca, pero como se dijo anteriormente, en este sector el rendimiento de proteína es regular con respecto al resto del país.

Diseñando un programa de mejoramiento genético se puede aspirar a incrementar la frecuencia del alelo B para que los resultados redunden en el sector económico, aportando además a la competitividad no solo dentro de las regiones sino a nivel internacional. La consolidación de índices genéticos en un futuro próximo reflejará otros rasgos muy importantes como resistencia a enfermedades, vida productiva, problemas reproductivos y metabólicos y niveles de kappa-caseínas en leche, entre otras.

9. CONCLUSIONES

- Las frecuencias genotípicas del polimorfismo del gen CSN3 en la población Holstein de la Sabana de Bogotá fue de 76.19% para AA, 22.51% para AB y 1.25 % para BB.
- Las frecuencias alélicas del polimorfismo para el gen CSN3 en la población Holstein de la Sabana de Bogotá fueron de 87.4% para el alelo A y 12.55% para el alelo B.
- La variante alélica B, se encontró asociada con mayor producción de proteína en la leche. El porcentaje promedio de proteína para el genotipo AB fue de 3.22 y 3.14 para el genotipo AA.
- La técnica desarrollada para la genotipificación de las variantes A y B de CSN3, mediante SSCP es de gran utilidad, debido a que suprime el uso de enzimas de restricción para la visualización de los polimorfismos y de esta manera reduce costos para evaluaciones de poblaciones bovinas en selección asistida por marcadores moleculares.
- Los resultados anteriores proveen un marcador potencial, con las metodologías desarrolladas en el laboratorio de genética molecular animal, que pueden ser utilizado en programas de selección asistida para el mejoramiento de la calidad de la composición de la leche.

10. RECOMENDACIONES

El desarrollo de esta propuesta se realizó sin el apoyo de proyectos paralelos que integran un programa estructurado de mejora genética, el cual es necesario para la implementación del uso de los marcadores moleculares para la selección por calidad. Es necesario el adelanto de un plan alternativo para la evaluación genética de estas poblaciones, la cual se apoyará en los resultados obtenidos de genética molecular, para la selección de individuos con el mejor potencial para la producción de leche con altos contenidos de proteína y grasa.

Actualmente no existen los programas estructurados de mejoramiento genético en la producción lechera que se mencionaron anteriormente. Con la implementación de estos programas se deberá tener en cuenta que el sistema genético de un individuo es una variable de gran influencia sobre las características de contenido de proteína, grasa y sólidos totales de la leche bovina.

La identificación de genes asociados con características cuantitativas, puede ser utilizada en programas de mejoramiento de ganado, mediante el uso de Selección Asistida por Marcadores Moleculares.

11. BIBLIOGRAFIA

ALEANDRI R, BUTAZZONI LG, SCHNEIDER JC, CAROLI A, DAVALI R .1990. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *J Dairy Sci.* 73: 241-255.

ALIPANAH, M.1, L. ALEXANDROVNA KALASHNIKOVA, G. VELADIMIROVICH R. 2008. Frecuencias genotípicas de kappa-caseína y de prl-rsa i en dos razas de ganado rusas. *Arch. Zootec.* 57 (218): 131-138.

ALVARADO C., MELÉNDEZ, B., CLAVIJO, M., CORONADO, M., ARMAS, S., GIMENEZ O. 2006. Efecto de la Variante Genética de la *k*-Caseína sobre la Producción y Composición de la Leche de un Rebaño Holstein en el Trópico. *Rev. Fac. Cienc. Vet.* v.47 n.1

BEATTIE. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136: 619 - 639.

BOBE, G. 2004. Milk protein genotypes explain variation of milk proteín composition. A.S. Leaflet R 1901. Iowa State University Animal Industry Report.

BOLAND, M.J., J.P HILL y L.K. CREAMER. 1992. Genetic manipulation of milk proteins & its consequences for the dairy industry. *Australian Biotechnology* 2(6): 355 - 360.

BONVILLANI A.G, M.A. DI RENZO & I.N. TIRANTI. 2000. Genetic polymorphism of milk protein loci in Argentinian Holstein cattle. *Genet. Mol. Biol.*, vol. 23, no. 4, 819-823. ISSN 1415-4757

BOVENHUIS, H., J.A.M. VAN ARENDONK, S. KORVER. 1992. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *J. Dairy Sci.* 74: 2549 - 2559.

BOVENHUIS, H., I.J.M. DE BOER. 1994. The potential contribution of milk protein loci to improvement of dairy cattle. Proc. of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Canada. 19: 311 - 318.

BRAUNSCHWEIG M., HAGGER.C, STRANZINGER G, .2000. Associations between casein haplotype and milk production traits of swiss brown cattle. *Journal of dairy of science* 83:1387-1395

BRAUNSCHWEIG M. 2008. Associations between 2 paternal casein haplotypes and milk yield traits of Swiss Fleckvieh cattle. *J Appl Genet* 49(1), pp. 69–74

CALDERÓN A., GARCIA, F., MARTINEZ, G. 2006. Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Rev. MVZ Córdoba vol.11 no.1 Córdoba Jan./June* .

DEL LAMA S.N. & M.A. ZAGO. 1996. Identification of κ -casein and β -lactoglobulin genotypes in Brazilian *Bos indicus* and *Bubalus bubalis* population. *Braz. J. Genet* 19: 73-77.

DEL LAMA SN, ZAGO M. A. 2002. Identification of kappa-casein and beta-lactoglobulin genotypes in Brazilian *Bos indicus* and *Bubalus bubalis* population. *Braz J Genet.* 19: 73-77.

DELFOUR, A., J. JOLLÉS, C. ALAIS y P. JOLLÉS. 1965. Caseino-glycopeptides: Characterization of a metionine residue and of the N-terminal sequence. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 19:452-455

DENISENKO E.A, KALASHNIKOVA L.A. 2004. Milk production of Black Pied breeds with difference genotypes of kappa casein. *4th conference problems biotechnology in farm animal. VIJ. Dobrovitsy.* Russia. 24-25 November. 47-48.

DE PETERS, E. J. Y J. D. FERGUSON. 1992. Nonprotein nitrogen and protein distribution in milk of cows. (A. Review). *J. Dairy Sci.*,75(11): 3192-3209

EIGEL, W.N., J.E BUTLER, C.A. ERNSTROM, H.M. FARRELL, Jr., V.R. HARWALKAR, R. JENNESS, y R.M. WHITNEY. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk. Fifth revision. *J. Dairy Sci.* 67:1599-1631

ERHARDT, G. 1993. A new alpha s1casein allele in bovine milk and its occurrence in different breeds. *Anim. Gent.* 24:65-66.

FAO, Databases 2007 (website <http://apps.fao.org/>)

FARRELL, H.M., Jr., P.X.Qi, E. M. BROWN, P.H. COOKE, M.H. TUNICK, E.D. WICKHAM, y J.J UNRUH. 2002. Molten globule structures in milk proteins: Implications for potential new structure –function relationships. *J. Dairy Sci.* 85:459-471.

FEDEGAN. 2007. Federación de Ganaderos de Colombia. <http://www.fedegan.org.co/>

FELMER, R.; BUTENDIECK, N. 1998. Frecuencia alélica del gen de la k-caseína bovina en un rebaño Frisón Negro Chileno. *Arch. Med. Vet.* Vol. 30. Nº 2, p. 145-150.

GALLARDO, M. R., S. G. ONETTI, A. R. CASTILLO Y J. O. NARI. 1996. Proteína en leche y su relación con el manejo nutricional. *En: "Temas de producción lechera"*. Publicación miscelánea Nº 81: 133-151. EEA Rafaela INTA.

GARMENDIA J., S. GODOY Y C. CHICCO, 1991. Complementación y suplementación, estrategias alimenticias para bovinos a pastoreo. *In: D. Plasse, N. Peña de Borsotti, y J. Arango (Eds.). VII Cursillo sobre Bovinos de Carne. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay, pp. 141-167.*

GENBANK. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=search&term=kappa+casein>

GOLIJOW C.D., G. GIOVAMBATTISTA, M.V.R. POLI, F.N. DULOT & M.M. LOJO. 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.

GONYON, D.S., R.E. MATHER, H.C. HINES, G.F.W. HAENLEIN, C.W. ARAVE, S.N. GAUNT. 1987. Associations of bovine blood and milk polymorphisms and lactation traits: Holsteins. *J. Dairy Sci.* 70: 2585 - 2598.

GONZÁLEZ H, FISCHER V, ROCHA R, FAINÉ G, STUMPJ W, ADEUDA S. Avaliação da qualidade do leite na base leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. *Rev Bras Zootec* 2004; 33:1531-1543.

GROSCLAUDE, F., M.F. MAHÉ, y B. RIBADEAU-DUMAS. 1973. Structure primaire de la caseine alpha s1-et de la caseine beta bovine. *Eur. J. Biochem.* 40:323-324.

GROSCLAUDE, F., M.F. MAHÉ, J.C. MERCIER, J. BONNEMAIRE, y J.H. TEISSIER. 1976. Polymorphisme des lactoprotéines de bovines Napalis. Polymorphisme des caseine alpha s2 mineurs. *Ann. Genet. Sel. Evol.* 8:461-479.

GROSCLAUDE, F., M.F. MAHÉ, y J.P. ACCOLAS. 1982. Note sur le polymorphisme génétique des lactoprotéines de bovins et de yaks Mongols. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 14: 545-550.

GROSCLAUDE, F. 1988 : Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relations avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait. *INRA Prod. Anim.* 1(1) : 5-17.

HALEY, C. S. 1995. Livestock QTLs-bringing home the bacon. *TIG.* 11(12): 488 - 492.

HAYES, M. CARRICK, P. BOWMAN, AND M. E. GODDARD. 2005. Genotype Environment Interaction for Milk Production of Daughters of Australian Dairy Sires from Test-Day Records B. J. *J. Dairy Sci.* 86:3736–3744

HERNÁNDEZ, 2005. Efecto de la época del año sobre el comportamiento de la producción y la composición de la leche en tres genotipos bajo silvopastoreo Departamento de Lactación, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)

HOAGLAND, P.D., J.J. UNRUH, E.D. WICKHAM, y H.M. FARRELL Jr. 2001. Secondary structure of bovine alpha s2 casein: Theoretical and experimental approaches. *J. Dairy Sci.* 84:1944-1949.

IKONEN, T., OJALA, M., and RUOTTINEN, O. 2000. Associations Between Milk Protein Polymorphism and First Lactation Milk Production Traits in Finnish Ayrshire Cows. 1999 *J Dairy Sci* 82:1026–1033

IKONEN T., BOVENHUIS H., OJALA M., RUOTTINEN O., GEORGES M. 2001 Associations between casein haplotypes and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire Cows. *Journal of Dairy Science.* 84: 507-514

IKONEN, T., MORRI, S., TYRISEVA., O. RUOTTINEN., M. OJALA. 2004. Genetic and Phenotypic Correlations Between Milk Coagulation Properties, Milk Production Traits, Somatic Cell Count, Casein Content, and pH of Milk. *J. Dairy Sci.* 87:458–467

JIMENEZ, A. 2007. Vaquerías de la CPA Cuba Nueva. Disponible en : <http://www.centrovision.cu/Enmarcha/masleche040907.htm> .

JOLLES, J.C. ALAIS Y P. JOLLES. 1968. The tryptic peptide with rennin-sensitive linkage of cow's kappa casein. *Biochem. Biophys. Acta* 168:591-593.

KAMIŃSKI S., 2000. Association between polymorphism within regulatory and coding fragments of bovine kappa-casein gene and milk performance traits. *J. of Animal and Feed Sci.* 9, 435-446.

KAMINSKI S.; 1993. Identyfikacja genotype kappa-kazeiny u buhajow przy uzyciu metody PCR-RFLP (PCR-RFLP Identification of Kappa-casein genotype in bulls). Tesis de doctorado, Universidad de Agricultura, Olsztyn.

KASTONINA OV, KHRIPIAKOV EN, STRIKOZOV NI, ZINOVEVA NA. 2004. Effects differences genotype kappa-casein, Beta-lactoglobulin and alpha-lactoalbumin on technological effects of milk. *4th conference problems biotechnology in farm animal*. VIJ Dobrovitsy. Russia. 24-25 November. 54-60.

KEMEMES P.A., L.C.A. REGINATO, A.J.M. ROSA, I.V. PARKER, G.A. RAZOOK, L.A. FIGUEREIDO, N.A. SILVA, M.A.L. ETCHEGARAY, L.L. COUTINHO. 1999. κ -casein, β Lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzera, Camcu, Charolais, Canchin an Santa Gertrudis cattle. *Genet. Mol. Biol.* 22: 539-541.

KONOVALOVA E.N, SELTCOV V.I, ZINOVEVA N.A. 2004. Polymorphism gene kappa casein and its effects on production traits cows Simmental breeds. *4th conference problems biotechnology in farm animal*. Dobrovitsy Russia. 24-25. November. 49-54.

LARA M.A.C, L.T. GAMA, G. BUFARAH, J.R.B. SERENO, E.M.L. CELEGATO, U.P. DE ABREU. 2002. Genetic polymorphism at the κ -casein locus in Panteneiro cattle. *Arch. Zootec.* 51: 99-105.

LIN, C.Y., A.J. MCALLISTER, K.F. NG-KWAI-HANG, J.F. HAYES. 1986. Effects of milk protein loci on first lactation production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 69: 704 - 712.

LIRON, J. P; RIPOLI, M. V ; DE LUCA, J. C ; PERAL-GARCÍA, P.: GIOVAMBATTISTA, G. 2002 Analysis of genetic diversity and population structure

in Argentine and Bolivian Creole cattle using five loci related to milk production. *Genet Mol Biol Sao Paulo*. 24 (4): 413-419.

LOOPER M, STOKES S, WALDNER D. 2001. Managing milk composition: evaluating herd potential. New Mexico State University. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/www.cahe.nmsu.edu>)

LÓPEZ BENAVIDES, M. 1998. Correlación entre la constitución genética kappa-caseína y características de producción en vacas Holstein de primer parto en la sabana Bogotá. *Primer Simposio de Investigación en la Universidad de la Salle. Noviembre, 1998*. Colombia.

LÓPEZ E. 2004. Determinación del sexo y genotipificación del gen de la κ -caseína en embriones bovinos *Rev. Col Cienc Pec* Vol. 17:3,

LUNDEN A., NILSSON M., JANSON L., 1997. Marked effect of beta lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. *Journal of Dairy Science*. 80, 2996-3005

MAMANI, J.C. 2007. Comportamiento de los índices de calidad de leche en la Sub Cuenca I. Majes - Arequipa - Perú 2007. Disponible en: www.portalechero.com

MARTÍNEZ, J. F., SÁNCHEZ C. 2007. Factores nutricionales que afectan a la composición de la leche. Disponible en: www.Engormix.com

MARZIALI A.S, NG-KWAI-HANG K.F. 1986. Effects of milk composition and genetic polymorphism on cheese composition. *J Dairy Sci*. 69: 2533-2542.

MCGEE, H (2004), *On Food and Cooking (Revised Edition)*, Scribner.

MCLEAN, DM,E.R.B. GRAHAM, R.W. PONZONI y H.A. MCKENZIE. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J. Dairy Sci*. 73: 2647 - 2656.

MEDRANO, J.F.; AGUILAR-CÓRDOVA, E.1990. Polymerase chain reaction amplification of bovine bLg genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Anim. Biotech*. 1(1): 73-77.

MEDRANO, J.F. 1992: Mejoramiento de la calidad de la leche. *Mundo Ganadero*. 3(12): 25-30.

MERCIER, J.F., F. GROSCLAUDE, y B. RIBADEAU –DUMAS. 1971. Structure primaire de la caseína alpha s1 bovine. Sequence complete. *Eur. J. Biochem.* 23: 41-51.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, MADR. Resolución 000012 de enero de 2007.

MIRANDA, J., BENEZRA, M., COLMENARES, O. 2002 Efecto de la suplementación estratégica con germen de maíz sobre la producción de leche y reproducción de vacas de doble propósito. *Zootecnia Trop.*, 20(1):31-47. 2002

MORALES S., M. 1999. Factores que afectan la composición de la leche. *TECNO VET*: Año 5 N°1, marzo.

NARANJO J, POSSO A, CÁRDENAS H, MUÑOZ F. Detección de variantes alélicas de la kappa-caseína en bovinos Hartón del Valle. 2000. Universidad Nacional de Colombia.

NEELIN, J.M. 1964. Variants of kappa casein revealed by improved starch gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 47:506-509.

NG-KWAI-HANG, K.F; L F. MAYES, J. E. MOXLEY y G. MONARDES. 1984. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat and protein in production by dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 67(4) : 835 - 840.

NG-KWAI-HANG, K.F., H.G. MONARDES, J.F. HAYES. 1990. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations. *J. Dairy Sci.* 73: 3414 - 3420.

OCHOA, P. 1991. Mejoramiento genético del ganado bovino productor de leche. *Ciencia veterinaria vol. 5-1991*.

ORITA, M; SUZUKI, Y; SEKIYA, T; HAYASHI, K. 1989 Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the Polymerase Chain Reaction. *Genomics* 5:874-879.

OSTA R. 1994. Caracterización genética de proteínas lácteas y sexaje de embriones en ganado vacuno mediante la aplicación de la biotecnología al análisis del DNA. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España

PÁEZ, L., LÓPEZ, N., SALAS, K., SPALDILERO, A., VERDE, O. 2002 Características físico-químicas de la leche cruda en las zonas de Aroa y Yaracal, Venezuela. *RC v.12 n.2 Maracibo abr. 2002.*

PECIULAITIENE N, MISEIKIENE R, BALTRENAITE L, MICEIKIENE I. 2007. Genetic differences among native and modern cattle breeds in Lithuania based on milk protein loci polymorphism. *Genetika*. Jan; 43(1):88-95

PÉREZ L, ANRIQUE R, GONZALEZ H. 2007. Factores no genéticos que afectan la producción y composición de la leche en un rebaño de pariciones biestacionales en la decima región de los lagos, Chile. *Agricultura técnica* 67 . 1: 39-48.

PINTO, M., RUBILAR, A., CARRASCO, E., AHHEN K., BRITO, C., MOLINA, M. 1998. Efecto estacional y del area geográfica en la composición de ácidos grasos en la leche de bovinos. *Agro sur vol.30 no.2 Valdivia July 2002.*

POSTIGLIONI, A., G. RINCÓN, L. KELLY, S. LLAMBÍ, G. FERNÁNDEZ, M. D'ANGELO, G. GAGLIARDI, J. TRUJILLO1, M. DE BETHENCOURT1, K. GUEVARA, A. CASTELLANO2 Y M.V. ARRUGA. 2002. Biodiversidad genética en bovinos criollos del Uruguay. Análisis con marcadores moleculares. *Arch. Zootec. 51: 195-202.*

POLI, M. A. Y ANTONIONI, G. 1991. Genetic structure of milk proteins in Argentinian Holstein and Argentinian Creole cattle. *Hereditas* 115:177-182.

RAMÍREZ, R.; BRAVO, H. 1999. Evaluación de la calidad físico química de la leche cruda proveniente de cuatro municipios del estado Portuguesa en tres épocas del año. IV Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. Memorias. 17-21 de Mayo de 1999. Maracaibo. Edo. Zulia. Venezuela. 1999.

RAZZ, R., CLAVERO, T. 2007. Efecto de la suplementación con concentrado sobre la composición química de la leche en vacas doble propósito pastoreando *panicum máximum - leucaena leucocephala*. *Rev. Cient. (Maracaibo)* v.17 n.1 Maracaibo feb. 2007.

REAÑO A. 1993. Evaluación de tres suplementos de distinta concentración y degradabilidad proteica para bovinos en crecimiento con una dieta base de pasto fresco. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela, Maracay, 68 pp.

REDVET Rev. Electrón. Vet. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://www.redvet.es>

ROMONASOVA, E.G. 1999. Effect of genotypes and environment on milk traits and quality technology of milk Swiss breeds. *Ph.D. Thesis*. Dobrovitsy, Russia.

RON, M., O. YOFFE, E. EZRA, J.F. MEDRANO, J.I. WELLER. 1994. Determination of effects of milk protein genotype on production traits of Israeli Holsteins. *J. Dairy Sci.* 77: 1106 - 1113.

RUVALCABA, 1994. Bioquímica de la leche. Libro resumen del 1^{er} Curso-Taller "Higiene y tecnología de la leche". Universidad de Guadalajara. México.

SABOUR, M.P., C.Y. LIN, A.J. LEE, A.J. MCALLISTER. 1996. Association between milk protein genetic variants and genetic values of Canadian Holstein bulls for milk yield traits. *J. Dairy Sci.* 79: 1050 - 1056.

SAMBROOK, J; RUSSELL, D. 1991 *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SÁNCHEZ, A.; MEDRANO, J.F. 1994: Marcadores moleculares en sanidad y producción animal. *Veterinaria*. 144: 20-31

SOLLER, M. 1990. Genetic mapping of the bovine genomic using deoxyribonucleic acid-level markers to identify loci affecting quantitative traits of economic importance. *J. Dairy Sci.* 73: 2628-2646.

STRZALKOWSKA N., KRZYZEWSKI J., ZWIERZCHOWSKI L., RYNIOWICZ Z. 2002. Effects of kappa casein and beta lactoglobulin loci polymorphism, cows' age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield and milk composition in Polish black and white cattle. *Animal Science Papers and Reports* vol 20 1: 21-35

SULIMOVA GE, ABANI AZARI M, ROSTAMZADEH J, MOHAMMAD ABANI MR, LAZEBNYĀ OE. 2006. Allelic polymorphism of kappa-casein gene (CSN3) in Russian cattle breeds and its informative value as a genetic marker. *J Dairy Sci.* Aug; 89(8):3164-74

SWAISGOOD H.E. 1992. Chemistry of the caseins. Pag. 63-110 in *Advanced Dairy Chemistry I: Proteins*. P.F. FOX, ed. Elsevier Applied Science, New York, NY.

TAMBASCO M.D. 1998. Detecao de polymorphism dos genes de κ -casina, β -lactoglobulina em animais da raza Jersey. Monografia: Universidad Federal de Sao Carlos. S.P.

THUỶ, L MINH Q. 2005. Polymorphisms of kappa casein gene (KCN) and the correlation with productivity and quality of cow milk. *Công nghệ sinh học* Vol 3. No 2. -p. 169-174

THOMPSON, M.P., y H.M. FARRELL, Jr. 1974. Genetic variants of the milk proteins. Pag. 109-134 in *Lactation*, vol. III. B.L. Larson y V.R. SMITH, ed. Academic Press, New York, NY.

TSIARAS, G. G. BARGOULI, G. BANOS, AND C. M. BOSCO. 2005. Effect of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin Loci on Milk Production Traits and Reproductive Performance of Holstein Cows *J. Dairy Sci.* 88:327–334

UFFO, O; MARTÍNEZ S. Amplificación por PCR de los genes que codifican para la α -lactoalbúmina, la β -lactoglobulina y la κ -caseína de una vaca alta productora de leche y dos de sus descendientes e identificación de las variantes alélicas por RFLP. 2004. Grupo Biología Molecular, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: uffo@censa.edu.cu

UFFO, O; BURRIEL M, MARTINEZ S, RONDA R, OSTA R, RODELLAR C, ZARAGOZA P. 2006 Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas *AGRI* 2006, 39: 15-24

VAN EENENNAAM, A.L.; MEDRANO, J.F. 1991 Differences in allelic protein expression in milk of heterozygous K-casein cows. *J. Dairy Sci.* 74: 1491-1496.

VELI, E. RIVAS, E. RIVAS, V. VERASTEGUI M. Evaluación de la variabilidad de genes de kappa caseína en poblaciones de bovinos criollos de Ticllos y Huaschao, región ancash 2006. Santiago Pastor Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) dnirrgg@inia.gob.pe

VIANA, J. L.; FERNÁNDEZ, A.; IGLESIAS, A.; SÁNCHEZ, L.; BECERRA, J. 2001. Análisis de los genotipos mas frecuentes de la kappa caseína en la raza vacuna rubia gallega mediante PCR/RFLPs. *Archivos de Zootecnia* 50:91-96.

VILLOCH A, MARTÍNEZ E, RIVERO R, RIOS I, GARCÍA L Y PONCE P. 1991. Influencia de diferentes condiciones de alimentación sobre la producción y la composición de la leche. *Revista de Salud Animal*: 48-55.

VLAIC, A., CIOBANU, D., OROIAN, T. Preliminary Research Concerning the Association Between the Genotypes at the Kappa-Caseine Locus and Milk Production Traits in Cattle. University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca

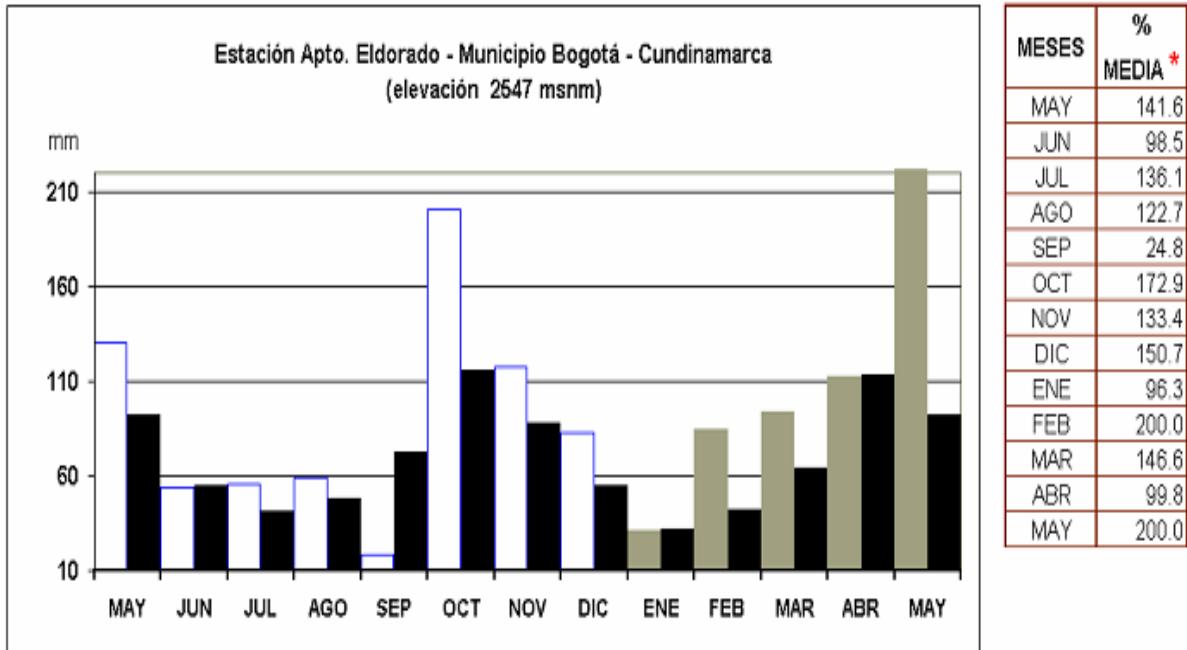
WALSTRA, P.; GEURTS, T; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M. 2000. Ciencia de la leche y Tecnología de los productos lácteos. Editorial Acribia, S.A., España.

WOYCHIK, J.H. 1964. Polymorphism in kappa casein of cow's milk. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 16:267-271.

ZWIAUER, D. 1980. Beziehungen zwischen biochemischen Markergenen und Leistungseigenschaften beim Rind. *Fortschr Tierz Z?gsbiol* 2. Parey, Hamburgo Berlin.

12. ANEXOS

Anexo 1. Comportamiento de la precipitación en la sabana de Bogotá para el periodo entre mayo de 2007 y mayo de 2008*



Valores mayores del 100% indican precipitaciones por encima del valor promedio mensual.

Valores menores del 100% indican precipitaciones por debajo del valor promedio mensual

Valores de precipitación entre el 90% y el 110% se consideran normales.

* Según informe No. 160 "Condiciones meteorológicas en Colombia durante mayo de 2008 y proyecciones en el corto, mediano y largo plazo", del Instituto de Hidrología, Meteorología y estudios Ambientales IDEAM. Mayo 2008.

Anexo 2. Familias de medias hermanas conformadas

PADRE	HIJAS POR FINCA						Total
	Albania	Guasucá	Cuatrov	Argovia	Luisiana	Salitre	
LYSTEL CHICAGO	3	0	0	0	0	0	3
200H4059	3	0	0	0	0	0	3
29H6697	0	3	0	0	0	0	3
AEROLINE	3	3	3	2	5	5	21
SKYHAWK	6	0	2	0	0	1	9
TCET LYSTER	0	3	2	0	2	6	13
RUDOLPH	10	3	0	0	0	0	13
LEE	0	2	2	2	0	4	10
DUNCAN PROGRESS	0	5	0	0	0	0	5
COMESTAR OUTSIDE	5	9	10	0	7	8	39
SUMMERSHADE	9	1	2	0	0	5	17
WALLACE	0	0	0	2	0	0	2
TORO17	0	0	0	1	0	0	0
STORMATIC	0	0	0	4	0	0	4
PIPPEN	0	0	0	6	0	0	6
OSAMA 563	0	0	0	3	0	0	3
LOBITO	0	0	0	5	0	0	5
LHEROS	0	0	0	2	0	0	2
LEADER	0	0	0	5	0	0	5
LASSO	0	0	0	3	0	0	3
JUSTY	0	0	0	38	0	0	38
EDDIE	0	0	0	3	0	0	3
CHAMP	0	0	0	4	0	0	4
BOND	0	0	0	3	0	0	3
BASAR	0	0	0	4	0	0	4

Anexo 3. Alimento proporcionado a los individuos de la población seleccionada

ALIMENTO KG	% MS	DIA/KG/VACA	KG MS /VACA
SEMILLA ALGODÓN	89	1,2	1,04
MINERALES	98	0,2	0,21
BICARBONATO Na	98	0,04	0,04
LEVADURA LIQUIDA	16	12,0	1,91
MAIZ MOLIDO	89	4,9	4,35
FORRAJE BUFALO	89	2,0	1,81
CARBONATO Ca	98	0,11	0,11
PASTO CORTE KG	16	36,1	5,78
PASTO MEZCLA	16	11,1	1,78
SILO TRIGO	40	2,2	0,87
PASTOREO	16	4,0	0,64
		TOTAL	18,55

Anexo 4. Procedimiento GLM. Salidas de SAS

Variable: Grasa

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la Media	Valor de F	PR >f
Modelo	117	236.106094	2.018001	4.39	<.0001
Error	1774	815.190653	0.459521		
Total correcto	1891	1051.296747			

R- Cuadrado	Coef de var	Raiz MSE	GRASA Media
0.224586	19.17165	0.677880	3.535846

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	Valor de F	PR >f
CSN3	1	0.57297514	0.57297514	1.25	0.2643
FINCA	5	10.40453342	2.08090668	4.53	0.0004
PADRE	24	20.75462402	0.86477600	1.88	0.0060
No. DE LACTANCIA	5	10.74920226	2.14984045	4.68	0.0003
CLIMA	1	8.95633698	8.95633698	19.49	<.0001

Variable: Proteína

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la Media	Valor de F	PR >f
Modelo	117	119.3989253	1.0205036	6.57	<.0001
Error	1774	275.3749421	0.1552283		
Total correcto	1891	394.7738674			

R- Cuadrado	Coef de var	Raiz MSE	PROTEINA Media
0.302449	12.45615	0.393990	3.163018

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	Valor de F	PR >f
CSN3	1	2.73040463	2.73040463	17.59	<.0001
FINCA	5	7.00848995	1.40169799	9.03	<.0001
PADRE	24	13.09335670	0.54555653	3.51	<.0001
No. DE LACTANCIA	5	5.33098147	1.06619629	6.87	<.0001
CLIMA	1	0.10828645	0.10828645	0.70	0.4037

Variable: Lactosa

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la Media	Valor de F	PR >f
Modelo	117	43.7000444	0.3735047	4.95	<.0001
Error	1774	133.7771304	0.0754099		
Total correcto	1891	177.4771748			

R- Cuadrado	Coef de var	Raiz MSE	LACTOSA Media
0.246229	5.827225	0.274609	4.712511

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	Valor de F	PR >f
CSN3	1	0.09399909	0.09399909	1.25	0.2644
FINCA	5	1.45774184	0.29154837	3.87	0.0017
PADRE	24	10.58700157	0.44112507	5.85	<.0001

No. DE LACTANCIA	5	0.43526391	0.08705278	1.15	0.3295
CLIMA	1	0.96392915	0.96392915	12.78	0.0004

Variable: Sólidos Totales (ST)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la Media	Valor de F	PR >f
Modelo	117	742.790055	6.348633	8.49	<.0001
Error	1774	1326.287242	0.747625		
Total correcto	1891	2069.077297			

R- Cuadrado	Coef de var	Raiz MSE	ST Media
0.358996	7.123746	0.864653	12.13762

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	Valor de F	PR >f
CSN3	1	8.35324035	8.35324035	11.17	0.0008
FINCA	5	0.0008	7.30957104	9.78	<.0001
PADRE	24	71.08244467	2.96176853	3.96	<.0001
No. DE LACTANCIA	5	35.70180756	7.14036151	9.55	<.0001
CLIMA	1	11.11676235	11.11676235	14.87	0.0001

Variable. Sólidos No Grasos (SNG)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la Media	Valor de F	PR >f
Modelo	117	204.5568627	1.7483493	11.27	<.0001
Error	1774	275.1073764	0.1550774		
Total correcto	1891	479.6642391			

R- Cuadrado	Coef de var	Raiz MSE	SNG Media
0.426458	4.583385	0.393799	8.591876

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	Valor de F	PR >f
CSN3	1	3.93394550	3.93394550	25.37	<.0001
FINCA	5	8.24735819	1.64947164	10.64	<.0001
PADRE	24	30.65263312	1.27719305	8.24	<.0001
No. DE LACTANCIA	5	7.01001597	1.40200319	9.04	<.0001
CLIMA	1	0.24703846	0.24703846	1.59	0.2071