

Plataforma Producción Preadial

PROYECTO EVALUACIÓN PRODUCTIVA HOMOLOGADA DE GENOTIPOS LECHEROS DEL REBAÑO NACIONAL MEDIANTE EL USO DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS

Código: M3P3

Fuente de Financiamiento: Fundación para Innovación Agraria (FIA)

Región o Regiones de Ejecución: La Araucanía, Los Ríos y Los Lagos.

Agente Ejecutor: Instituto de Investigaciones Agropecuaria (INIA)

Coordinador del Proyecto: Andrés Carvajal R.

Costos (en pesos): \$5.650.000

I. RESUMEN EJECUTIVO

El objetivo de este proyecto fue sentar las bases para implementar un servicio de información genética basada en la identificación de alelos de genes favorables (estimación del mérito o potencial genético) para mejorar la producción y calidad de la leche en Chile. Para esto fueron seleccionados varios marcadores moleculares que han sido reportados por estar asociados a características o rasgos de interés productivo como rendimiento y mejor composición de leche. Los marcadores seleccionados fueron: K232A (DGAT1), C(-963)T (leptina), T945M (receptor de leptina) y K468R (butirofilina).

En primer lugar se colectaron muestras de sangre de animales de un predio PABCO y posterior a la purificación del ADN, se realizaron ensayos de biología molecular basados en la técnica de PCR-RFLP para la genotipificación de los marcadores. A continuación y teniendo acceso a los datos de control lechero oficial, se realizaron análisis de asociación entre los genotipos obtenidos y los parámetros de producción y calidad de leche utilizando modelos lineales mixtos. Los resultados mostraron una asociación significativa de los marcadores para DGAT1 y receptor de leptina, con el volumen de producción de leche y con el rendimiento y porcentaje de grasa y proteína en leche, y se pudo determinar el efecto de sustitución alélica en dicho efecto.

El éxito de este sistema de información genética basado en polimorfismos de ADN está condicionado, y es complementario, al desarrollo de un programa de mejoramiento genético convencional que incluya el mejoramiento y ampliación de cobertura de los sistemas de registro y control lechero. Estas medidas, creemos, impulsarán en parte la competitividad del sector lácteo en los mercados nacionales e internacionales.

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES GENERALES

Con el desarrollo acelerado de la biología molecular y la bioinformática, las tecnologías de la información genética han tenido un gran impulso durante los últimos años. La utilización de marcadores de ADN ha permitido construir mapas genómicos de la mayoría de las especies animales y vegetales de importancia económica (Liu, 1998). Un marcador molecular se refiere a un polimorfismo o variación del ADN relacionado con una característica fenotípica en particular, que puede ser detectado a través de diversas técnicas de la biología molecular. Estos marcadores segregan de forma mendeliana, no son afectados por el medio ambiente, son abundantes y se pueden detectar en cualquier tejido y edad fisiológica (Liu, 1998; Dekkers and Hospital, 2002). A través del estudio de su segregación meiótica es posible establecer su posición relativa dentro los cromosomas de un genoma, conformando así verdaderos mapas. Una vez establecida la asociación entre un gen que regula un determinado fenotipo y un marcador de ADN, este último se puede utilizar para monitorear la segregación del gen. Esto tiene un gran potencial de aplicación especialmente en el manejo y mejoramiento genético de especies domésticas como el bovino. La detección precoz de la presencia de alelos

favorables o deletéreos facilita la elección de progenitores, disminuyendo el número de individuos que son sometidos a costosas pruebas de progenies. Además, los marcadores moleculares pueden ser de mucha utilidad cuando se trata de seleccionar para características difíciles de evaluar (Dekkers and Hospital, 2002).

La asociación entre marcador(es) molecular(es) y un determinado fenotipo depende de si este último corresponde a un carácter de herencia simple (mendeliano) o complejo (cuantitativo). En el caso del bovino, se han documentado más 350 características que ha sido caracterizadas genéticamente (base de datos de la Universidad de Sidney, Australia, OMIA 2003), correspondiendo 56 de ellas a genes simples y donde 27 han sido asociados a mutaciones de ADN. Para el caso de la características productivas de la leche (todas clasificadas como caracteres cuantitativos), como rendimiento, porcentaje de proteína y grasa y contenido de células somáticas, se han identificado las regiones dentro del genoma que más aportan a la expresión de estos caracteres, conocidos como QTLs (Khatkar *et al*, 2004). La utilización de marcadores moleculares para predecir la expresión de este tipo de características todavía es limitada, debido a que los marcadores existentes presentan altos grados de recombinación con los genes contenidos dentro las regiones de los QTLs (Dekkers, 2004). Sin embargo, la confección de mapas más saturados en marcadores y la identificación de marcadores más estrechamente ligados a los genes responsables de estos QTLs está cambiando esta situación (Dekkers, 2004; Ihara *et al*, 2004; Everts-van der Wind *et al*, 2005; Snelling *et al*, 2007; Cole *et al*, 2009; Zimin *et al*, 2009).

Las tecnologías de análisis de ADN de última generación han permitido la secuenciación de genomas de numerosos microorganismos y de varias especies de plantas y animales, incluyendo el genoma humano y bovino (NCBI, Genomic Biology). La secuenciación del borrador del genoma bovino que fue completada recientemente a mediados del 2004 (y la obtención del genoma completo en 2008), facilitará la identificación de los genes y/o marcadores asociados a las características de importancia en la producción de leche. Esto junto al estudio de la expresión de genes a través de experimentos de hibridación de ARNm y todas las áreas de la genómica bovina, potenciarán los estudios genéticos y se espera que estos generen herramientas de información genética aplicables a nivel de predios.

Hasta ahora, en el ámbito nacional ha existido un uso muy limitado de marcadores moleculares para obtener información genética en bovinos. Esto se ha limitado en una baja escala a la identificación de alelos del gen de *k*-caseína en ganado lechero (Felmer y Butendieck, 1998) y la implementación de un sistema de identificación y trazabilidad molecular en ganado de carne (Proyecto Corfo FDI 03C9AT-01; Felmer *et al*, 2008). Una gran limitación es el hecho que a pesar que existe un sistema de información que recaba las características fenotípicas (productivas) y genealógicas de los planteles lecheros, éste no es de carácter nacional ni independiente, y sólo abarca aprox. el 20% del rebaño productivo. Esto, en el futuro, podría ser abordado con la implementación del nuevo sistema de trazabilidad bovina del Servicio Agrícola y Ganadero. Otra limitación es la baja utilización de la inseminación artificial (IA), que no alcanza al 20% de nuestro ganado lechero, la cual se realiza utilizando en parte semen nacional, sin respaldo

alguno de su potencial mejorador en el rebaño. Por otro lado, el uso de semen importado si bien es cierto respaldado por programas de prueba de reproductores, estas evaluaciones no son directamente aplicables al rebaño nacional debido al efecto no evaluado de las condiciones ambientales y de manejo utilizadas en nuestro país.

La inseminación artificial junto a otras biotecnologías de reproducción, pueden mejorar notablemente la genética de nuestros plantales. Si junto a esto se desarrollan e introducen herramientas de información genética basadas en el uso de marcadores moleculares, los resultados en el mejoramiento se obtendrán más rápidos y, además, podrían constituirse en información indispensable para un adecuado manejo genético de los plantales lecheros. También, se generará información respecto al potencial genético de los animales respecto a parámetros de calidad y rendimiento.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Incorporar genética, biotecnología y bioinformática como herramientas de desarrollo tecnológico en la cadena láctea aplicadas al manejo productivo, reproductivo-sanitario y/o a la optimización de procesos a nivel industrial y de producción primaria.

Objetivos específicos

(I)- Generar una estrategia de incorporación de marcadores moleculares en la selección de reproductores bovinos para mejorar rendimiento y características de la leche, en los rebaños lecheros locales.

(II)- Avanzar en el diseño de un sistema de información genética basado en parámetros de genética cuantitativa y marcadores moleculares, accesible a los productores y empresas de servicio.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Descripción de la metodología utilizada.

- Identificación de marcadores moleculares asociados a características reproductivas del ganado lechero.

La identificación de marcadores moleculares asociados a características productivas de los bovinos de leche se realizó a través de una revisión bibliográfica que incluyó información de bases de datos públicas y por la información aportada mediante comunicación personal de investigadores líderes en el área (ejemplo, André Eggen y Vincent Ducrocq, INRA, Cedex, Francia). De una extensa lista de candidatos (por ejemplo, Ogorevc *et al*, 2009) se privilegió aquellos marcadores de mutaciones funcionales y en desequilibrio de ligamiento (LD), escogiendo 9 marcadores del tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism; Vignal *et al*, 2002) reportados como asociados a producción de leche y porcentaje de proteína y grasa

en leche en bovinos Holstein americano, Holstein New Zealand y Jersey, principalmente. Todos los SNPs correspondieron a polimorfismos en regiones codificantes o promotoras de genes de función conocida y relacionada a la fisiología de la glándula mamaria y/o producción de leche (ver Tabla 1).

- Estandarización de pruebas basadas en marcadores moleculares asociados a características productivas de la leche.

Se estandarizaron las condiciones de laboratorio (PCR, RFLP, electroforesis, y visualización de fragmentos de ADN) para identificar alelos favorables a características productivas y de calidad de la leche, basados en polimorfismos de ADN. La técnica de PCR-RFLP consiste en amplificar una región de ADN del bovino que contiene el marcador o polimorfismo (SNP) mediante la utilización de la enzima Taq polimerasa y partidores (primers), por lo que es necesario conocer la secuencia de la región a amplificar. Luego de obtenido el amplicón, el uso de enzimas de restricción que cortan el ADN en una región(es) específica, en este caso el sitio del polimorfismo, permite deducir el genotipo.

- Datos de producción y análisis de asociación.

Para el estudio se escogió un plantel de aprox. 430 bovinos lecheros de la comuna de Osorno, cuyos animales (vacas y vaquillas) contaban identificación única (DIIO), registro de genealogías y estaban bajo control oficial (PABCO A), esto con objeto de obtener la información mensual de parámetros de producción: producción de leche (Kg), porcentaje y rendimiento (Kg) de proteína y grasa en leche. Además, se tuvo acceso a la información de alimentación y suplementos de los animales según su nivel de producción de leche (baja y alta producción) y estado fisiológico (lactancia, secas). La asociación entre genotipos y datos productivos fue establecida utilizando modelos lineales mixtos para estimar el efecto del genotipo sobre los datos productivos considerando una serie de efectos fijos y aleatorios como número de lactancia, padre (considerando algunos genotipos), tipo de alimentación y ambiente.

Tabla 1. Marcadores moleculares tipo SNP seleccionados para la genotipificación de bovinos lecheros.

SNP	Gen	Referencias
K232A	DGAT1 (diacilglicerol acil-coA transferasa 1)	Banos <i>et al</i> , 2008; Demeter <i>et al</i> , 2009; Gautier <i>et al</i> , 2007, Grisart <i>et al</i> , 2004, Kaupe <i>et al</i> , 2007; Lacorte <i>et al</i> , 2006; Oikonomou <i>et al</i> , 2008; Ogorevc <i>et al</i> , 2009; Schennink <i>et al</i> , 2008; Sanders <i>et al</i> , 2008; Spelman <i>et al</i> , 2002; Szyda and Komisarek, 2007; Tupac-Yupanqui <i>et al</i> , 2004; Winter <i>et al</i> , 2002
T945M	LEPR (receptor de leptina)	Banos <i>et al</i> , 2008 Komisarek and Dorynek, 2006 Liefers <i>et al</i> , 2004 Szyda and Komisarek, 2007
C(-963)T	LEP (leptina)	Banos <i>et al</i> , 2008 Giblin <i>et al</i> , 2010 Komisarek and Antkowiak, 2007 Liefers <i>et al</i> , 2005 Ogorevc <i>et al</i> , 2009 Szyda and Komisarek, 2007
A80V		
R25C		
Y7F		
K468R	BTN1A1 (butirofilina)	Ogorevc <i>et al</i> , 2009 Szyda and Komisarek, 2007
F16Y		
P35Q		

4.2 Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.

- Extracción de ADN de vacas.

El ADN bovino fue obtenido a partir de sangre utilizando un protocolo de “salting out”. Brevemente, se obtuvo una muestra de sangre (aprox. 3 mL) mediante punción de la vena caudal utilizando un sistema venojet conteniendo anti-coagulante EDTA. Las muestras fueron mantenidas en hielo hasta su traslado al laboratorio donde fueron mantenidas a -20°C hasta su procesamiento. El ADN genómico fue obtenido a partir de 0,9 mL de sangre mediante lisis secuencial de glóbulos rojos y blancos utilizando el buffer 1 (NH₄Cl 15,5 mM, NaHCO₃ 10 mM y Na₂EDTA 0,1 mM, pH 7,4) y buffer 2 (NaCl 75 mM, Na₂EDTA 25 mM, SDS 1%, pH 8,0 conteniendo proteinasa K 100 µg/mL), respectivamente, e incubando con la enzima a 65°C toda la noche. Luego, la muestra lisada se trató con NaCl 6 M (saturado) y CHCl₃ y el ADN fue

precipitado con isopropanol 100% por 10 min a -20°C. Finalmente el ADN fue lavado con etanol 70% y disuelto en H₂O ultrapura y mantenido a -20°C hasta su análisis. La concentración y pureza del ADN fue determinada mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm y electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en buffer TBE 0,5x y visualizados con las tinciones bromuro de etidio o GelRed bajo luz UV.

- Extracción de ADN de toros.

El ADN de toros fue extraído a partir de una muestra de semen contenida en pajuelas utilizadas para inseminación artificial obtenidas en el Centro de Inseminación Artificial (CIA) de la Universidad Austral de Chile (Valdivia) y Cooprinsem (Osorno). Brevemente, la pajuela fue descongelada y lavada con citrato de sodio 0,11 M y PBS 1x, y posteriormente con PBS sperm 1x. Luego, el pellet se resuspende en buffer PCR 1x sin Mg²⁺ y se lisa a 56°C por 2 h en buffer conteniendo SDS 2%, DTT 1M y proteinasa K 100 µg/mL. El ADN es precipitado a -20°C por 30 min con una mezcla de isopropanol 100% (1 vol) y KAc 5 M (1/10 vol) y luego lavado en etanol 70%. Finalmente, el ADN es disuelto en 50 µL de agua ultrapura y mantenido a -20°C hasta su análisis.

- Genotipificación de marcadores.

Los marcadores (SNP) fueron genotipados mediante PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) según las condiciones descritas en la tabla 2, utilizando primers específicos diseñados a partir de las secuencias génicas disponibles en la base de datos GenBank (accesiones AY065621, AJ580801, U50365 y Z93323 para DGAT1, LEPR, LEP y BTN1A1, respectivamente). Brevemente, la amplificación se realizó en un termociclador a partir de 20-50 ng de ADN en un volumen de 20 µL conteniendo 0,5 U Taq polimerasa, entre 0,3-1 µM primers, 0,2-0,25 mM dNTP's y 2-3 mM Mg²⁺ en buffer PCR 1x. Luego de la amplificación los productos fueron digeridos enzimáticamente a la temperatura óptima toda la noche. Finalmente, los fragmentos amplificados y digeridos fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2-3% en tampón TBE 0,5x y visualizados con bromuro de etidio o GelRed bajo luz UV.

Tabla 2. Condiciones para la genotipificación de los polimorfismos mediante PCR-RFLP.

	Primers	T° annealing (°C)	Tamaño del amplicon (bp)	Enzima restricción	Productos de digestión
	Forward: TGCCGCTTGCTCGTAGCTTTGGCC* Reverse: ACCTGGAGCTGGGTGAGGAACAGC	60	411	CfrI	AA: no cut GC: 205
	Forward: GCAACTACAGATGCTCTACTTTTGT* Reverse: CAGGGAAATTTCCCTCAAGTTTCAA	56	400	TaqI	T: 400 C: 375, 25
T	Forward: GTGATCAGAAAACACATACCATTTTATAAT Reverse: GCCTGGTTGTTTTGCTTTTAATAATTATCTT*	55	295	DraI	C: 295 T: 268, 27
	Forward: TGGAGCTCTATGGAAATGGG Reverse: ACCCTTTGGGTTTTCTGCTT	60	780	BsuRI	A: 371, 162... G: 338, 162...

- Análisis de asociación.

La asociación entre los distintos genotipos para cada polimorfismo y los datos productivos estandarizados de las 3 primeras lactancias fue analizada utilizando el programa estadístico R (versión 2.10.1), asumiendo un modelo lineal mixto que consideró efectos fijos y aleatorios ajustados por máxima probabilidad con un fondo genético infinitesimal. Así, fueron estimados los efectos fijos de cada polimorfismo, número de lactancia y padre (ajustados como efecto aleatorio) sobre los datos productivos, expresando los resultados como el efecto de la sustitución alélica según método de Falconer y Mackay (2001).

V. RESULTADOS

- Genotipificación de marcadores.

En primer lugar se estandarizaron los protocolos y métodos para la genotipificación de algunos de los marcadores seleccionados mediante PCR-RFLP. La figura 1 muestra geles de agarosa representativos de la extracción de muestras de ADN desde sangre de bovinos (A), y la genotipificación de los polimorfismos tipo SNPs para: DGAT1 (B), LEPR (C), LEP (D) y BTN1A1 (E). Se observa que para cada polimorfismo existe un patrón característico dependiendo del alelo o polimorfismo presente. De esta forma se pudieron genotipar estos 4 polimorfismos en aprox. 391 bovinos lecheros (además, de aprox. 30 toros padres). Una vez obtenidos los genotipos de los animales para estos polimorfismos se procedió a determinar algunos parámetros genéticos como las frecuencias genotípicas y alélicas para cada marcador (ver Tabla 3).

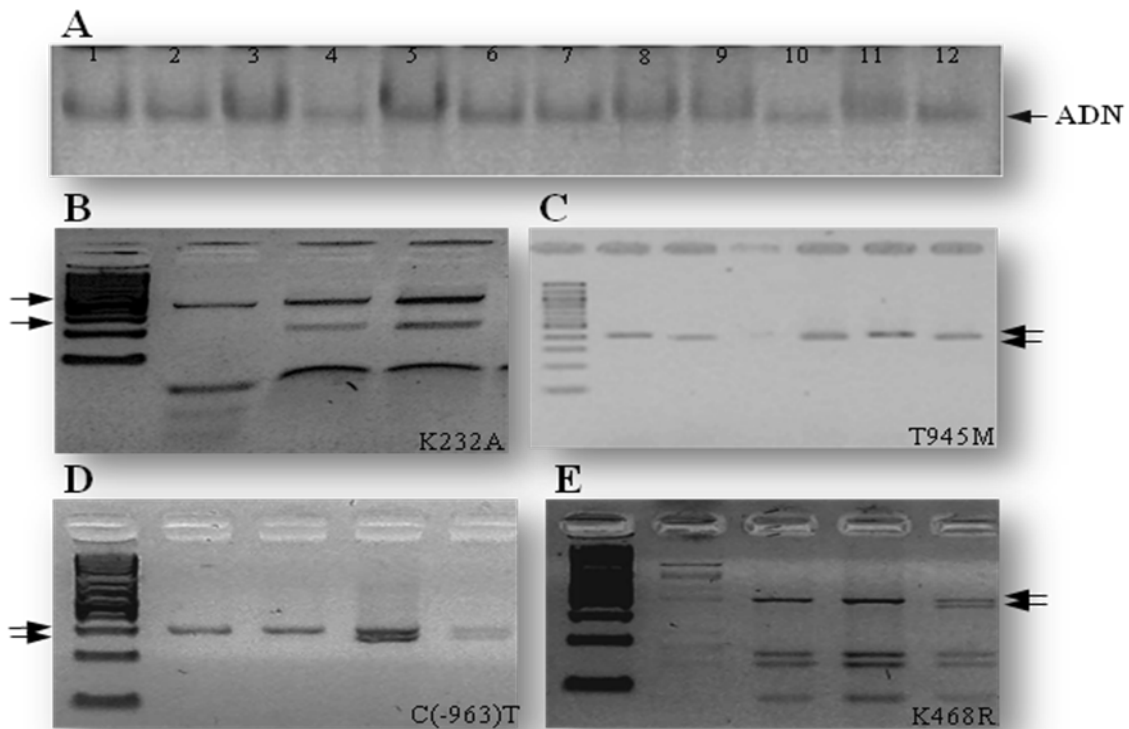


Figura 1. Visualización de ADN genómico y genotipificación de polimorfismos en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio bajo luz UV. A, extracción de ADN; B, C, D y E, PCR-RFLP para los polimorfismos de DGAT1 (K232A), LEPR (T945M), LEP (C(-963)T) y BTN1A1 (K468R), respectivamente. Las flechas señalan los tamaños de los amplicones esperados.

- Parámetros genéticos.

Del análisis de frecuencias se pudo observar que en la población animal evaluada, el marcador K232A para DGAT1 muestra mayoritariamente 2 formas alélicas, el homocigoto GC/GC y el heterocigoto GC/AA, mientras que el alelo AA/AA está muy poco representado (10,7%; ver Tabla 3). De esta forma, las frecuencias alélicas para GC y AA (también llamados alelos “q” y “Q”, según Grisart *et al*, 2002) fueron 0,68 y 0,32 respectivamente. Estos resultados son similares a las frecuencias reportadas en frisones españoles y bovinos Holstein en Brasil (Tupac-Yupanqui *et al*, 2004; Lacorte *et al*, 2006).

Respecto al marcador de LEPR (T945M), se observó que el alelo C fue mayoritariamente representado, con una frecuencia genotípica y alélica de 96 y 98%, respectivamente, mientras que el alelo T está pobremente representado tanto en su forma homocigota (0,5%) como heterocigota (3,1%), con una frecuencia alélica de sólo un 2% (ver Tabla 3). Estos resultados son similares a lo descrito en varios reportes (Liefers *et al*, 2004; Szyda and Komisarek, 2007; Banos *et al*, 2008; Giblin *et al*, 2010).

El marcador C(-963)T para leptina mostró una distribución de frecuencias similar a la de DGAT1, con una frecuencia genotípica de 40, 46,7 y 13,3% para las formas alélicas CC, CT y TT, respectivamente, y con una frecuencia alélica de 63 y 37% para los alelos C y T (ver Tabla 3). Estos resultados fueron similares a lo reportado por Banos *et al* (2002) en una población de bovinos Holstein del Reino Unido.

Por su parte, el marcador de butirofilina (K468R) mostró una frecuencia genotípica mayoritaria para la forma alélica AA (74%) y una menor distribución para las formas AG y GG (22 y 4%, respectivamente; ver Tabla 3). Estos resultados fueron similares a lo reportado por Szyda and Komisarek (2007).

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos.

SNP	Frecuencia genotípica (%)	Frecuencia alélica
K232A (DGAT1)	GC/GC = 46.0 GC/AA = 43.2 AA/AA = 10.7	GC = 0.68 AA = 0.32
T945M (LEPR)	CC = 96.4 CT = 3.1 TT = 0.5	C = 0.98 T = 0.02
C(-963)T (LEP)	CC = 40.0 CT = 46.7 TT = 13.3	C = 0.63 T = 0.37
K468R (BTN1A1)	AA = 73.9 AG = 22.3 GG = 3.8	A = 0.85 G = 0.15

- Análisis de Asociación.

La Tabla 4 muestra el efecto de sustitución alélica (α) para los polimorfismos K232A y T945M, los cuales mostraron un efecto significativo ($p < 0.05$). Para K232A (DGAT1) se observó que el efecto de sustitución para la variante alélica "Q" siguió un modelo aditivo tanto para producción de leche (-353 Kg) como para producción de grasa en leche (+3,47 Kg). Además, el efecto de sustitución fue significativo para el porcentaje de grasa y proteína (+0,3 y +0,08%, respectivamente) siguiendo también un modelo aditivo, mientras que para rendimiento de proteína siguió un modelo de dominancia. Estos efectos fueron en la dirección esperada según reportes en otras poblaciones animales (Grisart *et al.*, 2002, Spelman *et al.*, 2002, Thaller *et al.*, 2003; ver Tabla 5). En este sentido, numerosos estudios realizados en diferentes razas (entre ellas Holstein-Friesian y Jersey) han descrito que el alelo "Q" se asocia fuertemente a un aumento en la producción de grasa en leche y en menor grado a un mayor contenido de grasa y proteína en leche, mientras que el alelo "q" está asociado a un menor contenido de grasa en leche y una mayor producción de

leche (Grisart *et al*, 2002; Winter *et al*, 2002; Spelman *et al*, 2002; Thaller *et al*, 2003; Szyda and Komisarek, 2007; Gautier *et al*, 2007; Banos *et al*, 2008).

Para T945M (LEPR) la sustitución alélica tuvo efecto sobre la producción de leche (-518 Kg) y sobre el porcentaje de grasa y proteína (-0,14 y -0,13%, respectivamente), siguiendo en cada caso un modelo de sobredominancia, no encontrándose efectos significativos sobre el contenido de grasa y proteína en leche. El alelo T de este polimorfismo (muy poco representado en nuestro estudio) ha sido asociado a un menor contenido de grasa y proteína en leche, y un menor volumen de producción de leche (Komisarek and Dorynek, 2006; Szyda and Komisarek, 2007), aunque algunos reportes no muestran significancia para esta asociación (Banos *et al*, 2008; Giblin *et al*, 2010). Por otro lado, este polimorfismo ha sido asociado a los niveles circulantes de leptina (Liefers *et al*, 2004).

Para el marcador de leptina (C(-963)T) el análisis de asociación no encontró un efecto significativo de sustitución alélica sobre la producción de leche, concordando con lo reportado por Banos *et al* (2008) y Giblin *et al* (2010) en bovinos Holstein británicos. Sin embargo, se ha descrito que este polimorfismo tiene una asociación pequeña pero significativa con el volumen de producción de leche en una población de bovinos en Polonia (Szyda and Komisarek, 2007). Por otro lado, el polimorfismo tampoco reportó una asociación con rendimiento y porcentaje de grasa y proteína en leche ($p>0.05$). En este caso, Giblin *et al* (2010) si reportan una asociación con porcentaje de grasa y proteína.

Por último, para el marcador butirofilina (K468R) tampoco se encontró una asociación estadística entre los polimorfismos y las variables productivas evaluadas.

El efecto positivo del alelo “Q” sobre el contenido en grasa y proteína, y negativo sobre el volumen de leche, tiene importantes implicaciones económicas, y su selección o rechazo dependerá de la importancia económica relativa que los caracteres de cantidad y calidad de leche tengan en el sistema de producción y sistema de pagos de aplicación de estos genes. Así, por ejemplo, en Nueva Zelanda los pesos económicos de los caracteres de leche y sus componentes (sólidos totales) hace más rentable la selección de aquellos alelos que aumentan el contenido en grasa frente a aquellos que aumentan el contenido en proteína y volumen lechero (Spelman, 2002).

La mayor frecuencia del alelo “q” encontrada en este estudio puede ser consecuencia de la mayor importancia que la producción de leche ha tenido hasta ahora en los criterios de selección. Sin embargo, en el último tiempo se ha visto un mayor pago por sólidos en las plantas de recepción, lo que sugiere que una estrategia para aumentar los ingresos por este concepto sería aumentar las frecuencias alélicas de los marcadores evaluados utilizando animales portadores de aquellos alelos.

La incorporación del genotipo para DGAT1 y LEPR en los toros ofrecidos en catálogo, permitirá que en función de la estructura de costos-ingresos, el productor pueda elegir aquella opción que le proporcione mayores ventajas económicas.

Tabla 4. Efecto de sustitución alélica (α) para los polimorfismos de los marcadores K232A y T945M.

SNP	Efecto de sustitución alélica (α)*	α (% del promedio)
K232A (DGAT1)	-353 Kg milk yield ¹	5%
	+3.47 kg fat yield ¹	1%
	+0.30 % fat ¹	8%
	-8.28 kg prot yield ²	4%
	+0.08 % prot ¹	2%
T945M (LEPR)	-518 Kg milk yield ³	8%
	NS fat yield	
	-0.14 % fat ³	4%
	NS prot yield	
	-0.13 % prot ³	4%

* $\alpha = a + d(q-p)$, según Falconer y MacKay (2001)

** Similar a lo reportado por Grisart *et al* (2002), Tupac-Yupanqui *et al* (2004), Gautier *et al* (2007), Banos *et al* (2008).

1, Modelo aditivo; 2, Modelo de dominancia; 3, Modelo de sobredominancia; NS, no significativo.

Tabla 5. Comparación de los efectos reportados de la sustitución alélica (α) para el polimorfismo del marcador K232A (DGAT1).

Raza	Frecuencias genotípicas y alélicas	Efecto de sustitución alélica (α)*	Referencias
Chilean Frison (overo negro)	QQ = 10.7 Qq = 43.2 0.32 qq = 46.0 0.68	Q -353 Kg milk yield +3.5 kg fat yield q -8.3 kg prot yield	Our study, 2010
Dutch Holstein-Friesian		-158 Kg milk yield +5.2 Kg fat yield -2.8 Kg prot yield	Grisart <i>et al</i> , 2002
NZ Holstein	QQ = 38.2 Qq = 43.6 0.6	Q -134 Kg milk yield +5.8 Kg fat yield -2.5 Kg prot yield	Spelman <i>et al</i> , 2002

$$Qq = 18.2 \quad q$$

$$0.4$$

Jersey	$QQ = 79.2$ $Qq = 18.4$ 0.88 $qq = 2.4$ 0.12	Q q	-110Kg milk yield +3.3Kg fat yield -2.5 Kg prot yield	Spelman <i>et al</i> , 2002
Israeli Holstein			-309 Kg milk yield +7.8 kg fat yield -2.9 kg prot yield	Golik <i>et al</i> , 2002
Frison (Spain)	$QQ = 11.8$ $Qq = 58.1$ 0.4 $qq = 30.0$ 0.6	Q q	-312 Kg milk yield +8.0 kg fat yield -3,6 kg prot yield	Tupac-Yupanqui <i>et al</i> , 2004
Holstein (Brazil)	$QQ = 14.0$ $Qq = 26.0$ 0.27 $qq = 60.0$ 0.73	Q q		Lacorte <i>et al</i> , 2006
Holstein (Poland)	$QQ = 46$ $Qq = 27$ $qq = 28$		-107 Kg milk yield +5.4 Kg fat yield -1.6 Kg prot yield	Szyda and Komisarek, 2007
Holstein (France)	$QQ = 46.3$ $Qq = 45.3$ 0.63 $qq = 8.5$ 0.37	Q q	-351Kg milk yield +15 Kg fat yield -42 Kg prot yield	Gautier <i>et al</i> , 2007 (similar in Normande and Montbéliarde)
Holstein (Scotland)	$QQ = 25$ $Qq = 45$ 0.47 $qq = 30$ 0.53	Q q	-0.79 Kg milk yield	Banos <i>et al</i> , 2008

* $\alpha = a + d(q-p)$, Falconer and MacKay, 1996.

VI. IMPACTOS DEL PROYECTO:

Los principales aportes de este proyecto han sido dos: primero, generar información molecular que establece el potencial o mérito genético de bovinos lecheros para algunas características productivas como producción de leche, y contenido y porcentaje de grasa y proteína en leche, en las condiciones medioambientales y de manejo propias del sistema de producción de leche de la zona sur de Chile, que está basado principalmente en pastoreo y suplementación; y segundo, validar la metodología de análisis de asociación entre información de marcadores moleculares tipo SNPs y datos fenotípicos, la cual está siendo utilizada en varios países (ver documento "position paper").

En conjunto, esta información viene a sentar las bases para la incorporación de herramientas moleculares en programas de mejoramiento genético (por ejemplo, selección de reproductores), como está sucediendo en todos los países con un rubro lechero desarrollado. Sin embargo, para la utilización de esta información, es necesario tener un programa de evaluación genética nacional, estandarizado e independiente, con objeto de obtener registros de producción y genealógicos fiables.

El impacto de la información generada en el proyecto es:

1- Validar información genética (marcadores moleculares) utilizada en países desarrollados en rebaños lecheros bajo las condiciones medioambientales y de manejo que prevalecen en la zona sur de Chile, la cual concentra la mayor producción del país. Como indicador se ha estandarizado un protocolo para la genotipificación de 4 marcadores reportados en la literatura.

2- Identificar animales con potencial genético para la producción de un mayor volumen de leche, y con un contenido mayor de sólidos totales (proteínas y grasa). Se estableció la asociación de 2 marcadores con parámetros productivos. Esto tiene plena concordancia con la estrategia planteada por el sector lechero para desarrollar por los próximos 10 años: “Emplear ganado para nuevas exigencias y que produzca mayor contenido de sólidos meta” (Consorcio Lechero, 2010).

3- Sentar las bases para la implementación de un servicio de información genética basada en la identificación de animales con un potencial genético favorable para mejorar la producción y calidad de la leche en Chile.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES:

Conclusiones

- Se estableció una asociación significativa entre dos marcadores genéticos y características productivas en ganado de leche.
- Es posible identificar animales con potencial genético para una mayor producción de leche y mayor rendimiento y porcentaje de sólidos totales, en sistemas pastoriles con suplementación.
- En los animales evaluados la genética utilizada favorece una mayor producción de leche pero con menor contenido de sólidos totales.

El proyecto ha generado la capacidad de identificar el potencial productivo animal mediante el uso de información genética y/o molecular (marcadores genéticos). El uso de ésta herramienta permitiría evaluar el mérito genético del rebaño para mejorar las características productivas deseadas.

Recomendaciones

El logro del objetivo recién planteado se inserta en el contexto de un programa de desarrollo genético que incluya métodos cuantitativos para calcular el “valor genético animal” a partir de los registros productivos existentes (controles lecheros).

Es necesario difundir las potencialidades de la biotecnología y la manera en que puede apoyar el mejoramiento de características productivas del rebaño lechero (a productores y asesores). Además, es importante generar conciencia en productores y tomadores de decisión de la importancia de llevar a cabo un programa nacional que genere un índice de “valor genético animal” individual mediante el análisis de los registros productivos (controles lecheros), para ser usado en los programas de mejoramiento genético de características deseadas.

Otras áreas importantes a desarrollar son:

- Determinar características de calidad de leche (ej: perfil de ácidos grasos, CLA y proteínas) y establecer su asociación a factores genéticos y nutricionales.
- Avanzar en el uso de herramientas moleculares para la identificación y diagnóstico de patógenos asociados a las principales enfermedades del rebaño.

VIII. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Banos G, *et al.* (2008) “Impact of Single Nucleotide Polymorphisms in Leptin, Leptin Receptor, Growth Hormone Receptor, and Diacylglycerol Acyltransferase (DGAT1) gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows”. *J Dairy Sci.* 91: 3190-200.
- Cole JB, VanRaden PM, O’Connell JR, Van Tassell CP, Sonstegard TS, Schnabel RD, TaylorJF and Wiggans GR. (2009) “Distribution and location of genetic effects for dairy traits”. *J. Dairy Sci.* 92: 2931–46.
- Consorcio Lechero (2010) “Estrategia de desarrollo competitivo del sector lácteo chileno 2010-2020”.
- Dekkers JCM and Hospital F. (2002) “The use of molecular genetics in improvement of agricultural populations”. *Nat. Rev. Genet.* 3:22–32.
- Dekkers JCM. (2004) “Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons”. *J. Anim Sci.* 82: E313-28.
- Falconer DS y Mackay TFC. (2001) “Introducción a la Genética Cuantitativa”. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (España).
- Everts-van der Wind A, Larkin DM, Green CA, Elliott JS, Olmstead CA, Chiu R, Schein JE, *et al.* (2005) “A high-resolution whole-genome cattle–human comparative map reveals details of mammalian chromosome evolution”. *PNAS* 102(51): 18526–31.
- Felmer R. y Butendieck N. (1998) “Frecuencia alélica del gen de la k-caseína bovina en un rebaño Frisón Negro Chileno”. *Arch. Med. Vet.* 30(2):145-50.

- Gautier M, Capitan A, Fritz S, Eggen A, Boichard D and Druet T. (2007) "Characterization of the DGAT1 K232A and Variable Number of Tandem Repeat polymorphisms in French dairy cattle". *J Dairy Sci.* 90: 2980-8.
- Giblin L, Butler ST, Kearney BM, Waters SM, Callanan MJ and Berry DP. (2010) "Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in progeny tested Holstein-Friesian dairy cattle sires". *BMC Genetics* 11:73.
- Grisart B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Berzi P, *et al.* (2002) "Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition". *Genome Res.* 12: 222-31.
- Ihara N, Takasuga A, Mizoshita K, Takeda H, Sugimoto M, Mizoguchi Y, Hirano T, Itoh T, Watanabe T, Reed KM, Snelling WM, Kappes SM, *et al.* (2004) "A Comprehensive Genetic Map of the Cattle Genome Based on 3802 Microsatellites". *Genome Res.* 14:1987-98.
- Khatkar MS, Thomson PC, Tammen I and Raadsma HW. (2004) "Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis *Genet*". *Sel. Evol.* 36:163-90. (Ver página Web en URL http://www.vetsci.usyd.edu.au/reprogen/QTL_Map/)
- Komisarek J and Dorynek Z. (2006) "The relationship between the T945M single nucleotide polymorphism in the leptin receptor gene (LEPR) and milk production traits in Jersey cows". *Animal Science Papers and Reports* 24(4): 271-7.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). (Ver sección Genomic Biology en URL <http://www.ncbi.nih.gov/Genomes/>)
- Lacorte GA, Machado MA, Martinez ML, Campos AL, Maciel RP, Verneque RS, Teodoro RL, Peixoto MGCS, Carvalho MRS and Fonseca CG. (2006) "DGAT1 K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds". *Genetics and Molecular Research* 5(3): 475-82.
- Liefers SC, Veerkamp RF, te Pas MF, Delavaud C, Chilliard Y and van der Lende T. (2003) "Association of leptin gene polymorphisms with serum leptin concentration in dairy cows". *Mammalian Genome* 14: 657-63.
- Liefers SC, Veerkamp RF, te Pas MF, Delavaud C, Chilliard Y and van der Lende T. (2004) "A missense mutation in the bovine leptin receptor gene is associated with leptin concentrations during late pregnancy". *Anim Genetics* 35: 138-41.
- Liu BH. (1998) "Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis". CRC Press, Boca Ratón, Nueva York. ISBN: 0849331668. 611 pp.
- OMIA (ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN ANIMALS). (2006) Compiled by FW Nicholas. Reprogen, Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, NSW 2006, Australia. (URL: <http://www.angis.org.au/Databases/BIRX/omia/index.html>)

- Proyecto CORFO FDI 03C9AT-01. (2005) "Implementación de un Sistema de Trazabilidad Basado en Marcadores Moleculares, para mejorar la competitividad de Bovinos de Carne de Exportación".
- Spelman RJ. (2002) "Utilization of molecular information on dairy cattle breeding". 7th WCGALP. Montpellier (Francia). Comm. 22-02.
- Spelman RJ, Ford CA, McElhinney P, Gregory GC and Snell RG. (2002) "Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population". J Dairy Sci. 85: 3514-7.
- Snelling WM, Chiu R, Schein JE, Hobbs M, Abbey CA, Adelson DL, Aerts J, Bennett GL, Bosdet IE, Boussaha M, Brauning R, Caetano AR, Costa MM, Crawford AM, Dalrymple BP, Eggen A, *et al* (2007) "A physical map of the bovine genome". Genome Biology 8: R165.
- Szyda J and Komisarek J. (2007) "Statistical modeling of candidate gene effects on milk production traits in dairy cattle". J Dairy Sci. 90: 2971-9.
- Thaller G, Kramer A, Winter A, Kaupe B, Erhardt G and Fries R. (2003) "Effects of DGAT1 variantes on milk production traits in German cattle breeds". J Anim Sci. 81: 1911-8.
- Tupac-Yupanqui I, Baro JA y Dunner S. (2004) "Efecto del gen DGAT1 sobre la cantidad y composición de la leche en la raza bovina frisona española". Arch. Zootec. 53: 293-9.
- Winter A, Kramer W, Werner FAO, *et al*. (2002) "Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content". PNAS 99(14): 9300-5.
- Zimin AV, Delcher AL, Florea L, Kelley DR, Schatz MC, Puiu D, Hanrahan F, Pertea G, Van Tassell CP, Sonstegard TS, Marçais G, Roberts M, *et al* (2009) "A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos Taurus*". Genome Biology 10:R42.