

EFFECTO DEL GEN DGAT1 SOBRE LA CANTIDAD Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE EN LA RAZA BOVINA FRISONA ESPAÑOLA

EFFECTS OF DGAT1 ALLELES ON MILK AND COMPONENTS TRAITS IN SPANISH HOLSTEIN BREED

Tupac-Yupanqui¹, I., J.A. Baro² y S. Dunner¹

¹Laboratorio de Genética. Facultad de Veterinaria. 28040 Madrid. España. E-mail: dunner@vet.ucm.es

²Departamento de Producción Animal. ETSIA. Universidad de Valladolid. Palencia. España.

E-mail: baro@arrakis.es

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

DGAT1. Leche. Bovino. Holstein española.

ADDITIONAL KEYWORDS

DGAT1. Milk. Bovine. Spanish Holstein.

RESUMEN

El gen DGAT1, situado en la especie *Bos taurus* en el cromosoma 14, se ha asociado con caracteres de cantidad y calidad de leche. En este trabajo, realizado en la raza Frisona española desarrollamos un método de genotipado mediante electroforesis capilar con cebadores alelo-específicos de dos variantes de este gen que se producen por sustitución no sinónima de una *lisina* (variante Q) por una *alanina* (variante q) y estimamos su efecto sobre los caracteres de cantidad de leche y su contenido en grasa y proteína. Se genotiparon las hijas de tres sementales que resultaron heterocigotos para estas variantes alélicas con un tamaño de muestra por semental de 272, 173 y 54. La frecuencia global del alelo Q fue de un 40 p.100 y la de los genotipos QQ y Qq de un 12 y un 58 p.100 respectivamente. El efecto de sustitución de la variante *lisina* sobre cantidad de leche, y contenido de grasa y proteína fue, respectivamente de –312 litros, +8 kg de grasa y –3,6 kg de proteína. El genotipado para este gen permitirá la selección de la variante alélica que resulte de interés en función de la importancia económica que se

asigne a los caracteres de cantidad y calidad de leche.

SUMMARY

The DGAT1 gene, located at chromosome 14 in *Bos taurus*, is associated with milk yield and quality traits. This paper presents a method for capilar electrophoresis genotyping with allele-specific primers, and shows allelic effect estimates for two variants of this gene originating from non-synonymous substitution of *lysine* (Q allele) to *alanine* (q allele), on milk yield and fat and protein percentages.

Daughters from three heterozygote sires were genotyped (n= 272, 173, and 54 respectively) for the DGAT1 gene. The overall allele frequency for the Q allele was 40 percent and frequencies for genotypes QQ and Qq were 12 and 58 percent respectively. The substitution effects for the *lysine*-carrying Q allele on milk yield and fat and protein contents were –312 l, +8 kg, and –3,6 kg, respectively. We conclude that genotyping for the

DGAT1 gene may provide useful criteria for selection under a wide range of economic weights for yield and quality traits in milk production.

INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha señalado al gen DGAT1, que codifica la enzima diacilglicerol O-aciltransferasa, como el primer QTL obtenido mediante clonado posicional en una población de mamíferos (Coppieters *et al.*, 1998, Grisart *et al.*, 2002). Cataliza el paso final de la síntesis de triglicéridos y está localizado en el extremo centro-mérico del cromosoma bovino 14 (BTA14q).

En este gen se ha detectado una sustitución no sinónima en las posiciones nucleotídicas 10433 y 10434 en el exon 8, de dos nucleótidos AA por GC, causando un cambio de *lisina* a *alanina* en la posición 232 (K232A) (Grisart *et al.*, 2002; Winter *et al.*, 2002). La sustitución del residuo de *lisina*, hidrofílico y positivamente cargado, por un residuo de *alanina*, hidrofóbico y neutral, puede producir la alteración funcional de la enzima y ser la causa de las estimaciones obtenidas del efecto de este gen tanto sobre la producción lechera como sobre su composición.

Estudios previos (Grisart *et al.*, 2002; Golik *et al.*, 2002; Spelman, 2002, Thaller *et al.*, 2003) han estimado un efecto de la sustitución alélica A por K sobre la cantidad de leche y su composición.

En este trabajo hemos desarrollado un método de PCR alelo-específica visualizada por electroforesis capilar que permite discriminar los productos amplificados tanto por su tamaño como

por su fluorescencia con relativa facilidad y eficacia y, con el fin de estimar los efectos de sustitución génica en caracteres de cantidad y composición lechera, lo aplicamos a muestras de leche obtenidas a través del control lechero de vacas pertenecientes a 5 familias de medio-hermanas de la raza Frisona española.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL ANIMAL

Las muestras procedían de vacas de la raza Frisona, con lactaciones comenzadas entre 1998 y 2002, y pertenecientes a 5 familias de medio hermanas todas ellas en el control lechero de ASCOL (Asturiana de Control Lechero).

EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN fue extraído a partir de muestras de leche de vacas mediante métodos de fenol-cloroformo y precipitación con etanol después de eliminar la grasa por centrifugación.

GENOTIPADO

La reacción de PCR, que consistió en 35 ciclos de 94 °C, 55 °C, y 72 °C durante 40 segundos cada uno y una extensión final de 10 minutos a 72 °C, se realizó para un volumen final de 10 µl con 30 ng de ADN genómico. Se utilizó entre 0,1 y 0,4 pmol de cada uno de los 3 cebadores, 0,5 unidades de Taq polimerasa (Biotools); 1x buffer de reacción, 2,0 mM MgCl₂ y 0,3 µM de cada dNTP.

A partir de la secuencia depositada en GenBank n° AY065621, se diseñaron tres cebadores distintos, dos de

ellos alelo-específicos, cada uno de los cuales contiene en el extremo terminal 3' los nucleótidos correspondientes a cada una de las sustituciones, combinados con un solo *primer reverse* en una misma reacción.

Los productos amplificados fueron analizados mediante un secuenciador automático ABI PRISM® 3100 (Applied Biosystems), para lo que cada uno de los dos cebadores alelo-específicos fue marcado con un fluoróforo distinto [6'FAM (*K*) o PET (*A*)] en su extremo 5', permitiendo así la discriminación entre los alelos.

MODELOS GENÉTICOS

Los datos productivos se analizaron asumiendo herencia mixta con un fondo genético infinitesimal con efecto sobre la producción y un *locus* bi-alélico para el gen DGAT1, mediante un análisis en dos etapas:

a) *Análisis de los fenotipos*. Se aplicó el siguiente modelo mínimo-cuadrático a los 93221 registros productivos de la población total:

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{Rebaño-Año-Estacion}_i + \text{Parto-Edad}_j + \text{Semental}_k + e_{ijkl} \quad [1]$$

b) *Análisis de residuos*. A partir de los residuos obtenidos aplicando el modelo [1], se obtuvieron 499 residuos medios correspondientes a las hijas de los sementales heterocigotos que se analizaron con el modelo fijo siguiente:

$$\text{Residuo}_{ij} = \mu + \text{Genotipo}_i + e_{ij} \quad [2]$$

Los efectos aditivo (a) y dominante (d) se obtuvieron aplicando un contraste basado en la parametrización (μ

- a), ($\mu + d$) y ($\mu + a$) para los genotipos QQ, Qq y qq respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un fragmento de 175 pb, que permitió ser discriminado en función del color que mostró, según fuese el alelo *K* (Q) o *A* (q), diferenciándose inequívocamente los dos alelos (**figura 1**).

De los 5 sementales genotipados, 2 resultaron homocigotos para cada una de las alternativas alélicas y los otros 3 heterocigotos. Los resultados que se presentan corresponden a las 499 hijas de los 3 sementales heterocigotos para el DGAT1, con 173, 54 y 272 hijas para cada uno de ellos.

La frecuencia del alelo **Q** denominado *lisina* (K), que es el que se considera como ancestral, resultó inferior a la del alelo **q** denominado *alanina* (A), 0,401 vs 0,599 (**tabla I**), frecuencias bastante distanciadas de las que se han obtenido en otras poblaciones de Holstein. Así, por ejemplo, Spelman *et al.* (2002) describen una frecuencia del alelo *alanina* entre el 20-40 p.100 para la raza Holstein, mientras que en otras razas la frecuencia de este alelo se sitúa en valores más extremos, por ejemplo, un 12 p.100 para la raza Jersey y un 78 p.100 para la raza Ayrshire, y Thaller *et al.* (2003) encuentran una frecuencia de los genotipos QQ del 29 p.100 en Holstein Alemán y del 4 p.100 en Fleckvieh, aunque este dato debe contemplarse con precaución porque se basó en 138 hijas de un semental heterocigoto para este gen.

Los resultados presentados en la **tabla II** muestran, en primer lugar, un

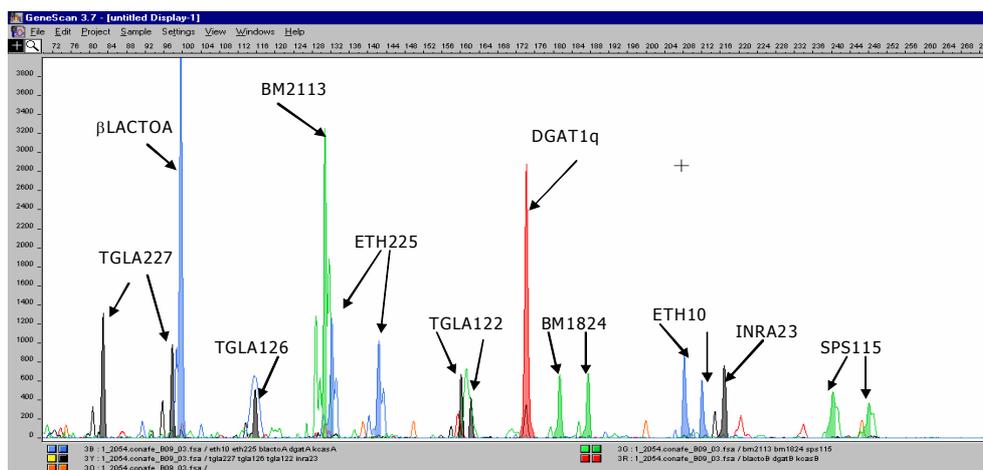


Figura 1. Genotipo correspondiente a un individuo del estudio para los 9 marcadores del panel de microsatélites recomendado por la ISAG y tres genes (β -lactoglobulina, κ -caseína y *DGAT1*). Este individuo es homocigoto para el alelo *q* del gen *DGAT1*. (Genotype of an individual of the study showing the nine microsatellite markers of the ISAG panel and three genes (β -lactoglobulin, κ -casein and *DGAT1*). This individual is homozygote for the *DGAT1* q allele).

efecto en el sentido esperado de acuerdo con los resultados de trabajos previos llevados a cabo en otras poblaciones (Grisart *et al.*, 2002, Spelman *et al.*, 2002, Thaller *et al.*, 2003), es decir, un efecto aditivo significativo de la variante alélica *lisina* tanto para la cantidad de leche producida (-312 kg), como para el contenido de grasa en la leche (+8 kg). Aunque en otros trabajos (Spelman, 2002; Thaller *et al.*, 2003) se observaron, junto a estos efectos, una significativa reducción del contenido proteico de la leche, nuestros resultados no permitieron obtener diferencias significativas para este carácter, a pesar de que la estimación puntual (-3,5 kg) tuvo el mismo signo que en los referidos trabajos. Este resultado es coherente con el conocimiento que se tiene del grado de asociación del gen *DGAT1* con el conte-

nido en grasa de la leche.

Aunque cuando se han llevado a cabo análisis para estos caracteres en diferentes lactaciones se observó que este efecto sobre leche y grasa se produce de una manera similar en todas las lactaciones (Thaller *et al.*, 2003), en nuestro caso las variables con las que trabajamos se ajustaron previamente para el efecto *número de lactación* por lo que nuestros resultados deben interpretarse como efectos globales sobre los caracteres, independientemente de la edad de la vaca.

Este efecto positivo del alelo *lisina* sobre el contenido en grasa 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 produc-

EFFECTO DEL GEN DGAT1 SOBRE CARACTERES LECHEROS

Tabla I. Distribución de las frecuencias genotípicas y génicas del gen DGAT1 dentro de 3 sementales de la raza Holstein y valores globales de estas frecuencias. (Genotypic and allelic frequency distributions of the DGAT1 gene within three Holstein sires and across sires frequency values).

	Semental			Global
	1	2	3	
QQ	13,3	14,8	10,3	11,8
Qq	56,7	48,2	61,0	58,1
qq	30,1	37,0	28,7	30,1
Q	41,6	38,8	40,8	40,1
q	58,4	61,2	59,2	59,9

Q= AA (lisina); q= GC (alanina).

ción y sistema de pagos de aplicación de estos genes. Así, por ejemplo, en Nueva Zelanda los pesos económicos de los caracteres de leche y componentes hace más rentable la selección de alelos que aumentan el contenido en grasa frente al que aumenta el contenido en proteína y volumen lechero (Spelman, 2002). Esta parece ser también la conclusión en el caso del gana-

do lechero en Alemania con las razas Fleckvieh y Holstein (Thaller *et al.*, 2003). Observando las diferencias en frecuencias génicas para este gen dentro de una misma raza parece lógico pensar que son fruto de los diferentes énfasis que en los distintos países, incluso regiones dentro de un país, se ponen en los caracteres lecheros a la hora de decidir los reproductores a utilizar. Estas diferencias se acentúan cuando se trata de razas diferentes que han podido ser utilizadas tradicionalmente para alguna característica lechera especial, véase por ejemplo las diferencias entre las razas Jersey y Ayrshire en las que el alelo que incrementa el contenido de grasa en la leche varía entre un 88 p.100 y un 22 p.100 respectivamente. La menor frecuencia del alelo *q* en nuestros resultados puede ser consecuencia de la mayor importancia que los caracteres de cantidad de leche y contenido proteico han tenido en los criterios de selección. En España, desde el año 2003, CONAFE ha incorporado el genotipo para este gen de los sementales que se incluyen en su catálogo, de tal manera que en función de la estructura de

Tabla II. Efecto de substitución del gen (α) calculado mediante la expresión $[a + d(q-p)]^1$. (Allele substitution effects (α) estimated from $[a + d(q-p)]^1$).

Carácter	Efecto aditivo		Efecto de dominancia	
	Estimación (E.S.)	P-valor	Estimación (E.S.)	P-valor
kg de leche	- 312,4 (73,5)	0,0003	112,42 (92,8)	0,2270
kg de grasa	8,04 (3,1)	0,0094	4,60 (3,89)	0,2375
kg de proteína	- 3,55 (2,22)	0,1100	4,45 (1,59)	0,1120

¹de acuerdo con Falconer y Mackay (2001) a y d son las estimaciones de los efectos aditivo y dominante, y q y p son las frecuencias de los alelos Q y q.

Tabla III. Comparación de los resultados obtenidos en nuestro estudio frente a los de otros autores con la raza Holstein. (Contrast between the results obtained in this study and those obtained by other authors in Holstein breed).

	Grisar ¹	Golik ²	Spelman ³	Thaller ⁴	Este trabajo	
					Aditivo	Dominancia
kg de leche	- 161,0	- 309,0	- 134	- 260 ⁵ a - 320	- 312,4*	+ 112,4
kg de grasa	+ 7,46	+ 7,8	+ 5,8	+7,6 a +10,7	+ 8,0*	+ 4,6
kg de proteína	- 2,64	- 2,9	- 2,4	- 4,8 a - 5,2	- 3,5 (2,2)	4,5 (1,6)
p.100 de grasa	+ 0,42	ND ⁴	ND	+ 0,132 a + 0,147	ND	ND
p.100 de proteína	+ 0,08	ND	ND	+ 0,026 a + 0,034	ND	ND

¹Grisart *et al.* (2002); ²Spelman *et al.* (2002); ³Thaller *et al.* (2003); ⁴Valores no disponibles; ⁵Valores obtenidos en la primera y tercera lactación.

*Valores significativos para $p < 0,01$.

costes-ingresos el ganadero pueda elegir aquella opción que le proporcione mayores ventajas económicas.

Otro resultado de interés, que también se repite en los trabajos publicados recientemente, es la ausencia de efecto significativo ($p < 0,05$) de acción dominante entre los alelos de este gen para los caracteres analizados. Con el fin de evitar el análisis en dos etapas sería muy interesante aplicar modelos de herencia mixta con muestreo de Gibbs. De esta forma podría incluirse, sin sobreparametrizar, toda la información productiva disponible tanto de hijas de toros no informativos como de hijas no genotipadas de toros genotipados.

Finalmente, el método de genotipado descrito permite la obtención si-

multánea del genotipo para el gen DGAT1 y del genotipo tanto de los marcadores propuestos por el ISAG (International Society of Animal Genetics) para el control de paternidad, como de los alelos correspondientes a genes de proteínas de la leche (**figura 1**). Esta metodología representa una simplificación y reducción del coste frente a las otras publicadas (Thaller *et al.*, 2003; Grisart *et al.*, 2004).

AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por CICYT, nº: 1FD97-0042. Las muestras de leche fueron proporcionadas por ASCOL (Asturiana de Control Lechero).

BIBLIOGRAFÍA

Coppieters, W., J. Riquet, J.J. Arranz, P. Berzi, N. Cambisano, B. Grisart, L. Karim, F. Marcq, L. Moreau, C. Neze, P. Simon, P. Vanmans-

hoven, D. Wagenaar and M. Georges. 1998. A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine Chromosome

EFFECTO DEL GEN DGAT1 SOBRE CARACTERES LECHEROS

14. *Mammalian Genome*, 9: 540-544.
- Falconer, D.S. y T.F.C. Mackay. 2001. Introducción a la Genética Cuantitativa. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (España).
- Golik, M., E. Seroussi, J.I. Weller, E. Ezra and M. Ron. 2002. Population-wide analysis of a QTL affecting milk-fat production in the Israeli Holstein population. XVIII International Conference on Animal Genetics, Göttingen, 165-166.
- Grisart, B., W. Coppieters, F. Farnir, L. Karim, C. Ford, P. Berzi, N. Cambisano, M. Mni, S. Reid, P. Simon, R. Spelman, M. Georges and R. Snell. 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 Research*, 12: 222-31.
- Grisart, B., F. Farnir, L. Karim, N. Cambisano, J.J. Kim, A. Kvasz, M. Mni, P. Simon, J.M. Frère, W. Coppieters and M. Georges. 2004. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 2398-2403.
- Spelman, R.J. 2002. Utilisation of molecular information on dairy cattle breeding. 7th WCGALP. Montpellier (Francia). Comm. 22-02.
- Spelman, R.J., C.A. Ford, P. McElhinney, G.C. Gregory and R.G. Snell. 2002. Characterization of the DGAT1 Gene in the New Zealand Dairy Population. *J. Dairy Sci.*, 85: 3514-3517.
- Thaller, G., W. Krämer, A. Winter, B. Kaupe, G. Erhardt and R. Fries. 2003. Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. *J. Anim. Sci.*, 81: 1911-1918.
- Winter, A., W. Kramer, F.A. Werner, S. Kollers, S. Kata, G. Durstewitz, J. Buitkamp, J.E. Womack, G. Thaller and R. Fries. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 9300-9305.

Recibido: 8-6-04. Aceptado: 27-9-04.

Archivos de zootecnia vol. 53, núm. 203, p. 299.