

## POLIMORFISMOS BIOQUÍMICOS DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS EN LA RAZA OVINA LATXA

### Biochemical polymorphisms of milk proteins in Latxa sheep breed

Tejedor, T.; Muñoz, T.; Razquin, J. M.

Área de Genética. Facultad de Veterinaria de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza.

Recibido: 17-5-91

Aceptado: 11-6-91

#### RESUMEN

En un estudio inicial acerca de la variabilidad genética de las proteínas lácteas en la raza ovina Latxa, se han analizado muestras de leche individuales de 36 ovejas, que se encontraban entre la segunda y la duodécima semana tras el parto. Las proteínas del lactosuero fueron analizadas mediante electroforesis en gel de almidón y mostraron ausencia de variabilidad para  $\alpha$ -lactalbúmina y frecuencias génicas intermedias para las variantes de  $\beta$ -lactoglobulina ( $LGB^*A$ :  $0,5417 \pm 0,0587$ ;  $LGB^*B$ :  $0,4583 \pm 0,0587$ ). Existe equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo encontrado ( $X^2_{eq}$ : 0,14 N.S.). Las caseínas fueron estudiadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-urea y no se encontraron variantes genéticas.

*Palabras clave:*  $\alpha$ -lactalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, caseínas, ganado ovino, polimorfismo.

#### SUMMARY

In an initial study about genetic variability of milk proteins in Latxa sheep breed, individual milk samples from 36 ewes —between two and twelve weeks after parturition— were analysed by starch gel electrophoresis and they showed no variability for  $\alpha$ -lactalbumin and intermediate frequencies for  $\beta$ -lactoglobulin variants ( $LGB^*A$ :  $0.5417 \pm 0.0587$ ;  $LGB^*B$ :  $0.4583 \pm 0.0587$ ). Hardy-Weimberg's equilibrium exists for the found polymorphism ( $X^2_{eq}$ : 0.14 N.S.). Caseins were studied by polyacrylamide-urea gel electrophoresis and no genetic variants were found.

*Key words:*  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, caseins, sheep, polymorphism.

## INTRODUCCIÓN

La raza Latxa es una raza de ovinos autóctonos del País Vasco de gran importancia por su producción lechera. Esta raza es objeto, en la actualidad, de numerosos estudios acerca de su rendimiento productivo (URARTE *et al.*, 1989) e incluso de los polimorfismos bioquímicos de sus proteínas sanguíneas (ESTOMBA *et al.*, 1986). Sin embargo, hasta ahora no conocemos ningún estudio acerca de los posibles polimorfismos de sus proteínas lácteas. En este trabajo presentamos los resultados de un estudio inicial sobre dichos polimorfismos, como una aportación más del Área de genética de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza a un mejor conocimiento de las razas autóctonas españolas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio, se han recogido muestras de leche de 36 animales de raza Latxa, pertenecientes al rebaño de la Cooperativa «San Miguel de Aralar» de Oscoz (Navarra). Se trata de animales escogidos al azar entre las ovejas en lactación de dicho rebaño. Debido a que los partos se producen escalonadamente, las ovejas se encuentran en distintos estadios productivos, hecho que queda reflejado en la muestra analizada, en la que se encuentran desde hembras al comienzo del período de ordeño (segunda semana tras el parto) hasta ovejas ya al final del mismo (duodécima semana tras el parto), pasando por todos los estadios intermedios.

La toma de muestras se realizó en el momento de iniciarse el ordeño de la mañana, antes de colocar las pezoneras y después de la eliminación rutinaria por parte del ordeñador de los primeros chorros de leche. Las muestras de leche fueron desnatadas por centrifugación (2.500 rpm durante 5 minutos a 40 °C) y posterior eliminación de la película grasa. Una vez desnatadas, se separan el lactosuero y la caseína

añadiendo ácido acético glacial diluido en agua destilada (1:2) hasta conseguir un pH de 4,3, lo que determina la precipitación de la caseína. A continuación, las muestras se centrifugan a 2.000 rpm durante 15 minutos, de manera que el lactosuero sobrenadante puede recogerse fácilmente.

La caseína entera ácida que queda en el fondo se lava dos veces con alcohol etílico y otras dos veces más con éter sulfúrico. Estas operaciones tienen como finalidad desengrasar y desecar a fondo la caseína, con lo cual ésta adquiere el aspecto de un polvo fino de color blanco.

La hidrólisis y reducción de la caseína entera ácida es necesaria para la adecuada visualización de las variantes electroforéticas de las diversas caseínas. Se consigue disolviendo dicha caseína al 5% en el buffer de hidrólisis de Peterson (1963): 0,085M Tris; 0,003M Na<sub>2</sub>EDTA; 0,013M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH=9,2 tras la adición de urea (7M).

Tanto las muestras de lactosuero como las de caseína se conservaron congeladas (-30 °C) hasta el momento de su análisis electroforético. Para el lactosuero se ha utilizado la técnica de King (1969) sobre gel de almidón horizontal al 12% (p/v). Para preparar el buffer de gel se mezclan 50ml de ácido cítrico 0,05M con 45 ml de Tris 0,2M, ajustando a pH=7,2 con adiciones posteriores de una y otra disolución. Esta mezcla se diluye en 500 ml para su uso. El buffer de electrodos es 0,3 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>— 0,1 M NaOH (pH=8,6). La electroforesis tiene lugar a 200V durante unas 5 horas.

Las caseínas se han analizado en gel vertical de poliacrilamida (7%)-urea. A partir del buffer stock (0,825 M Tris; 0,035 M Na<sub>2</sub>EDTA; 0,124 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), se elabora el buffer del gel (55ml de buffer stock, 45M urea y agua destilada hasta 1 litro, pH=9,0 con SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> al 10%) y el buffer de cubetas (dilución 1:9 del buffer stock en agua destilada, pH=9,1). La electroforesis se desarrolla a 600V durante 4 horas. Tras una fijación en ácido tricloroacético (12,5% p/v) durante media hora, el gel se tiñe en Azul de Coomassie R-250

al 0,2% (p/v) durante otros 30 minutos. El procedimiento descrito supone una conjunción de las técnicas originales puestas a punto por PETERSON (1963) y WOYCHIK (1964).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La electroforesis en gel de almidón de las muestras de lactosuero muestra dos grupos de bandas. Las más rápidas, de acuerdo con KING (1966), corresponden a  $\alpha$ -lactalbúmina (*LALBA\**) y las más lentas a  $\beta$ -lactoglobulina (*LGB\**). (Ver Figura 1).

No se ha observado variabilidad para *LALBA\**, pero en el caso de *LGB\** se aprecian muestras con una sola banda, ya sea rápida o lenta, así como muestras con ambas bandas. Estas imágenes son idénticas a las obtenidas por KING (1966) con la misma técnica electroforética, lo que permite identificarlas, respectivamente, como correspondientes a los homocigotos *LGB\*A/A* y *LGB\*B/B* y al heterocigoto *LGB\*A/B* (ver Figura 1).

A partir de los datos de las muestras analizadas se han calculado unas frecuencias génicas de  $0,5417 \pm 0,0587$  para *LGB\*A* y de  $0,4583 \pm 0,0587$  para *LGB\*B*. La población se encuentra

en equilibrio genético de Hardy-Weinberg ( $X^2_{eq}: 0,14$  N.S. con  $gl = 1$ ).

La raza Latxa presenta unas frecuencias intermedias para los alelos de *LGB\**, como ciertas razas inglesas (BLACKFACE, WILTSHIRE HORN —KING, 1969—), soviéticas (TSIGAI —MACHA y NOVAKOVA, 1974—; LATVIAN DARKHEADED y MERINO SOVIÉTICO —STAMBEKOV *et al.*, 1974 y 1975—) y húngaras (PLEVEN —ERHARDT, 1989—), aunque existe una gran variabilidad de frecuencias para los alelos de esta proteína, como se aprecia en el Cuadro 1.

En cuanto a las caseínas, la técnica utilizada por nosotros, ya descrita en el apartado de material y métodos, fue inicialmente ideada para el estudio de las caseínas de vacuno, pero su aplicación al estudio de las caseínas de leche ovina ha dado muy buenos resultados. Con la utilización de dicha técnica se visualizan juegos de tres bandas rápidas que corresponden a  $\alpha_{s1}$ -caseína (*CASAS1\**) y conjuntos de dos bandas más lentas que representan a  $\beta$ -caseína (*CASB\**) (Ver Figura 2). Esta imagen es idéntica a la obtenida por ARAVE *et al.* (1973) sobre geles de almidón. La utilización de geles de poliacrilamida resulta más ventajosa, dado que estos geles proporcionan una mayor resolución de bandas y

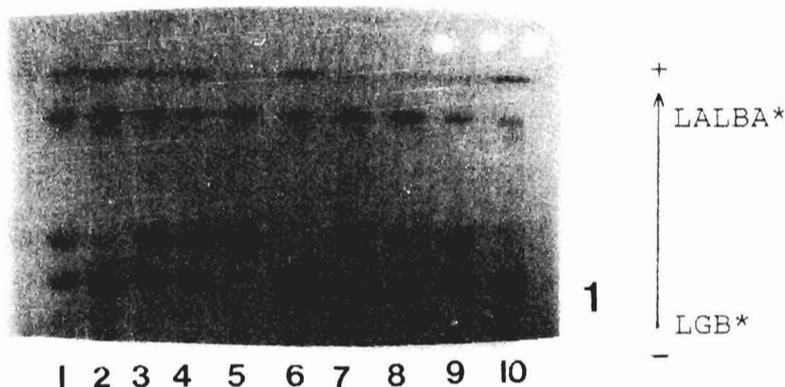


FIGURA 1. Imagen electroforética de las proteínas del lactosuero. *LALBA\** no presenta variabilidad genética. *LGB\** muestra la siguiente lectura: 1, 3, 4, 8 y 9: *A/B*; 2, 6 y 10: *A/A* y 5: *B/B*.

CUADRO I  
 FRECUENCIAS GÉNICAS DE LOS ALELOS DE LGB\* EN DIVERSAS RAZAS OVINAS

RAZA	N	LGB*A	LGB*B	LGB*C	REFERENCIA
Blackface	18	0,5600	0,4400	-	KING (1969)
Cheviot	8	0,6200	0,3800	-	«
Clun Forest	174	0,8000	0,2000	-	«
Dorset Horn	16	0,9100	0,0900	-	«
Finnish					
Landrace	8	0,7500	0,2500	-	«
Merino					
(Inglaterra)	16	0,7800	0,2200	-	«
Soay	11	0,8600	0,1400	-	«
Suffolk	15	0,7000	0,3000	-	«
Welsh	110	0,6100	0,3900	-	«
Wiltshire					
Horn	5	0,5000	0,5000	-	«
Latvian					
Darkheaded	240	0,5750	0,4250	-	STAMBEKOV <i>et al.</i> (1974)
Stavropol	304	0,7582	0,2418	-	MACHA & NOVAKOVA (1974)
Mutton Merino	126	0,9048	0,0952	-	«
Tsigai	129	0,5853	0,4147	-	«
Valachian	61	0,8361	0,1639	-	«
Romanov	7	0,4286	0,5714	-	«
Merino (URSS)	220	0,5725	0,4275	-	STAMBEKOV <i>et al.</i> (1975)
Comisana	293	1,0000	-	-	RUSSO <i>et al.</i> (1979)
Merinoland					
(Alemania)	189	0,5790	0,2460	0,1750	ERHARDT (1989)
Black Faced					
Mutton	145	0,8480	0,1520	-	«
East Friesian	89	0,7700	0,2300	-	«
Rhon	36	0,3240	0,6760	-	«
Pleven	36	0,5280	0,4720	-	«
Tsigaja	23	0,6520	0,3480	-	«
Black Razka	25	0,7600	0,2400	-	«
Latxa	36	0,5417	0,4583	-	Presente trabajo

son más baratos, de realización menos engorrosa y de más larga conservación que los geles de almidón tradicionalmente utilizados.

En el caso de CASASI\*, se observa una gran variabilidad en la intensidad de las bandas corres-

pondientes, como ya indicaron KING (1969) y RUSSO *et al.* (1979). Esta variabilidad afecta sobretodo a la banda más anódica —más rápida— de las tres que constituyen el fenotipo de CASASI\*. Sin embargo, ni en CASASI\* ni en CASB\*

se ha observado polimorfismo genético alguno.

KING (1966) observó en ovino una variante más lenta tanto de *CASAS1\** (denominada inicialmente variante «Welsh», por haber sido descubierta en ovejas de Gales) como de *CASB\**, que demostraron ser independientes. De este

modo, se conocen dos alelos codominantes para ambos loci, denominándose *CASAS1\*A* y *CASB\*A*, respectivamente, a las variantes más habituales de ambos loci, y *CASAS1\*B* y *CASB\*B* a las variantes más lentas y menos frecuentes de los mismos. Los Cuadros 2 y 3

CUADRO 2  
FRECUENCIAS GÉNICAS DE LOS ALELOS DE *CASAS1\** EN DIVERSAS RAZAS OVINAS

RAZA	N	<i>CASAS1*A</i>	<i>CASAS1*B</i> (WELSH)	REFERENCIA
Welsh	106	0,8350	0,1650	KING (1969)
Strovopol	70	0,7786	0,2214	MACHA & HORAK (1972)
Tsigai	95	0,9842	0,0158	«
Mutton				
Merino	100	0,8650	0,1350	«
Valachian	78	0,9167	0,0833	«
Columbia	161	0,9910	0,0090	ARAVE <i>et al.</i> (1973)
Dorset	11	1,0000	-	«
Hampshire	15	0,8670	0,1330	«
Rambouillet	117	0,9400	0,0600	«
Targhee	159	0,9750	0,0250	«
Comisana	293	0,9980	0,0020	RUSSO <i>et al.</i> (1979)
Sarda	70	0,7571	0,2428	ROSSI & CLEMENTI (1984)
Latxa	36	1,0000	-	Presente trabajo

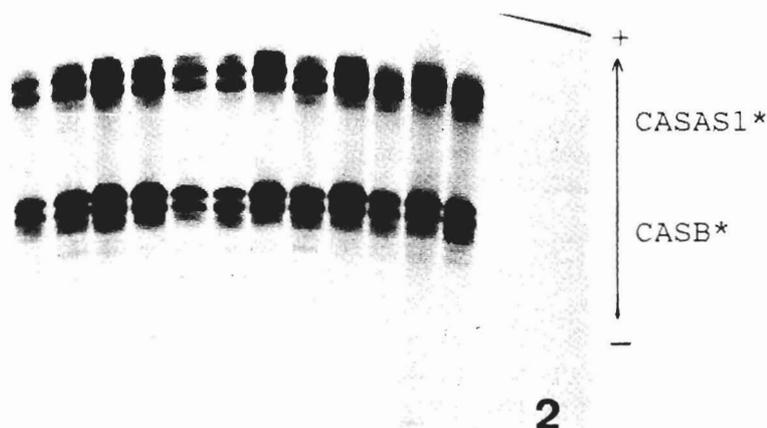


FIGURA 2. Imagen electroforética de las caseínas. No se observa variabilidad genética en ningún caso.

CUADRO 3  
FRECUENCIAS GÉNICAS DE LOS ALELOS DE CASB\* EN DIVERSAS RAZAS OVINAS

RAZA	N	CASB*A	CASB*B	REFERENCIA
Clun Forest	228	0,9560	0,0440	KING (1969)
Columbia	161	0,9630	0,0370	ARAVE <i>et al.</i> (1973)
Dorset	11	1,0000	-	«
Hampshire	15	1,0000	-	«
Rambouillet	117	1,0000	-	«
Targhee	159	0,9970	0,0030	«
Comisana	193	1,0000	-	RUSSO <i>et al.</i> (1979)
Latxa	36	1,0000	-	Presente trabajo

muestran las frecuencias de dichas variantes en diversas razas ovinas europeas y asiáticas. Como puede apreciarse, CASAS1\*B es muy poco frecuente, salvo en las razas Welsh (KING, 1969), Strovopol y Merino soviético (MACHA y HORAK, 1972), HAMPSHIRE (ARAVE *et al.*, 1973) y Sarda (ROSSI y CLEMENTI, 1984), donde supera una frecuencia del 10%. Por su parte, CASB\*B es mucho menos frecuente: sólo tres de las razas estudiadas hasta el momento presentan esta variante y su frecuencia es siempre inferior al 5%.

El hecho de que CASAS1\*B y CASB\*B no hayan sido encontrados en el presente estudio sigue la tónica general en la especie ovina de bajas frecuencias —e incluso ausencia total— para dichos alelos. Sin embargo, no podemos olvidar el pequeño efectivo considerado en estos estudios preliminares, por lo que la ampliación del mismo en un futuro próximo permitirá confirmar la presencia o ausencia de dichas variantes en la raza Latxa.

## BIBLIOGRAFÍA

- ARAVE, C. W.; GILLET, T. A.; PRICE, D. A.; MATTHEWS, D. H. (1973): Polymorphisms in caseins of sheep milk. *J. Anim. Sci.* 36: 241-244.
- ERHARDT, G. (1989): Evidence for a third allele at the b-lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) locus of sheep milk and its occurrence in different breeds. *Anim. Genet.* 20: 197-204.
- ESTOMBA, A.; VICARIO, A.; LOSTAO, C. M.; MAZÓN, L. I. (1986): Estudio de los polimorfismos Hb y Tf en ovinos Latxos y Carranzanos. *XXII Jornadas de Genética Luso-Españolas*. Oviedo (España). 122.
- KING, J. W. B. (1966): The caseins of sheep's milk. En *Polymorphismes Biochimiques des Animaux*, pp. 427-431. Inst. Nat. Recherche Agronomique. Paris.
- (1969): The distribution of sheep b-lactoglobulins. *Anim. Prod.* 11: 53-57.
- MACHA, J.; HORAK, F. (1972): Studies on polymorphism of protein in ewes' milk. *Acta Universitatis Agriculturae, Facultas Agronomica* 20: 113-117.
- MACHA, J.; NOVACKOVA, I. (1974): Genetic b-lactoglobulin polymorphism in ewes' milk. *Zivciska Vyroba* 19: 883-888.
- PETERSON, R. F. (1963): High resolution of milk proteins obtained by gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 46: 1.136-1.139.
- ROSSI, J.; CLEMENTI, F. (1984): Polimorfismo genetico delle caseine del latte di pecora: rilievi preliminari in allevamenti locali. *Annali della Facoltà di Agraria*, vol. XXXVIII: 101-108.
- RUSSO, V.; CHIOFALO, L.; MICARI, P. (1979): Polimorfismo delle proteine del latte nelle pecore di razza Comisana. *Riv. Zootec. Vet.* 4: 239-244.
- STAMBEKOV, S. ZH.; SHAPIRO, YU. O.; MANDRUSOVA, E. E.; ROMANYUK, A. (1974): Polimorfism of milk proteins in Latvian Darkheaded ewes. *Sb. Rab., Leingr. Vet. Inst.* 35: 125-126.

- STAMBEKOV, S. ZH.; SHAPIRO, YU. O.; MANDRUSOVA, E. E. (1975): Milk protein polymorphism in Soviet Merino and Latvian Darkheaded ewes and its connection with economically valuable characteristics. *Sb. Rab., Leingr. Vet. Inst.* 42: 214-216.
- WOYCHIK, J. H. (1964): Polymorphism in  $\kappa$ -Cn of cow's milk. *Biochem. Biophys. Com.* 16: 267-271.
- URARTE, E.; GABIÑA, D.; ARRANZ, J.; ARRESE, F.; GOROSTIZA, P.; SIERRA, I. (1989): Las razas ovinas Latxa y Carranzana. I. Sistemas de producción. *I. T. E. A.* 84: 7-25.