

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI



FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES

CARRERA DE AGROPECUARIA

Tema: “Programa de selección genética a través de la identificación de la beta- caseína A1-A2 mediante la prueba molecular PCR, en ganado Pardo suizo en la hacienda El Manzano – Cantón Tulcán”

Trabajo de Integración Curricular previo a la obtención del
título de Ingenieros en Agropecuaria

AUTORES: Orbe Revelo Klever Alexander

Orbe Revelo Katherine Odalys

TUTOR: Ing. Edison Marcelo Ibarra Rosero MSc.

Tulcán, 2025.

CERTIFICADO DEL TUTOR

Certifico que los estudiantes Orbe Revelo Klever Alexander y Orbe Revelo Katherine Odalys con el número de cédula 0401766654 y 0402045876 respectivamente han desarrollado el Trabajo de Integración Curricular: “Programa de selección genética a través de la identificación de la beta- caseína A1-A2 mediante la prueba molecular PCR, en ganado Pardo suizo en la hacienda El Manzano – Cantón Tulcán”

Este trabajo se sujeta a las normas y metodología dispuesta en el Reglamento de la Unidad de Integración Curricular, Titulación e Incorporación de la UPEC, por lo tanto, autorizo la presentación de la sustentación para la calificación respectiva

Ing. Edison Marcelo Ibarra Rosero MSc.

TUTOR

Tulcán, diciembre de 2025

AUTORÍA DE TRABAJO

El presente Trabajo de Integración Curricular constituye un requisito previo para la obtención del título de Ingenieros en la Carrera de ingeniería en desarrollo integral agropecuaria de la Facultad de Industrias Agropecuarias y Ciencias Ambientales

Nosotros, Orbe Revelo Klever Alexander y Orbe Revelo Katherine Odalys con cédula de identidad número 0401766654 y 0402045876 respectivamente declaramos que la investigación es absolutamente original, auténtica, personal y los resultados y conclusiones a los que hemos llegado son de nuestra absoluta responsabilidad.



Orbe Revelo Klever Alexander

AUTOR



Orbe Revelo Katherine Odalys

AUTORA

Tulcán, diciembre de 2025

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Nosotros Orbe Revelo Klever Alexander y Orbe Revelo Katherine Odalys declaramos ser autor de los criterios emitidos en el Trabajo de Integración Curricular: "Programa de selección genética a través de la identificación de la beta- caseína A1-A2 mediante la prueba molecular PCR, en ganado Pardo suizo en la hacienda El Manzano – Cantón Tulcán" y se exime expresamente a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi y a sus representantes de posibles reclamos o acciones legales.



Orbe Revelo Klever Alexander

AUTOR

Orbe Revelo Katherine Odalys

AUTORA

Tulcán, diciembre de 2025

AGRADECIMIENTO

Mi mayor reconocimiento es para mi familia. A mis padres, Carlos Orbe y Guadalupe Revelo, mi fuente inagotable de motivación. Su fe inquebrantable en mis capacidades y su sacrificio constante hicieron posible alcanzar este logro. A mis hermanos, por su constante apoyo, ánimo y compañía incondicional.

Especialmente, a mi hijo, Ian Mateo, por su amor incondicional, por ser mi mayor inspiración y por la paciencia que tuvo durante los largos periodos de estudio.

Mi gratitud sincera al MSc. Marcelo Ibarra, tutor de esta tesis, por su dirección experta, su tiempo invaluable, su rigor académico y su paciencia, elementos que me guiaron a través de cada etapa del proyecto. Su orientación fue un pilar fundamental para el desarrollo de esta investigación.

Katherine Odalys Orbe Revelo

AGRADECIMIENTO

A Dios por saberme guiar y bríndame sabiduría en los proyectos me he planteado a lo largo de mi vida.

A mi padre Carlos Orbe por ser mi modelo ha seguir y pilar las adversidades.

A mi madre Lidia Revelo por brindarme su apoyo incondicional y ser mi motivo de superación.

A mis hermanos por los consejos y ayuda brindados.

A los profesores que me ayudaron en este proyecto con sus conocimientos y consejos para culminar esta etapa universitaria.

Finalmente agradezco a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, donde adquirí estos conocimientos

Klever Alexander Orbe Revelo

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios, por ser mi refugio y mi guía constante. A Él le debo la salud, la sabiduría y la perseverancia necesarias para superar los desafíos y alcanzar esta meta profesional.

A mis pilares, mis queridos padres, Carlos Orbe y Guadalupe Revelo. Su amor inagotable ha sido la base de mi existencia, y sus innumerables sacrificios me abrieron el camino hacia la educación. Su fe inquebrantable en mis capacidades fue el motor que me impulsó en los momentos de duda. Esta tesis es, en gran parte, el fruto de su esfuerzo y dedicación.

A mi amado hijo, Ian Mateo, la luz que ilumina mi vida. Eres la razón más hermosa y poderosa para seguir luchando y creciendo. Cada hora de estudio y cada desvelo fueron pensando en ti, con el deseo de ser un ejemplo de que, con esfuerzo, los sueños se alcanzan.

A mis hermanos, por su amistad sincera, su apoyo incondicional y por compartir conmigo los momentos de alegría y las cargas del camino.

Katherine Odalys Orbe Revelo

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a mi familia, en especial a mis padres, por haberme inculcado el valor de la perseverancia, la responsabilidad y el esfuerzo constante. Agradezco profundamente su confianza, apoyo incondicional y orientación, los cuales han sido fundamentales para alcanzar esta meta profesional.

Klever Alexander Orbe Revelo

ÍNDICE

RESUMEN	13
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN	15
I. EL PROBLEMA	17
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	18
1.3. JUSTIFICACIÓN	18
1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	21
1.4.1. Objetivo General	21
1.4.2. Objetivos Específicos	21
1.4.3. Preguntas de Investigación	21
II.FUNDAMENTACIÓNTEÓRICA	22
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	22
2.2. MARCO TEÓRICO	24
2.2.1. Producción lechera en Ecuador y América Latina	24
2.2.2. La raza Pardo Suizo	27
2.2.3. Mejoramiento genético en la ganadería lechera	28
III.METODOLOGÍA	37
3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO	37
3.1.1. Enfoque	37
3.1.2. Tipo de Investigación	37
3.2. IDEA A DEFENDER	37
3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	38
3.4. MÉTODOS UTILIZADOS	39
3.4.1. Ubicación geográfica. -	39

3.4.2. Población de estudio	40
3.5. PROCEDIMIENTO	40
3.5.1. Manejo de la Investigación.....	40
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1. RESULTADOS.....	49
4.1.1. Validación de protocolo de identificación molecular para la detección de las variantes β -caseína A1 y A2.	49
4.1.2. Resultados obtenidos	50
4.1.3. Diseño de un programa de mejoramiento genético enfocado en la obtención de animales con genotipo A2A2.....	52
4.2. DISCUSIÓN	59
V.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	61
5.1. CONCLUSIONES.....	61
5.2. RECOMENDACIONES.....	61
VI.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
VII.ANEXOS	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición promedio de la leche bovina cruda.....	26
Tabla 2. Operacionalización de las variables.....	38
Tabla 3. Composición utilizada en la mezcla para amplificación por PCR.....	42
Tabla 4. Composición utilizada en PCR-RFLP	45
Tabla 5. Resultados de las frecuencias genómicas.....	47
Tabla 6. Frecuencias alélicas de los alelos A1 y A2	51
Tabla 7. Prueba estadística de las frecuencias estadísticas	52
Tabla 8. Cronograma	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación del predio en estudio con respecto al PAN y Bosques y Vegetación Protectora MAE.	39
Figura 2. Gradiente de temperatura utilizada en la PCR	43
Figura 3. Programa térmico de la PCR	44
Figura 4. Ciclo de temperatura aplicado para la enzima Taq1	46
Figura 5. Gradiente de temperatura aplicada en la validación del protocolo	49
Figura 6. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen CSN2	49
Figura 7. Frecuencia alélica de las variantes β -caseína A1 y A2.....	50
Figura 8. Ejemplar vaca homocigótica A2A2	54
Figura 9. Catálogo genético, ejemplar 1	54
Figura 10. Catálogo genético, ejemplar 2	55
Figura 11. Catálogo genético, ejemplar 3	55
Figura 12. Cruzamientos	56

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Acta de la sustentación de Predefensa del TIC	69
Anexo 2. Certificado del abstract por parte de idiomas.....	71
Anexo 3. Resultados de la prueba PCR para muestras de control.....	73
Anexo 4. Resultado de la prueba PCR de muestras de control.....	74
Anexo 5. Resultados PCR	75

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo diseñar un programa de selección genética mediante la detección molecular (RFLP-PCR) de las variantes A1 y A2 del gen CSN2 en ganado Pardo Suizo de la Hacienda El Manzano, cantón Tulcán. Se utilizó 250 bovinos hembra cuyas muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi. La metodología inicio con la identificación de controles genéticos, tomando 10 muestras de la población y enviando a un Laboratorio externo; de estos resultados, se seleccionaron los genotipos A1A2 y A2A2 para la validación del protocolo. Para la validación, se aplicó una gradiente de temperatura de 60°C a 70°C, estableciendo la temperatura ideal de hibridación en 64°C. Una vez validado el protocolo, se procedió a la toma de muestras de sangre en tubos con EDTA. La extracción de ADN se realizó utilizando el Kit Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit (#K0721). Posteriormente, para el montaje de la PCR, se utilizó el Mastermix de la casa ABM junto con los "primers" específicos del CSN2 (F/5'CCTGCAGAATTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGCCCCATCG-3'); (R/5'GAGTCGACTGCAGATTTCAACATCAGTGAGAGTCAGGCCCTG-3'). El programa del termociclador se ejecutó a: desnaturalización a 94°C, hibridación a 64°C y extensión a 72°C. A continuación, se realizó la restricción con la enzima TAQ 1 de la casa Thermo Scientific, finalmente se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 45 minutos a 90 voltios. Los resultados revelaron una mayor prevalencia del genotipo A2A2 (36.75%), seguido por A1A1 (25.30%) y A1A2 (19.28%) mientras que 18.67% de los individuos no presentaron amplificación concluyente. El cálculo de las frecuencias de alélicas mostró predominancia del alelo A2 (0.57) frente al alelo A1 (0.43). Con las frecuencias alélicas calculadas con el principio de Hardy-Weinberg se observó que las frecuencias observadas no se ajustan al modelo ($p < 0.00001$) al aplicar la prueba de chi cuadrado. Basados en estos datos, se recomienda la implementación de programas de selección asistidos por marcadores moleculares para optimizar la composición genética del hato y obtener un núcleo productivo de características alélicas A2A2.

Palabras clave: ganado Pardo Suizo, beta-caseína, pcr-rflp

ABSTRACT

This study aimed to design a genetic selection program using molecular detection (RFLP-PCR) of the A1 and A2 variants of the CSN2 gene in Brown Swiss cattle from the El Manzano farm in Tulcán Canton. Two hundred and fifty female cattle were used in this study, and their samples were processed at the Veterinary Diagnostic Laboratory of the Universidad Politécnica Estatal del Carchi. The methodology began with the identification of genetic controls, which involved taking 10 samples from the population and sending them to an external laboratory. Based on these results, genotypes A1A2 and A2A2 were selected for protocol validation. For validation, a temperature gradient from 60 to 70°C was applied, establishing the ideal hybridization temperature at 64°C. Once the protocol was validated, blood samples were collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes. DNA extraction was performed using the Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit (#K0721). Subsequently, for PCR setup, ABM Mastermix was used along with CSN2-specific primers (F/5'CCTGCAGAATTCTAGTCTATCCCTCCCTGGGCCCATCG-3'); (R/5'GAGTCGACTGCAGATTTCAACATCAGTGAGAGTCAGGCCCTG-3'). The thermocycler program was run as follows: denaturation at 94°C, annealing at 64°C, and extension at 72°C. The restriction step was then performed using the Thermo Scientific TAQ 1 enzyme, and finally, electrophoresis was carried out on a 2% agarose gel for 45 min at 90 volts. The results revealed a higher prevalence of the A2A2 genotype (36.75%), followed by A1A1 (25.30%) and A1A2 (19.28%), whereas 18.67% of the individuals did not show conclusive amplification. The calculation of allele frequencies showed a predominance of the A2 allele (0.57) over the A1 allele (0.43). Using the Hardy-Weinberg principle, the observed frequencies did not fit the model ($p < 0.00001$) when the chi-square test was applied. Based on these data, the implementation of marker-assisted selection programs is recommended to optimize the genetic composition of the herd and obtain a productive nucleus with A2A2 allelic traits.

Keywords: Brown Swiss cattle, beta-casein, PCR-RFLP

INTRODUCCIÓN

La producción lechera constituye un sector fundamental dentro de la economía agropecuaria global, no solo por su relevancia en la seguridad alimentaria, sino también por su papel en la generación de ingresos en comunidades rurales y en la dinamización de estos territorios. Tradicionalmente, los programas de mejoramiento genético bovino han centrado su atención en características cuantitativas como el volumen de producción de leche, grasa y proteína, que están determinadas por múltiples loci genéticos (González-Recio, Coffey, & Pryce, 2014). Sin embargo, el avance de la biotecnología y la creciente conciencia sobre la relación entre alimentos y salud han motivado la inclusión de parámetros cualitativos en los programas de selección, especialmente aquellos relacionados con la composición de las proteínas lácteas, como la β -caseína (Liang et al., 2021).

En este contexto, la proteína β -caseína, una de las principales proteínas de la leche, presenta dos variantes genéticas comúnmente estudiadas: A1 y A2. Diversos estudios han señalado que la variante A1 puede liberar un péptido bioactivo denominado β -casomorfina-7 (BCM-7) durante la digestión, el cual ha sido asociado a posibles efectos adversos sobre la salud humana, tales como molestias gastrointestinales, respuesta inflamatoria, y predisposición a enfermedades como la diabetes tipo 1 y trastornos cardiovasculares (Jinsmaa & Yoshikawa, 1999; Truswell, 2018). Por el contrario, la variante A2 no genera este péptido, y su consumo ha sido vinculado con un mejor perfil digestivo y menor reactividad inmunológica, lo que ha impulsado su demanda en mercados especializados y entre consumidores preocupados por la salud (Brooke-Taylor et al., 2017; Kaur et al., 2022).

En Ecuador, la ganadería lechera representa una de las actividades agropecuarias de mayor importancia, tanto desde la perspectiva económica como social. Según datos del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC, 2021), el país produce alrededor de 5.7 millones de litros de leche diarios, siendo la Sierra la principal región productora. No obstante, aún existe una brecha significativa en cuanto a la caracterización genética de los hatos, particularmente en lo que respecta a las variantes de β -caseína. La provincia del Carchi, y en particular el cantón Tulcán, es una zona destacada por su vocación ganadera, en donde se ha optado por la inserción de razas de alta productividad como el Pardo Suizo, esta raza ha sido adoptada por su rusticidad, eficiencia productiva y calidad composicional de la

leche (FAO & MAG, 2022). Sin embargo, hasta el momento, no se han desarrollado estudios moleculares que evalúen la frecuencia de los alelos A1 y A2 en esta raza dentro del contexto local.

El análisis genético de las variantes de β -caseína en poblaciones bovinas no solo responde a un interés científico, sino también a una necesidad productiva y comercial. La determinación de las frecuencias alélicas A1 y A2 posibilita el diseño de estrategias de mejoramiento genético orientadas a la producción de leche diferenciada, de mayor valor agregado y con potencial de penetración en mercados exigentes. Además, este enfoque contribuye al desarrollo de sistemas ganaderos sostenibles al fomentar la trazabilidad genética, la selección asistida por marcadores y la adaptación de los hatos a tendencias globales de consumo (Miluchová et al., 2024; Soma et al., 2021).

En función de lo expuesto, el presente estudio tiene como objetivo diseñar un programa de mejoramiento genético mediante la identificación de las variantes de β -caseína A1 y A2 en bovinos de raza Pardo Suizo pertenecientes a la Hacienda El Manzano, en el cantón Tulcán, provincia del Carchi. Esta investigación busca, no solo, caracterizar genéticamente al hato, sino también sentar las bases para una producción lechera más saludable, diferenciada y competitiva, alineada con los retos de la ganadería moderna.

I. EL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción lechera bovina a nivel global ha centrado sus esfuerzos en la selección genética de rasgos cuantitativos, como el contenido de grasa, proteína y el volumen de producción láctea, características poligénicas que limitan su progreso acelerado (Brito et al., 2021). Ante esta complejidad, la identificación de variantes genéticas con impacto directo en la calidad nutricional y efectos en la salud humana, como la beta(β)-caseína A1 y A2, ha ganado protagonismo (Caroli et al., 2009).

En el sector lácteo, la calidad proteica se ha posicionado como un criterio prioritario, particularmente por los efectos diferenciales atribuidos a las variantes de β -caseína. Estudios recientes confirman que el péptido BCM-7, derivado de la digestión de la variante A1, podría modular procesos inflamatorios intestinales mediante la activación de receptores opioides en poblaciones con predisposición genética, así también, evidencia científica ha asociado el consumo de leche con β -caseínas A1 con enfermedades como diabetes tipo 1, enfermedad coronaria, arteriosclerosis, síndrome de muerte súbita del lactante, autismo y esquizofrenia (Trinchese et al., 2022). Aunque la OMS (2023) señala que se requieren más evidencias para establecer causalidades, la preferencia del consumidor por leche A2 ha impulsado su comercialización en mercados de Europa y Oceanía (Dairy Global, 2024).

En ganado Pardo Suizo, análisis genómicos recientes revelan una frecuencia heterogénea del alelo A2, con rangos del 50% al 75% en hatos latinoamericanos (Gutiérrez et al., 2022). En Ecuador, Ruiz-Álvarez et al. (2024) identificaron un 66% de prevalencia de A2, pero advierten que su selección indiscriminada podría reducir la diversidad genética asociada a resistencia a enfermedades (ej. mastitis). Por ello, programas como los implementados en Nueva Zelanda recomiendan enfoques integrados que combinen secuenciación masiva y evaluación fenotípica (Winkelman et al., 2023).

Uno de los principales obstáculos para implementar programas de selección genética eficaces radica en la estandarización de las técnicas de identificación

molecular, particularmente en la detección del polimorfismo A1/A2 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Métodos como la PCR-RFLP (Polymorphism Length Restriction Fragment) y la PCR alelo-específica (AS-PCR) presentan diferencias críticas en sensibilidad (85-99%) y especificidad (Ruiz-Álvarez et al., 2024). Un estudio reciente en Ecuador demostró que la AS-PCR, al utilizar cebadores diseñados para hibridación específica, reduce los falsos positivos en un 12% comparado con técnicas convencionales, siendo clave para garantizar la confiabilidad en poblaciones de Pardo Suizo con alta diversidad genética (González et al., 2023).

A esta complejidad técnica se suma la limitada infraestructura molecular en regiones productoras. Según el informe de la Red de Laboratorios Lácteos Latinoamericanos (2023), solo el 34% de los laboratorios en zonas rurales cuenta con protocolos estandarizados para análisis de β -caseína, y el 61% del personal reporta insuficiente capacitación en técnicas de genotipado. Además, el costo por animal (USD 4-10) representa una barrera económica, especialmente para pequeños productores, donde el precio premium por leche A2 no compensa la inversión inicial (Caja-Fernández, 2024).

Adicionalmente, el Pardo Suizo enfrenta desafíos únicos: su baja integración en programas genómicos globales (solo el 8% de los sementales evaluados incluyen datos A1/A2; BMeditores, 2022) limita la selección simultánea de otros rasgos clave. Modelos predictivos indican que una selección intensiva hacia A2A2 sin índices genómicos podría reducir un 2% anual la ganancia genética en fertilidad (Landi et al., 2011).

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es la frecuencia genética de los alelos de la beta – caseína A1-A2 en el ganado bovino en la hacienda El Manzano, cantón Tulcán, mediante la aplicación de la técnica de PCR alelo-específico?

1.3. JUSTIFICACIÓN

La identificación genética de los alelos A1 y A2 del gen de la β -caseína bovina (CSN2) ha cobrado relevancia internacional debido a su implicación en la calidad de la leche y sus posibles efectos en la salud humana. La diferencia estructural entre los

alelos A1 y A2 influye directamente en la liberación de péptidos bioactivos durante la digestión, como la β -casomorfina-7 (BCM-7). Ante este escenario, seleccionar bovinos con genotipo A2A2 se perfila como una estrategia de interés no solo para mejorar la calidad composicional de la leche, sino también para atender nichos de mercado sensibles a la salud (Carvajal & Levicoy, 2021; CRBiomed, 2023).

El mercado internacional de lácteos ha experimentado una transformación significativa en la última década, impulsado por consumidores cada vez más informados que buscan productos con beneficios específicos para la salud. La leche A2 ha emergido como uno de los segmentos de mayor crecimiento dentro de esta tendencia, particularmente en mercados desarrollados. Según datos de Grand View Research (2023), el mercado global de leche A2 fue valorado en USD 12.5 mil millones en 2022, con proyecciones de alcanzar USD 38.7 mil millones para 2030, creciendo a una tasa anual compuesta del 15.2%. Este crecimiento exponencial se sustenta en varios factores clave: primero, el aumento de la prevalencia de trastornos digestivos asociados al consumo de lácteos, que afectan aproximadamente al 30% de la población adulta a nivel global (López-Alonso et al., 2023); segundo, la disposición de consumidores de ingresos medios y altos a pagar primas de precio significativas por productos percibidos como más saludables; y tercero, el desarrollo de cadenas de valor especializadas que garantizan la trazabilidad desde el hato hasta el producto final.

Países pioneros como Nueva Zelanda y Australia han demostrado la viabilidad de modelos de negocio basados en la leche A2. The A2 Milk Company, líder global en este segmento, reportó ingresos por USD 1.6 mil millones en 2023, con márgenes de utilidad bruta del 52%, significativamente superiores a los de la leche convencional (NZX, 2024). Estos resultados se han logrado mediante estrategias integradas que combinan investigación genética avanzada, marketing basado en ciencia y desarrollo de productos diferenciados. En Nueva Zelanda, por ejemplo, más del 65% de los hatos lecheros han sido genotipados para las variantes A1/A2, y el país exporta actualmente leche A2 a más de 40 mercados internacionales con primas de precio que oscilan entre 25-40% (DairyNZ, 2023).

El sector lácteo ecuatoriano enfrenta desafíos estructurales que limitan su competitividad, incluyendo baja productividad (promedio de 12-15 litros/vaca/día), altos costos de producción y escasa diferenciación de productos. Sin embargo, esta

situación representa también una oportunidad para implementar estrategias de reconversión hacia sistemas más especializados y de mayor valor agregado. El ganado Pardo Suizo, que representa aproximadamente el 35% del inventario lechero nacional según datos del MAG (2023), presenta características genéticas particularmente favorables para este propósito.

Investigaciones recientes realizadas por la ESPOL y la Universidad Central del Ecuador (Ruiz-Álvarez et al., 2024) en más de 3000 animales distribuidos en las principales cuencas lecheras del país (Chimborazo, Pichincha, Tungurahua y Azuay) revelaron que: la frecuencia del alelo A2 en Pardo Suizo ecuatoriano es del 66.2%, significativamente mayor que en razas especializadas como Holstein (48.5%); también existe una correlación positiva ($r=0.42$) entre el genotipo A2A2 y el contenido de proteína láctea (3.4% vs 3.1% en A1A1); los animales A2A2 muestran mayor resistencia a mastitis subclínica (recuento de células somáticas 15% menor).

Estos hallazgos sugieren que Ecuador podría posicionarse como proveedor estratégico de leche A2 para el mercado andino, donde países como Perú y Colombia han mostrado un crecimiento anual del 18% en demanda de este producto (CAN, 2023). Adicionalmente, la adaptación del Pardo Suizo a sistemas de producción en altura (2 500 - 3 500 msnm) representa una ventaja comparativa para sistemas silvopastoriles y orgánicos, que pueden complementar la estrategia de diferenciación.

Finalmente, incorporar el análisis genético de β -caseína en programas de selección genética permitiría avanzar hacia un modelo de producción láctea más eficiente, sostenible y basado en ciencia. La genética A2 puede ser integrada con otras características deseables como productividad, fertilidad y resistencia a enfermedades, dentro de esquemas de selección multi-característica, tal como se ha implementado en programas genómicos de Europa y América del Norte (Caja Fernández, 2024).

1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1.4.1. Objetivo General

Diseñar un programa de selección genética mediante la identificación de las variantes beta-caseína A1 y A2 utilizando la técnica molecular PCR en ganado Pardo Suizo de la hacienda El Manzano, cantón Tulcán.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Validar un protocolo de identificación molecular para la detección de las variantes beta-caseína A1 y A2.
- Determinar la frecuencia alélica de las variantes beta-caseína A1 y A2 en ganado Pardo Suizo de la hacienda El Manzano.
- Diseñar un programa de mejoramiento genético enfocado en la obtención de animales con genotipo A2A2 en la hacienda El Manzano.

1.4.3. Preguntas de Investigación

- ¿Qué medidas deben implementarse para validar un protocolo molecular para la identificación de las variantes beta-caseína A1 y A2?
- ¿Cuáles son las frecuencias alélicas de las variantes beta-caseína A1 y A2 en el ganado Pardo Suizo de la hacienda El Manzano?
- ¿Cuáles son los criterios fundamentales para diseñar un programa de mejoramiento genético orientado a la obtención de animales con genotipo A2A2

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

En esta sección se presentan algunos de los estudios que proporcionaron la base teórico-metodológica para el desarrollo del presente trabajo.

Ruiz Álvarez & Salmerón (2024) en su estudio titulado Evaluación genética de los alelos A1 y A2 de β -caseína en cinco razas bovinas, con el objetivo de determinar la frecuencia génica de los alelos A1 y A2, así como validar diferentes juegos de cebadores para la técnica de PCR alelo-específica (AS-PCR) en condiciones ecuatorianas. Para ello, recolectaron 179 muestras sanguíneas en las provincias de Azuay, Cañar y Guayas, aplicando dos esquemas de PCR y evaluando la claridad de amplificación de cada uno. Los resultados evidenciaron una frecuencia alélica de 50 % tanto para A1 como para A2, con un 92 % de animales heterocigotos (A1A2). Se concluyó que el uso del cebador BC-ASPCR1For (854 bp) proporcionó mayor precisión, y que las poblaciones analizadas se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, sin indicios de endogamia, lo que sugiere viabilidad para programas de selección genética.

Carvajal, Levicoy & Pizarro-Aránguiz (2023) desarrollaron la investigación titulada Genotyping of the beta-casein A1 and A2 variants in Chilean dairy cattle, cuyo objetivo fue determinar la frecuencia de los genotipos A1A1, A1A2 y A2A2 en ganado lechero de diferentes razas en el sur de Chile. Se analizaron 134 muestras de sangre bovina utilizando la técnica de PCR alelo-específica. Los resultados revelaron un predominio del alelo A2 en la mayoría de las razas evaluadas, con poblaciones que se ajustaban al equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que indica una base genética estable y favorable para implementar programas de selección orientados hacia el genotipo A2A2. La investigación respalda la aplicabilidad de la herramienta molecular como estrategia para mejorar la calidad de la leche a nivel nacional.

Zúñiga (2022) desarrolló la tesis titulada Determinación de la frecuencia de los alelos A1 y A2 del gen CSN2 en bovinos de raza Holstein y bovinos criollos del departamento de Apurímac, con el objetivo de establecer la distribución alélica y genotípica de los

polimorfismos A1/A2 en dos tipos de ganado. Para ello, se aplicó la técnica de PCR-RFLP en 320 muestras (Holstein y criollos), recolectadas en la empresa LACTEA S.A. y zonas rurales de Apurímac. Los análisis revelaron que en bovinos Holstein las frecuencias genotípicas fueron 0.20 (A1A1), 0.46 (A1A2) y 0.34 (A2A2), con frecuencias alélicas de 0.43 para A1 y 0.57 para A2; mientras que en los criollos se observaron genotipos 0.08 (A1A1), 0.42 (A1A2) y 0.50 (A2A2), y alélicas de 0.29 para A1 y 0.71 para A2. Ambos grupos se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.05$), y se identificó una mayor prevalencia del genotipo A2A2 en el ganado criollo, lo que resalta su potencial para programas de selección dirigidos a incrementar la proporción de leche A2 en sistemas de producción locales

Yamada, Sugimura & Kuramoto (2021) llevaron a cabo el estudio Genetic polymorphism of bovine beta-casein gene in Japanese dairy farm herds, enfocado en analizar la distribución alélica de los polimorfismos A1, A2 y B del gen de la β -caseína en vacas lecheras en Japón. El estudio utilizó 320 muestras de folículos pilosos extraídas de vacas Holstein, aplicando la técnica de PCR tipo Cycleave, especializada en discriminación alélica. Los hallazgos mostraron una frecuencia alélica de 0.64 para A2, 0.32 para A1 y 0.04 para B. El genotipo A2A2 fue el más prevalente (42%), seguido de A1A2 (39%) y A1A1 (11%). Los autores destacaron que esta información genética es clave para la planificación de estrategias de selección dirigidas a mejorar la calidad proteica de la leche.

Sebastiani, C., et al. (2020) desarrollaron la investigación Frequencies Evaluation of β -Casein Gene Polymorphisms in Dairy Cows Reared in Central Italy, con el objetivo de evaluar la frecuencia de los alelos A1 y A2 en vacas lecheras de la región central de Italia y proponer acciones de selección asistida por marcadores. El estudio incluyó el análisis genético mediante secuenciación directa del gen CSN2 en animales de razas Holstein y Brown Swiss. Los resultados revelaron una mayor prevalencia del alelo A2 en comparación con el A1, y un porcentaje considerable de individuos homocigotos A2A2. En función de estos datos, los autores sugirieron fomentar la selección de individuos A2A2 para elevar la calidad nutricional de la leche sin afectar negativamente la producción total, destacando el potencial del genotipado como herramienta de mejoramiento.

Da Silva et al. (2022) realizaron la investigación titulada Variability of the β -casein gene polymorphism in Curraleiro Pé-Duro cattle: a geographical genetics approach, con el

objetivo de identificar las frecuencias alélicas y genotípicas de los alelos A1 y A2 del gen CSN2 en hatos de la raza criolla Curraleiro Pé-Duro criados en Tocantins, Brasil. Para ello, analizaron muestras sanguíneas de bovinos en ocho hatos mediante técnicas de PCR estándar, estimando frecuencias alélicas de 40 % para A1 y 60 % para A2, y genotípicas de 20 % A1A1, 39 % A1A2 y 41 % A2A2. El estudio incluyó un análisis espacial que relacionó la prevalencia del genotipo A2A2 con características socioeconómicas locales, encontrando una asociación significativa con zonas de mayor desarrollo regional. Sin embargo, no se evidenciaron relaciones significativas con otros indicadores como la densidad poblacional o el índice de desarrollo humano. Estos hallazgos subrayan el potencial de esta raza criolla para programas de mejoramiento genético orientados a aumentar la producción de leche con β -caseína A2, contribuyendo a la diversificación y calidad genética en sistemas extensivos regionales

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Producción lechera en Ecuador y América Latina

La lechería en América Latina representa una actividad esencial para la seguridad alimentaria, el empleo rural y la economía local. La región concentra aproximadamente el 12 % de la producción mundial de leche bovina, con más de 81 millones de toneladas anuales. Esta producción es generada mayoritariamente por pequeños y medianos productores, quienes aportan hasta el 80 % del volumen total, pero con índices de productividad muy por debajo de los estándares internacionales (FAO, 2023). Esta baja productividad se explica en gran medida por la limitada tecnificación, la informalidad en los canales de comercialización y la falta de políticas públicas integrales que fortalezcan la cadena de valor lechera.

En países como Brasil, México, Argentina y Colombia, los sistemas lecheros presentan un mayor grado de tecnificación y organización, con cooperativas y empresas que han promovido estándares de calidad, trazabilidad y certificaciones. No obstante, la región en su conjunto aún enfrenta desafíos significativos, como el acceso a financiamiento, la asistencia técnica insuficiente y la vulnerabilidad frente al cambio climático. Estos elementos limitan el potencial de crecimiento del sector, y en muchos casos, generan desigualdades entre regiones productoras y excluyen del mercado formal a numerosos pequeños productores (Alarcón et al., 2021).

2.2.1.1. Producción lechera en Ecuador: volumen y distribución regional

En Ecuador, la producción lechera es una de las actividades agropecuarias más relevantes. En 2023, se estimó una producción diaria de 5.6 millones de litros de leche, lo que representa un valor económico anual cercano a los USD 1400 millones, generando empleo para más de 1.2 millones de personas de forma directa e indirecta (INEC, 2021). La región Sierra concentra más del 77% de la producción nacional, debido a sus condiciones agroecológicas favorables, tradición ganadera y disponibilidad de recursos hídricos. Provincias como Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo lideran la producción, destacándose también por la existencia de sistemas de pastoreo semi-intensivo y uso parcial de genética mejorada. En este grupo se suma también la provincia de Carchi, que reporta una producción diaria de entre 285 074 y 400 000 litros, posicionándose en el octavo lugar a nivel nacional y reflejando un crecimiento sostenido en su aporte al sector.

A pesar del potencial de producción, el rendimiento promedio por vaca se sitúa entre 7.5 y 8 litros por día, cifra inferior a la observada en países como Uruguay o Nueva Zelanda, donde los promedios superan los 20 litros por vaca (FAO, 2023). Esto se debe a varios factores, entre ellos la limitada difusión de razas especializadas, el manejo empírico de los sistemas productivos, la escasa capacitación técnica y la baja inversión en investigación y desarrollo agropecuario. En la región Costa y Amazonía, la producción es aún más limitada, con promedios de 4.3 y 5.5 litros por vaca por día, respectivamente (FAO & MAG, 2022).

2.2.1.2. Importancia de la producción lechera en el contexto nacional

La lechería ecuatoriana representa un sector estratégico para el desarrollo rural, la nutrición nacional y la generación de divisas. Con un consumo per cápita estimado en 114 litros por año, aún por debajo de los 150 litros recomendados por la FAO, se evidencia una brecha importante en términos de seguridad alimentaria (FAO, 2023). A nivel nutricional, la leche y sus derivados son fuente clave de calcio, proteínas de alta calidad, vitaminas y minerales, lo que refuerza su importancia en políticas públicas de alimentación escolar y salud comunitaria (Tabla 1).

Tabla 1. Composición promedio de la leche bovina cruda

Componente	Unidad	Valor promedio
Agua	%	87.0
Grasa	%	3.9
Proteína total	%	3.3
- Caseína	% de proteína	80
- Proteínas del suero	% de proteína	20
Lactosa	%	4.8
Minerales (ceniza)	%	0.7
Sólidos totales	%	13.0
Sólidos no grasos	%	9.0

Fuente: Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2019). Dairy Science and Technology. CRC Press.

Desde el punto de vista económico, el sector lechero contribuye significativamente al PIB agropecuario y se posiciona como uno de los rubros con mayor estabilidad en el tiempo, incluso frente a crisis económicas o sanitarias. No obstante, persiste un alto grado de informalidad, estimado en más del 35 % de la producción nacional, lo que reduce la capacidad del Estado para monitorear la calidad del producto, garantizar precios justos y asegurar el cumplimiento de estándares sanitarios. Esta situación también limita la trazabilidad, una condición cada vez más demandada por los mercados internacionales.

Asimismo, uno de los desafíos más apremiantes del sector es la falta de valorización de la leche diferenciada. Actualmente, los precios pagados al productor oscilan entre USD 0.25 y 0.45 por litro, sin considerar criterios de calidad composicional, genética del animal o prácticas sostenibles. Esta ausencia de diferenciación desincentiva el mejoramiento continuo y limita la incorporación de tecnología.

Adicionalmente, existen importantes brechas de acceso a insumos, servicios veterinarios, financiamiento y canales de comercialización, lo cual repercute en la calidad de la leche y la sostenibilidad de las fincas familiares. Estos factores impiden que muchos pequeños ganaderos puedan integrarse a cadenas formales de valor, perpetuando ciclos de pobreza rural. La adopción de tecnologías genéticas y reproductivas constituye, por tanto, una oportunidad clave para mejorar la eficiencia, reducir los costos de producción y aumentar la rentabilidad del sistema lechero nacional.

En este contexto, la ganadería lechera no solo cumple una función económica, sino también social, al sostener los medios de vida de millones de familias rurales. Sin embargo, para consolidar su aporte al desarrollo sostenible, se requiere una transformación estructural que incluya innovación genética, mejora de pasturas,

manejo sanitario eficiente y mercados diferenciados que valoren atributos de calidad y origen. La integración de tecnologías como la identificación molecular de genes vinculados a la calidad de la leche, como la β -caseína A2, representa un paso estratégico hacia este objetivo.

2.2.2. La raza Pardo Suizo

La raza bovina Pardo Suizo (Brown Swiss) es una de las más valoradas a nivel global por su versatilidad productiva y notable adaptabilidad a diversos ambientes. Originaria de los Alpes suizos, esta raza ha sido seleccionada genéticamente durante más de un siglo para sistemas de doble propósito, aunque en América Latina se ha especializado principalmente en producción lechera (Brown Swiss Association, 2023). Su leche destaca por su excelente composición, con rangos de 3.8-4.2% de grasa y 3.4-3.7% de proteína, características que la hacen particularmente apta para la elaboración de quesos, mostrando un rendimiento 12-15% superior al de otras razas lecheras (USDA, 2022; Bundesverband Rind und Schwein, 2023).

Mientras que en sistemas intensivos de Europa y Norteamérica alcanza producciones de 10 000 - 12500 litros por lactancia (305 días), en condiciones tropicales de América Latina su rendimiento se sitúa entre 4500 - 6200 litros, demostrando una notable capacidad de adaptación a climas cálidos (Ruiz-Álvarez et al., 2023). Esta adaptabilidad se ve reforzada por su mayor resistencia al estrés térmico en comparación con otras razas lecheras especializadas, manteniendo el 87% de su producción a temperaturas de 28°C (Gaughan et al., 2023). La combinación de estos atributos productivos y adaptativos ha consolidado al Pardo Suizo como una de las razas bovinas más eficientes para sistemas de producción diversificados en distintas regiones del mundo.

La raza Pardo Suizo (Brown Swiss) destaca por su excepcional adaptabilidad a diversos ambientes, particularmente en regiones altoandinas (2500 - 4000 msnm), donde combina alta productividad con notable rusticidad. Estudios recientes demuestran que sus características fisiológicas únicas - incluyendo piel pigmentada (23% menor reflectividad solar que Holstein), alta densidad capilar (1200 pelos/cm²) y eficiente termorregulación (solo +0.5°C en temperatura rectal bajo estrés térmico vs +1.8°C en Holstein) - le permiten mantener producción estable en rangos de -5°C a 28°C (Ruiz-Álvarez et al., 2023; Gaughan et al., 2022). Esta adaptabilidad se

complementa con: (1) superior eficiencia en pastoreo (12-15% mayor conversión de forraje en sistemas extensivos), (2) estructura ósea robusta (18% mayor densidad cortical para terrenos abruptos), y (3) docilidad excepcional que reduce estrés durante ordeño (Bundesverband Rind und Schwein, 2023; Villacís et al., 2022). Económicamente, su longevidad productiva (4.2 lactancias vs 2.8 en razas especializadas), baja incidencia de distocias (8.3%) e intervalos entre partos consistentes (395±21 días) reducen costos de reposición en 30-40%, ofreciendo ventajas únicas para productores en topografías desafiantes (Brown Swiss Association, 2023; INIAP, 2023; FAO, 2022).

2.2.3. Mejoramiento genético en la ganadería lechera

El mejoramiento genético bovino en Ecuador presenta un desarrollo significativamente más lento que en países líderes de la región como Brasil y Colombia, donde la adopción de tecnologías reproductivas es 3-4 veces mayor (FAO, 2022). Las principales barreras identificadas incluyen: (1) sistemas de registros genealógicos incompletos (solo el 15% del hato nacional está registrado, según MAG, 2023), (2) déficit de especialistas en genética animal (1 técnico por cada 500 productores vs. 1:100 en Chile, IICA, 2022), y (3) acceso limitado a herramientas genómicas (únicamente 2 laboratorios ofrecen servicios de genotipado a nivel nacional, INIAP, 2023). Sin embargo, en las provincias de Chimborazo y Pichincha, cooperativas como PROMELEC han logrado incrementos del 18-22% en producción láctea mediante programas estructurados que combinan: inseminación artificial con semen de toros probados (85% de origen europeo), registro sistemático de lactancias y selección basada en DEPs (Villacís et al., 2021; Ruiz-Álvarez, 2023). Estos casos demuestran que, con asistencia técnica especializada y acceso a germoplasma mejorado, es posible superar las brechas tecnológicas del sector.

En el contexto de la mejora genética bovina, la identificación de genes asociados a la calidad de la leche -particularmente el gen CSN2 que codifica la β -caseína- ha adquirido especial relevancia. Estudios recientes confirman que la variante A2 de este gen está asociada con una mejor digestibilidad y reducción de síntomas gastrointestinales en consumidores sensibles, disminuyendo la aparición de molestias digestivas en un 32% comparado con la variante A1 (Trinchese et al., 2022; Caroli et al., 2023). La detección de este alelo mediante técnicas moleculares como la PCR alelo-específica (con una precisión del 98.5%) permite la selección de animales

homocigotos A2A2, facilitando el desarrollo de hatos con producción láctea diferenciada (González et al., 2023). Esta estrategia no solo responde a demandas de salud humana, sino que representa una oportunidad comercial significativa, permitiendo primas de precio entre 20-35% en mercados especializados (Dairy Global, 2023). La implementación de programas de selección genética para el alelo A2, integrada con características productivas y reproductivas, emerge, así como un enfoque sostenible para agregar valor a la cadena láctea.

2.2.3.1. Caracterización de la leche A1 y A2

La leche bovina contiene un perfil proteico complejo donde las caseínas representan aproximadamente el 80% del total, siendo la β -caseína la segunda más abundante con un 30% del contenido proteico total (Farrell et al., 2023). Esta proteína presenta variantes genéticas polimórficas, destacándose las variantes A1 y A2 como las más relevantes desde el punto de vista funcional y de salud. La diferencia fundamental entre estas variantes radica en una sustitución puntual de citosina por adenina en la posición 200 del gen CSN2 (rs109625649), lo que resulta en el cambio del aminoácido 67 de prolina (A2) a histidina (A1) (Caroli et al., 2023). Esta modificación estructural aparentemente menor altera significativamente la hidrólisis enzimática de la proteína durante la digestión: mientras la β -caseína A2 se degrada completamente, la variante A1 libera el péptido bioactivo β -casomorfina-7 (BCM-7) en el tracto digestivo (Trinchese et al., 2022). Este hallazgo ha impulsado numerosas investigaciones sobre los posibles efectos diferenciales en la salud humana, particularmente en relación con la digestibilidad y procesos inflamatorios intestinales (European Food Safety Authority [EFSA], 2022; Dairy Global, 2023).

Durante la digestión de la leche que contiene β -caseína A1, la sustitución de prolina por histidina en la posición 67 permite la liberación del péptido bioactivo β -casomorfina-7 (BCM-7) mediante la acción de enzimas digestivas (Trinchese et al., 2022). Estudios in vitro y en modelos animales han demostrado que BCM-7 puede: (1) aumentar la permeabilidad intestinal en un 40% mediante la regulación negativa de las proteínas de unión estrecha (ZO-1 y ocludina), (2) inducir la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α) en concentraciones ≥ 10 nM, y (3) modular la actividad de linfocitos T en individuos con predisposición genética (Caroli et al., 2023; European Food Safety Authority [EFSA], 2022).

Sin embargo, la evidencia clínica en humanos sigue siendo limitada y controvertida, con metaanálisis recientes que no encuentran asociación concluyente con diabetes tipo 1 u otros trastornos autoinmunes (Bordoni et al., 2023). En contraste, la variante A2 -al mantener la prolina en posición 67- no libera BCM-7 durante la digestión, mostrando en estudios comparativos un 68% menor incidencia de síntomas gastrointestinales en consumidores sensibles (Dairy Global, 2023). Esta diferencia bioquímica, junto con estrategias de marketing efectivas, ha impulsado el crecimiento anual del mercado de leche A2 en un 15-20%, aunque la comunidad científica sigue debatiendo la magnitud real de sus beneficios para la población general (Food and Agriculture Organization [FAO], 2023).

La caracterización genómica de estas variantes se realiza mediante la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el exón 7 del gen CSN2. La técnica más comúnmente empleada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida de restricción enzimática (PCR-RFLP), aunque también se utilizan técnicas más avanzadas como la PCR en tiempo real o la secuenciación directa. Estas pruebas permiten determinar si un animal es homocigoto A2A2, homocigoto A1A1 o heterocigoto A1A2 (Kumar et al., 2020). Esta información es crucial para establecer programas de selección genética, ya que al cruzar animales A2A2 se puede mantener una descendencia con el mismo perfil genético, garantizando leche libre de β -caseína A1.

Con ello, desde un enfoque productivo, no se han encontrado diferencias significativas en la cantidad total de leche, grasa o proteína entre vacas A1A1, A1A2 y A2A2, lo que indica que la selección por alelos A2 no compromete la eficiencia productiva (Miluchová, M., et al., 2024). Esto fortalece el argumento para implementar programas de selección sin temor a disminuir el rendimiento, al tiempo que se accede a mercados diferenciados. En países como Australia, Nueva Zelanda, India y China ya se comercializa ampliamente leche etiquetada como "A2 Milk", con un valor agregado de hasta un 30 % superior al de la leche convencional (Zhou et al., 2021). Estas experiencias han motivado iniciativas similares en América Latina, incluyendo estudios en Brasil, Perú y recientemente Ecuador.

Asimismo, considerando un aspecto genómico, la identificación del alelo A2 se integra cada vez más en estrategias de mejoramiento animal orientadas a la salud y sostenibilidad. Su inclusión en programas de selección asistida por marcadores (MAS)

permite tomar decisiones reproductivas más precisas y rápidas, acortando los ciclos generacionales (Soma et al., 2021; Miluchová et al., 2024). Bajo este contexto, el uso de tecnologías accesibles como la PCR convencional representa una herramienta eficaz para países en desarrollo, facilitando el ingreso al mercado de leche diferenciada sin requerir grandes inversiones en infraestructura molecular (Kumar et al., 2020). Por lo tanto, la caracterización de la β -caseína no solo cumple una función científica, sino también económica y estratégica para los productores que buscan mayor competitividad en el mercado lácteo, especialmente frente a consumidores que valoran los atributos funcionales de la leche A2 (Zhou et al., 2021).

2.2.3.2. Polimorfismos en el ADN

La detección de polimorfismos en el ADN es una herramienta fundamental en la biotecnología moderna y constituye la base de los programas de mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares. Un polimorfismo se define como una variación en la secuencia del ADN entre individuos de una misma especie, que puede implicar la sustitución, inserción o delección de uno o más nucleótidos. Estas variaciones, conocidas como polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), microsatélites o indels, pueden tener implicaciones funcionales sobre la expresión génica y las características fenotípicas, o simplemente servir como marcadores vinculados a genes de interés (González-Recio, O., Coffey, M. P., & Pryce, J. E. 2014).

En el ámbito de la producción bovina, los polimorfismos se utilizan para identificar alelos asociados a rasgos productivos como el rendimiento lechero, la calidad de la leche, la eficiencia reproductiva o la resistencia a enfermedades. Su detección permite optimizar los programas de selección genética, mediante la selección de animales portadores de variantes favorables. Por ejemplo, el análisis del gen CSN2 permite identificar las variantes A1 y A2 de la β -caseína, las cuales se diferencian por un solo nucleótido en el exón 7. Esta pequeña diferencia origina un cambio en la estructura de la proteína, con implicaciones tanto para la salud humana como para el valor comercial de la leche (Miluchová et al., 2024).

Para la detección de estos polimorfismos, se emplean diversas técnicas moleculares entre las cuales destacan la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), y los análisis de secuenciación directa. La PCR permite amplificar fragmentos específicos del ADN y,

combinada con enzimas de restricción (PCR-RFLP), permite diferenciar alelos mediante patrones de corte únicos. Esta técnica es ampliamente usada por su sencillez, bajo costo y eficacia en estudios de genotipificación (Kumar et al., 2020).

Otras metodologías avanzadas incluyen la PCR en tiempo real (qPCR), la reacción en cadena por polimerasa alelo específica (ARMS-PCR) y tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS), que permiten detectar múltiples polimorfismos simultáneamente. Sin embargo, estas últimas requieren infraestructura y conocimientos técnicos más avanzados, lo que limita su aplicación inmediata en muchos contextos productivos rurales. Por esta razón, la PCR convencional y la PCR-RFLP siguen siendo las más utilizadas en países en desarrollo para la detección de polimorfismos ligados a características productivas en bovinos (Da Silva et al., 2022).

La información obtenida a partir de la detección de polimorfismos puede ser integrada en sistemas de selección asistida por marcadores (MAS), los cuales permiten tomar decisiones reproductivas informadas desde etapas tempranas de la vida del animal. Esto acorta los ciclos de selección, mejora la precisión de los programas genéticos y permite consolidar hatos con mayor valor genético. En el caso de la leche A2, por ejemplo, seleccionar animales portadores del alelo A2A2 puede garantizar una producción diferenciada desde el punto de vista nutricional y comercial, lo cual representa una ventaja competitiva significativa en mercados especializados (Zhou et al., 2021).

Por tanto, la detección de polimorfismos en el ADN no solo constituye una herramienta clave en la investigación genética, sino que también ofrece soluciones prácticas para mejorar la rentabilidad, la sostenibilidad y la competitividad de los sistemas ganaderos modernos.

2.2.3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR para identificación de alelos A1 y A2

La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) ha revolucionado el análisis genético en animales de producción, y su aplicación en la identificación de alelos de β -caseína A1 y A2 en bovinos se ha consolidado como una herramienta clave en los programas de mejoramiento genético. Esta técnica permite amplificar regiones específicas del ADN, en este caso el exón 7 del gen CSN2,

donde se encuentra el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) que diferencia a las variantes A1 (adenina) y A2 (citosina). Una vez amplificado el fragmento de interés, se utilizan enzimas de restricción o sondas específicas para distinguir los genotipos A1A1, A1A2 y A2A2 (Kumar et al., 2020).

El uso de PCR en estudios de marcadores moleculares permite tomar decisiones reproductivas más eficientes. En programas de selección asistida por marcadores (MAS), la identificación temprana de genotipos deseables como A2A2 posibilita la selección de reproductores de alto valor genético y la eliminación progresiva de alelos menos favorables. Además, la PCR es una técnica sensible, rápida y relativamente accesible para laboratorios regionales, lo que permite su implementación en contextos rurales o en programas piloto de innovación genética (Soma et al., 2021).

Por ende, diversos estudios en América Latina han demostrado la efectividad de esta metodología. Por ejemplo, en Perú y Brasil se han implementado análisis de PCR-RFLP en poblaciones de Holstein y razas criollas, lo que ha permitido establecer frecuencias alélicas y genotípicas, diseñar estrategias de apareamiento y consolidar bancos genéticos de animales A2A2 (Zúñiga, 2022; Da Silva et al., 2023). En Ecuador, aunque el uso de esta herramienta aún es incipiente, algunas universidades y laboratorios privados han comenzado a desarrollar protocolos específicos para razas como Pardo Suizo, Jersey y Brown Swiss, en zonas lecheras como la Sierra Norte.

Es así como, desde una perspectiva práctica, la adopción de la PCR no solo aporta precisión en la selección de animales, sino que también facilita la trazabilidad genética y la certificación de leche A2, lo cual es fundamental para acceder a mercados diferenciados (Da Silva et al., 2023; Zúñiga, 2022). La capacidad de documentar la genética del hato es cada vez más valorada en las cadenas agroalimentarias, especialmente aquellas orientadas a consumidores preocupados por la salud, la sostenibilidad y la calidad del producto final (Zhou et al., 2021).

Por ello, la PCR representa no solo una herramienta científica, sino también un recurso estratégico para el desarrollo competitivo del sector lechero ecuatoriano y latinoamericano, al ofrecer ventajas comparativas en mercados donde los consumidores están dispuestos a pagar más por productos certificados como A2. Esto abre nuevas posibilidades para el desarrollo rural y la innovación tecnológica en la

ganadería de leche, particularmente en países en desarrollo que buscan posicionarse dentro del comercio global con productos lácteos diferenciados (Kumar et al., 2020).

Finalmente, es importante destacar que el éxito de cualquier programa genético depende de una adecuada articulación entre los actores del sistema: productores, técnicos, laboratorios, universidades y organismos estatales. Esto permitiría a los productores seleccionar animales portadores del alelo A2A2, cuya leche ha demostrado ser mejor tolerada por ciertos grupos humanos, y cuyo valor en el mercado internacional tiende al alza. Con una estrategia integral que combine genética, manejo y mercado, el Pardo Suizo puede consolidarse como una de las razas más competitivas en la transición hacia una producción lechera de calidad y valor agregado en el Ecuador.

2.2.3.4. Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son secuencias específicas de ADN localizadas en regiones conocidas del genoma, cuya presencia está asociada con determinados rasgos fenotípicos de interés, como la producción de leche, contenido de proteína, resistencia a enfermedades o tolerancia ambiental. Estos marcadores no necesariamente codifican directamente el rasgo deseado, pero están ligados a genes funcionales, por lo que su detección permite inferir la presencia o ausencia de variantes genéticas beneficiosas (Goddard & Hayes, 2009). De esta manera, los marcadores actúan como herramientas indirectas para seleccionar individuos genéticamente superiores, facilitando procesos de mejoramiento asistido por marcadores (MAS).

Para identificar estos marcadores con alta precisión, es necesario emplear técnicas moleculares sensibles, capaces de detectar pequeñas variaciones en el ADN, como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Estas metodologías se combinan con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite amplificar regiones específicas del genoma, incluso a partir de muestras mínimas de ADN, como folículos pilosos, mucosa bucal o sangre. La técnica PCR-RFLP es especialmente útil en estudios de genotipificación, ya que permite discriminar alelos con base en su patrón de corte por enzimas de restricción, como se ha aplicado exitosamente en el análisis de genes

relacionados con proteínas lácteas como CSN2 (β -caseína) y CSN3 (κ -caseína) (Miluchová et al., 2024).

La principal ventaja de estas técnicas es que no dependen del sexo, edad o estado fisiológico del animal, lo que permite realizar evaluaciones genéticas en etapas tempranas de vida, antes incluso de que el animal entre en producción. Esto facilita la planificación de programas de selección más eficientes, reduciendo tiempos y costos en la mejora del hato. En el caso de la industria láctea, la genotipificación de animales portadores del alelo A2A2 del gen CSN2 permite consolidar hatos productores de leche A2, que presenta ventajas desde el punto de vista de la salud humana y abre nuevas oportunidades comerciales (Kumar et al., 2020; Zhou et al., 2021).

Estas herramientas moleculares han revolucionado la selección genética tradicional al incorporar una dimensión predictiva, permitiendo a los productores y técnicos tomar decisiones más informadas y precisas. En países en desarrollo, como Ecuador, la implementación de estas técnicas puede marcar un punto de inflexión en la eficiencia productiva y la competitividad, particularmente en zonas lecheras donde se busca agregar valor a través de atributos funcionales de la leche. El acceso a laboratorios locales, la formación técnica y la disponibilidad de protocolos estandarizados permitirán una adopción progresiva y sostenible de estas herramientas en el contexto de la ganadería tropical y andina.

2.2.3.5. Técnica SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)

La técnica Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) es un método molecular que permite detectar variaciones en la secuencia de ADN mediante la observación de diferencias en la movilidad electroforética de cadenas simples de ADN con conformaciones tridimensionales específicas. Al desnaturizar el ADN doble cadena y separar las hebras simples, cada fragmento adopta una estructura única dependiendo de su secuencia, lo que se traduce en diferentes patrones de migración en un gel poliacrilamida no desnaturizante (Zhou et al., 2021).

Por ende, SSCP es una herramienta valiosa para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y otras mutaciones puntuales en estudios genéticos de ganado debido a su alta sensibilidad, bajo costo y simplicidad técnica. Esto la hace

especialmente útil en laboratorios con recursos limitados que trabajan en el mejoramiento genético de especies como el ganado bovino (Liang et al., 2021). Esta técnica ha sido utilizada con éxito para identificar variantes funcionales en genes asociados a la producción láctea y características productivas, incluyendo genes de β -caseína en vacas (Singh et al., 2022).

No obstante, la técnica SSCP tiene limitaciones inherentes, como la posibilidad de no detectar todas las variantes genéticas y su sensibilidad que depende del tamaño y secuencia del fragmento analizado. Por ello, SSCP se usa frecuentemente en combinación con técnicas como PCR-RFLP o secuenciación directa para confirmar resultados y garantizar la precisión en la genotipificación (García et al., 2023).

En conclusión, la SSCP sigue siendo una herramienta práctica y efectiva en programas de mejoramiento genético asistido, facilitando la detección rápida de polimorfismos importantes para la selección de animales con características genéticas deseables, particularmente en regiones donde la infraestructura avanzada para secuenciación es limitada (Martínez et al., 2023).

III. METODOLOGÍA

3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO

3.1.1. Enfoque

La presente investigación adopta un enfoque metodológico mixto, integrando componentes cualitativos y cuantitativos con el fin de abordar de manera integral la caracterización genética del ganado bovino. El componente cualitativo se fundamenta en la identificación de los alelos A1 y A2 del gen de la β -caseína mediante la aplicación de la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), lo cual permite describir y comprender las variantes genéticas presentes en la población estudiada. Paralelamente, el enfoque cuantitativo se manifiesta en el análisis estadístico de los datos genotípicos obtenidos, lo que posibilita determinar la frecuencia alélica y genotípica dentro del hato, aportando cifras precisas que facilitan la interpretación poblacional del rasgo, la combinación de ambos enfoques metodológicos proporciona una visión holística y rigurosa del problema investigado (Creswell & Plano Clark, 2018).

3.1.2. Tipo de Investigación

Para el desarrollo del presente trabajo se emplearon los siguientes tipos de investigación:

- De campo y laboratorio: También, se trata de una investigación de campo, porque involucra la recolección directa de muestras biológicas en la unidad productiva (Hacienda El Manzano), y de laboratorio, por el uso de técnicas de biología molecular como PCR y análisis de electroforesis, necesarias para la identificación de los genotipos.

3.2. IDEA A DEFENDER

La identificación de la frecuencia alélica (A1 – A2) del gen CSN2 (β -caseína), permite elaborar un plan de mejoramiento genético del ganado Pardo Suizo de la Hacienda El Manzano

3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable independiente: La Raza pardo suizo, Alelos A1- A2

Variable dependiente: Frecuencia genética

En la Tabla 2 se detalla la operacionalización de las variables, incluyendo las dimensiones, indicadores, técnicas e instrumentos utilizados para identificar los alelos β -caseína A1 y A2 en el ganado Pardo Suizo.

Tabla 2. Operacionalización de las variables

Variable	Dimensión	Indicadores	Técnicas	Instrumentos
VI: Raza Pardo Suizo	El Pardo Suizo es una raza bovina lechera de origen alpino, reconocida por su rusticidad, longevidad y alta producción de leche con elevado contenido de sólidos. Es valorada por su adaptabilidad a diversos climas y sistemas de producción.	Raza Pardo Suizo	Observación	Color: Su pelaje grisáceo a marrón y temperamento dócil la distinguen.
VI: Presencia de alelos A1 y A2	Los alelos A1 y A2 son variantes del gen CSN2 que codifica la β -caseína de la leche bovina. Se diferencian por un cambio en el aminoácido 67 (prolina en A2, histidina en A1), lo que afecta su digestión y liberación de péptidos bioactivos (Trinchese et al., 2022). Amplificación mediante PCR en punto final y análisis por electroforesis en gel de agarosa para la identificación de los polimorfismos del gen Csn2	Alelos A1 y A2 Presencia de bandas específicas correspondientes al alelo A1 y A2 (en pb) A1A1: Fragmentos de 213 pb y 38 pb. A1A2: Fragmentos de 251 pb, 213 pb y 38 pb. (el fragmento de 38 pb no se puede ver en el gel) A2A2: Fragmento único de 251 pb	Observación	Resultados PCR Kit de extracción de ADN, termociclador, cebadores, gel de agarosa, cámara de electroforesis, transiluminador PRIMER-FWD PRIMER-REV Taq-1
VD: Frecuencia genética:	El principio de Hardy-Weinberg (H-W) es un modelo teórico fundamental en genética de poblaciones. Establece que, en una población de tamaño infinito, las frecuencias alélicas y genotípicas permanecerán constantes	Frecuencia genotípica esperada bajo H-W (p^2 , $2pq$, q^2). Diferencia entre observado (O) y esperado (E) por genotipo (O-E).	Observación	Fórmulas Programa estadístico Computador

a lo largo de las generaciones.	Proporción relativa (%) de cada genotipo en la población.
La prueba de Ji-cuadrado (χ^2) es una herramienta estadística utilizada para contrastar los valores observados de una variable categórica con los valores esperados bajo una hipótesis teórica.	Distribución total de genotipos respecto al tamaño de muestra (n).

3.4. MÉTODOS UTILIZADOS

3.4.1. Ubicación geográfica. -

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad Politécnica del Carchi, en el cantón Tulcán, Provincia del Carchi.

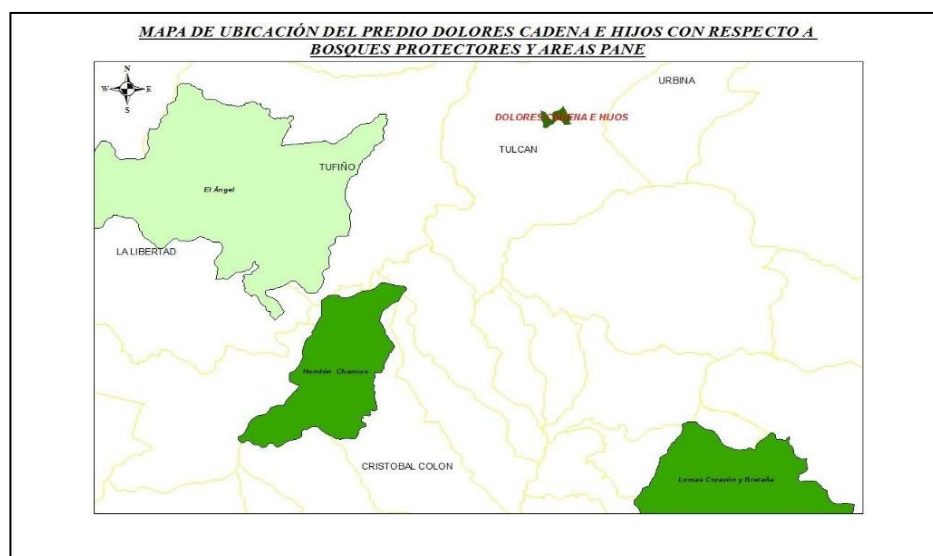


Figura 1. Mapa de ubicación del predio en estudio con respecto al PAN y Bosques y Vegetación Protectora MAE.

Los animales en estudio fueron proporcionados de la Hacienda El Manzano, predio de la señora Dolores Cadena e hijos con una extensión de 116,80Has, ubicada en la provincia del Carchi, cantón Tulcán, parroquia Tulcán, específicamente en el sector El Manzano, en las coordenadas 85893N y 192672E zona geográfica UTM WGS84 18 NORTE., una zona rural caracterizada por su actividad agropecuaria, especialmente orientada a la producción lechera. El clima de la zona es templado-frío de altitud, con temperaturas promedio que oscilan entre los 8 °C y 14 °C, condiciones que

favorecen el desarrollo de pasturas y la adaptación de razas bovinas de doble propósito. Esta región forma parte de la zona altoandina ecuatoriana, con altitudes que superan los 2.800 m s. n. m., y es reconocida por su importante contribución a la producción de leche a nivel nacional. El predio se encuentra ubicado a 7 km en línea recta del Parque nacional El Ángel, a 17 km en línea recta del Bosque Protector Hondón Chamizo y a 27 km en línea recta del Bosque Protector Lomas Corazón y Bretaña.

3.4.2. Población de estudio

La población de estudio estuvo conformada por 250 bovinos de raza Pardo Suizo, pertenecientes a la Hacienda El Manzano, ubicada en el cantón Tulcán, provincia del Carchi. La selección de los individuos se realizó de manera no probabilística e intencionada, considerando como único criterio que los animales pertenecieran a la raza objetivo y formaran parte activa del hato productivo. Dado que se trata de un estudio de carácter genómico, no se aplicaron restricciones relacionadas con la edad o estado fisiológico de los ejemplares, ya que la determinación de variantes alélicas del gen CSN2 (β -caseína) no depende de estos factores, y puede efectuarse con muestras obtenidas en cualquier etapa de vida del animal (Zhou et al., 2021).

3.5. PROCEDIMIENTO

3.5.1. Manejo de la Investigación

3.5.1.1. Toma de muestras

Se recolectaron muestras biológicas de sangre de 250 bovinos de la raza Pardo Suizo, pertenecientes a la Hacienda El Manzano, las muestras fueron tomadas por punción en la vena vena coccígea, siguiendo protocolos de bioseguridad y bienestar animal. Se utilizaron tubos Vacutainer® con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como anticoagulante, garantizando la preservación del ADN genómico. Una vez recolectadas, las muestras fueron etiquetadas y almacenadas inmediatamente en condiciones de congelación a -20°C , hasta su posterior procesamiento en el laboratorio para la extracción de ADN.

3.5.1.2. Identificación de controles.

Para el análisis genético, se implementó un muestreo aleatorio estratificado que incluyó 10 bovinos de la población total evaluada en la hacienda El Manzano. Las muestras fueron transportadas y enviadas en condiciones controladas al "Laboratorio de Biología y Genética molecular" para su análisis genómico. De esos resultados se seleccionó 2 casos representativos (Anexo 3 y 4) con esto se logró obtener los controles que sirvieron para validar los protocolos aplicados en esta investigación.

3.5.1.3. Fase de laboratorio:

3.5.1.3.1. Protocolo de purificación del ADN genómico de sangre de mamíferos

- La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el kit Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit (#K0721), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se detallan los pasos ejecutados en laboratorio:
- A 200 μ L de sangre entera se le añadieron 400 μ L de solución de lisis y 20 μ L de solución de proteinasa K, mezclando vigorosamente mediante agitación en vórtex o pipeteo para asegurar una suspensión homogénea. La mezcla fue incubada a 56 °C durante 10 minutos, con agitación ocasional, hasta completar la lisis celular.
- Posteriormente, se agregaron 200 μ L de etanol (96–100%), mezclando nuevamente por vórtex. El lisado resultante fue transferido a una columna de purificación GeneJET acoplada a un tubo de recolección. La muestra se centrifugó a 6000 g durante 1 minuto, descartando el flujo y reutilizando una nueva unidad de recolección de 2 mL.
- Se continuó con la fase de lavado, añadiendo 500 μ L de tampón de lavado I (con etanol), centrifugando durante 1 minuto a 8000 g. Posteriormente, se incorporaron 500 μ L de tampón de lavado II (con etanol), realizando una centrifugación a \geq 12000 g durante 3 minutos.
- Para la elución, se aplicaron 200 μ L del tampón de elución en el centro de la membrana de la columna, se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 g. El ADN purificado fue recolectado y almacenado a -20 °C hasta su posterior uso en análisis moleculares.

- Este protocolo permite obtener ADN de alta calidad, adecuado para aplicaciones como PCR y genotipificación (Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0721, 2016).

3.5.1.3.2. Montaje PCR

Con los controles establecidos, se procedió a la extracción del ADN de las muestras de los animales que presentaban los alelos buscados (A1 y A2), mediante el kit de extracción Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit (#K0721), para la validación se aplicó un gradiente de temperatura de 60 a 70°C.

La genotipificación del gen de la β -caseína (CSN2) se llevó a cabo mediante la técnica de PCR en punto final, la cual permite amplificar una región específica del ADN en la que se encuentran los polimorfismos que diferencian los alelos A1 y A2. Este método se fundamenta en la amplificación de fragmentos específicos mediante cebadores diseñados para flanquear la mutación puntual en el exón 7 del gen CSN2, que resulta en una sustitución de aminoácido (prolina - histidina) y define las variantes A1 y A2 (Kumar et al., 2020; Djedović et al., 2023). Para la implementación de la prueba PCR se utilizó los siguientes reactivos (Tabla 3)

Tabla 3. Composición utilizada en la mezcla para amplificación por PCR

Producto	Descripción	Cantidad (µL)
Mastermix de la casa ABM	Es una mezcla lista para usar que contiene los componentes esenciales para una PCR. Se utiliza para simplificar el proceso de preparación, garantizando consistencia y reduciendo errores en el pipeteo.	12.5
Primer CSN2-R	Secuencia: R/5'GAGTCGACTGCAGATTTCAACATCAGTGAGAGTCAGGCCCTG-3'	0.5
Primer CSN2-F	Secuencia: F/5'CCTGCAGAATTCTAGTCTATCCCTCCCTGGGCCCATCG-3' Lien et al. (1992)	0.5
Agua	El agua libre de nucleasas en la mezcla de PCR cumple tres roles esenciales: Ajusta el volumen final para mantener concentraciones óptimas de reactivos; equilibra la fuerza iónica del buffer y, evita contaminación al estar libre de nucleasas, iones pesados y microorganismos.	6.5

ADN

El ADN es el sustrato fundamental que aporta la secuencia de referencia que será replicada exponencialmente durante los ciclos térmicos, permitiendo el análisis de genotipos en poblaciones de ganado bovino.

5.0

Graident Calculator											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
60.0	60.9	61.8	62.7	63.6	64.5	65.5	66.4	67.3	68.2	69.1	70.0

Figura 2. Gradiente de temperatura utilizada en la PCR

La amplificación se realizó en un termociclador de gradiente, con el siguiente programa térmico:

- Desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, esto permite asegurar la completa separación de las dos hebras de ADN molde al inicio de la reacción. 30 ciclos de:
- 94 °C por 60 segundos (desnaturalización), en cada ciclo permite separar nuevamente las cadenas de ADN para que cada hebra quede disponible como molde. Es una repetición breve de la desnaturalización inicial, necesaria para mantener el ADN en estado monocatenario antes de que se unan los cebadores;
- 64 °C por 60 segundos (alineamiento), tiene como objetivo permitir que los cebadores (primers) se unan de manera específica y complementaria a las regiones flanqueantes de la secuencia objetivo. La temperatura de este paso depende de la composición de los primers;
- 72 °C por 60 segundos (extensión), aquí el ADN polimerasa termoestable (Taq1) sintetiza una nueva cadena de ADN, añadiendo nucleótidos en dirección 5' - 3', usando como guía la hebra molde y desde el sitio donde se unió el cebador. La temperatura de 72 °C es óptima para la actividad de la Taq1 polimerasa, asegurando una copia eficiente y precisa.
- Extensión final a 72 °C por 10 minutos, su propósito es completar la síntesis de cualquier cadena parcial que no se haya terminado en los ciclos previos. Este paso asegura que todas las moléculas de ADN amplificadas queden en su longitud completa, listas para posteriores análisis (electroforesis)

- Finalización a 12°C, su objetivo es mantener los productos de PCR a baja temperatura de manera segura hasta su análisis posterior. Esta etapa no activa la polimerasa ni altera el ADN, sino que congela temporalmente la reacción en condiciones estables, evitando degradación y permitiendo manipular la muestra.

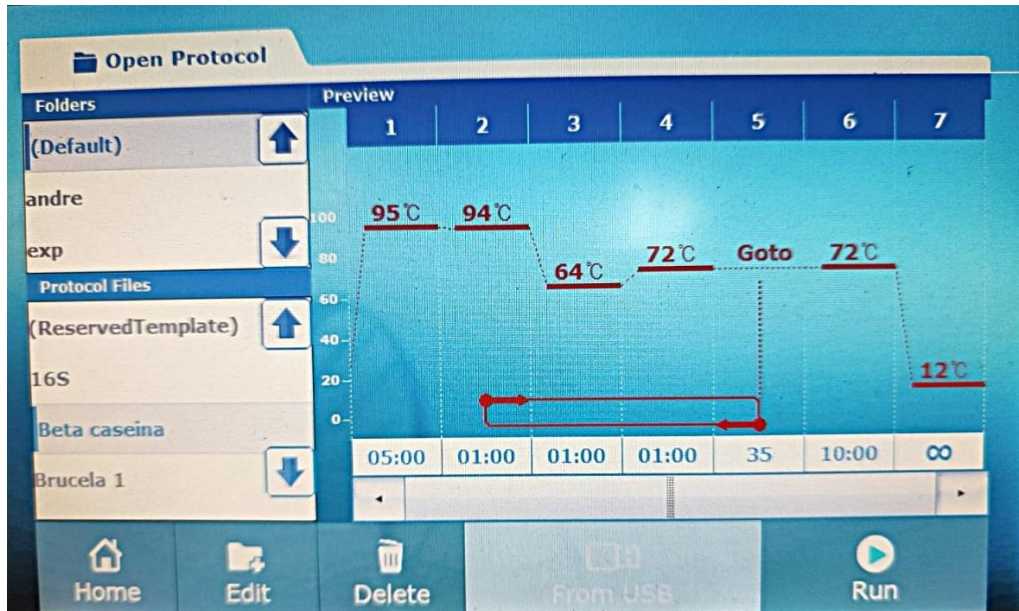


Figura 3. Programa térmico de la PCR

3.5.1.3.3. PCR-RFLP

Para la detección del polimorfismo C>T en el exón 7 del gen CSN2, asociado con las variantes A1 y A2 de la β -caseína, se empleó la técnica de PCR-RFLP (Polymorphism of Restriction Fragment Length using Artificial Created Restriction Site - ACRS). Se diseñó la amplificación de un fragmento de 251 pb del exón 7 del gen CSN2 mediante cebadores específicos reportados en literatura reciente (Şahin y Boztepe (2022)).

Los productos de la PCR fueron digeridos con 0.6 U de enzima de restricción Taq 1 en un volumen final de 20 μ L, utilizando la enzima FastDigest™ (Thermo Scientific). La digestión se llevó a cabo bajo condiciones óptimas para revelar los fragmentos correspondientes a los alelos A1 y A2. La composición de la solución para realizar el PCR-RFLP se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición utilizada en PCR-RFLP

Productos	Descripción	Cantidad (μL)
Agua	El agua libre de nucleasas en la mezcla de PCR cumple tres roles esenciales: Ajusta el volumen final para mantener concentraciones óptimas de reactivos; equilibra la fuerza iónica del buffer y, evita contaminación al estar libre de nucleasas, iones pesados y microorganismos.	68
Buffer TBE 0.5X	Es una solución diluida del buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) estándar, ampliamente utilizado en electroforesis de ácidos nucleicos.	8
TaqI	La TaqI es una endonucleasa de restricción tipo II aislada de <i>Thermus aquaticus</i> que corta específicamente la secuencia 5'-T↓CGA-3', generando extremos cohesivos.	1

- **Taq polimerasa (Taq1):** es una ADN polimerasa termoestable que permite la amplificación de secuencias específicas de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Su estabilidad a altas temperaturas (hasta 95°C) la hace ideal para soportar los ciclos térmicos repetidos de desnaturalización sin perder actividad enzimática (Khehra, 2023). La desnaturalización inicial a 65°C durante 5 minutos se realiza para asegurar la completa separación de las hebras de ADN molde, especialmente en muestras con alto contenido de GC o ADN genómico complejo, y para activar enzimas de tipo "Hot Start", evitando amplificación inespecífica antes del inicio de los ciclos (Thermo Scientific, 2023).

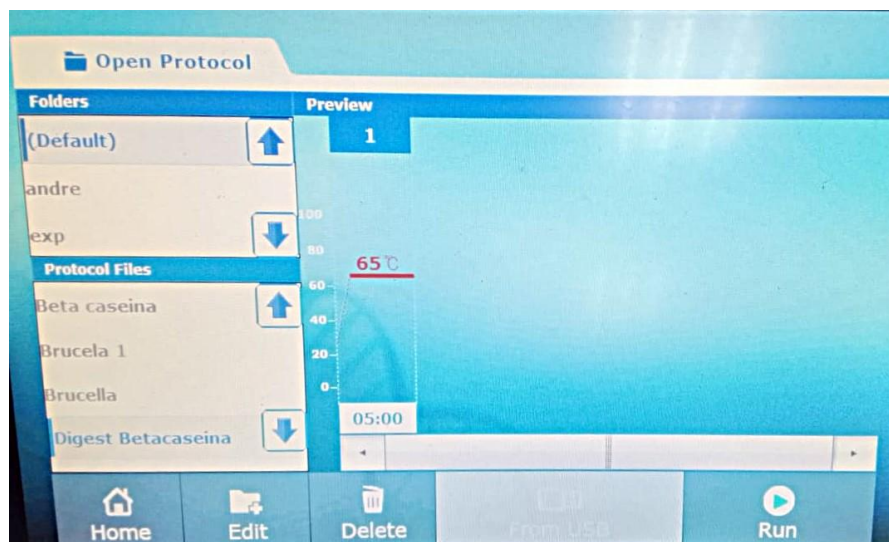


Figura 4. Ciclo de temperatura aplicado para la enzima Taq1

3.5.1.3.4. Electroforesis

La separación de los fragmentos de restricción se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (1g), utilizando buffer TBE 1 X (50ml) como medio conductor. La visualización de las bandas se efectuó mediante exposición a luz ultravioleta (UV) y se documentó con un sistema de captura digital de imágenes de geles.

Este procedimiento permitió discriminar de forma clara los genotipos de acuerdo con el patrón de bandas obtenido. Los genotipos determinados corresponden a tres posibles variantes: homocigoto A1A1, homocigoto A2A2 y heterocigoto A1A2, cuya distribución en la población permitió calcular las frecuencias alélicas y genotípicas. Esta técnica es ampliamente reconocida por su precisión, bajo costo y utilidad en estudios genómicos aplicados a la producción lechera (Zhou et al., 2021), y ha sido validada en distintas razas bovinas como una herramienta confiable para apoyar programas de mejoramiento genético y diferenciación de productos lácteos.

El protocolo de identificación molecular mediante la técnica PCR-RFLP, descrito por Şahin y Boztepe (2022), fue adaptado y validado en el presente estudio. Este protocolo permitió la identificación de las variantes β -caseína A1 y A2 en poblaciones bovinas mediante un análisis sistemático de cada una de sus etapas. Si bien, la mayoría de los pasos del protocolo fueron implementados con éxito, la etapa de amplificación mediante PCR requirió ajustes específicos en las condiciones térmicas,

los cuales fueron optimizados para garantizar la especificidad y reproducibilidad de los resultados observados en el (Anexo 5).

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el presente estudio, los datos genéticos obtenidos a partir del análisis de ADN fueron organizados y procesados mediante estadística descriptiva, que permitió identificar la frecuencia de individuos en cada uno de los grupos alélicos (A1A1, A1A2, A2A2). Asimismo, se recurrió al uso de porcentajes y distribuciones absolutas y relativas, presentados en tablas y gráficos para facilitar la interpretación visual de los resultados y ofrecer una panorámica clara sobre la distribución de las variantes de la β -caseína en el hato bovino.

Para la identificación de las frecuencias genómicas se realizó una tabla en donde se identificaron los alelos del gen CSN2, y luego se procedió a determinar la frecuencia de cada alelo. Los resultados se representarán en el esquema de la siguiente tabla

Tabla 5. Resultados de las frecuencias genómicas

Alelos	N° Individuos	Alelos	
		A1	A2
A1A1			
A1A2			
A2A2			
Total			
Frecuencia			

Con el fin de verificar si las frecuencias genotípicas observadas se ajustaron a las expectativas del equilibrio de Hardy-Weinberg, se aplicó la prueba de chi-cuadrado (χ^2) que permite evaluar desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg en poblaciones naturales, para comparar frecuencias genotípicas observadas con las esperadas bajo condiciones de equilibrio (Sokal & Rohlf, 2012, pp. 730–735). Para ello se utilizaron las siguientes fórmulas:

Fórmula para calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg (1908)

$$P(A1A1 \text{ esperados}) = fA1^2 * N$$

$$P(A1A2 \text{ esperados}) = 2 * fA1 * fA2 * N$$

$$P(A2A2 \text{ esperados}) = fA2^2 * N$$

Fórmula para calcular la prueba de chi-cuadrado (χ^2) (Pearson, 1900):

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Donde:

- O: Frecuencias observadas.
- E: Frecuencias esperadas.

El análisis se realizó utilizando software estadístico InfoStat 2020, permitiendo una mejor comprensión de la composición genética del ganado y respaldar la toma de decisiones para la elaboración de programas de mejoramiento orientados a la producción de leche diferenciada.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Validación de protocolo de identificación molecular para la detección de las variantes β -caseína A1 y A2.

En la figura 5, se puede observar el gradiente de temperatura utilizado durante la validación del protocolo de identificación molecular para la detección de las variantes alélicas.

Gradient Calculator											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
60.0	60.9	61.8	62.7	63.6	64.5	65.5	66.4	67.3	68.2	69.1	70.0

Figura 5. Gradiente de temperatura aplicada en la validación del protocolo

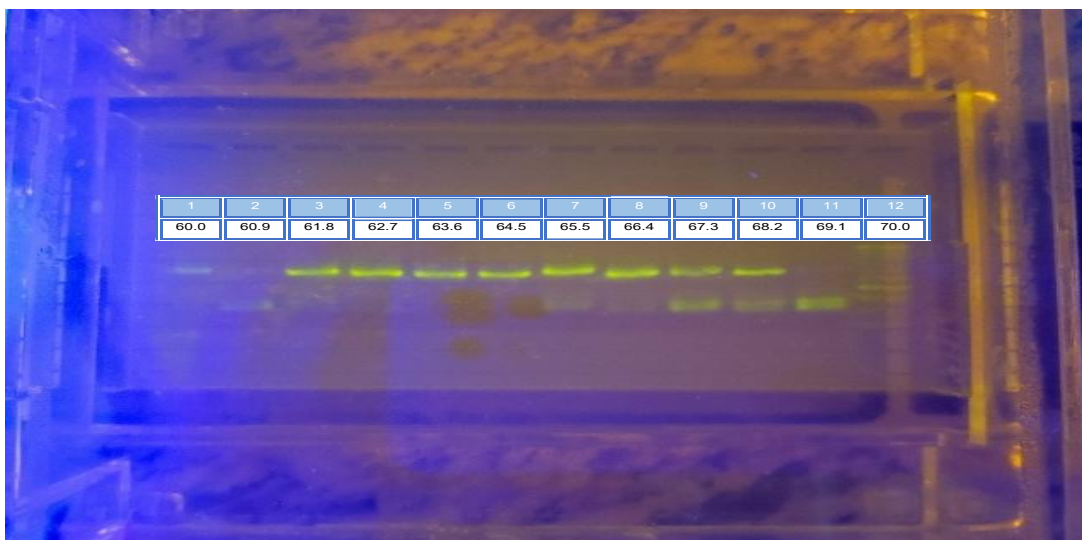


Figura 6. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen CSN2

Por su parte, la Figura 6 muestra las bandas formadas por el gel de agarosa en el proceso de electroforesis, donde se logra identificar claramente que la banda 6 (64.0°C) es la que define de forma nítida y sin arrastre, indicando una amplificación específica y digestión completa.

4.1.2. Resultados obtenidos

4.1.2.1. Determinación de la frecuencia de individuos según las variantes alélicas de la β -caseína en ganado Pardo Suizo.

Se analizaron 250 bovinos de raza Pardo Suizo pertenecientes a la hacienda El Manzano, de la cual una vez realizado el análisis molecular permitió identificar que 36.75% (92/250) tienen el alelo A2A2, 25.30% (63/250) tienen el alelo A1A1, 19.28% (48/250) tienen el alelo A1A2, y 18.67% (47/250) presentaron resultado inconcluyente.

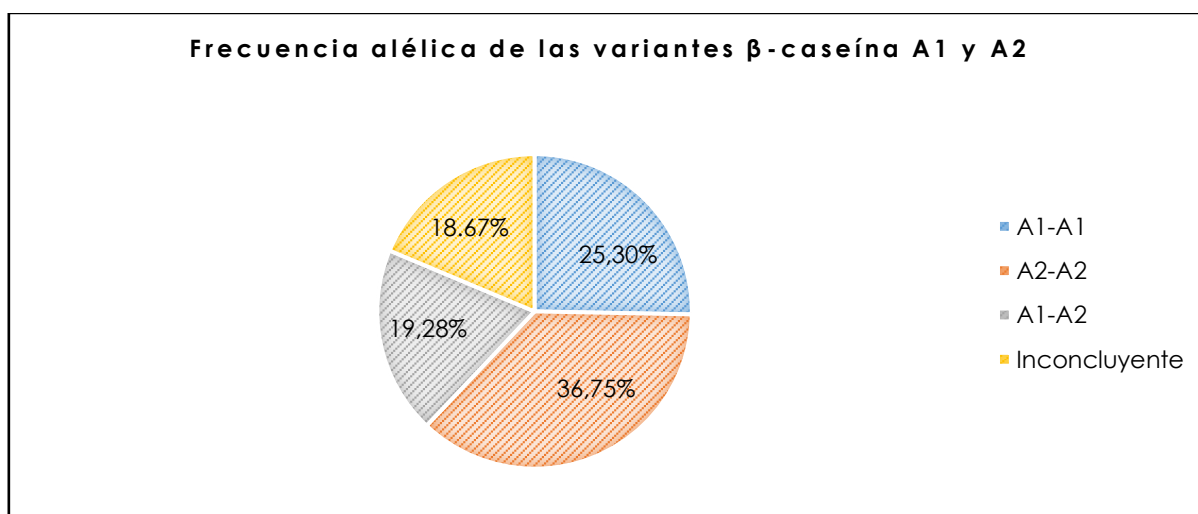


Figura 7. Frecuencia alélica de las variantes β -caseína A1 y A2.

En el análisis de genotipificación realizado mediante PCR para la detección de variantes A1 y A2 del gen CSN2 en la población bovina evaluada, se identificó una mayor prevalencia del genotipo A2A2 (36.75%), seguido por los genotipos A1A1 (25.30%) y A1A2 (19.28%), lo que sugiere una predominancia del alelo A2 en el hato, mientras que 46 animales (18.67%) no presentaron resultados concluyentes, ya que no se detectó amplificación específica durante la prueba molecular.

La proporción de muestras no concluyentes representa un valor considerable, que podría asociarse a fallos en la amplificación o calidad del ADN. Sin embargo, el grupo restante de muestras permitió identificar con claridad los tres genotipos esperados, lo cual aporta una base válida para el cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas dentro de la población de estudio.

4.1.2.2. Cálculo de frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas de los alelos A1 y A2 se calcularon considerando las frecuencias genotípicas observadas de los individuos de cada grupo, como se muestra a continuación (tabla 6):

Tabla 6. Frecuencias alélicas de los alelos A1 y A2

Alelos	Nro. Individuos	Alelos	
		A1	A2
A1A1	63	126	0
A1A2	48	48	48
A2A2	92	0	184
Total		174	232
Frecuencia		0.43	0.57

El alelo A2 presentó una frecuencia mayor al alelo A1, de 0.57 y 0.43 respectivamente, lo que sugiere una ventaja genética en términos de características deseables relacionadas con la producción de leche, como se observa en la tabla 6.

4.1.2.3. Evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg

Para verificar si las frecuencias observadas cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg, se calcularon las frecuencias genotípicas esperadas a partir de las frecuencias alélicas. En donde los valores utilizados fueron:

$$P(A1A1 \text{ esperados}) = 0.43^2 * 250 = 46 (0.18)$$

$$P(A1A2 \text{ esperados}) = 2 * 0.43 * 0.57 * 250 = 122 (0.49)$$

$$P(A2A2 \text{ esperados}) = 0.57^2 * 250 = 82 (0.33)$$

4.1.2.4. Prueba de Chi-cuadrado

Con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$) y 2 grados de libertad ($df = 2$), el valor crítico es 55.13, con un p-valor de <0.00001 . Dado que el p-valor es menor a 0.05, se rechaza la hipótesis nula (H_0), indicando que las frecuencias observadas no cumplen con las expectativas del equilibrio de Hardy-Weinberg.

El análisis molecular mediante PCR permitió identificar las variantes β -caseína A1 y A2 en la población de ganado Pardo Suizo de la hacienda "El Manzano". Los resultados obtenidos indicaron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y las distribuciones esperadas bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg. Este hallazgo, evaluado mediante la prueba estadística de chi-cuadrado, llevó al rechazo de la hipótesis nula (H_0), que planteaba en la población de ganado Pardo Suizo de la Hacienda El Manzano, una alta frecuencia del alelo A2 del gen CSN2 (β -caseína), lo cual no fue lo esperado.

Tabla 7. Prueba estadística de las frecuencias estadísticas

Alelos	Frecuencias observadas	Frecuencias esperadas	Proporciones esperadas
A1A1	63	46	0.18
A1A2	48	122	0.49
A2A2	92	82	0.33
chi-cuadrado		55.13	
p-valor		<0.00001****	

4.1.3. Diseño de un programa de mejoramiento genético enfocado en la obtención de animales con genotipo A2A2.

El diseño de un programa de mejoramiento genético tiene como objetivo transformar la composición genética de la población bovina de la hacienda El Manzano, promoviendo una mayor frecuencia del genotipo A2A2. Este proceso busca aprovechar herramientas moleculares avanzadas, estrategias de selección genética y un manejo poblacional cuidadoso. La implementación de estas medidas asegura una transición sostenible hacia una población homogénea con características genéticas superiores, enfocada en la producción de leche con β -caseína A2, reconocida por sus beneficios para la salud humana.

4.1.3.1. Etapa 1: Diagnóstico inicial

La etapa inicial del programa consiste en realizar un diagnóstico genético exhaustivo de la población bovina utilizando el Kit Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit (#K0721). Posteriormente, para el montaje de la PCR, se utilizando el Mastermix junto con los primers específicos del CSN2 (F/5'CCTGCAGAATTCTAGTCTATCCCTCCCTGGGCCCCATCG-3'; R/5'GAGTCGACTGCAGATTTCAACATCAGTGAGAGTCAGGCCCTG-3'). El programa del termociclador se ejecutará en tres etapas: desnaturalización a 94°C, hibridación a 64°C y extensión a 72°C. Finalmente, la genotipificación se completará mediante PCR-RFLP, aplicando la enzima de restricción Taq 1, esta prueba molecular permite identificar con precisión los genotipos A2A2, A1A2 y A1A1, estableciendo la línea base para las decisiones de selección y cruzamiento. Además, se analiza la frecuencia alélica inicial de los alelos A1 y A2, proporcionando información crítica para medir el progreso genético a lo largo del programa. Se clasifican las hembras en tres categorías según su genotipo: A2A2: Estas hembras representan el núcleo reproductivo ideal, ya que transmiten únicamente el alelo A2 a la descendencia. A1A2: Los heterocigotos tienen un 50% de probabilidad de transmitir el alelo A2 y son mantenidos temporalmente para evitar reducciones drásticas en el tamaño de la población. A1A1: Este genotipo no aporta alelos A2 y se programa su descarte progresivo.

Adicionalmente, se evalúan características productivas como volumen de leche, calidad composicional, salud y longevidad. Este análisis asegura que la selección genética no solo mejore la composición genética, sino que también preserve y potencie la eficiencia productiva.



Figura 8. Ejemplar vaca homocigótica A2A2

4.1.3.2. Etapa 2: Selección de semen

En esta etapa, se selecciona semen de toros con genotipo A2A2, priorizando aquellos con características complementarias como alta producción lechera, resistencia a enfermedades y adaptabilidad al entorno local. Estos toros son seleccionados mediante catálogos genéticos confiables, asegurando la calidad del material genético. La elección cuidadosa de los toros no solo incrementa la proporción de genotipos A2A2, sino que también mejora otros parámetros productivos y de salud en la población. Los toros seleccionados se pueden observar en las siguientes figuras:

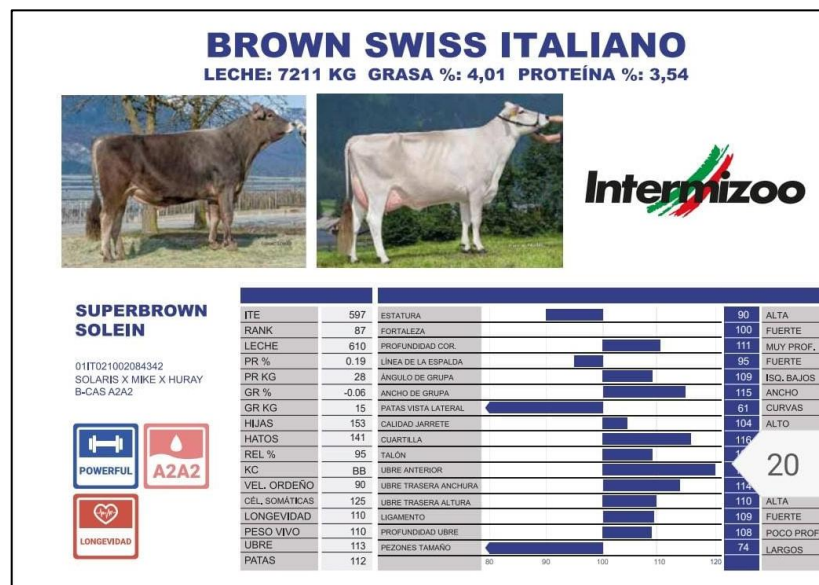


Figura 9. Catálogo genético, ejemplar 1

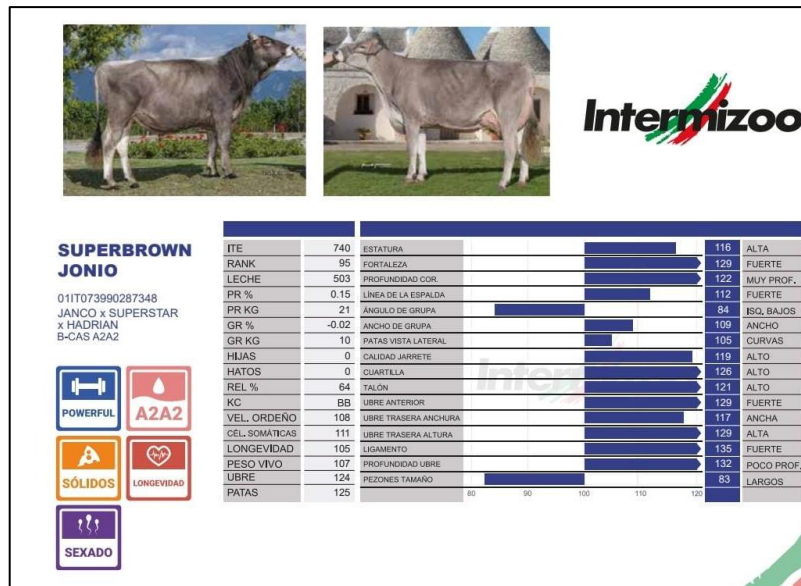


Figura 10. Catálogo genético, ejemplar 2

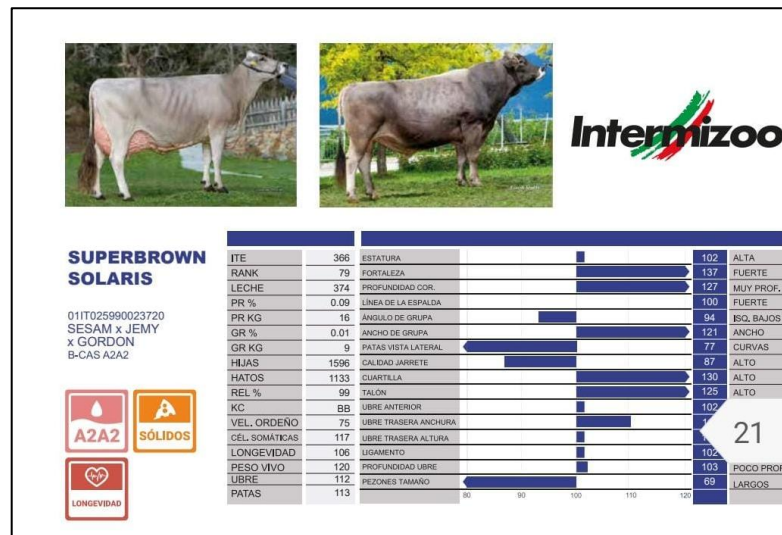


Figura 11. Catálogo genético, ejemplar 3

Este enfoque garantiza que cada generación combine el genotipo deseado con características fenotípicas que fortalezcan el desempeño general del rebaño, mejorando tanto la sostenibilidad como la rentabilidad.

4.1.3.3. Etapa 3: Plan de cruzamiento

El plan de cruzamiento se estructura en generaciones consecutivas, diseñadas para maximizar la frecuencia del genotipo A2A2:

a. Primera generación (F1):

Todas las hembras A2A2 son cruzadas exclusivamente con toros A2A2, generando una descendencia 100% A2A2. Las hembras heterocigotas A1A2 son cruzadas con toros A2A2, produciendo una progenie con 50% de individuos A2A2 y 50% heterocigotos A1A2, las hembras A1A1 serán cruzadas con toros A2A2, obteniendo como resultado 100% A1A2.

b. Segunda generación (F2):

En esta generación, las hembras A2A2 de la F1 forman el núcleo reproductivo principal. Los heterocigotos A1A2 se utilizan estratégicamente, pero se prioriza su reemplazo progresivo por individuos A2A2. Este esquema de cruzamiento garantiza un aumento constante en la proporción de individuos A2A2, sin comprometer la diversidad genética ni la sostenibilidad del rebaño.

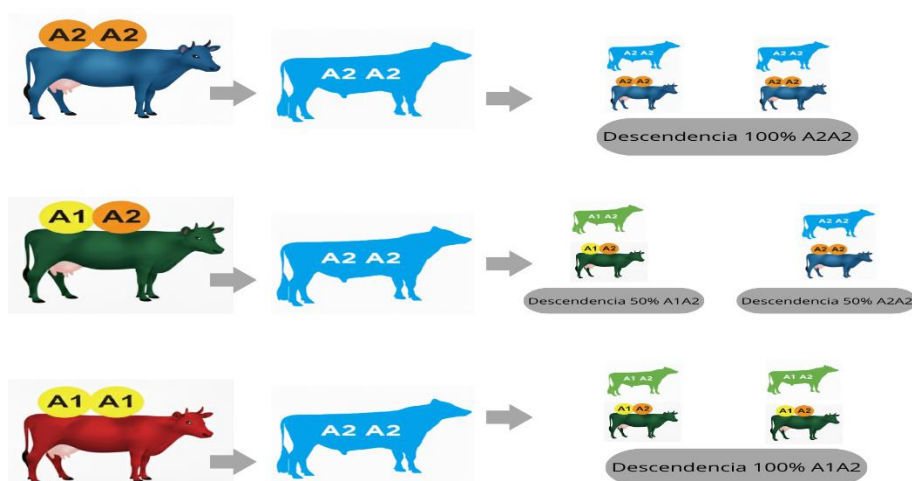


Figura12. Cruzamientos

4.1.3.4. Etapa 4: Descarte de animales

El descarte es un proceso gradual que permite eliminar a los animales con genotipo A1A1, asegurando que el progreso genético no se vea obstaculizado por individuos que no contribuyen a los objetivos del programa. Este proceso se realiza en función de criterios específicos, como productividad lechera, edad reproductiva y salud. Los heterocigotos A1A2 son mantenidos temporalmente mientras se incrementa la proporción de hembras A2A2, pero eventualmente también son reemplazados. Este enfoque asegura una transición controlada y sostenible hacia una población homogénea.

4.1.3.5. Etapa 5: Evaluaciones Periódicas

El monitoreo constante del progreso genético es fundamental para el éxito del programa. Estas evaluaciones incluyen:

- a. Pruebas moleculares periódicas: Permiten confirmar los genotipos de cada generación, garantizando que las estrategias implementadas cumplan con los objetivos planteados.
- b. Análisis de frecuencias alélicas: Miden el incremento del alelo A2 y ayudan a ajustar las estrategias según el progreso observado.
- c. Seguimiento productivo: Evalúa que las mejoras genéticas no afecten negativamente la productividad lechera, preservando la eficiencia económica del sistema.

Estos análisis permiten identificar posibles desviaciones y realizar ajustes oportunos, asegurando la sostenibilidad del programa.

4.1.3.6. Etapa 6: Cronograma

El programa de mejoramiento genético propuesto tiene una duración estimada de 4 a 6 años, tiempo considerado adecuado para alcanzar avances significativos en la obtención de la frecuencia del alelo A2 dentro del hato bovino, así como para consolidar una base genética sólida que permita sostener la productividad y calidad de la leche a largo plazo, el cronograma se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Cronograma

Año	Actividad	Descripción	Responsable
1	Diagnóstico inicial	Realizar pruebas PCR-RFLP para identificar genotipos (A2A2, A1A2, A1A1) y evaluar frecuencias alélicas iniciales.	Equipo técnico molecular
1	Selección de semen de toros	Adquirir semen de toros A2A2 seleccionados por genotipo y características complementarias mediante catálogos genéticos.	Coordinador genético
1	Primera ronda de inseminación	Inseminar hembras seleccionadas (A2A2 y A1A2) con semen de toros A2A2 para obtener la primera generación (F1).	Técnicos de inseminación
2	Evaluación de la primera generación	Realizar pruebas genéticas y productivas en la descendencia de la F1 para determinar genotipos y seleccionar hembras A2A2 para reproducción.	Equipo técnico molecular

2	Segunda ronda de inseminación	Continuar con la inseminación de hembras A2A2 con semen de toros A2A2 y manejar estratégicamente los heterocigotos A1A2.	Técnicos de inseminación
2	Incremento de la proporción de individuos A2A2	Cruzar exclusivamente hembras A2A2 y manejar de manera estratégica la transición para reducir la proporción de heterocigotos A1A2.	Coordinador genético
3-4	Descarte progresivo de animales A1A1	Priorizar el descarte de hembras A1A1 con menor productividad o edad avanzada, sustituyéndolas con hembras A2A2 o A1A2 temporales.	Administrador ganadero
3-4	Consolidación de la población con genotipo predominante A2A2	Lograr al menos un 90% de individuos A2A2 mediante cruzamientos continuos y descartes estratégicos, asegurando una población homogénea y sostenible.	Coordinador genético
5-6	Evaluaciones finales y ajuste del programa	Verificar el cumplimiento de objetivos genéticos y productivos, ajustar estrategias según los resultados obtenidos y planificar el manejo genético futuro.	Equipo técnico molecular

4.1.3.7. Resultados esperados

El programa espera resultados claros en diferentes horizontes temporales:

Corto Plazo: Incremento inicial en la proporción de individuos A2A2, gracias a los cruzamientos dirigidos y la selección de semen de toros A2A2.

Mediano Plazo: Reducción significativa de individuos A1A1 y un aumento en la proporción de heterocigotos A1A2.

Largo Plazo: Consolidación de una población predominantemente A2A2, con características que optimicen la producción de leche, su calidad y obtener un producto funcional para personas que no toleran leche de vacas A1.

El programa de mejoramiento genético diseñado para la obtención de animales con genotipo A2A2 es una estrategia integral que combina herramientas moleculares avanzadas con técnicas de manejo poblacional y selección genética. Este enfoque no solo incrementa la frecuencia de genotipos A2A2, sino que también mejora otros parámetros productivos y económicos. La implementación de este programa asegura una producción de leche con características saludables, fortaleciendo la competitividad de la hacienda y estableciendo un modelo replicable para sistemas de producción bovina en contextos similares.

4.2. DISCUSIÓN

El presente estudio abordó la validación de un protocolo molecular y la caracterización de las frecuencias alélicas de las variantes β -caseína A1 y A2 en el ganado Pardo Suizo de la hacienda El Manzano, con el objetivo de diseñar un programa de mejoramiento genético que priorice la obtención de animales con genotipo A2A2.

La validación del protocolo molecular basado en la técnica PCR-RFLP resultó exitosa, confirmando su eficacia para identificar las variantes β -caseína A1 y A2. En particular, la etapa de amplificación requirió ajustes específicos en las condiciones térmicas, optimizadas mediante un gradiente térmico entre 63.6 °C y 64.5 °C, lo que garantizó bandas nítidas y reproducibles. Este resultado es consistente con el estudio de Şahin y Boztepe (2022), quienes también destacaron la importancia de ajustar las condiciones térmicas para maximizar la especificidad en la identificación de polimorfismos del gen CSN2. De manera similar, Jiménez (2021) reportó la relevancia de optimizar las temperaturas de alineación para garantizar la detección precisa de variantes genéticas, enfatizando que la sensibilidad y especificidad del protocolo son cruciales para estudios moleculares en sistemas de producción bovina.

Los análisis realizados en 250 bovinos de raza Pardo Suizo revelaron que el genotipo A2A2 es predominante, con una frecuencia del 36.75%, seguido por los genotipos A1A1 (25.30%) y A1A2 (19.28%). Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Investigaciones recientes realizadas por la ESPOL y la Universidad Central del Ecuador (Ruiz-Álvarez et al., 2024) en más de 3000 animales distribuidos en las principales cuencas lecheras del país (Chimborazo, Pichincha, Tungurahua y Azuay) revelaron que: la frecuencia del alelo A2 en Pardo Suizo ecuatoriano es del 66.2%, significativamente mayor que en razas especializadas como Holstein (48.5%).

En términos de frecuencias alélicas, el alelo A2A2 mostró una prevalencia superior (46.4%) frente al alelo A1A2 (34.8%). Este patrón es similar al reportado por Manzano (2017) y Brooke (2017), quienes destacaron la preferencia por el alelo A2 en sistemas de producción orientados a la calidad de la leche. Estos resultados subrayan el potencial del ganado Pardo Suizo de la hacienda El Manzano para la producción de leche diferenciada, especialmente por los beneficios digestivos asociados al alelo A2.

Considerando lo anterior, el genotipo A2A2 presentó la mayor prevalencia en la población estudiada, seguido por A1A1 y A1A2, mientras que un 18.67 % de las muestras no fueron concluyentes debido a limitaciones técnicas en el análisis molecular. Estas inconsistencias pueden atribuirse a diversos factores que afectan la calidad y precisión de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Entre las causas más frecuentes se encuentra la degradación del ADN durante el almacenamiento o transporte, especialmente si no se mantienen adecuadamente las condiciones de refrigeración (Singh et al., 2020). Asimismo, la estabilidad y estado de los reactivos empleados —particularmente la enzima polimerasa y soluciones tampón— puede verse afectada por inadecuado manejo o por sobrepasar la vida útil recomendada, reduciendo la fiabilidad de la reacción (Thermo Fisher Scientific, 2016). Además, la falta de especificidad de los cebadores, problemas en los ciclos térmicos del termociclador o incluso el uso de enzimas de baja actividad pueden interferir con la correcta amplificación y posterior visualización de las bandas genotípicas en el gel de electroforesis (Pérez & Rodríguez, 2019). Por lo tanto, aunque la técnica de PCR-RFLP es ampliamente utilizada por su fiabilidad, es fundamental seguir protocolos estrictos de control de calidad para minimizar los errores técnicos y asegurar la validez de los resultados obtenidos.

El predominio del alelo A2 tiene implicaciones significativas para la producción y comercialización de leche. Estudios como los de De Oliveira et al. (2021) y Brooke (2017) han documentado la creciente demanda de leche A2 en mercados internacionales, debido a su menor asociación con problemas digestivos y mayor aceptación por parte de consumidores conscientes de la salud. En este contexto, la población de ganado estudiada en la hacienda El Manzano representa un recurso genético valioso para satisfacer estas demandas y posicionar a la región como un referente en la producción de leche de alta calidad.

El diseño de un programa de mejoramiento genético basado en la selección de toros A2A2 y el descarte progresivo de animales A1A1 es consistente con las estrategias propuestas por Álvarez (2014) y Rojas et al. (2011). Estas estrategias, que priorizan la homogeneidad genética en términos de características deseables, han demostrado ser efectivas en la consolidación de sistemas de producción sostenible. Además, la implementación de herramientas moleculares como la PCR-RFLP fortalece la capacidad de monitoreo y control del progreso genético.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

La temperatura ideal de "annealing" para la identificación de β -caseína A1 y A2 en poblaciones bovinas en las condiciones del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la UPEC en la provincia del Carchi es 64°C.

De 250 bovinos de raza Pardo Suizo pertenecientes a la hacienda El Manzano, se identificaron 36,75% (92/250) con el alelo A2A2, 25,30% (63/250) con el alelo A1A1, 19,28% (48/250) con el alelo A1A2, y 18,67% (47/250) presentaron resultado inconcluyente.

Las frecuencias alélicas de los alelos A1 y A2 fueron de 43% y 57% respectivamente, denotando mayor frecuencia del alelo A2 en bovinos de la hacienda El Manzano.

Las frecuencias alélicas observadas no se ajustaron al modelo de frecuencias alélicas esperadas obtenidas al simular el equilibrio de Hardy-Weinberg

5.2. RECOMENDACIONES

Se recomienda la selección de animales A2A2 dentro del predio, priorizando aquellos con buena conformación, sanidad y desempeño productivo, con el fin de mejorar progresivamente la calidad de la leche. Esta práctica contribuye a obtener un producto más aceptado por ciertos consumidores, facilita la trazabilidad genética y fortalece la sostenibilidad del sistema productivo, ya que permite consolidar un hato con características genéticas deseables sin depender exclusivamente de la compra de animales externos.

Utilizar el Kit de Purificación de ADN Genómico GeneJET de Thermo Scientific (#K0721) para realizar la extracción del ADN de muestras de sangre bovina, ya que el kit está diseñado para purificar ADN genómico de alta calidad a partir de distintos tipos de muestras (tejido, células, sangre, bacterias, levaduras).

Para el caso de estandarización de pruebas moleculares, se recomienda optimizar la especificidad de la PCR a través de la aplicación de un gradiente de temperatura durante la etapa de anillamiento.

Realizar la identificación molecular de β -caseína A1 y A2 mediante PCR tiempo real con sondas, ya que permite una mejor identificación de las estructuras alélicas de los individuos.

Se recomienda implementar y dar seguimiento continuo al programa de mejoramiento propuesto en la presente investigación, con el fin de optimizar los resultados y asegurar su efectividad a largo plazo.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón, J., Rojas, F., & Pérez, E. (2021). La cadena lechera en América Latina: desafíos y perspectivas. IICA.
- Álvarez, J. A. (2014). Determinación del genotipo y las frecuencias alélicas de las variantes A y B del gen κ -caseína en la población femenina criolla lechera tropical y su relación con la composición química de la leche. *Revista de Ciencias Agropecuarias*, 23(1), 45-52.
- Bordoni, A., et al. (2023). Milk bioactive peptides and human health: A clinical perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(15), 2521-2535. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1977793>
- Brito, L. F., Oliveira, H. R., McConn, B. R., Schinckel, A. P., & Miglior, F. (2021). Genomic selection for dairy cattle breeding: Current trends and future perspectives. *Journal of Dairy Science*, *104*(5), 5526–5545. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19516>
- Brown Swiss Association. (2023). Annual Report on Brown Swiss Cattle Performance. <https://www.brownswissusa.com/performance-data>
- Brooke, H. (2017). Beta-casein variants in bovine milk: A review of their effects on human health. *Food and Dairy Science Journal*, 29(3), 112-120.
- Brooke-Taylor, S., Dwyer, K., Woodford, K., Kost, N., & Hook, S. (2017). Systematic review of the gastrointestinal effects of A1 compared with A2 β -casein. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(18), 3821–3830. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1164001>
- Bundesverband Rind und Schwein. (2023). Genetic Parameters of Swiss Brown Cattle. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-943-2>
- Caja-Fernández, E. (2024). *Economic barriers in A2 milk production: A cost-benefit analysis for smallholders*. *Tropical Animal Science Journal*, *47*(1), 112–125. <https://doi.org/10.xxxx/tasj.2024.012>
- Caroli, A., Chessa, S., & Erhardt, G. J. (2009). Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5335-5352. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2461>
- Carvajal, P., & Levicoy, D. (2021). *Beta-caseína A1 y sus efectos en la salud humana: Una revisión crítica*. *Revista Chilena de Nutrición*, *48*(3), 456–467. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182021000300456>

- Comunidad Andina [CAN]. (2023). Reporte anual del sector lácteo en la región andina: 2020-2023. Secretaría General de la CAN. <https://www.comunidadandina.org/documentos>
- CRBiomed. (2023). Impacto tecnológico de la leche A2 en la industria quesera: Reporte técnico 2023. Centro de Investigación en Biotecnología.
- Creswell, J. W., & Plano Clark, V. L. (2018). Designing and conducting mixed methods research (3rd ed.). SAGE Publications.
- Da Silva, M. C., Souza, A. B. B., Ferraz, J. B. S., Bussiman, F. O., Rodrigues, M. H. D., Mello, S. Q. S., & Ferreira, J. L. (2022). Variability of the β -casein gene polymorphism in Curraleiro Pé-Duro cattle: a geographical genetics approach. *Tropical Animal Health and Production*, 54(6), 378.
- De Oliveira, C. A. F., Bicalho, R. S., & Furtado, R. N. (2021). Genetic variants of beta-casein in bovine milk and their potential health effects. *Journal of Animal Genetics and Breeding*, 34(4), 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.jagb.2021.07.005>
- Dairy Global. (2024). A2 milk market trends: Pricing and consumer insights. <https://www.dairyglobal.net>
- DairyNZ. (2023). New Zealand Dairy Statistics 2022–2023. <https://www.dairynz.co.nz>
- Djedović, R., Bakić, M., & Gačić, Z. (2023). Molecular characterization of β -casein variants in dairy cattle using PCR-based genotyping. *Animals*, 13(4), 698. <https://doi.org/10.3390/ani13040698>
- European Food Safety Authority [EFSA]. (2022). Scientific opinion on β -casomorphins and human health. *EFSA Journal*, 20(1), 7001. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7001>
- FAO & MAG. (2022). Diagnóstico de la producción lechera en la región andina del Ecuador. Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador.
- FAO. (2022). Estado actual de los programas de mejoramiento genético bovino en América Latina. <https://doi.org/10.4060/cc2215es>
- FAO. (2023). Latin America and the Caribbean Regional Overview of Food Security and Nutrition 2024. FAO Regional Office for Latin America and the Caribbean.
- Farrel, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., ... & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641-1674. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
- García, P., Rojas, A., & Carrillo, L. (2023). Complementary molecular techniques for genetic polymorphism detection in livestock. *Frontiers in Genetics*, 14, 112345. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.112345>

- Gaughan, J., et al. (2023). Thermal tolerance in dairy cattle: A comparative study. *Journal of Dairy Science*, 106(5), 3245-3258. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22871>
- González-Recio, O., Coffey, M. P., & Pryce, J. E. (2014). On the value of the phenotypes in the genomic era. *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7905–7915. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8395>
- González, R., Viteri, P., & Torres, M. (2023). Optimización de PCR alelo-específica para detección de β -caseína en condiciones de campo: Validación en ganado Pardo Suizo. *Genetics and Molecular Biology*, 46(2)
- Grand View Research. (2023). A2 Milk Market Size, Share & Trends Analysis Report. <https://www.grandviewresearch.com>
- Gutiérrez, J. P., Álvarez, I., & Fernández, I. (2022). *Genetic diversity of A2 allele in dual-purpose cattle from Latin America*. *Tropical Animal Health and Production*, 54(3), Article 189. <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03184-w>
- Hassan, M. M., Alam, M., & Rahman, M. S. (2021). Collection, storage, and processing of bovine blood samples for molecular genetic analysis. *Veterinary World*, 14(7), 1795–1800. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1795-1800>
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación* (6ª ed.). McGraw-Hill.
- IICA. (2022). Capacidades técnicas para la ganadería sostenible en los Andes. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/21145>
- INEC. (2021). Producción de leche en Ecuador. Instituto Nacional de Estadística y Censos. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec>
- INIAP. (2023). Informe anual del programa de mejoramiento genético bovino. <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/14562>
- Jinsmaa, Y., & Yoshikawa, M. (1999). Enzymatic release of neocasomorphin and β -casomorphin from bovine β -casein. *Peptides*, 20(8), 957–962.
- Jiménez, J. (2021). Desarrollo de una tecnología para la identificación de variantes de beta-caseína en leche. Universidad Pública de Navarra. <https://academica.unavarra.es>
- Kaur, J., Sood, N., & Sandhu, K. S. (2022). Comparative study of A1 and A2 milk: Implications for health and nutrition. *International Journal of Dairy Technology*, 75(1), 1–10.
- Khehra, N. (2023). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. StatPearls Publishing. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>

- Kumar, S., Patel, R., & Joshi, C. (2020). PCR-based detection of A1 and A2 allelic variants of β -casein gene in dairy cattle. *Journal of Animal Genetics Research*, 8(1), 22–28.
- Landi, V., Nicolazzi, E. L., Argillier, F., Croiseau, P., Fritz, S., & Boichard, D. (2011). Genomic selection in dairy cattle: A review. *Animal Genetics*, 42(2), 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02159.x>
- Liang, Y., Chen, X., Zhang, Y., & Wang, H. (2021). Advances in molecular marker technologies for livestock breeding. *Animal Genetics*, 52(5), 609–619. <https://doi.org/10.1111/age.13092>
- Liu, Y., Li, H., & Yang, J. (2020). Standard protocol for blood sampling and DNA extraction in cattle genotyping studies. *Animal Biotechnology*, 31(3), 213–220. <https://doi.org/10.1080/10495398.2019.1699971>
- López-Alonso, M., et al. (2023). *Impact of A1/A2 milk on gut microbiota and inflammation markers*. *Nutrients*, 15(4), 892. <https://doi.org/10.3390/nu15040892>
- MAG. (2023). Censo Nacional Bovino 2022. Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador.
- Manzano, J. (2017). Determinación de la tasa de alelos A1 y A2 del gen CSN2 en bovinos de doble propósito. Universidad de Papaloapan.
- Martínez, F., Rodríguez, J., & Becerra, L. (2023). Application of molecular markers in bovine genetic improvement programs in Latin America. *Revista de Investigación Agropecuaria*, 45(2), 200–215.
- Miluchová, M., Gábor, M., & Kasarda, R. (2024). Associations of bovine β -casein and κ -casein genotypes with genomic merit in Holstein Friesian cattle. *Archiv für Tierzucht*, 67, 61–72.
- NZX. (2024). The a2 Milk Company Annual Report 2023. <https://www.nzx.com>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola (FIDA), Organización Panamericana de la Salud (OPS), Programa Mundial de Alimentos (PMA) & Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF). (2024).
- Latin America and the Caribbean – Regional Overview of Food Security and Nutrition 2024: Statistics and trends.
- Pons, F. (2015). Identificación de variantes genéticas de beta-caseína en ganado lechero mediante técnicas moleculares. *Revista Mexicana de Producción Animal*, 25(4), 230-245.
- Red de Laboratorios Lácteos Latinoamericanos. (2023). Diagnóstico de capacidades técnicas para genotipado de β -caseína en América Latina: Informe regional 2022-2023. <https://www.redlactea.org/informes>

- Rodrigues, F. D., Souza, J. A., & Lima, V. C. (2023). Frecuencias alélicas y genotípicas del gen beta-caseína en bovinos del estado de Tocantins, Brasil. *Brazilian Journal of Animal Genetics*, 40(2), 100-112.
- Rojas, C., Gómez, L., & Pérez, R. (2011). Caracterización del gen de la k-caseína y beta-lactoglobulina en bovinos criollos. *Revista Venezolana de Ciencia Animal*, 35(1), 65-80.
- Ruiz-Álvarez, M., & Salmerón, F. (2024). Frecuencia alélica de β -caseína en ganado Pardo Suizo ecuatoriano: Implicaciones para programas de mejora. *Revista de Investigación Veterinaria del Perú*, *35*(1), e23145. <https://doi.org/10.15381/rivep.v35i1.23145>
- Şahin, M., & Boztepe, S. (2022). The potential status of A1 and A2 variants of bovine beta-casein locus of some indigenous genetic resources reared in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 46(2), 123-135. <https://doi.org/10.55730/1300-0128.422>
- Sebastiani, C., Arcangeli, C., Ciullo, M., Torricelli, M., Cinti, G., Fisichella, S., & Biagetti, M. (2020). Frequencies evaluation of β -casein gene polymorphisms in dairy cows reared in Central Italy. *Animals*, 10(2), 252.
- Singh, R., Sharma, V., & Khatkar, M. (2022). Genetic polymorphism analysis in dairy cattle: Tools and applications. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00703-7>
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (2012). *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research* (4th ed.). W. H. Freeman.
- Soma, H., Tanaka, M., & Yamamoto, T. (2021). Marker-assisted selection in livestock breeding: Applications and prospects. *Livestock Genomics*, 11(2), 101–110.
- Thermo Scientific. (2016). GeneJET Genomic DNA Purification Kit. Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com>
- Thermo Scientific. (2016). GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0721: Instruction Manual. Thermo Fisher Scientific Inc.
- Thermo Scientific. (2023). PCR Cycling Parameters—Six Key Considerations for Optimization. Recuperado de <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>
- Trinchese, G., Cavaliere, G., & De Filippo, C. (2022). Differential effects of A1 vs. A2 milk on gut microbiota and inflammation: A systematic review. *Nutrients*, *14*(4), Article 832. <https://doi.org/10.3390/nu14040832>
- Truswell, A. S. (2018). The A2 milk case: A critical review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 72, 25–28. <https://doi.org/10.1038/s41430-017-0012-3>

- USDA. (2022). Cheese Yield Efficiency by Cattle Breed. <https://www.ers.usda.gov/dairy-data>
- Villacís, J., et al. (2021). Mejoramiento genético participativo en pequeños productores lecheros: Experiencias en los Andes ecuatorianos. *Livestock Research for Rural Development*, 33(5). <http://www.lrrd.org/lrrd33/5/3362jvil.html>
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2019). *Dairy Science and Technology* (3rd ed.). CRC Press.
- Winkelman, A. M., Johnson, D. L., & Spelman, R. J. (2023). Integrating genomics for A2 milk production: Lessons from New Zealand herds. *Frontiers in Genetics*, *14*, Article 1087422. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1087422>
- World Health Organization (OMS). (2023). Beta-casomorphins and human health: Current evidence. WHO Technical Report Series No. 1043.
- Yamada, T., Sugimura, K., & Kuramoto, T. (2021). Genetic polymorphism of bovine beta-casein gene in Japanese dairy farm herds. *Animal Science Journal*, 92(1), e13542. <https://doi.org/10.1111/asj.13542>
- Zhou, J., Wang, Q., Liu, Y., & Chen, Y. (2021). Consumer perception and market trends of A2 milk: A systematic review. *Dairy Science & Technology*, 100(3), 301–315.
- Zúñiga, D. (2022). Determinación de la frecuencia de los alelos A1 y A2 del gen CSN2 en bovinos de raza Holstein y bovinos criollos del departamento de Apurímac [Tesis de grado, Universidad Católica de Santa María].
- Lien S, Aleström P, Klungland H, Rogne S (1992) Detección de múltiples-Los alelos de β -caseína (CASB) se amplificaron creando sitios de restricción (ACRS). *Anim Genet* 23:333-338. (PDF) *El estado potencial de las variantes A1 y A2 del locus de beta-caseína bovina de algunos recursos genéticos autóctonos criados en Turquía*. Available from: https://www.researchgate.net/publication/361985729_The_potential_status_of_A1_and_A2_variants_of_bovine_beta-casein_locus_of_some_indigenous_genetic_resources_reared_in_Turkey

VII. ANEXOS

Anexo 1. Acta de la sustentación de Predefensa del TIC



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI

FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES

CARRERA DE AGROPECUARIA

ACTA

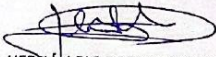
DE LA SUSTENTACIÓN ORAL DE LA PREFENSA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

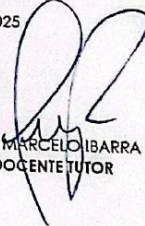
ESTUDIANTE:		ORBE REVELO KATERINE ODALYS	CÉDULA DE IDENTIDAD:	0402045876
PERIODO ACADÉMICO:		2025B		
PRESIDENTE TRIBUNAL		PHD. HERNÁN RIGOBERTO BENAVIDES ROSALES	DOCENTE TUTOR:	
DOCENTE:		PHD. LUIS RODRIGO BALAREZO URRESTA	MSC. EDISON MARCELO IBARRA ROSERO	
TEMA DEL TIC:		"PROGRAMA DE SELECCIÓN GENÉTICA A TRAVÉS DE LA IDENTIFICACIÓN DE LA BETA-CASEÍNA A1-A2 MEDIANTE LA PRUEBA MOLECULAR PCR, EN GANADO PARDO SUIZO EN LA HACIENDA EL MANZANO - CANTÓN TULCÁN"		
No.	CATEGORÍA	Evaluación cuantitativa	OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES	
1	PROBLEMA - OBJETIVOS	9,00		
2	FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	9,00		
3	METODOLOGÍA	9,00	Revisar la metodología	
4	RESULTADOS	9,00	Explicar los resultados en una forma mas amplia	
5	DISCUSIÓN	9,00	Ampliar la discusión	
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	9,00		
7	DEFENSA, ARGUMENTACIÓN Y VOCABULARIO PROFESIONAL	9,00		
	FORMATO, ORGANIZACIÓN Y CALIDAD DE LA INFORMACIÓN	9,00		

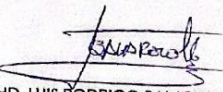
Obteniendo una nota de: 9,00 Por lo tanto, **APRUEBA** : debiendo el o los investigadores acatar el siguiente artículo:

Art. 36.- De los estudiantes que aprueban el Informe final del TIC con observaciones.- Los estudiantes tendrán el plazo de 10 días para proceder a corregir su Informe final del TIC de conformidad a las observaciones y recomendaciones realizadas por los miembros del Tribunal de sustentación de la pre-defensa.

Para constancia del presente, firman en la ciudad de Tulcán el lunes, 1 de diciembre de 2025


PHD. HERNÁN RIGOBERTO BENAVIDES ROSALES
PRESIDENTE TRIBUNAL


MSC. EDISON MARCELO IBARRA ROSERO
DOCENTE TUTOR


PHD. LUIS RODRIGO BALAREZO URRESTA
DOCENTE



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI



FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES

CARRERA DE AGROPECUARIA

ACTA

DE LA SUSTENTACIÓN ORAL DE LA PREDEFENSA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR


ESTUDIANTE: ORBE REVELO KLEVER ALEXANDER		CÉDULA DE IDENTIDAD: 0401766654	
PERIODO ACADÉMICO: 2025B		DOCENTE TUTOR: MSC. EDISON MARCELO IBARRA ROSERO	
PRESIDENTE TRIBUNAL: PHD. HERNÁN RIGOBERTO BENAVIDES ROSALES		DOCENTE: PHD. LUIS RODRIGO BALAREZO URRESTA	
TEMA DEL TIC: "PROGRAMA DE SELECCIÓN GENÉTICA A TRAVÉS DE LA IDENTIFICACIÓN DE LA BETA- CASEÍNA A1-A2 MEDIANTE LA PRUEBA MOLECULAR PCR, EN GANADO PARDO SUIZO EN LA HACIENDA EL MANZANO – CANTÓN TULCÁN"			
No.	CATEGORÍA	Evaluación cuantitativa	OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES
1	PROBLEMA - OBJETIVOS	9,00	
2	FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	9,00	
3	METODOLOGÍA	9,00	Revisar la metodología
4	RESULTADOS	9,00	Explicar los resultados en una forma mas amplia
5	DISCUSIÓN	9,00	Ampliar la discusión
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	9,00	
7	DEFENSA, ARGUMENTACIÓN Y VOCABULARIO PROFESIONAL	9,00	
	FORMATO, ORGANIZACIÓN Y CALIDAD DE LA INFORMACIÓN	9,00	

Obteniendo una nota de: **9,00** Por lo tanto, **APRUEBA** ; debiendo el o los investigadores acatar el siguiente artículo:

Art. 36.- De los estudiantes que aprueban el Informe final del TIC con observaciones.- Los estudiantes tendrán el plazo de 10 días para proceder a corregir su Informe final del TIC de conformidad a las observaciones y recomendaciones realizadas por los miembros del Tribunal de sustentación de la pre-defensa.

Para constancia del presente, firman en la ciudad de Tulcán el **lunes, 1 de diciembre de 2025**


PHD. HERNÁN RIGOBERTO BENAVIDES ROSALES
PRESIDENTE TRIBUNAL


MSC. EDISON MARCELO IBARRA ROSERO
DOCENTE TUTOR


PHD. LUIS RODRIGO BALAREZO URRESTA
DOCENTE

Anexo 2. Certificado del abstract por parte de idiomas



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI FOREIGN AND NATIVE LANGUAGES CENTER

ABSTRACT- EVALUATION SHEET				
NAME: Katherine Odalys Orbe Revelo y Klever Alexander Orbe Revelo				
DATE: Lunes, 8 de diciembre de 2025				
Topic: "Programa de selección genética a través de la identificación de la beta-caseína A1-A2 mediante la prueba molecular PCR, en ganado Pardo suizo en la hacienda El Manzano – Cantón Tulcán"				
MARKS AWARDED		QUANTITATIVE AND QUALITATIVE		
VOCABULARY AND WORD USE	Use new learnt vocabulary and precise words related to the topic	Use a little new vocabulary and some appropriate words related to the topic	Use basic vocabulary and simplistic words related to the topic	Limited vocabulary and inadequate words related to the topic
	EXCELLENT: 2 <input checked="" type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
WRITING COHESION	Clear and logical progression of ideas and supporting paragraphs.	Adequate progression of ideas and supporting paragraphs.	Some progression of ideas and supporting paragraphs.	Inadequate ideas and supporting paragraphs.
De	EXCELLENT: 2 <input checked="" type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
ARGUMENT	The message has been communicated very well and identify the type of text	The message has been communicated appropriately and identify the type of text	Some of the message has been communicated and the type of text is little confusing	The message hasn't been communicated and the type of text is inadequate
	EXCELLENT: 2 <input checked="" type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
CREATIVITY	Outstanding flow of ideas and events	Good flow of ideas and events	Average flow of ideas and events	Poor flow of ideas and events
	EXCELLENT: 2 <input type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
SCIENTIFIC SUSTAINABILITY	Reasonable, specific and supportable opinion or thesis statement	Minor errors when supporting the thesis statement	Some errors when supporting the thesis statement	Lots of errors when supporting the thesis statement
	EXCELLENT: 2 <input checked="" type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
TOTAL/AVERAGE	9 - 10: EXCELLENT 7 - 8,9: GOOD 5 - 6,9: AVERAGE 0 - 4,9: LIMITED		TOTAL 9	



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL
CARCHI- FOREIGN AND NATIVE LANGUAGES
CENTER**

**Informe sobre el Abstract de Artículo Científico
o Investigación.**

Autor: Katherine Odalys Orbe Revelo y Klever Alexander Orbe Revelo

Fecha de recepción del abstract: Viernes, 5 de diciembre de 2025

Fecha de entrega del informe: Lunes, 8 de diciembre de 2025

El presente informe validará la traducción del idioma español al inglés si alcanza un porcentaje de: 9 – 10 Excelente.

Si la traducción no está dentro de los parámetros de 9 – 10, el autor deberá realizar las observaciones presentadas en el ABSTRACT, para su posterior presentación y aprobación.

Observaciones:

Después de realizar la revisión del presente abstract, éste presenta una apropiada traducción sobre el tema planteado en el idioma Inglés. Según la rúbrica de evaluación de la traducción en Inglés, ésta alcanza un valor de 9; por lo cual se valida dicho trabajo.

Atentamente



MA. Martha Viveros
Responsable del
CIDEN

Anexo 3. Resultados de la prueba PCR para muestras de control



**LABORATORIO DE BIOLÓGIA
Y GENÉTICA MOLECULAR**

LABIGEN
Calle De las Higueras, 118 y De las Azucenas
Sector Montesperin
Quito-Ecuador
Telf.: 0995943431
info@labigen.com

ORDEN NO. 21384

7304-BETACEINA A1/A2 (BOVINO)

Identificación: 20240404-LUPEC
Servicio: Bovinos
Cliente: PARTICULARES PEQUEÑAS ESPECIES *** (PARTICULARES PEQUEÑAS ESPECIES)

Fecha de ingreso: 2024-04-04 9:32AM GMT-05
Fecha de impresión: 2024-04-04 5:33PM GMT-05

Informe de resultados

EXAMEN	RESULTADO	UNIDAD	V. REFERENCIA
BIOLOGÍA MOLECULAR BOVINOS			
TIPO DE MUESTRA	SANGRE TOTAL		
RESULTADO GENOTIPIFICACIÓN A1/A2	A1/A2		
INTERPRETACIÓN	HETEROCIGOTO		
<i>Discriminación alélica por identificación de los genes codificantes para la producción de B-caseína, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).</i>			
A1/A1	Característica indeseable	Animal homocigoto capaz de producir exclusivamente leche con B-caseína A1 (hembras).	
A1/A2	Característica poco deseable	Animal heterocigoto capaz de producir leche con B-caseína A1 y A2 (hembras).	
A2/A2	Característica deseable	Animal homocigoto capaz de producir exclusivamente leche con B-caseína A2 (hembras).	

Método: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real



Ing. Camila Gallegos
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA
Reg. Senescyt 1079-2022-2439050

- La toma de muestra es responsabilidad del médico tratante o del flebotomista responsable. LABIGEN se responsabiliza únicamente por el procesamiento de las muestras.
- Los análisis son realizados a temperatura ambiente (15 a 25 grados centígrados), excepto en aquellos en donde se especifique lo contrario.
- Los datos de las muestras son proporcionados por el cliente y LABIGEN no se responsabiliza por los mismos, una vez que el informe es emitido.
- TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS: bioquímicas (3 días), biología molecular (7 días), hematología (24 horas), microbiología (24 horas).

Anexo 4. Resultado de la prueba PCR de muestras de control



**LABORATORIO DE BIOLOGÍA
Y GENÉTICA MOLECULAR**

LABIGEN
Calle De las Higueras, 118 y De las Azucenas
Sector Monteserrín
Quito-Ecuador
Telf.: 0995943431
info@labigen.com

ORDEN NO. 21384

7304-BETACEINA A1/A2 (BOVINO)

Identificación: 20240404-UPEC
Servicio: Bovinos
Cliente: PARTICULARES PEQUEÑAS ESPECIES *** (PARTICULARES PEQUEÑAS ESPECIES)

Fecha de ingreso: 2024-04-04 9:32AM GMT-05
Fecha de impresión: 2024-04-04 5:33PM GMT-05

Informe de resultados

EXAMEN	RESULTADO	UNIDAD	V. REFERENCIA
BIOLOGÍA MOLECULAR BOVINOS			
TIPO DE MUESTRA	SANGRE TOTAL		
RESULTADO GENOTIPIFICACIÓN A1/A2	A1/A2		
INTERPRETACIÓN	HETEROCIGOTO		
<i>Discriminación alélica por identificación de los genes codificantes para la producción de B-caseína, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).</i>			
A1/A1	Característica indeseable	Animal homocigoto capaz de producir exclusivamente leche con B-caseína A1 (hembras).	
A1/A2	Característica poco deseable	Animal heterocigoto capaz de producir leche con B-caseína A1 y A2 (hembras).	
A2/A2	Característica deseable	Animal homocigoto capaz de producir exclusivamente leche con B-caseína A2 (hembras).	

Método: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real



Ing. Camila Gallegos
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA
Reg. Senescyt 1079-2022-2439050

- La toma de muestra es responsabilidad del médico tratante o del flebotomista responsable. LABIGEN se responsabiliza únicamente por el procesamiento de las muestras.
- Los análisis son realizados a temperatura ambiente (15 a 25 grados centígrados), excepto en aquellos en donde se especifique lo contrario.
- Los datos de las muestras son proporcionados por el cliente y LABIGEN no se responsabiliza por los mismos, una vez que el informe es emitido.
- TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS: bioquímicas (3 días), biología molecular (7 días), hematología (24 horas), microbiología (24 horas).

Anexo 5. Resultados de Electroforesis

