

Ministerio de Educación Superior
Universidad Agraria de la Habana
Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria

Aplicación de los marcadores moleculares al estudio de la biodiversidad del ganado bovino cubano

Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

Autor: Lic. Odalys Uffo Reinosa
Tutores: Dr. Rodrigo Ronda, Dr. C
Dra. Rosario Osta, Dr. C
Asesora: Dra. Siomara Martínez, Dr. C

2003

	Pág.
I. Introducción	1
II. Revisión bibliográfica	4
Biotecnología aplicada a la producción animal	4
II.1. Métodos de de polimorfismo genético	5
II.2. *Loci* de las proteínas lácteas	11
II.2.1. Estructura de los genes de las proteínas lácteas	13
II.2.1.1.Genes de las caseínas	14
II.2.1.1.1. a_{s1}-caseína (CASA1)	14
II.2.1.1.2. ß-caseína (CASB)	16
II.2.1.1.3. a_{s2}-caseína (CASA2)	18
II.2.1.1.2. ?-caseína (CASK)	20
II.2.1.2. Genes de las proteínas del suero (proteínas séricas)	23
II.2.1.2.1. a-lactoalbúmina (LAA)	23
II.2.1.2.2. ß-lactoglobulina (LGB)	25
II.3. *Loci* microsatélites	27
II.4. Aplicaciones de los marcadores moleculares en ganadería	29
II.4.1. Variantes genéticas de las proteínas de la leche y producción láctea	32
II.4.2. Evaluación de la biodiversidad a través de marcadores moleculares	35
II.5. Razas cubanas seleccionadas para su caracterización	40
II.1.1. Ganado Criollo de Cuba	40
II.1.2. Ganado Cebú Cubano	41
II.1.3. Ganado Siboney de Cuba	42
III. Materiales y métodos generales	43
III.1. Animales	43
III.2.Obtención del material genético	43
III.2.1. Extracción partiendo de sangre periférica	43
III.2.1.1. Método rápido	44
III.2.1.2. Método de precipitación salina ("Salting out")	45
III.2.2. Extracción partiendo de semen	45
III.2.2.1. Método A	45
III.2.2.2. Método B	46
III.3. Tipificación por PCR/RFLP de los genes que codifican para las proteínas lácteas	47
III.4. Tipificación de microsatélites bovinos	48
III.5. Análisis estadístico	50

III.5.1. Variación dentro de la población 50
III.5.2. Diferenciación genética entre poblaciones 51
IV. Determinación de la estructura genética de las poblaciones bovinas cubanas estudiadas con respecto a las proteínas lácteas 53
IV.1. Introducción 53
IV.2. Materiales y métodos 53
IV.3. Resultados y discusión 53
IV.3.1. Variación intra-raza. Análisis de los *loci* individuales 54
IV.3.1.1. a_{s1}-caseína 55
IV.3.1.2. ß-caseína 57
IV.3.1.3. a_{s2}-caseína 58
IV.3.1.4. ?-caseína 59
IV.3.1.5. a-lactoalbúmina 60
IV.3.1.6. ß-lactoglobulina 62
IV.3.2. Diversidad genética de las proteínas lácteas en las poblaciones cubanas 64
IV.4. Conclusiones parciales 66
V. Experimento II. Determinación de la estructura genética de los *loci* microsatélites 67
V.1. Introducción 67
V.2. Materiales y métodos 68
V.3. Resultados y discusión 68
V.3.1. Variación intra-razas 68
V.3.2. Relaciones genéticas entre razas 75
V.3.3. Comparación con razas españolas 79
V.4. Conclusiones parciales 85
VI. Discusión general 86
VII. Conclusiones generales 91
VIII. Recomendaciones 92
IX. Lista de referencias
X. Anexos
X.1. Datos primarios de la tipificación de las proteínas lácteas
X.2. Resultados del análisis del Equilibrio de Hardy-Weinberg
X.3. Datos primarios de la tipificación de los 30 *loci* microsatélites
X.4. Frecuencias alélicas de los *loci* microsatélites
X.5.1. Representación gráfica (análisis de conglomerados) de las relaciones entre individuos
X.5.2. Representación gráfica radial de las relaciones entre individuos

CAPITULO I: INTRODUCCION

En la década del 60' en Cuba se trazó la estrategia para transformar una ganadería subdesarrollada e improductiva, con la utilización de las razas existentes de ganado bovino. Esta estrategia contemplaba cuatro aspectos fundamentales. A saber, el mantenimiento genético de las razas adaptadas a las condiciones del trópico cubano y su utilización en áreas donde no se requería de inversiones; la formación de nuevas razas, combinando las características deseables de cada uno de los grupos genéticos involucrados; la adaptación de razas especializadas importadas para mantener el reemplazo de sementales a utilizar en los programas de cruzamiento y la utilización permanente de cruzamientos entre razas adaptadas con razas más especializadas, y finalmente, el empleo de sementales cruzados (López, 1998). El objetivo fue incrementar la potencialidad productiva lechera del ganado existente y desarrollar paralelamente una explotación adecuada a las condiciones tropicales. Se trazaron dos líneas fundamentales de desarrollo: el programa de absorción del Holstein y la formación de nuevas razas.

A través de los años, se ha trabajado por el cumplimiento de este objetivo con el desarrollo de un programa que permitiera identificar los animales de mejor comportamiento bajo nuestras condiciones y la producción de toros con mayor nivel de adaptación al trópico. Para ello, se han mantenido núcleos de animales identificados como razas autóctonas resistentes a las condiciones tropicales como el Criollo de Cuba y el Cebú Cubano, y se han logrado cruzamientos que combinan la rusticidad de este ganado resistente y las cualidades productivas de razas importadas. El Siboney de Cuba ($^{5}/_{8}$ Holstein-$^{3}/_{8}$Cebú) es un ejemplo de este último.

El Criollo Cubano es de vital importancia para nuestra ganadería tropical, debido a su grado de adaptación manifestado por más de 500 años, con amplias posibilidades de mejora, utilización y conservación, aunque esta última se ha visto afectada por aspectos económicos. Constituye una raza

productora de carne y leche, y es excepcional como animal de trabajo. Por otra parte, el Cebú Cubano se ha mantenido como genofondo base para la creación de nuevas razas, aportando características de resistencia. También ha mostrado sus bondades para la producción de carne y como animal de trabajo. El Siboney de Cuba, ha sido el cruzamiento que se ha diseñado para que esta población se manifieste como raza lechera por excelencia en nuestras condiciones.

La posibilidad de detectar diferencias a nivel de secuencia de ADN, y que estas se utilicen como marcadores para desarrollar estudios en el genoma, ha cambiado significativamente la aplicación de la genética y ha permitido el desarrollo de técnicas para el diagnóstico molecular, que se han utilizado en animales domésticos y de importancia económica. Por otra parte, la importancia económica del ganado vacuno, justifica que el genoma de la especie bovina haya sido ampliamente estudiado y, en el momento actual, en el conjunto de los genomas de mamíferos, el bovino es el cuarto mejor conocido después de los de las especies humana, ratón y rata.

Si bien el conocimiento del genoma de las especies ganaderas es uno de los proyectos actuales en el campo de la Genética Animal, otro, no menos importante, es el mantenimiento de la riqueza genética. La búsqueda del incremento de producción ha dado lugar, en muchas ocasiones, a la introducción masiva de animales muy productivos en zonas rústicas donde tradicionalmente se encontraban las razas autóctonas. Esto ha llevado a la pérdida de un material genético de enorme importancia, tanto biológica como económica, por su gran adaptación a medios difíciles.

Las investigaciones en Cuba en cuanto al conocimiento de las características genéticas del ganado bovino cubano, comenzaron con la evaluación de los resultados de las pruebas de progenie y en estudios de polimorfismos bioquímicos de grupos sanguíneos y proteínas lácteas. Con la introducción de las técnicas de análisis del ADN se puede explorar el genoma de la especie y conocer sus características propias. Con la utilización de la información que estas técnicas brindan, es posible verificar la diversidad genética de diferentes poblaciones del ganado bovino. Esta tecnología es

aplicable al estudio de caracteres de interés económico y de aquellos que aporten informaciones valiosas al conocimiento del genoma.

Por lo tanto, la posibilidad de conocer las características genéticas que posee el ganado cubano relacionadas con la producción y calidad de la leche, podría contribuir a los programas de mejora. Además, se pueden trazar estrategias de cruzamiento más efectivas, al reducir los riesgos de consanguinidad y garantizar así la pureza de las razas, lo cual es importante en programas de conservación de recursos genéticos nacionales.

Por ello, la **hipótesis** a demostrar es que "la variación molecular en los *loci* de las seis proteínas lácteas y de 30 microsatélites refleja la variabilidad y las asociaciones genealógicas de las razas bovinas cubanas Criollo, Siboney y Cebú entre sí y con sus posibles ancestros".

Teniendo en cuenta el estado actual de desarrollo de la biotecnología y sus posibles aplicaciones a la ganadería, el hecho de que en nuestro país existan genofondos valiosos que aún no se han explorado y que su conocimiento puede ser útil tanto para el diseño de programas de selección como para la conservación de recursos genéticos, el **objetivo general** fue la aplicación de los marcadores moleculares a la caracterización de las tres razas bovinas: Criollo de Cuba, Siboney de Cuba y Cebú Cubano. Los **objetivos particulares** fueron:

- ✓ Conocer la estructura genética de las tres razas de ganado bovino Criollo de Cuba, Siboney de Cuba y Cebú Cubano, a partir de las seis proteínas principales de la leche.
- ✓ Analizar 30 *loci* microsatélites, recomendados por la FAO para estudios de biodiversidad, en las tres razas bovinas cubanas analizadas.
- ✓ Indagar sobre las posibles relaciones entre las tres razas bovinas cubanas estudiadas y algunas razas españolas.

CAPITULO II. REVISION BIBLIOGRAFICA

II. Biotecnología aplicada a la producción animal

El término "biotecnología" se refiere a un grupo de herramientas que utiliza a los organismos vivos o partes de estos, para hacer o modificar productos, mejorar plantas y/o animales o construir microorganismos por ingeniería genética, con un objetivo determinado (BIO 2000; Martin, 2000). Esta es una industria en crecimiento que puede ofrecer un medio importante para incrementar la eficiencia de la producción de alimentos y mejorar la salud de las poblaciones mundiales. Son numerosos los ejemplos del enorme potencial que ofrece la biotecnología en el aumento de la eficiencia y la confiabilidad de la producción animal, así como la seguridad, la calidad y la utilidad de los productos provenientes de la ganadería.

En el campo de la genética animal se ha producido una verdadera revolución en todas las vertientes de la investigación relacionadas con la producción con calidad y con la mejora de agrupaciones animales. Por una parte, se encuentra la Genética Cuantitativa, con una concepción y estudio integrales de los factores que inciden en la mejora. En su metodología se utiliza ampliamente la recopilación de datos, con una gran velocidad de cálculo y mayores posibilidades de almacenamiento dinámico de datos en bases interactivas. Por otro lado, está la Citogenética que aporta nuevos enfoques e informaciones para su aplicación en las producciones animales. También se encuentran las metodologías de que disponen la Biología Molecular y la Genética Bioquímica, que basándose en el estudio del material genético, tienen un papel imprescindible en la identificación genética y pruebas de parentesco, en el diagnóstico de enfermedades hereditarias y en el aporte de los marcadores genéticos para el apoyo a la selección dirigida a caracteres cuantitativos o económicos (Zaragoza *et al.,* 1994).

La mayoría de estas aplicaciones en el campo de la producción animal está basada en la variabilidad genética, detectada por marcadores entre individuos y poblaciones lo que lleva al estudio de los polimorfismos genéticos.

II.1. Métodos de detección de polimorfismo genético

La variación de naturaleza cuantitativa y de origen genético dentro de las poblaciones se presenta en dos formas básicas: mutantes raros y polimorfismo genético. Atendiendo al valor de la frecuencia, si la variante más escasa aparece con una frecuencia menor del 1% se denomina mutante raro, pero si ésta es mayor que este valor es un polimorfismo genético (Clarke, 1975). Así pues, Berovides y Alfonso (1987) definieron este último como la ocurrencia dentro de una población de variantes discontinuas de origen genético, con una frecuencia del gen que no puede ser explicada por la acción exclusiva de mutaciones, por ser este un evento sumamente raro.

La variabilidad genética es un atributo que no puede ser exhaustivamente medido. Es imposible examinar cada gen en cada individuo de una especie dada para obtener una enumeración completa de la variación genética de la especie; sin embargo, si se toma una muestra de una población es posible estimar su variabilidad genética (Ayala, 1984), al utilizar un carácter o marcador que propicie la medición de dicha variabilidad.

El polimorfismo genético o variación de origen genético ha sido muy estudiado en poblaciones naturales, pues permite el análisis de fenómenos como cantidad de variabilidad genética y frecuencia de mutaciones a través de caracteres de fácil medición y de base genética conocida, con poca influencia del ambiente en su expresión fenotípica (Berovides y Alfonso, 1987).

Hasta mediados de la década de los 60', los marcadores usados en genética y mejora animal estaban controlados por genes asociados a caracteres polimórficos, en general fáciles de identificar visualmente (Ferreira y Grattapaglia, 1995). Pero solo un pequeño número de marcadores morfológicos permitían encontrar asociaciones significativas entre estos y los caracteres con

importancia económica. Por sus limitaciones surgieron los marcadores isoenzimáticos que eran accesibles a un mayor número de especies y brindaban mejores resultados.

Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular aparecieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel de ADN. Inicialmente el descubrimiento de las enzimas de restricción permitió el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (Grodzicker *et al.,* 1974). Posteriormente, con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction (PCR), Mullis y Faloona, 1987; Saiki *et al.,* 1988), se desarrollaron nuevos métodos de detección de marcadores moleculares; estos últimos se definen (Ferreira y Grattapaglia, 1995) como todo aquel fenotipo molecular proveniente de un gen expresado, como en el caso de las isoenzimas o las proteínas (marcadores bioquímicos), o de un segmento específico de ADN (correspondiente a regiones expresadas o no del genoma).

En las determinaciones de la variabilidad genética, los marcadores "ideales" cumplen una serie de características: elevada capacidad de detectar altos niveles de polimorfismo, alta heredabilidad, gran capacidad para acceder a todas las regiones del genoma, independencia del estado físico y de desarrollo del individuo, facilidad de obtención, detección por métodos económicos, independencia de las condiciones ambientales y la posibilidad de determinación en cualquier tipo de células que contenga núcleo (Ferreira y Grattapaglia, 1995). Estas constituyen algunas de las ventajas de los marcadores moleculares sobre los morfológicos e isoenzimas; otras radican en su capacidad de detección de mutaciones silenciosas, que no originan cambios de aminoácidos.

Los polimorfismos detectados en el ADN están ocasionados por diferencias en cuanto al número de determinadas regiones no codificantes, que se encuentran dispersas en el genoma (regiones repetidas) o por mutaciones puntuales. En función de estas características se pueden clasificar los diferentes métodos de detección de polimorfismos, que serán expuestos a continuación enfatizando en los más utilizados en este trabajo: los marcadores asociados a variaciones debidas al número de

repeticiones en su secuencia y los marcadores que detectan cambios puntuales en el genoma, que pueden ser detectables o no por enzimas de restricción.

En primer lugar, dentro los marcadores asociados a variaciones debidas al número de repeticiones los primeros en ser utilizados fueron los minisatélites o VNTR ("Variable Number of Tandem Repeats") (Jeffreys *et al.,* 1985), que están ubicados en regiones centroméricas y teloméricas de los cromosomas (Moyzis *et al*., 1988). De esta observación surgió el concepto de huella dactilar genética o "genetic fingerprint" y este tipo de marcador constituyó durante un tiempo la base genética de la identificación de individuos. Estos se han utilizado cada vez menos, debido a causas como la gran complejidad de la técnica y su elevado costo, que limitan su utilización, por ejemplo, para la detección de genes ligados a *loci* de rasgos cuantitativos ("Quantitative Traits *Loci"*, QTL): *loci* con una gran influencia sobre rasgos comercialmente importantes, marcados por polimorfismos de ADN, cuya variación puede ser empleada en la selección de forma semejante a los genes simples y que se caracterizan por estar ligados a marcadores genéticos (Distl, 2000).

Los *loci* microsatélites (Litt y Luty, 1989; Koreth *et al.,* 1996), también conocidos como SSR ("Simple Sequence Repeat": Secuencias Simples Repetidas), consisten en pequeñas secuencias con 2-6 nucleótidos repetidos en tándem, altamente variables en tamaño, en un rango alrededor de los 100-200pb. Weber y May (1989) propusieron la PCR como método general para el estudio del polimorfismo de estas regiones, las que se amplifican individualmente utilizando un par de oligonucleótidos específicos (20-30mer) complementarios a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite. Los fragmentos amplificados, casi invariablemente, presentan un polimorfismo extensivo resultante de la diferencia en el número de elementos simples repetidos. Así, cada región microsatélite, independientemente de la secuencia repetida, constituye un *locus* altamente variable, multialélico y de gran contenido informativo. Cada segmento amplificado representa un alelo diferente del mismo *locus*. La detección de estas secuencias se realiza en geles de poliacrilamida

altamente resolutivos debido a que las diferencias entre uno y otro alelo pueden ser de uno o dos nucleótidos (Womack, 1993). Además, pueden analizarse muchos genotipos simultáneamente por ser los marcadores más adecuados para el desarrollo de mapas de ligamiento.

Por las ventajas que poseen estos marcadores, se ha trabajado ampliamente en la búsqueda y empleo en diferentes especies de interés en ganadería, tales como ovino (Buchanan *et al.,* 1998; Dietz *et al.,* 1993), caprino (Kemp *et al.,*1995), porcino (Moran, 1993), bovino (Fries *et al.,* 1990; Vaiman *et al.,* 1992; Usha *et al.,* 1995; Giovambatista *et al.,* 2000; Hansen *et al.,* 2002) y equino (Marklund *et al.,* 1994). Se han realizado estudios en distintas especies ganaderas y por supuesto en bovinos (MacHugh *et al.,* 1994; Ciampolini *et al.,* 1995; Moazami-Goudarzi *et al.,* 1997; Martín-Burriel *et al.,* 1999; Rusell *et al.,* 2000) que han tomado como base las investigaciones realizadas por Edwards *et al.,* (1992) relacionadas con la caracterización de poblaciones humanas.

Otro método de detectar la variabilidad genética consiste en identificar marcadores que presentan cambios puntuales en el genoma, donde se identifica fundamentalmente el cambio de una base por otra, que origina una mutación que puede ser detectable o no, por el corte de una enzima de restricción.

En este caso, en un primer momento fueron identificados los RFLPs ("Restriction Fragment Length Polymorphism": Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción) o marcadores detectados mediante enzimas de restricción. El estudio de los polimorfismos de este tipo consiste en el análisis en cuanto a número y tamaño de los fragmentos de ADN al ser digeridos con distintas enzimas de restricción. Los patrones de bandas resultantes se generan por la presencia o ausencia de los sitios de corte de la enzima producidos por mutaciones, delecciones o inserciones. Por lo tanto, la variabilidad está dada por las distintas tallas de los fragmentos que se originan al digerir con las mencionadas enzimas el material genómico o un fragmento amplificado del genoma, de manera que un sitio de restricción polimórfico o una delección o inserción entre dos sitios de corte

será detectado como un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción generados a nivel fenotípico (Botstein *et al.,* 1980). La identificación de estos polimorfismos puede hacerse por Southern Blot o por PCR (Leveziel *et al.,* 1988). Este método se ha empleado en la caracterización de los genes de algunas de las proteínas lácteas bovinas (Rodellar *et al.,* 1992; Osta, 1994).

En animales domésticos se ha realizado este tipo de análisis del ADN desde 1985, con numerosos trabajos en una amplia diversidad de especies: perros (Jeffreys *et al.,* 1987); cerdos (Davies *et al.,* 1988); gatos (Hillel *et al.,* 1989); cabras (Bergensen, 1990); ovinos (Leveziel *et al.,* 1991); bovinos (Rodellar *et al.,* 1992); aves (Bumstead, *et al.,* 1992; Cheng, 1997). En la actualidad su mayor utilización se basa en la combinación con la técnica de PCR.

También existen los marcadores que detectan cambios puntuales pero que no es posible estudiar por las enzimas de restricción, algunos de los cuales serán empleados en el presente trabajo para la tipificación de las proteínas lácteas. En primer lugar, están los ASOs ("Allele Specific Oligonucleotides"), los llamados oligonucleótidos alelo-específicos, cuya metodología de identificación consiste en la detección de la variabilidad mediante sondas específicas de los alelos. Pueden usarse marcados con radiactividad para detectar la variabilidad en un "dot blot" tras una amplificación (Pinder *et al.,* 1991) o como oligonucleótidos para PCR que amplificarán un alelo específicamente (Leveziel *et al.,* 1994; Okimoto y Dogson, 1996; Braunschweirg *et al.,* 1999). Presentan el inconveniente de que cuando se usan sondas, cada análisis deberá realizarse tantas veces como alelos sean detectados, ya que cada sonda será capaz de reconocer si el alelo está presente o no, pero no se puede determinar el genotipo del animal.

Otra forma de detección de este tipo de cambios puntuales es la creación de un sitio de restricción o ACRS ("Amplification Created Restriction Sites"). Este método se basa en originar, mediante los oligonucleótidos de la PCR, sitios de corte artificiales para alguna enzima de restricción (Medrano y Sharrow, 1991; Lien *et al.,* 1992), aprovechando la diferencia entre alelos. Así, la secuencia

original de uno de los alelos se modifica mediante la secuencia del cebador, y la Taq polimerasa sintetiza la cadena complementaria usando como molde la cadena de ADN y el oligonucleótido (Lien *et al.,* 1992; Osta, 1994); de esta forma aparece la secuencia de reconocimiento de la enzima, lo que permite la identificación de ambos alelos.

Existen otros métodos de detección de marcadores moleculares como los llamados RAPDs ("Random Amplified Polymorphism DNA"), que resultan de las amplificaciones mediante la utilización de oligonucleótidos al azar, los que han sido descritos en numerosas especies, (Hunt y Page, 1995; Cushwa y Medrano, 1996; Rincon *et al.,* 2000; Alves *et al.,* 2003). Estos se han empleado en la comparación de poblaciones bovinas, demostrando su utilidad en la determinación de distancias genéticas entre rebaños de diferentes origen geográfico (Bhattacharya *et al.,* 2003), así como entre poblaciones de *Bos taurus* y *Bos indicus* (Alves *et al.,* 2003). Los RAPDs se han utilizado para la caracterización racial en ganado bovino (Parejo *et al.,* 2002), pero su desarrollo requiere que se garanticen condiciones de adecuada repetibilidad, además de ser un método muy trabajoso y costoso.

Otro método es la identificación de SSCPs ("Single Strand Conformations Polymorphism", Polimorfismo de Conformación de las Cadenas Simples), que consiste en la detección de las diferencias en la estructura secundaria o terciaria entre fragmentos de ADN amplificados, con distinta secuencia (Orita *et al.,* 1989). Esto permite la detección de mutaciones puntuales de ADN sin necesidad de conocer su secuencia (Berta *et al.,* 1990) y son capaces de identificar entre el 30 y 70% de todos los polimorfismos debidos a una mutación simple (Larsen y Nielsen, 1992). Su detección se lleva a cabo en un gel de acrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Han sido utilizados en la identificación de variantes alélicas de las proteínas lácteas (Barroso *et al.,* 1999a y b, Prinzenberg *et al.,* 1999; Klauzinska *et al.,* 2001) así como en estudios de expresión de ellas

(Robitaille y Petitclere, 2000), pero para el desarrollo de esta metodología se requiere una amplia batería de oligonucleotidos que encarece su utilización.

Por último, está la detección de los SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), basados en la identificación de la sustitución de un nucleótido simple por otro. La mayoría de los métodos de detección de SNPs se basan en la amplificación de una secuencia diana y la identificación de las variantes en la secuencia de ADN por hibridación con sondas cortas, por digestión con endonucleasas de restricción, por reacciones con polimerasas o ligasas. Estos han sido empleados como marcadores para el diagnóstico de rasgos específicos (Jordan y Humphries, 1994) por ser abundantes en el genoma bovino (Heaton *et al.,* 2002), genéticamente estables (Markovstka *et al.,* 2000) y de análisis fácilmente automatizable (Lindblan-Toh, 2000), lo que ha permitido además, su utilización como marcadores para la identificación animal y pruebas de paternidad en ganado bovino (Heaton *et al.,* 2002). Precisamente la necesidad de la automatización, sin la cual sería muy engorrosa la aplicación de esta metodología, por una parte simplifica el análisis, pero en nuestras condiciones lo encarece.

La mayoría de los métodos descritos han sido empleados en la caracterización de los genes de las proteínas lácteas, objeto de estudio del presente trabajo, por lo que a continuación se describirán algunas de las características de los genes que las codifican.

II.2. *Loci* de las proteínas lácteas

Debido a su importancia comercial y nutricional, la leche probablemente es el alimento mejor conocido con respecto a su composición, biosíntesis y a la estructura química de sus componentes individuales. Esta es procesada para obtener una amplia diversidad de productos alimenticios, los cuales comprenden más del 25% de la proteína dietética consumida en el mundo industrializado (Barroso *et al.,* 1999). La leche constituye una emulsión de materias grasas en una solución acuosa que comprende numerosos elementos, disueltos o en estado coloidal (Zarazaga *et al.,* 1992). Su

compleja composición varía sensiblemente según las razas y los individuos, el período del parto, el estado de lactación, el régimen alimenticio, el número de ordeños y el estado sanitario de la glándula mamaria.

Zarazaga *et al.,* (1992) señalan que desde los años 50' se ha estudiado el papel del polimorfismo de las lactoproteínas en la composición de la leche y que desde hace casi medio siglo se trabaja en las aptitudes tecnológicas de dichas proteínas para la fabricación de quesos, otros productos lácteos y diversos derivados.

La composición de las proteínas lácteas difiere cualitativa y cuantitativamente entre especies. Las proteínas totales de la leche, las cuales pueden variar en cantidades entre 10 (primates) a 200 g/L de leche (lagomorfos), comprenden dos grupos de constituyentes, las caseínas y las proteínas del suero lácteo, además de algunos componentes menores. En la glándula mamaria de los rumiantes se sintetizan seis proteínas principales que constituyen el 95% del total de proteínas lácteas (34 g/L en la leche de vaca), las cuales son producidas bajo un control multihormonal complejo. Los niveles de proteínas de la leche, a diferencia de lo que ocurre en la fracción lipídica (Barroso *et al.,* 1999), están determinados prácticamente por factores genéticos lo que le concede gran importancia, por lo que es uno de los grupos moleculares mejor conocidos.

Las proteínas de la leche, sintetizadas como pre-proteínas, sufren una serie de modificaciones durante su transporte a través del citoplasma de la célula mamaria: modificaciones co-traduccionales (hidrólisis enzimática del péptido señal, formación de puentes disulfuro) en el retículo endoplasmático rugoso y modificaciones post-traduccionales (fosforilación de las caseínas, glicosilación de la κ-caseína) en las vesículas del aparato de Golgi (Mercier y Villote, 1993).

Varios autores han analizado la influencia de diferentes genotipos de proteínas lácteas en la calidad de la leche a través de los polimorfismos bioquímicos (Grosclaude, 1988; Bolla *et al.,* 1992), pero su difícil tipificación ha supuesto un obstáculo para su introducción en los planes de mejora. Para

conocer el genotipo de los machos se hacía necesario el estudio de las cadenas polipeptídicas y por lo tanto, el análisis de las proteínas en la leche, lo que implicaba obtener información a partir de sus hijas. Con la técnica de PCR y enzimas de restricción para obtener diferentes RFLPs, es posible el testaje de estas proteínas directamente en machos, bien a partir de sangre o semen. De la misma manera, se pueden tipificar animales en edades muy tempranas del desarrollo, (ej. el embrión) y en cualquier célula que posea un núcleo (linfocitos, semen, embriones, óvulos)(Osta *et al.,* 1993). Este hecho ha permitido que actualmente existan catálogos de sementales donde el genotipo de estas proteínas aparece descrito.

II.2.1. Estructura de los genes de las proteínas lácteas

La estructura y expresión de los genes de las proteínas lácteas se han investigado en, al menos 10 especies incluyendo los rumiantes y se ha descrito la secuencia de nucleótidos de muchos ARNm y genes (Threadgill y Womack, 1990; Vilotte *et al.,* 1991; Vilotte y Soulier, 1992; Bleck y Bremel, 1993; Provot *et al,* 1995).

La unidad de trascripción de los genes de las proteínas lácteas está formada por varios intrones y contiene en dirección 5' a 3', la señal de poliadenilación AATAAA, varias secuencias consenso de "*splicing*" y el sitio *cap*. Por delante de la unidad de trascripción se encuentra la caja TATA y posibles cajas CAAT con la señal de inicio de la trascripción para la ARN polimerasa II (Martin y Grosclaude, 1993).

La base molecular del polimorfismo de las proteínas de la leche es la sustitución o la supresión de aminoácidos en la estructura primaria de las proteínas, generadas por cambios de nucleótidos en la secuencia del gen que codifica para estas (Medrano, 1992). Los efectos de este polimorfismo en las propiedades de la leche pueden ser de dos tipos:

- ✓ Efecto biológico directo que provoca cambios en las características físico-químicas de la leche.

- ✓ Efecto cuantitativo en la variación de la tasa de síntesis de la proteína.

Los métodos para el estudio del polimorfismo de las proteínas lácteas han sido de gran interés entre los investigadores, lo que se ha demostrado por las numerosas experiencias realizadas en el ganado bovino de leche (Ng-Kwai-Hang, 1984; Zadworny y Kuhnlein, 1990; Ron *et al.,* 1994; Lindersson *et al.,* 1995; Rijnkels *et al.,* 1997b).

II.2.1.1. Genes de las caseínas

En la especie bovina, los genes de las caseínas se encuentran situados en el cromosoma 6 (Gallagher *et al.,* 1994), en el orden relativo αs_1-β-αs_2-κ (Ferretti *et al.,* 1990; Threadgill y Womack, 1990), dentro de una región de 250 Kb desde el punto de inicio de la trascripción de αs_1 hasta el extremo 3' del gen de la κ-caseína (Rijnkels *et al.,* 1997a). El ligamiento y orden relativo de las caseínas está conservado evolutivamente, demostrado por trabajos en ratón y humanos (Rijnkels *et al.,* 1997a y b). Las caseínas se comportan como una unidad genética, en la cual la combinación de alelos (haplotipos),puede ser una característica peculiar de una raza y usarse como herramienta o marcador genético (Lien y Rogne, 1993; Formaggioni *et al.,* 1999).

II.2.1.1.1. αs_1-caseína (CASA1)

Esta proteína está formada por dos componentes: αs_1 y αs_0 (Manson *et al.,* 1977). Su secuencia aminoacídica fue establecida por Mercier *et al.*, (1971) y Grosclaude *et al.,* (1973). La diferencia entre ambos radica en la adición de un grupo fosfato en la serina en posición 41 de la αs_0, que no está presente en la αs_1 (Eigel *et al.,* 1984). La αs_1-caseína consiste en 199 residuos de aminoácidos, con una delección de 13 residuos en el alelo A (Mercier *et al.,* 1971). Presenta un peso molecular de 23.614 Daltons y un punto isoeléctrico de 4.97 (Trieu-Cout y Gripon, 1981; Formaggioni *et al.,* 1999).

El cDNA de la proteína fue descrito por Stewart *et al.,* (1987) y posteriormente Koczan *et al.,* (1991) secuenciaron totalmente el gen. Este tiene una longitud de 17.5Kb; está compuesto por 19

exones en todas las variantes, excepto en la A en la que se pierde el exón IV, el último de los cuales no se traduce a proteína (Rando *et al.,* 1998). El exón II es quien codifica para el péptido señal, así como para los dos primeros aminoácidos de la proteína. Esta estructura es característica de las caseínas calcio dependientes (Mercier *et al.,* 1991).

El procesamiento (*splicing*) alternativo de esta proteína es una fuente importante de polimorfismo, al ser este proceso el responsable de la gran heterogeneidad de esta proteína en bovinos, caracterizada por la delección de los codones de los aminoácidos codificados por el exón IV, consecuencia de una mutación puntual en uno de los sitios de *splicing* (Mohr *et al.,* 1994) así como por la inserción en el exón XIX de un fragmento de alrededor de 400pb de origen retroposicional (Rando *et al.,* 1998).

En la Tabla 1 se muestran las modificaciones para cada una de las variantes de la proteína en bovinos con relación a la CASA1^{B}, considerada como variante base (Kiddy *et al.,* 1963; Thompson y Kiddy, 1964; Grosclaude *et al.,* 1966, 1974, 1976a y b; Bell *et al.,* 1981; Erhadrt, 1993; Rando *et al.,*1992, 1993; Prinzenberg *et al.,*1998; Mahé *et al.,*1999).

Tabla 1: Diferencias aminoacídicas entre las variantes de la αs_1-caseína

Variante	**Posiciones aminoacídicas**					
	14-26	**51-58**	**53**	**66**	**59**	**192**
A	Delección					
B*	-	-	GCC (A)	TCG (S)	CAA (Q)	GAA (E)
C						GGA (G)
D			ACC (T)			
E_{yak}					AAA (K)	GGA (G)
E_{Bali}**						
F				TTG (L)		
G	*"untcum"*, no hay diferencias con proteína madura; es sintetizada en menor cantidad que CASA1^{B}, originada por inserción de 371pb en el exón XIX					
H		Delección				

*Variante base de referencia
**Variante no caracterizada

La variante más difundida de esta proteína es la CASA1^{B}, presente en la mayoría de las razas con frecuencias entre 90-95% y en ocasiones 100%. Solamente en algunas razas como Jersey,

Guernsey, Normande, Italian Brown, Reggiana y Modenese las frecuencias son ligeramente menores (75-85%). En ganado Cebú y en Yak, predomina el alelo C (ν=0.90) con respecto al B (?=0.63) (Grosclaude *et al.,* 1976b). Sorpresivamente Lunden *et al.,* (1997), encontraron rebaños Holstein Suecos con frecuencias elevadas del alelo C.

La variante D no es muy común, observada en la raza francesa Flamande (Grosclaude *et al.,* 1966), Red Danish y Red Polish (Michalak, 1969), Jersey (Corradini, 1969), y otras razas italianas (Russo y Mariani, 1971; Chianese *et al.,* 1988). El alelo A se ha detectado en Holstein-Freisian, Red Danish (Larsen y Thymann, 1966), Kostroma (Petrushko, 1970) y otros rebaños de Holstein (Erhardt, 1993). El alelo G se ha detectado en algunas razas italianas como Agerolese y Modicana (Rando *et al.,* 1995; Marletta *et al.,* 1996).

Para la detección de estos polimorfismos es necesario crear sitios de corte para identificar las variantes de la proteína que se corresponden con sustituciones aminoacídicas, pues no presenta en su secuencia sitios reconocidos por ninguna endonucleasa de restricción. Lien *et al.,* (1993) crearon un sitio de restricción que es capaz de detectar la enzima *Hph*I, con el que se diferencia el alelo $CASA1^B$ (que se digiere) del $CASA1^C$ (que no se digiere), polimorfismo que utilizaremos en la caracterización de esta proteína en nuestro ganado. También en 1993, Koczan *et al.,* detectaron una mutación en la región próxima al promotor en el gen de esta proteína, lo que permite diferenciar las variantes antes mencionadas por digestión con la enzima *Mae*III. Se ha detectado además un sitio de repetición de trinucleótidos $(CTT)_{2/3}$ en el intrón IV del gen, a 15pb del inicio del exón IV (Prinzenberg *et al.,* 1997), que se ha identificado igualmente por PCR.

II.2.1.1.2 β-caseína (CASB)

La β-caseína es una proteína sensible al calcio sólo por debajo de los 18°C. Representa el 30% de la caseína total y tiene un peso molecular de 23 983 Daltons. Su estructura primaria está descrita desde 1972 (Ribadeau-Dumas *et al.,* 1972; Grosclaude *et al.,* 1973). Consiste en una proteína de

209 aminoácidos incluyendo cinco fosfoserinas (Eigel *et al.,* 1984). Este fue el primer gen secuenciado de las caseínas (Jones *et al.,* 1985) descrito totalmente por Bonsing *et al.,* (1988), el cual contiene una unidad de transcripción de 8.5Kb, que esta formada por 9 exones, de los que el primero y 12pb del segundo, corresponden a la zona 5' no traducida (Mercier y Villote, 1993).

En el ganado bovino, la β-caseína aparece con once variantes proteicas originadas todas por cambios de bases que provocan cambios en la estructura aminoacídica de la proteína (Aschaffenburg *et al.,* 1963 y 1968; Peterson y Kopfler, 1966; Voglino, 1972; Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992; Mercier y Grosclaude, 1993).

Las variantes más importantes se muestran en la Tabla 2. Se han reportado otras que aún no han sido caracterizadas, por lo tanto no aceptadas por muchos autores: A', A^3_m, B^2, A^4. Las más difundidas son A_1 y A_2, con un ligero predominio de la segunda en la mayoría de las razas con genes *B. taurus*. La variante B también está muy difundida, aunque con menor frecuencia que las anteriores y algo mayor que $CASB^C$ (Formaggioni *et al.,* 1999). Según Aschaffenburg *et al.,* (1968). La variante D es típica del ganado *B. indicus* de la India y Africa.

Tabla 2: Diferencias aminoacídicas entre las variantes de β-caseína bovina de composición conocida

Variante	Posiciones aminoacídicas									
	18	**25**	**35**	**36**	**37**	**67**	**106**	**122**	**137**	**152**
A*										
A^1						CAT (H)				
A^{2**}	AGC (S)	AGG (R)	AGC (S-P)	GAA/G (E)	GAA (E)	CCT (P)	CAC (S)	AGC (S)	CCT (P)	CCT (P)
A^3							CAA (Q)			
A^5										
B						CAT (H)		AGG (R)		
C			TCG (S)		AAA (K)	CAT (H)				
D	AAA/G (K)									
E				AAA (K)						
H		TGT (C)				CAT (H)				
F						CAT (H)			CTC (L)	
G						CAT (H)				CTC (L)

*Variante no caracterizada
**Variante base, de referencia

Para la detección de las variantes alélicas de esta proteína se han utilizado las técnicas de isoelectroenfoque y electroforesis bidimensional, utilizando el conocimiento de su punto isoeléctrico y su peso molecular (Trieu-Cout y Gripon, 1981; Seibert *et al.,* 1985). Los estudios realizados a nivel de ADN son menos numerosos que para otras proteínas lácteas, los cuales comenzaron con la realización de Southern Blot utilizando las enzimas *Hind*III, *Taq*I y *Msp*I (Threadgill y Womack, 1990). De forma análoga a la αs_1-caseína, el empleo de la metodología de PCR presenta dificultades, pues los cambios en la proteína no van acompañados por cambios en el ADN que puedan ser reconocidos mediante una enzima de restricción en las distintas variantes genéticas. Esto hace necesaria la utilización de técnicas como ACRS, ASO o SSCP (Savva *et al.,* 1990; Pinder *et al.,* 1991; Barroso *et al.,* 1999a, b).

II.2.1.1.3. αs_2-caseína (CASA2)

Esta es una familia de proteínas que incluye αs_2, αs_3, αs_4 y αs_6, las cuales presentan la misma secuencia de aminoácidos pero diferente contenido en grupos fosfato (13, 12, 11 y 10,

respectivamente). La secuencia de la variante A, la más frecuente de esta proteína, fue descrita por Brignon *et al.,* (1977). Está formada por 207 aminoácidos con un peso molecular que varía entre 25 150 y 25 930 Da, dependiendo del número relativo de grupos fosfato (Mercier *et al.,* 1991), y es la más fosforilada de las caseínas sensibles al calcio.

La organización estructural del gen αs_2-caseína se ha determinado en bovinos (Stewart *et al.,* 1987; Martin *et al.*, 2002), cuya unidad de trascripción de 18.5Kb, es el más largo de los genes de las cuatro caseínas, aunque muy similar al gen de αs_1-caseína y comprende 18 exones entre 21 y 266pb.

Se describe una gran homología entre esta proteína y la αs_1-caseína, según su secuencia nucleotídica similar y la talla de sus exones (Mercier y Villote, 1993). Al igual que la αs_1-caseína, tiene mayor número de intrones que la β-caseína. También presenta algunas peculiaridades como la secuencia homóloga de las zonas N y C terminales (Brignon *et al.,* 1977) y la homología entre los nucleótidos de su ARNm (Stewart *et al.,* 1987). Esto sugiere que la cadena polipeptídica de esta proteína fue originada por la duplicación de un gen primitivo.

Para esta proteína se han descrito cuatro variantes genéticas que se muestran en la Tabla 3. La primera evidencia de polimorfismo fue mostrada por Grosclaude *et al.,* (1976) en poblaciones *Bos taurus* y *Bos indicus* nepalesas, en las que encontraron las variantes A y B, además de identificar la variante C en Yaks mongolés, alelo particular de *Bos grunniens*, mientras que $CASA2^B$ nunca se ha reportado en esta especie, pero sí en *Bos indicus* con frecuencias de 0.34. Existen otras evidencias de esta última variante en el ganado *Bos taurus*, pero esta no ha sido caracterizada aún (Erhardt, 1993; Ikonen *et al.,* 1996; Formaggioni *et al.,* 1999). Grosclaude *et al.,* (1978) encontraron que al producirse una delección de nueve aminoácidos correspondiente a la totalidad del exon VIII, se origina el alelo $CASA2^D$ proceso semejante al que ocurre en la CASA1.

Tabla 3: Diferencias aminoacídicas conocidas entre las variantes de αs_2-caseína bovina

Variante	Posiciones aminoacídicas			
	33	**47**	**51-59**	**130**
A	GAG (E)	GCA (A)	-	ACC (T)
B*				
C	GGG (G)	ACA (T)		ATC(I)
D			Deleción	

* Su composición química se desconoce

Las técnicas de isoelectroenfoque y electroforesis bidimensional han permitido la detección de las variantes de esta proteína (Trie-Cout y Gripton, 1981; Seibert *et al.,* 1985). Se conoce que en la mayoría de las razas estudiadas esta proteína se presenta como monomórfica (fijada para el alelo $CASA2^A$)(Osta, 1994).

II.2.2.1.4. κ-caseína (CASK)

La familia κ-caseína consiste en un componente principal libre de carbohidratos y en uno menor glicosilado. Este último presenta la misma secuencia de aminoácidos pero con diferencias en la naturaleza y número de grupos carbohidrato (MacKinlay y Wake, 1965). La primera secuencia conocida de esta proteína fue la reportada por Mercier *et al.,* (1973).

La κ-caseína es una proteína constituida por 169 aminoácidos con un peso molecular de poco más de 19 000 Da y difiere de las restantes caseínas en el número de grupos fosfato fijados a la molécula y en su glicosilación. Representa el 13% del total de las caseínas y su concentración en la leche es de 3.5g/L (Grosclaude, 1988).

La principal característica de la κ-caseína es que presenta propiedades químicas y físicas únicas al compararla con las restantes proteínas lácteas, las cuales tienen consecuencias inmediatas en el estado físico de la leche (Swaisgood, 1975; Eigel *et al.,* 1984), como son:

- ✓ Se mantiene soluble en soluciones de calcio en condiciones en las que precipita las otras caseínas debido a que carece de MPS (sitio mayor de fosforilación)

- ✓ Tiene la capacidad de estabilizar a otras caseínas contra la precipitación por calcio formando micelas coloidales
- ✓ Es la única de las caseínas que contiene cadenas laterales de carbohidratos y residuos de cisteína
- ✓ Se hidroliza por la acción de la enzima renina, originando la desestabilización de las micelas y la formación de precipitados

Las secuencias de los ADN complementarios (cADN) de la κ-caseína han sido descritas en varias especies (Nakhasi *et al.,* 1984; Gorodetsky y Kalendi, 1987; Furet *et al.,* 1990); la estructura del gen fue parcialmente investigada en la especie bovina (Alexander *et al.,* 1988) y finalmente descrita por Mercier *et al.,* (1990). El gen de la κ-caseína en la especie bovina, presenta una unidad de transcripción de 13kb de longitud dividida en solamente cuatro intrones y cinco exones. Todos los intrones son grandes y tanto el segundo, que divide la región que codifica para el péptido señal, como el tercero, que contiene muchas secuencias repetitivas de tipo *Ahu*, contienen microsatélites polimórficos.

Dicho gen difiere grandemente del de las otras caseínas. Esta parece estar relacionada evolutivamente con la familia del fibrinógeno a nivel aminoacídico (Jolles *et al.,* 1978), el cual tiene una función semejante a la de la κ-caseína en cuanto a su relación con la formación de coágulos en el torrente sanguíneo (Guyton, 1980). Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que la κ-caseína, en presencia de 50% de alcohol, tiene características fibrosas. Así, Alexander *et al.,* (1988) proponen que la κ-caseína y el γ-fibrinógeno están relacionados evolutivamente y su divergencia recae en la pérdida de intrones y reagrupamiento de exones.

Se han descrito 10 alelos del gen κ-caseína. Los más frecuentes son $CASK^{A}$ y $CASK^{B}$, los restantes aparecen muy raras veces, las que se diferencian en la sustitución de varios aminoácidos (Ng-Kwai-Hang *et al.,* 1991; Klauzinska *et al.,* 2001). Schlieben *et al.,* (1991) describen la

secuenciación de la variante CASK^{E}, después de haber sido identificada por PCR/RFLP, lo que proporciona la diferenciación directa entre esta y las variantes A y B. Miranda *et al.,* (1993) desarrollaron una PCR para diferenciar las variantes C y E. Existe también un microsatélite en el intrón III de este gen (Lien y Rogne, 1993) del que se han detectado seis alelos (Levéziel *et al.,* 1994). En 1999, Prinzenberg *et al.,* reportaron tres alelos para esta proteína: H, I, A1. Los dos primeros se originan por cambios de bases, y el tercero aparece como producto de una mutación silente en el tercer codón de la prolina en la posición 150, referido al alelo A. La última variante detectada es la J, que fue encontrada por Mahé *et al.,* (1999) en ganado africano Bavolí (*B. taurus*) y se caracteriza por una sustitución en la posición 155 de una serina por una arginina, comparándola con la variante B (Tabla 4).

Tabla 4: Diferencias aminoacídicas entre las variantes de la κ-caseína bovina

Variante	**Posiciones aminoacídicas**							
	10	**97**	**104**	**135**	**136**	**148**	**150**	**155**
A*	CGC (R)	CGT (R)	AGC(S)	ACC(T)	ACC (T)	GAT (C)		AGC (S)
A1							**	
B					ACT (I)	GCT (A)		CGC (R)
C		CAT (H)			ACT (I)	GCT (A)		
E								GGC (G)
F	CAC (H)							
G		TGT (C)						
H				ACT(I)				
I			GCT(A)					
J								AGC (S)

*Variante Base
** Mutación silente en el tercer codón de la prolina

También se ha encontrado variación en la región 5' del gen CASK relacionada con sitios de regulación potencial y posiblemente involucrada en la expresión del gen, por lo que es posible que la diferencia en la expresión de los alelos A o B de CASK esté relacionada con alguna de estas mutaciones (Kaminski, 1996). Debeljak *et al.,* (2000) se refieren a la expresión diferencial debido al control post-traduccional que determina las diferencias en el contenido de esta proteína en la

leche. Se ha reportado otra región polimórfica relativa a un sitio SINE (Short Interspersed Elements) en el intrón II del gen (Damiani *et al.,* 2000).

La tipificación de este gen se ha realizado incluso en embriones bovinos utilizando la PCR, a partir de muy pequeñas cantidades de ADN (incluso de una célula) y digiriendo con enzimas de restricción (Osta *et al.,* 1993).

Los análisis de los genes de las caseínas en distintas especies han permitido concluir que la β-caseína, la αs_1-caseína y αs_2-caseína provienen de un ancestro común, comprobándose que han evolucionado muy rápidamente (Mercier y Chobert, 1976; Martin, 2002). Las características que han llevado a pensar en un ancestro común para estas proteínas son:

- ✓ La presencia de varios motivos estructurales comunes
- ✓ La similitud de organización del comienzo de la unidad de transcripción
- ✓ Los sitios múltiples de fosforilación de tipo "Ser-Ser-Ser-Glu-Glu" originados por "splicing" de dos exones

II.2.1.2. Genes de las proteínas del suero (proteínas séricas)

Son un grupo de proteínas que permanecen en solución en el suero lácteo después de la precipitación de las caseínas a pH 4.6 a 20ºC. Son dos: α-lactoalbúmina (LAA) ubicada en el grupo sinténico U3 del cromosoma 5 (Fries *et al.,* 1993) y la β-lactoglobulina (LGB) en el cromosoma 11, grupo sinténico U16 (Hayes y Petit, 1993), lo que justifica su segregación independiente con respecto a los *loci* de las caseínas (Formaggioni *et al.,* 1999).

II.2.1.2.1. α-lactoalbúmina (LAA)

Se trata de una metaloproteína cálcica de estructura globular, muy conservada entre las especies de rumiantes domésticos. Influye en la síntesis de la lactosa en el aparato de Golgi de la glándula mamaria, modificando la especificidad de sustrato de la galactosiltransferasa, importante en la síntesis de la leche y controlando así el movimiento de agua (Bleck y Bremel, 1993). Por la

similitud en su secuencia aminoacídica con la RBP (Retinol Binding Protein) del suero humano, podría unir y transportar retinol u otros ligandos hidrofóbicos pequeños en los infantes.

Esta proteína tiene un peso molecular de 14 175 Daltons y presenta gran homología con la lisozima; de los 123 residuos aminoacídicos de la α-lactoalbúmina, 24 son idénticos a los hallados en la enzima lisozima de la clara de huevo de gallina. Estas proteínas que aparentemente no están relacionadas, comparten un ancestro común (Soulier *et al.,* 1989), al ser capaces de activar grupos carbohidratos (Grosclaude, 1988).

El cADN de esta proteína se conoce en diferentes especies (Hall *et al.,* 1982; Gaye *et al.,* 1987; Hurley y Schuler, 1987; Kumagai *et al.,* 1987; Villote *et al.,* 1987). Su unidad de transcripción es de aproximadamente 2Kb; el gen está compuesto de cuatro exones, en el que el exón II es el doble en tamaño de cada uno de los restantes. El primer exón codifica para la porción 5' no traducida del gen y los primeros 25 aminoácidos de la proteína. Además del gen funcional de la α-lactoalbúmina, se han descrito varios pseudogenes (Vilotte *et al.,* 1993), que son genes afuncionales por mutaciones en la región promotora (Martin-Burriel, 1997).

En la proteína madura se han detectado dos variantes alélicas fundamentales de la α-lactoalbúmina que se diferencian entre sí por la sustitución del residuo de aminoácido en la posición 10, siendo Gln en LAA^A y Arg en la LAA^B (Grosclaude, 1988). La variante B ha sido encontrada en todas las razas, mientras que la A está presente sólo en ganado *Bos indicus* (Formaggioni *et al.,* 1999). Existe una tercera variante (LAA^C) detectada en ganado de Bali y *Bos javanicus* (Bell *et al.,* 1981) debida a una sustitución de aminoácidos que ocasiona un cambio aminoacídico (Asp→Asn) pero no se sabe cuál es su posición.

Otro polimorfismo en la α-lactoalbúmina, conocido como αLa(+15)(Bleck y Bremel, 1993) fue encontrado en la secuencia no codificante del gen. De este se han descrito dos variantes (A y B) caracterizadas por una adenina y una guanina en la posición +15 del gen, respectivamente. Esta

mutación es una característica peculiar del ganado Hosltein-Freisian, aunque también se ha descrito en Holstein de Taiwan (Mao *et al.*, 1991), en ganado italiano (Dall'Olio *et al.,* 1999), y en las razas Suizo Rojo y Blanco (Lunden y Lindersòn, 1998). En 1997, Voelker *et al.,* encontraron otra diferencia en una base simple localizada en la posición –1689 a partir del *tsp*, representada por una transición adenina (LAA^A) → alanina (LAA^B), e hicieron notar que existe relación entre estas y que el polimorfismo $\alpha La(+15)^A$:$\alpha La(+15)^A$ siempre estuvo ligado a la variante $\alpha La(-1689)^A$. Este polimorfismo se ha encontrado por Chung y Kim (1999) también en poblaciones Holstein coreanas.

Mediante la utilización de la técnica de PCR es posible detectar los polimorfismos descritos para esta proteína, cuya la metodología está descrita en la base de datos del proyecto europeo del genoma bovino (http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv).

II.2.1.2.2. β-lactoglobulina (LGB)

La β-lactoglobulina, es la proteína sérica más abundante en la leche de los rumiantes (3g/L en bovinos; Mercier *et al.,* 1990), sintetizada en la glándula mamaria y formada por 162 aminoácidos, con un peso molecular de 18 277 Daltons. Esta es la proteína encargada de unirse al retinol (vitamina A), y de esta forma la vitamina es transportada para su aprovechamiento por el recién nacido (Clark *et al.,* 1989). No está presente en todos los mamíferos, y es producida por aquellas especies que transfieren gran cantidad de inmunoglobulinas a sus crías.

La secuencia de la proteína fue reportada por primera vez por Braunitzer *et al.,* (1972), la cual fue corregida posteriormente por Groscalude *et al.,* (1976b) y Préaux *et al.,* (1979). El cDNA de la β-lactoglobulina bovina fue descrito por Jamieson *et al.,* en el año 1987. El gen β-lactoglobulina está completamente secuenciado en las especies bovina y ovina (Ali y Clark, 1988; Harris *et al.,* 1988; Alexander *et al.,* 1992). Presenta una unidad de transcripción de aproximadamente 5Kb de longitud que contiene 6 intrones (Mercier *et al.,* 1993). Su organización es similar a la de los genes que

codifican para la proteína urinaria principal de ratón (MUP-Murine Urinary Protein) (Ali y Clark, 1988) y la proteína de unión al retinol (RBP-Retinol Binding Protein) (Papiz *et al.,* 1986). Todo esto apunta a la confirmación de que estos genes provienen de un ancestro común muy antiguo, que se remonta a un tiempo anterior a la división entre vertebrados e invertebrados, puesto que estas proteínas están presentes en ambos.

A nivel de polimorfismo genético, la β-lactoglobulina fue la primera en la que se observaron variantes genéticas de las proteínas lácteas (Tabla 5). Aschaffenberg y Drewry en 1955 y 1957, reportaron la presencia de las variantes LGB^A y LGB^B en las razas Ayrshire, Guernsey, Holstein y Shorthorn. A estos trabajos les sucedieron una serie de investigaciones hasta la actualidad, donde se han descrito 12 alelos más en diferentes razas (Figura 7) (Bell, 1962; Meyer, 1966; Bell *et al.,* 1970; Grosclaude *et al.,* 1976; Bell *et al.,* 1981; Baranji *et al.,* 1993).

Tabla 5: Diferencias aminoacídicas entre las variantes de la β-lactoglobulina de composición conocida

Var.	**Posición aminoacídica**												
	28	**45**	**50**	**56**	**59**	**64**	**78**	**108**	**118**	**129/130**	**135**	**155**	**158**
A						GAT (D)					ACC (T)		
B	GAC (D)	GAG (E)	CCT (P)	ATC (I)	GAG (Q)	GGT (G)	ATC (I)	GAG (E)	GCC (A)	GAC (D)	ATC (I)	TCT (S)	GAG (E)
C					CAC/T (H)								
D		CAG (Q)											
Dr	AAC (N)					GAT (D)			GTC (V)				
Dyak/ E													GGG (G)
F			TCT (S)							TAC (Y)			GGG (G)
G							ATG (M)						
W				CTC (L)									
I								GGG (G)					
J												AGG (R)	
H											ATC (I)		

Las variantes más estudiadas por su importancia en la producción de leche y queso son LGB^A y LGB^B, y las más frecuentemente encontradas en la mayoría de las poblaciones (Grosclaude *et al.*, 1991). Estas dos variantes difieren en dos aminoácidos y este polimorfismo puede ser detectado por PCR-RFLP. También se han desarrollado técnicas moleculares que utilizan la metodología de identificación de alelos específicos (ASO) y métodos de estudio de SSCPs, capaces de detectar mutaciones puntuales en esta proteína que no pueden ser identificadas por endonucleasas (Jador *et al.*, 1992).

La PCR se ha empleado para amplificar y clonar una región del *locus* β-lactoglobulina abarcando los exones IV y V (849pb), cuya secuencia reveló dos nuevas sustituciones de nucleótidos simples (SNPs) que permiten diferenciar entre los alelos A y B. La mutación se localizó en la secuencia del intrón entre los dos exones en la posición 276 (T en A y C en B) y en 562 (T en A y G en B) en el fragmento clonado, con un perfil de restricción alelo específico que puede ser utilizado como marcador molecular (Zhou *et al.*, 1996).

II.3. *Loci* microsatélites

En genomas eucariotas las secuencias de los microsatélites son muy frecuentes, bien distribuidas y mucho más polimórficas que los *loci* hipervariables formados por minisatélites, constituyendo la clase de marcadores moleculares más polimórficos que se conocen (Ferreira y Grattapaglia, 1995). Se ha señalado que los elementos más repetidos en mamíferos son extensiones de dinucleótidos CA.

Por el momento, se desconoce exactamente el origen y la función de estas secuencias repetidas. Respecto a su origen, la aparición inicial de los microsatélites pudo deberse al azar, o podrían haber surgido como producto de mutaciones en la secuencia poli-A en el extremo 3' de las secuencias *Alu* adyacentes. Por otra parte, la prevalencia selectiva de CA puede explicarse por metilación de los residuos de citosina en el extremo 5' de GC, secuencias normalmente presentes en el genoma.

Por último, los residuos metilados pueden ser desaminados produciendo una transición C/T (Koreth *et al.,* 1996).

En relación con su función, se cree que no son más que un reflejo interno de mecanismos genómicos con tendencia a producir y cortar estas secuencias (Tauz *et al.,*1986), donde existen evidencias de que no son necesarios para la expresión génica (Stalling, 1994). Anteriormente se habían propuesto como puntos calientes en la recombinación genética, en los cuales se producen entrecruzamientos con intercambios desiguales de cromátidas (Slightom *et al.,* 1980; Weber y May, 1989) y como reguladores de genes (Hamada *et al.,* 1984). Por último, Kashi *et al.,* (1997) lanzaron la hipótesis de que los microsátelites son una fuente de variación cuantitativa. Estos autores se basaron en una serie de características de estas regiones como son su dispersión a lo largo del genoma, su asociación a genes como elementos de control de transcripción o como componentes codificantes, las variaciones observadas en el número de repeticiones que pueden causar cambios cuantitativos en la expresión génica y función, así como cambios fenotípicos, entre otras. Así, la variación en el número de repeticiones puede ser un medio exquisitamente específico y sensible de regulación cuantitativa de variación. Esta fuente de mutación y cambio en el número de repeticiones podría proveer una fuente de variación cuantitativa para una rápida adaptación evolutiva de las especies a cambios ecológicos. Así, se ha descrito (Rosenberg *et al*., 1994) que la nutrición y el estrés podrían incrementar la velocidad de mutación en los microsatélites debido a un descenso de la regulación de reparación de errores. De esta forma, el estrés que acompaña al cambio evolutivo podría inducir en una población el incremento de mutaciones requeridas para adaptarse al cambio.

Los microsatélites han demostrado ser los marcadores más informativos para estudios poblacionales a nivel de subespecie. La mayoría de los estudios realizados hasta el momento con este tipo de marcadores se basa en el análisis de frecuencias alélicas, con la finalidad en un

principio de la creación de mapas genéticos y posteriormente para la determinación de QTLs (Georges *et al.,* 1995; Velmala *et al.,* 1999).

II.4. Aplicaciones de los marcadores moleculares en ganadería

Como ya se ha expuesto, la biotecnología se está utilizando en diversos campos de la producción y sanidad animal. Entre sus principales aplicaciones en ganadería se encuentran la identificación y chequeo de parentesco, la contrucción de mapas genéticos, el desarrollo de nuevos tratamientos de enfermedades.

Una de sus primeras aplicaciones ha sido la identificación y chequeo de parentesco. En países de alto desarrollo ganadero y especialmente en especies de interés económico, específicamente en vacunos y equinos, la identificación genética y el obligado establecimiento de pruebas de paternidad, queda lejos de cualquier duda como argumento para la fiabilidad y credibilidad de los libros genealógicos en las distintas razas (Zaragoza *et al*, 1994). En esos países, todo aquel que se dedique directa o indirectamente a la selección ganadera, debe aceptar el análisis de conformidad.

En vacunos, cerdos y caballos principalmente, el control de parentesco se ha realizado de forma rutinaria en la mayoría de los países mediante la metodología de grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos, dirigida su estandarización por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG). En Europa, desde hace más de una década, la legislación acerca del tema exige la obligatoriedad de acompañar todos los registros e intercambios de material genético vivo, semen o embriones, con documentos que acrediten la veracidad y contrastación de paternidad del mencionado material genético. Estos métodos clásicos de polimorfismos bioquímicos y grupos sanguíneos presentan limitaciones, debido a que estos representan del 5 al 10% del genoma, no se detectan mutaciones silenciosas, se requieren técnicas específicas para cada marcador y la exclusión de paternidad solo suele llegar al 95% si el número de marcadores es elevado (Ferreira y Grattapaglia, 1995).

La ISAG, en la XXIII Conferencia Internacional sobre Genética Animal, decidió el estudio y estandarización de las técnicas de análisis de ADN para su posible uso futuro en las pruebas de paternidad (http://www.inmgen.com), sobre todo de microsatélites, debido a las características que los han convertido en marcadores de elección para este tipo de estudios (Craighead *et al.,* 1995; Schnabel *et al.,* 2000).

Estos marcadores constituyen una herramienta fundamental en la construcción de mapas genéticos (Todd, 1992). Dichos mapas, además de su indudable interés científico, son herramientas fundamentales para la identificación y aislamiento tanto de genes responsables de enfermedades como otros de interés económico (ej. QTLs)(Rodríguez-Zas *et al.*, 2002) para posteriormente utilizar esta información en programas de mejoramiento animal a través de la llamada Selección Asistida por Marcadores (Marker Assisted Selection, MAS). Grisat *et al.,* (2002) y Brunner *et al.,* (2003) entre otros, han desarrollado metodologías para la identificación de QTL en bovinos.

El esfuerzo realizado a nivel mundial para la construcción de los mapas genéticos de distintas especies está dando sus frutos en la actualidad, ofreciendo hoy verdaderas aplicaciones prácticas, tanto en el campo de la salud como en el productivo e industrial.

En la especie humana (Weissenbach *et al.,* 1992) y en el ratón (Dietrich *et al.,* 1992), se utilizaron secuencias anónimas de microsatélites para la construcción de mapas con una distancia media entre marcadores consecutivos de 5cM. En ratas, se publicó un mapa compuesto exclusivamente por microsatélites asociados a secuencias codificantes (Serikawa *et al.,* 1992). En la especie bovina, se estimó que se necesitaría un mínimo de 150-200 marcadores para construir un mapa de 20 cM de resolución (Lange y Boehnke, 1982; Steele y Georges, 1991).

En la actualidad se ha pasado de la asignación de los genes con herencia mendeliana a grupos de ligamiento, mediante cruces de estirpes de ratones con fenotipos mutantes, a las nuevas tecnologías como el "clonaje posicional" o "genética inversa", en el que una vez encontrado un marcador

asociado a una enfermedad, se busca el gen responsable de ella (Takeda *et al.*,2002), y al "clonaje funcional", basado en el conocimiento previo de la base bioquímica de la proteína o enzima causante, por ejemplo, de una enfermedad, para posteriormente localizar el gen (Collins, 1992; Permyakov *et al.*, 2001). De esta forma, en la especie humana se han encontrado los genes responsables de la anemia falciforme (Saiki *et al.*, 1985), la distrofia muscular de Duchenne (Chamberlain *et al.*, 1988), y la fibrosis quística (Estivill *et al.*, 1989), entre otros.

A pesar de que este campo no se encuentra tan desarrollado en las especies productivas, este tipo de metodología también se ha utilizado. Un ejemplo es la detección del gen responsable de la acondroplasia en bovinos (Takeda *et al.*, 2002). Una vez conocido, se ha realizado un test mediante PCR que permite identificar la enfermedad en cualquier muestra que contenga ADN. Otro ejemplo lo representa el conocido síndrome BLAD (Bovine Leucocite Adhesion Deficience) o "LAD bovine" (Kehrli *et al.*, 1992) que ha sido propagado por la utilización del semen de un semental canadiense portador de la enfermedad. Esta se debe a un defecto de la expresión de la proteína CD18 causado por una mutación en el gen que origina una alteración en el transporte de los leucocitos desde la sangre a los lugares de infección (Smith *et al.*, 1989; Shuster *et al.*, 1992). El método de diagnóstico desarrollado por Kehrli *et al.*, (1992a), consiste en la amplificación específica de un fragmento del gen CD18 mediante la técnica de PCR (Tammen *et al.*, 1996; Zsolnai y Fesüs, 1996; Mukhopadyaya *et al.*, 2000).

En el campo de la sanidad animal se han utilizado estas metodologías moleculares en el desarrollo de nuevos tratamientos de enfermedades, en la creación de vacunas como la de la fiebre aftosa, primer producto de la biología molecular, la de la tuberculosis bovina (Buddle, 1996) o de la brucelosis bovina (Al-mariri *et al.*, 2002), así como en la creación de anticuerpos monoclonales (utilizados en vacunas y tratamientos), inmunoglobulinas, etc. Pero no solo se han aplicado en lo

relacionado con la salud veterinaria, sino también en lo referente a los aspectos que influyen en la producción y calidad de la leche, sobre todo en el ganado bovino.

II.4.1. Variantes genéticas de las proteínas de la leche y producción láctea

Son muy numerosos los estudios llevados a cabo acerca de las variantes genéticas de las proteínas de la leche y su relación con sus componentes fundamentales. Estas investigaciones se han basado en el estudio de la evolución química de dichas proteínas y su similitud eventual con otras, en la verificación de las relaciones entre especies o razas, en el control de las variaciones en el tiempo y el espacio de cierta población animal y fundamentalmente para conocer el significado biológico de las variantes genéticas. Sus resultados han estado dirigidos a la posibilidad de utilizar los genes de las lactoproteínas, como marcadores genéticos para mejorar los aspectos cuantitativos y cualitativos de la producción láctea, así como las propiedades tecnológicas de la leche.

Los resultados obtenidos por diferentes autores parecen ser contradictorios, pues a la complejidad del carácter producción láctea se le une la gran variabilidad de las condiciones experimentales (tamaño de muestra, razas implicadas, proteína específica estudiada y frecuencias relativas de sus variantes, procedimientos de determinación de genotipos y variantes consideradas, métodos de estimación de la producción, etc.), así como el rigor de los ajustes estadísticos de otros factores igualmente importantes sobre la producción de leche (edad de la vaca, estación, estado sanitario o efectos de otras variantes genéticas)(Falaki *et al.,* 1997; Buchberger y Dovc, 2000). No obstante, se han realizado numerosos estudios de relación entre las variantes genéticas de las proteínas lácteas y sus efectos sobre las características tecnológicas de la leche en diferentes especies, con mucho mayor énfasis en el bovino, especie en la cual incluso se ha comenzado la aplicación de programas de selección asistida por marcadores, dirigidos al mejoramiento en función de los genotipos de algunas de estas proteínas, en países como Austria, Alemania, Italia y Suiza, entre otros (Kenelly *et al.,* 2000).

En la Tabla 6 se resumen los efectos reportados que ejercen las diferentes variantes de las lactoproteínas, descritos en la literatura. En algunos casos, el efecto de determinadas variantes se ha demostrado por diferentes trabajos, mientras que en otros solo han sido encontrados por un autor. En estos casos, el efecto que se refiere debe ser tomado con precaución y ser comprobado por otros grupos de trabajo. También es necesario considerar que la mayoría de estos estudios se realizaron en ganado Holstein, además de tener en cuenta la influencia de factores como la raza, el estado de salud del animal, las condiciones ambientales, el tiempo y número de lactancia, las condiciones de manejo, entre otras, por lo que la información que se ofrece no debe considerarse como absoluta, aunque se tiende a utilizar como criterio de selección (Kenelly *et al.*, 2000).

Tabla 6. Efecto de las distintas variantes de las proteínas lácteas en algunos de los componentes de la leche.

Carácter	Efecto	Variantes	Referencias
Producción de leche	Favorable	$CASA1^B$	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1984, 1986; Aleandri *et al.*, 1990
		$CASB^A$	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986
		$CASK^A/CASK^A$	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986, Lin *et al.*, 1989
		LGB^A	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986, Bolla *et al.*, 1992
Producción de grasa	Favorable	$CASA1^B$	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986; Aleandri *et al.*, 1990
		$CASB^B/CASB^B$	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986
		$CASK^B/CASK^B$	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986
		$LAA(+15)^A/LAA(+15)^A$	Bleck y Bremel, 1993
		LGB^B	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986; Aleandri *et al.*, 1990
% de grasa	Favorable	LGB^B	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986; Aleandri *et al.*, 1990
	Desfavorable	$CASK^B$	Cowan *et al.*, 1992
		$LAA(+15)^A/LAA(+15)^A$	Bleck y Bremel, 1993
Proteína total	Favorable	$CASA1^B$	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986; Aleandri *et al.*, 1990
		$CASB^A$	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1984, 1986; Graml *et al.*, 1986
		$CASK^B$	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1984, 1986; Van der Berg *et al.*, 1992
		$LAA(+15)^A/LAA(+15)^A$	Bleck y Bremel, 1993
		LGB^B	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1990 ; Hill, 1993
% Proteínas	Favorable	$CASA1^B/CASA1^C$	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986; Aleandri *et al.*, 1990; Ripoli *et al.*, 1999
		$CASK^B/CASK^B$	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1990; Aleandri *et al.*, 1990
		LGB^A	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986, 1990 ; Cowan *et al.*, 1992
Proteinas del suero	Favorable	LGB^A	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986; Van der Berg *et al.*, 1992
% caseína	Favorable	$CASB^B$	Graml et al., 1986 ; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1987
		$CASK^B/CASK^B$	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1987 ; Mariani, 1983
		LGB^B/LGB^B	Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986 ; Hill, 1993
Extracto seco	Desfavorable	LGBA/LGBA	McLean *et al.*, 1984; Hill, 1993

Las caseínas aumentan la concentración de calcio y fosfato en la leche al formar micelas estables con estos minerales. Las micelas, formadas por estas αs_1, αs_2 y β-caseínas y el Ca_2PO_4, se estabilizan por la interacción con la κ-caseína, que interviene en la formación del coágulo. Esta propiedad es importante fisiológicamente, puesto que un coágulo firme asegura la retención de las proteínas de la leche en el estómago del infante, lo que contribuye al proceso de digestión (Threadgill y Womack, 1990).

Su efecto también influye en las propiedades tecnológicas de la leche. Sartore y Stasio (1984) indicaron que la combinación LGB^B, $CASB^B$ y $CASK^B$ lo es para la leche destinada a la producción de queso y LGB^A, $CASB^C$ y $CASK^A$ lo es para la leche destinada al consumo directo. Esto ha sido confirmado por Formaggioni *et al.,* (2000) quienes refieren evidencias de que las leches caracterizadas por el alelo B de estas tres proteínas presentan un menor contenido de nitrógeno y mejores propiedades de coagulación que aquellas leches tipo A, por lo tanto favorables las primeras para la producción de quesos. Según Tejedor *et al.,* (1986), la selección a favor de la $CASK^B$ ejerce un efecto de arrastre favorable a los alelos LGB^B y $CASB^B$ y negativo para el alelo $CASA1^C$. No debemos obviar el tipo de asociación o ligamiento que existe entre los genes estructurales de las caseínas en el cromosoma 6.

En relación con la α-lactoalbúmina debido a su escaso o casi nulo polimorfismo a nivel proteico, son pocos los resultados que se han publicado con respecto a los efectos de esta proteína en las características tecnológicas de la leche a pesar de ser una de las proteínas lácteas más estudiadas. En el caso de la β-lactoglobulina, se observa un efecto beneficioso de la LGB^B sobre la producción de queso. Probablemente debido a su relación con mayor cantidad de caseína, presenta una mayor firmeza del cuajo (Rahali y Menard, 1991) y mayor rendimiento total de queso (Aleandri *et al.,* 1990; Jakob y Puhan, 1992). Los efectos de las diferentes variantes de la αs_2-caseína en las

aptitudes tecnológicas de la leche o las características productivas de calidad no han sido ampliamente estudiados.

No fue hasta la puesta en marcha de las técnicas de biología molecular para el testaje de proteínas lácteas, que los genotipos de éstas se introdujeron en los programas de mejora. Los catálogos de sementales de distintos países como Suiza, España, Canadá e Italia muestran el genotipo del animal para la κ-caseína y β-lactoglobulina en los reproductores seleccionados (Zaragoza *et al.,* 1992; Zarazaga *et al.,* 1992).

II.4.2. Evaluación de la Biodiversidad a través de marcadores moleculares

El término Biodiversidad puede ser equiparado con la "riqueza de especies", esto es, el número de especies que ocupa un lugar determinado y la variedad de actividades que cada especie realiza o ha realizado a lo largo de su existencia. La Biodiversidad incluye un gran número de procesos que varían de localidad en localidad o de hábitat en hábitat. La riqueza de especies en un determinado lugar se observa en el número de interacciones inter e intra especies y cómo estas se agrupan y cohabitan en el mismo sitio (Erwin, 1991). El estudio de la Biodiversidad es una herramienta que puede ser utilizada para establecer las decisiones políticas necesarias para la conservación de las especies.

Las estrategias de conservación han sido marcadamente antropocéntricas. Durante los tiempos feudales, la aristocracia preservaba todo aquello que le pertenecía, como los bosques en los que realizaba cacerías. Esto, junto con el control natural y cultural estricto de las poblaciones humanas, dio como resultado la protección del medio ambiente durante siglos. Hoy, la conservación de las especies se debe a la percepción de la pérdida de biodiversidad a nuestro alrededor. Las campañas al respecto se basan principalmente en la disminución de fuentes potencialmente útiles, como plantas con actividad farmacéutica o animales de interés para la especie humana. En la práctica, esto da como resultado la conservación de la fauna y flora en un espacio de tierra reducido en el

cual residen algunos taxones bien conocidos (FAO, 1999), pero la ciencia ha sido demasiado lenta para proveer datos que ayuden a la realización de este objetivo. Lo que debió ser un esfuerzo colectivo entre conservación y ciencia generalmente no ha existido o incluso, en algunos casos, ha sido discordante.

Cuando nos referimos a conservación de especies, generalmente tendemos a pensar en variedades de plantas o animales salvajes. Sin embargo, las razas de interés en producción animal han sido reconocidas como componentes importantes de la biodiversidad mundial, debido a que los genes que portan y la combinación de ellos pueden ser de gran utilidad en el futuro de la agricultura. La ganancia económica que puede suponer la utilización de este material genético puede superar los gastos de su conservación. Muchas de las razas, que alguna vez tuvieron una gran importancia económica, se encuentran ahora prácticamente en extinción (Hall y Bradley, 1995).

Una raza es un grupo de animales seleccionados por el hombre que tiene una apariencia uniforme, que los distingue de otros miembros de la misma especie. Se ha calculado que existen 3213 razas de burros, vacas, cabras, caballos, cerdos, ovejas y búfalos y, posiblemente 1000 de estas razas se encuentran en peligro de extinción (Hall y Ruane, 1993; Bradley *et al.,* 1994). En un principio, el valor de los genes de interés en producción podría conservarse mediante cruzamiento al azar de los individuos, sin tener en cuenta hs razas. Esta estrategia no se debe estimular porque los genes son difíciles de evaluar y de recuperar. Además, las razas pueden poseer combinaciones únicas de alelos como resultado de la adaptación a distintos cambios ambientales que podrían ser difíciles de volver a conseguir (Hall y Bradley, 1995). Uno de los hechos más frecuentes que ha dado lugar a la pérdida de razas ha sido la absorción por otras "más fuertes", por el repetido uso de machos de estas razas en cruzamientos con hembras pertenecientes a las razas menos productivas. Uno de los principios básicos para la conservación de estas poblaciones ha sido la promoción de las razas

puras, lo que ha dado lugar a la formación de libros genealógicos en los que se controla, por parte de las asociaciones ganaderas, los pedigrís genéticos.

La necesidad de la conservación de las razas alcanza un interés incluso mayor en los países en vías de desarrollo. En muchos de estos países, la utilización de razas nativas puede dar resultados productivos mejores que los obtenidos con la importación de razas caracterizadas por grandes niveles de producción principalmente utilizadas en países más industrializados. Las razas propias de estas localidades tienen un gran potencial para incrementar su producción y se encuentran adaptadas al medio, sin embargo, las altamente seleccionadas procedentes de la Europa Occidental o de Norte América, sólo pueden conseguir su gran potencial productivo cuando se crían en condiciones óptimas en cuanto a nutrición o tratamiento veterinario y al ambiente. Esto también puede aplicarse a razas autóctonas de países más desarrollados, pero en las cuales el sistema de producción tradicional supone que los animales permanezcan durante grandes periodos de tiempo, si no en su totalidad, en espacios abiertos. En este tipo de producción extensiva, la adaptación al medio es fundamental para conseguir niveles productivos económicamente rentables.

El estudio de las razas indígenas y la descripción de sus recursos genéticos únicos desde el punto de vista de la genética molecular, puede proveer en un futuro muy cercano una guía de gran utilidad para su conservación. Sin embargo, el éxito en la conservación de las razas de interés en producción animal dependerá finalmente, tanto del desarrollo de las políticas de conservación en países individuales, como de la filosofía de las agencias internacionales para el desarrollo. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 1993a) ha desarrollado un programa integrado para el manejo global de los recursos genéticos. El éxito de esta iniciativa y otras similares tendrá una importancia vital para la conservación de los recursos biológicos que iniciaron y sostienen a la civilización humana (Hall y Bradley, 1995).

Para conservar la biodiversidad, en primer lugar, tenemos que conocer la base genética de las distintas poblaciones. Para ello, la genética molecular ofrece un amplio rango de técnicas que permiten obtener los datos suficientes con los que, una vez procesados mediante la utilización de diversos parámetros estadísticos, poder caracterizar y diferenciar las poblaciones. Generalmente esta diferenciación se expresa en forma de árboles filogenéticos, los cuales dan idea de los distintos patrones de relaciones entre poblaciones y, según la longitud de sus ramas, la divergencia entre ellas.

La genética molecular combinada con otras disciplinas como la reproducción, epizotiología de enfermedades infecciosas o ecología, puede ser aplicada directamente en los planes de conservación de especies. Aporta información de la cantidad de variación genómica, diferenciación genética entre taxones y relaciones filogenéticas de poblaciones aisladas (O´Brien, 1994). Se ha observado cómo genes altamente polimórficos y cruciales para la defensa del organismo como es el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), aparecen prácticamente monomórficos en poblaciones con una consanguinidad elevada (O'Brien *et al.,* 1985). La aplicación de técnicas de genética molecular también ha permitido el conocimiento de los procesos reproductivos de las especies salvajes, de la selección natural realizada en ciertas comunidades y de la estructura social de las mismas (Norin *et al.,* 1994).

Numerosos han sido los ejemplos de utilización de la genética molecular para estudios de biodiversidad (Pépin *et al.,* 1995; Ellegren *et al.,* 1997; MacHugh *et al.,* 1997; Martín-Burriel *et al.,* 1999, Kantanen *et al.,* 2000; Kim *et al.,* 2001). En muchos casos, estos se basaron (y aún se basan) en el empleo de los microsatélites como marcadores poderosos por sus ventajas ya descritas anteriormente. Estas ventajas los hacen muy versátiles en sus aplicaciones, entre las que se encuentran, con una alta frecuencia la detección de variabilidad genética y diferenciación de la estructura poblacional entre diferentes razas; así como estudios de filogenias y pruebas de

paternidad que han permitido la evaluación de la historia genética y demográfica reciente de las razas.

Este tipo de marcadores exhibe un elevado poder de discriminación entre razas de una misma especie, lo que ha sido utilizado especialmente en la especie bovina, donde la combinación, en muchos de estos *loci* de alelos raza-específicos, ha permitido establecer las características moleculares de algunas razas (MacHugh, 1996; Blott *et al.,* 1999) además de la determinación de mezclas o cruzamientos entre razas (Hall y Bradley, 1995).

Esta información, que resulta útil para la selección de animales cuyos genotipos sean favorables para reproducir, permitirá la elaboración tanto de programas de cruzamientos como de estrategias de conservación de determinado grupo genético. La evaluación de la diversidad a nivel molecular es particularmente útil para diseñar planes y tomar decisiones en cuanto a la conservación de razas importantes, sobre todo si se trata de países en vías de desarrollo, en los cuales, el mantenimiento de dichas razas (productivas y resistentes) resulta más económico que el de razas especializadas importadas (Barker *et al.,* 1993). Además, se puede evitar una reducción en la diversidad genética, lo que de ocurrir, restringiría las posibilidades de los ganaderos de cumplir con los requerimientos productivos (FAO, 1996).

La pérdida de rebaños autóctonos o indígenas, que teniendo alta resistencia o tolerancia a enfermedades y a diferentes condiciones ambientales, son capaces de permitir su explotación en ambientes extremos, también afecta seriamente la capacidad de los hombres de vivir en grandes áreas de una forma sostenible. Sin las razas locales y los métodos tradicionales de cultivo, muchos aspectos culturales pueden desaparecer y la población humana perdería parte de su propia historia y tradiciones (FAO, 1999).

En la actualidad un grupo de países, liderado por la FAO y financiado por la Unión Europea, han puesto sus esfuerzos en la realización de proyectos de conservación de recursos genéticos, y

especialmente en la especie bovina, desde el BovMap (dirigido al mapeo del genoma bovino) pasando MoDAD (proyecto coordinado por la FAO para estudios de diversidad de animales domésticos), hasta los más recientes (RESGEN: liderado por la Asociación Europea de Producción Animal para realizar un inventario de los recursos genéticos de la ganadería europea y trazar estrategias para su caracterización, conservación y utilización), en los que se combinan las técnicas de genética molecular, genética de poblaciones, estadísticas e informática, para generar información de las características genéticas de las poblaciones de esta especie. Hasta ahora, la mayoría de este tipo de proyectos está siendo realizado por los países más desarrollados. Actualmente, se está intentando desarrollar proyectos mucho más amplios, que incluyan también a otros países menos desarrollados pero que cuenten con una gran riqueza de recursos genéticos. Estos estudios aportarían conocimiento suficiente para decidir los planes de conservación y cruzamiento de razas para mantener la biodiversidad, en este caso bovina, del planeta.

II.5. Razas autóctonas cubanas seleccionadas para su caracterización

II.5.1. Ganado Criollo de Cuba

Antes del descubrimiento de América, no había ganado bovino en el continente. Fueron Cristóbal Colón, en su segundo viaje, y otros navegantes portugueses y españoles quienes trajeron los primeros ejemplares. Los primeros bovinos en aclimatarse provenían de España y era un ganado andaluz, *Bos taurus*, de tamaño mediano y de color variable. Se empleaba tanto como animal de carga como para la obtención de carne y leche. Según algunos autores (Granado *et al.*, 1974), nuestra raza Criollo no es más que el producto de un prolongado proceso de selección natural, en parte empíricamente dirigido, de los descendientes del ganado introducido por los españoles. Entre sus posibles ascendientes se señalan la Rubia Gallega, la Asturiana y la Andaluza. Sin embargo, se ha relacionado el origen del ganado Criollo con el arribo a Cuba de animales procedentes de

Jamaica, el cual tenía genes *Bos indicus*, lo que fue corroborado por Sánchez *et al.*, (1977) al encontrar rasgos citogenéticos de esta especie en sementales Criollo.

Desafortunadamente, pocas veces se reconoce explícitamente la necesidad de desarrollar eficientes programas de mejora genética en la raza Criollo de Cuba, en cuyo caso se hace hincapié en los aspectos de conservación de su genofondo como recurso genético para el futuro. Aunque estas premisas son totalmente válidas (Menéndez-Buxadera y Planas, 1996), este ganado puede cumplir también las metas actuales de desarrollo sostenible en la producción animal que demandan un amplio conocimiento de aquellos genotipos capaces de mantener un adecuado comportamiento en condiciones difíciles.

II.5.2. Ganado Cebú Cubano

Los animales que se agrupan bajo la denominación de Cebú pertenecen a un conjunto de variedades de ganado vacuno pertenecientes a la especie *Bos indicus,* y a los cuales algunos investigadores le asignan su origen geográfico a la India, aunque también se piensa que pudieron originarse además en regiones del Cercano Oriente, en Asia o en África (Prada *et al.,* 1979). Esta especie es más resistente que el *Bos taurus*, fundamentalmente en ambientes tropicales y sub-tropicales, por lo que fue necesaria su introducción en los programas de mejora, para incrementar la rusticidad y la resistencia de los genotipos especializados en la producción de leche.

Las primeras importaciones de Cebú a Cuba ocurrieron después de las guerras de independencia y fue en los inicios del siglo XX que se incrementaron los hatos de Cebú procedentes de Jamaica, Estados Unidos y Brasil. Se introdujeron diferentes variedades: Gir, Guzerat, Nelore, Indo Brazil y Brahman, las que se mezclaron y dieron origen al tipo racial denominado por nuestros criadores "Cebú Cubano". Este genotipo ha sido la población base para transformar nuestra ganadería improductiva, hacia niveles superiores de producción de carne y leche (Prada *et al.,* 1979), además de aportar los genes de resistencia al medio tropical.

II.5.3. Ganado Siboney de Cuba

La transformación de la ganadería cubana en poco más de 40 años, a partir de una población eminentemente cebuína (aproximadamente el 96% del total) y de pequeños núcleos lecheros aislados, hacia una ganadería cuyos niveles productivos pudieran satisfacer las necesidades crecientes de consumo de leche de la población, fue uno de los principales objetivos económicos y sociales del país desde principios de la década del 60 (López, 1998). La estrategia fue incrementar la potencialidad productiva lechera del ganado existente y desarrollar paralelamente una explotación adecuada a las condiciones tropicales.

Con la introducción a escala nacional de la técnica de inseminación artificial y la producción masiva de animales F_1 Holstein-Cebú, se trazaron dos líneas fundamentales de desarrollo: el programa de absorción del Holstein y la formación de nuevas razas. La primera tenía como objetivo principal el desarrollo de un programa que permitiera identificar los animales de mejor comportamiento bajo nuestras condiciones y la producción de toros con mayor nivel de adaptación al trópico. La segunda línea estaba encaminada a la obtención de dos nuevos genotipos: el Siboney de Cuba (estabilizado en la proporción 5/8H-3/8C) y el Mambí de Cuba (3/4H -1/4C)(López, 1998). A principios de la década de los 80', se realizó una modificación en la política genética inicial. Esta nueva etapa se conoce como Programa Nacional de Mejora Genética (PNMG; Prada, 1983) y uno de sus aspectos principales lo constituía el uso del Siboney de Cuba sobre una parte importante de la población bovina nacional. De esta manera, con su propagación masiva, se dio respuesta a la necesidad de mantener niveles intermedios de cruzamientos *Bos taurus* x *Bos indicus*, especialmente en aquellos lugares donde las condiciones no recomendaran el incremento de los genes de Holstein.

CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

III.1. Animales

Se tomaron 50 muestras aleatorias de cada una de las poblaciones seleccionadas para su estudio. El rebaño muestreado de la raza Criollo de Cuba estaba ubicado en la vaquería 073 de la Empresa Pecuaria Genética "Los Naranjos", en el oeste de la provincia La Habana. El muestreo se realizó en dos etapas, la primera en diciembre del año 2000 y la segunda el septiembre del 2002. De la población Cebú Cubano se tomaron muestras del rebaño ubicado en la unidad 681, de la Granja Pedernales de la mencionada Empresa en Noviembre del 2002. Tanto en el Criollo como en el Cebú todas las muestras se obtuvieron de hembras adultas.

De la raza Siboney de Cuba se tomaron muestras de la Empresa Pecuaria Genética "Nazareno", de la Provincia La Habana, 42 de las cuales eran provenientes de vacas ubicadas en diferentes vaquerías (002, 020, 038) así como de semen de ocho toros que se encontraban en prueba de progenie en el momento en que se realizó el muestreo (Diciembre 2001).

III.2. Obtención del material genético

El ADN fue extraído de diferentes materiales de partida. En la mayoría de los casos (142 individuos), la sangre periférica se colectó en tubos con 500mM EDTA como anticoagulante, posteriormente se congeló a -20ºC para conservarla hasta su uso. De esta forma se obtuvo el material de partida para la extracción del material genético de todas las hembras de las tres razas. El ADN de los ocho sementales Siboney en prueba, de los cuales no fue posible obtener sangre, se extrajo partiendo del contenido de una pastilla de semen congelado, tal y como se usa para inseminación.

III.2.1. Extracción partiendo de sangre periférica

La extracción de ADN a partir de sangre periférica se realizó por dos métodos en dependencia del momento de su obtención, para lograr ADN con la pureza y concentración adecuadas. Los métodos se describen a continuación:

III.2.1.1. Método rápido

Esta metodología fue descrita por Osta (1994), dirigida a la obtención de ADN para ser utilizado como molde en reacciones de PCR. Se partió de 200µL de sangre periférica y se realizaron lavados con solución NE 10x (10M NaCl, 10M EDTA), hasta que en la muestra no quedaron restos de hemoglobina (sobrenadante claro); después de cada lavado se centrifugaron las muestras a 13 000 rpm durante dos minutos y se eliminó el sobrenadante, quedando los leucocitos en el precipitado.

Este se digirió con 400µL de solución PK2 (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 9.0, 1% Tritón X-100, 200µg/mL proteinasa K), durante 1 hora a 56ºC. Se agitó suavemente y se mantuvo media hora más en incubación a la misma temperatura. Posteriormente se inactivó la enzima, incubando la muestra a 99ºC por 15 minutos y se conservó a 4ºC hasta su uso.

III.2.1.2. Método de precipitación salina ("Salting out")

Se procedió a la extracción del material genético por el método propuesto por Miller *et al*, (1988).

Se tomaron 200µL de sangre descongelada y se adicionó 1 mL de solución SSC 1X (150mM NaCl, 15mM Na Citrato) y se homogenizó por inversión del tubo eppendorf. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante por inversión suave del tubo. Estos lavados se repitieron dos veces más hasta conseguir un sobrenadante traslúcido donde se observó bien el pellet de células nucleadas. Se centrifugó brevemente y se eliminó el resto de sobrenadante con una pipeta, procurando no tocar el pellet de células. Se adicionaron 100µL de solución de lisis (buffer GET 1x: 1M Glucosa, 1M Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M EDTA, pH 8,) y se agitó fuertemente en vortex para resuspender el pellet. Se añadieron además 225µL de una mezcla que contenía 200µL de la solución de lisis, 20µL de SDS 10% y 5µL de proteinasa K 10mg/mL, se homogenizó y se incubó por una hora a 56°C.

Transcurrido este tiempo se pasó a un homogenizador de tubos y se mantuvo en movimiento a temperatura ambiente por una hora. Si una vez pasado este tiempo se observaban aún partículas

en suspensión, se adicionaban 5µL más de la enzima y se continuaba la incubación en movimiento hasta que desaparecieran las partículas.

Seguidamente se añadieron 100µL de NaCL 6M y se agitó fuertemente por 15 segundos, para provocar la precipitación de las proteínas desnaturalizadas. Se centrifugó 5 minutos a 10 000 rpm y se pasó el sobrenadante con una micropipeta a un nuevo tubo de 1.5mL, cuidando no arrastrar el pellet de proteínas; se adicionaron 300µL de una solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se centrifugó 2 minutos a 10 000 rpm. Se trasvasó la fase acuosa superior a un tubo nuevo de 1.5mL, intentando no remover la interfase. Se adicionaron al tubo 2 volúmenes de etanol 95% frío y se mantuvo en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante por inversión suave del tubo.

Se adicionó 1mL de etanol al 70% frío, se agitó suavemente y se centrifugó a 10 000 rpm durante dos minutos, y se eliminó luego el sobrenadante por inversión suave del tubo. Este procedimiento se repitió una vez más para lograr la eliminación total de las sales. Finalmente se secó el pellet al vacío y para resuspenderlo se adicionaron 50µL de buffer TE 1X (10mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.25mM EDTA), se incubó a 56°C durante 30 minutos, y se dejó posteriormente a 4°C durante toda la noche.

III.2.2. Extracción partiendo de semen

La extracción de ADN a partir del contenido de las pastillas de semen congelado se realizó por dos métodos rápidos, para obtener el material genético con la calidad y concentración deseadas para su empleo como molde de la PCR.

III.2.2.1. Método A

Este método fue descrito por Tompsem *et al.,* (1991). El contenido de una pastilla de semen se lavó cuatro veces con 1mL de 0.9M NaCl. Después del último lavado se resuspendió la muestra en una solución compuesta por 200µL de 0.2M NaOH y 300mg de DTT, y se incubó a 100°C

durante 10 minutos. Se neutralizó la muestra con 200µL de 0.2M Tris-HCl, pH 7.8, se centrifugó 15 minutos a 13 000 rpm, y se colectó finalmente el sobrenadante.

III.2.2.2. Método B

Tomando como base el método reportado por Lien *et al.,* (1993), se tomaron pastillas de semen de 200-250µL, se descongelaron en hielo y se centrifugaron en un tubo de 1.5mL, a 6 000 rpm durante 5 minutos para después eliminar el sobrenadante. Se resuspendió completamente el precipitado de esperma en 1 mL de solución TES (1M Tris-HCl, 0.5M EDTA, 3M NaCl), y se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso anterior, eliminando igualmente el sobrenadante. Se adicionaron al pellet 500µL del buffer de digestión (3M NaCl, 1M Tris-HCl, 0.5M EDTA, 20% SDS), además se añadieron cuidadosamente 22µL de DTT 0.1M y 27µL de proteinasa K (20mg/mL). Se incubó la reacción a 55ºC durante 3 horas, al cabo de las cuales se realizó extracción con fenol equilibrado con Tris a pH 7.8 (500µL) y se mezcló por inversión fuerte del tubo, y se centrifugó posteriormente durante 2 minutos a 10 000 rpm.

Transcurrido este tiempo se transfirió la fase acuosa superior a otro tubo y se le adicionaron 300µL de fenol equilibrado y 300µL de cloroformo. Se mezclaron las fases por inversión fuerte del tubo y se centrifugó a 10 000 rpm por 2 minutos. Se tomó la fase acuosa superior y se transfirió a otro tubo que contenía 700µL de cloroformo, se mezclaron bien ambas fases y se centrifugó en las mismas condiciones que en los dos pasos anteriores.

Se transfirió la fase acuosa superior a un nuevo tubo de 1.5mL y se le adicionaron 2 volúmenes de etanol 95% frío y se mezcló suavemente. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se secó el pellet al vacío. Se resuspendió el ADN en 80-150µL de buffer TE 1X.

Una vez resuspendido y disuelto totalmente el ADN obtenido por todos los métodos, se realizó electroforesis en geles de agarosa 0.8%, en buffer TBE 0.5X (44.5mM Tris-HCl, pH 8.0; 44.5mM ácido bórico; 1mM EDTA) para comprobar la presencia del material genético. Se

midió la densidad óptica a 260 y 280nm para determinar la concentración y estimar la pureza del ADN extraído. Para su posterior empleo en PCR, se ajustaron las concentraciones de todas las muestras a 250ng/µL, realizándose las diluciones necesarias con buffer TE 1X.

III.3. Tipificación por PCR/RFLP de los genes que codifican para las proteínas lácteas

Las metodologías de amplificación específica se correspondieron con las PCR descritas para el testaje de las seis proteínas lácteas [α_{s1}-caseína (CASA1), β-caseína (CASB), α_{s2}-caseína (CASA2), κ-caseína (CASK), α-lactoalbúmina (LAA) y β-lactoglobulina (LGB)], con posterior digestión con endonucleasas de restricción. Para la tipificación de la α_{s1}-caseína (Lien *et a*l., 1993) y la β-caseína (Medrano y Sharrow, 1991) se empleó el método ACRS (creación de sitios de restricción) para la identificación de sus diferentes variantes por no presentarse en el fragmento amplificado ningún sitio de corte específico para alguna enzima de restricción. Así también, para la determinación de los genotipos de la κ-caseína se utilizó la metodología ASO (ologonucleotidos alelo-específicos), para la detección de un alelo específico ($CASK^A$).

Las condiciones de reacción para todas las proteínas lácteas fueron descritas por Osta en 1994. Se preparó una mezcla de reacción 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.8, 1,5mM $MgCl_2$, 0,1% de Triton X-100, 0,2mM de dNTPs, 75pmol de cada uno de los oligonucleótidos específicos para cada caso (Tabla 7) y una unidad de la Taq Polimerasa (Promega) en un volumen final de 50µL.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones estudiadas

Loci	Nombre	Secuencia (5'-3')	Ta (ºC)	Referencia
CASA1	CASA1(36)	CTgCTCCACATgTTCCTgAg	57	Lien *et al.*, 1993
	CASA1(37)	CggATCCTATTggCTCTgAgAACggTg		
CASB	CASB(18)	CCAgACACAgTCTCTAgTCTATCCC	59	Medrano y Sharrow, 1991
	CASB(19)	CAACATCAgTgAgAgTCAggCTCCg		
CASA2	CASA2(31)	TgTgTATTCTCTTgAgCCAC	62	Osta, 1994
	CASA2(32)	TgATTTCTCCATTgCTCACC		
CASK	CASK1	TgAg**C**AggTATCCTAgTTAT	42	Osta, 1994
	CASK2	TgAg**T**AggTATCCTAgTTAT		
	CASK3	TTTgATgTCTCCTTAgAgT		
LAA	LAA(33)	TTCCTggATgTAAggCTTgA	62	Osta, 1994
	LAA(34)	ggTATgAAACgCggTACAgA		
LGB	LGB(29)	TgTgCTggACACCgACTACAAAAAg	60	Medrano y Aguilar-Cordova,
	LGB(30)	gCTCCCggTATATgACCACCCTCT		1989

Se tomaron 10 µL de cada uno de los productos amplificados para ser digeridos con las enzimas específicas para cada fragmento (Tabla 8), en un volumen final de 15µL, con 1U de cada enzima, 1.5µL de buffer específico para cada una de ellas y se completó el volumen con agua desionizada. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción a 37ºC durante 3h (Osta, 1994).

Tabla 8: Enzimas de restricción para cada fragmento de proteína amplificado

Loci	Enzima
CASA1	*Hph*I
CASB	*Msp*I
CASA2	*Mnl*I
CASK	*Hind*III
LAA	*Msp*I
LGB	*Hae*III

III.4. Tipificación de microsatélites bovinos

Se realizó la amplificación por PCR de 30 microsatélites (Tabla 9) que se corresponden con los incluidos en el Proyecto MoDAD de la FAO para estudios de biodiversidad (http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html) como metodología para la caracterización genética de cada rebaño. Las reacciones de amplificación y la visualización de la reacción se

realizaron según la metodología disponible en la Base de Datos "Cattle Diversity" (http://www.ir.bbsrc.ac.uk/cdiv_www). Los controles de talla empleados fueron facilitados por la Dra. Pilar Zaragoza, Universidad de Zaragoza, España, los cuales eran muestras previamente tipificadas junto con controles de talla incluidos en el proyecto MoDAD y por lo tanto, su genotipo era conocido.

Tabla 9: Microsatélites utilizados.

Marcador	Crom.	Secuencia de los oligonucleotidos (5' - 3')	Ta (ºC)	Referencia
INRA063 (D18S5)	18	ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC AAACCACAGAAATGCTTGGAAG	55	Vaiman y Mercier, 1994
INRA005 (D12S4)	12	CAATCTGCATGAAGTATAAATAT CTTCAGGCATACCCTACACC	55	Vaiman *et al.*,1992
ETH225 (D9S1)	9	GATCACCTTGCCACTATTTCCT ACATGACAGCCAGCTGCTACT	65	Stephen *et al.*,1993
ILSTS005 (D10S25)	10	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGTAAGC	58	Brezinsky *et al.*,1993a
HEL5 (D21S15)	21	GCAGGATCACTTGTTAGGGA AGACGTTAGTGTACATTAAC	57	Kaukinen y Varvio,1993
HEL1 (D15S10)	15	CAACAGCTATTTAACAAGGA AGGCTACAGTCCATGGGATT	57	Kaukinen y Varvio,1993
INRA035 (D16S11)	16	ATCCTTTGCAGCCTCCACATTG TTGTGCTTTATGACACTATCCG	60	Vaiman y Mercier, 1994
ETH152 (D5S1)	5	TACTCGTAGGGCAGGCTGCCTG GAGACCTCAGGGTTGGTGATCAG	60	Stephen *et al.*,1993
INRA023 (D3S10)	3	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC TAACTACAGGGTGTTAGATGAACTC	55	Vaiman y Mercier, 1994
ETH10 (D5S3)	5	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	65	Solinas Toldo *et al.*,1993
HEL9 (D8S4)	8	CCCATTCAGTCTTCAGAGGT CACATCCATGTTCTCACCAC	55	Kaukinen y Varvio,1993
CSSM66 (D14S31)	14	ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	65	Barendse *et al.*,1994
INRA032 (D11S9)	11	AAACTGTATTCTCTAATAGCTAC GCAAGACATATCTCCATTCCTTT	58	Vaiman y Mercier, 1994
ETH3 (D19S2)	19	GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	65	Solinas Toldo *et al.*,1993
BM2113 (D2S26)	2	GCTGCCTTCTACCAAATACCC CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	60	Bishop *et al.*,1994
BM1824 (D1S34)	1	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC CATTCTCCAACTGCTTCCTTG	60	Bishop *et al.*,1994
HEL13 (D11S15)	11	TAAGGACTTGAGATAAGGAG CCATCTACCTCCATCTTAAC	57	Kaukinen y Varvio,1993
INRA037 (D10S12)	11	GATCCTGCTTATATTTAACCAC AAAATTCCATGGAGAGAGAAAC	58	Vaiman y Mercier, 1994
BM1818 (D23S21)	23	AGCTGGGAATATAACCAAAGG AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	60	Bishop *et al.*,1994
ILSTS006 (D7S8)	7	TGTCTGTATTTCTGCTGTGG ACACGGAAGCGATCTAAACG	55	Brezinsky *et al.*,1993b
MM12 (D9S20)	9	CAAGACAGGTGTTTCAATCT ATCGACTCTGGGGATGATGT	50	Mommens *et al.*,1994
CSRM60 (D10S5)	10	AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCA AGGACCAGATCGTGAAAGGCATAG	65	Moore *et al.*,1994

Tabla 9. Microsatélites utilizados (cont.)

Marcador	Crom.	Secuencia de los oligonucleotidos (5' - 3')	Tm(°C)	Referencia
ETH185 (D17S1)	17	TGCATGGACAGAGCAGCCTGGC GCACCCCAACGAAAGCTCCCAG	67	Stephen *et al.*,1993
HAUT24 (D22S26)	22	CTCTCTGCCTTTGTCCCTGT AATACACTTTAGGAGAAAAATA	52	Thieven *et al.*,1997
HAUT27 (D26S21)	26	TTTTATGTTCATTTTTTGACTGG AACTGCTGAAATCTCCATCTTA	57	Thieven *et al.*,1997
TGLA227 (D18S1)	18	CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT ACAGACAGAAACTCAATGAAAGCA	55	Georges y Massey, 1992
TGLA126 (D20S1)	20	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC	55	Georges y Massey, 1992
TGLA122 (D21S6)	21	CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC AATCACATGGCAAATAAGTACATAC	55	Georges y Massey, 1992
TGLA53 (D16S3)	16	GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	55	Georges y Massey, 1992
SPS115 (D15)	15	AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG AACGAGTGTCCTAGTTTGGCTGTG	50	Moore y Birne, 1993

III.5. Análisis estadístico

III.5.1. Variación dentro de la población

Para el estudio de la variabilidad genética en la población analizada se utilizó el programa Biosys-1, (Swofford y Selander, 1989). A partir de los genotipos se obtuvieron las frecuencias alélicas, el número medio de alelos por *locus*, la heterocigosidad estimada por conteo directo y no sesgada, así como el porcentaje de *loci* polimórficos, cuando la frecuencia del alelo más común era menor que 0.95. Los alelos específicos para cada raza se determinaron mediante el programa MICROSAT (Minch, 1997). Con el programa GENEPOP 3.1 (Raymond y Rousset, 1995) se llevaron a cabo ensayos de probabilidades para determinar las posibles desviaciones de las proporciones de Hardy-Weinberg.

El programa BOTTLENECK (Piry *et al.,* 1999) se utilizó para comprobar si las poblaciones analizadas tuvieron una reducción en su tamaño efectivo, desarrollando un exceso temporal de heterocigotos. Se aplicó un modelo de mutación en dos fases (Two-Phases Model, TPM) con valores de varianza para TPM de 10, y con una proporción de modelo simple de mutación (Single Mutation Model, SMM) del 90% en este modelo, con 1000 repeticiones, como se recomienda para la mayoría de los *loci* microsatélites (Di Rienzo *et al.,* 1994; Luikart *et al.,* 1998). Al asumir este modelo, las desviaciones del equilibrio deriva-mutación fueron

determinadas siguiendo el procedimiento descrito por Cornuet y Luikart, (1996). El programa también cuenta con un descriptor cuantitativo de las distribución de las frecuencias alélicas ("mode-shift" indicator) el cual discrimina entre poblaciones estables y poblaciones en "cuello de botella".

III.5.2. Diferenciación genética entre poblaciones

Se desarrollaron pruebas exactas mediante el programa GENEPOP 3.1 (Raymond y Rousset, 1995) para la diferenciación poblacional entre todas las poblaciones y por pares de ellas. También se utilizó un test de probabilidades para estimar los valores de P insesgados (o test exacto de Fisher) según describen Raymond y Rousset (1995), para comprobar si la distribución alélica es idéntica entre las poblaciones.

Se estimó la distancia D_A de Cavalli-Sforza y Edwards modificada (Nei *et al.,* 1983), la cual se basa en un modelo de deriva genética puro, que ha sido aplicado exitosamente en la diferenciación entre razas cuando se utilizan *loci* microsatélites (Kantanen *et al.,* 2000; Kim *et al.,* 2001). El programa DISPAN (Ota, 1993) se aplicó para el cálculo de D_A. Se utilizó el paquete informático Phyllip (Felsenstein, 1993) para construir los árboles filogenéticos a partir de las distancias D_A, por el método de "Neighbour-joining" (NJ) (Saitou y Nei, 1987). La robustez de la topología de los dendogramas fue evaluada por repetición de réplicas ("boostrap resampling") (n=1000). El programa GENETIX (Montpellier; France) se utilizó para realizar el Análisis Factorial de Correspondencias (Benzécri, 1973; Escofer y Pagès, 1990).

Las medidas de distancias genéticas D_{TL} de Tomiuk y Loeschcke (1991, 1995) se utilizaron para determinar el tiempo evolutivo de divergencia. Esta medida ha sido recomendada para dar una relación evolutiva confiable cuando se usan datos de microsatélites de razas bovinas (Kantanen *et al.,* 2000). Los errores estándar de D_{TL} fueron estimados para cada *locus* por "jacknifing" (réplicas). Los valores de D_{TL} se emplearon para calcular el tiempo de divergencia en generaciones (Tomiuk *et al.,* 1998). La tasa de mutación recomendada por Kantanen *et al.,* (2000) en su estudio de ganado bovino fue de 1.4×10^{-4}/*locus*/gameto, de acuerdo con el

promedio estimado en grupos grandes de poblaciones de ovejas (Crawford y Cuthbertson, 1996). Los años de divergencia se calcularon asumiendo un intervalo generacional de 5 o 6 años para cada generación (Kantanen *et al.,* 1999 y 2000).

Finalmente, utilizando los valores de las frecuencias alélicas de 21 de los 30 microsatélites, se determinaron las relaciones genéticas con algunas razas españolas previamente descritas. En este caso fue necesario reducir el número de *loci* para la construcción de los árboles, debido a que solo se disponía de información para esas ocho razas españolas (Asturiana de los Valles y de los Montes, Morena, Casta, Betizu, Pirenaica, Menorquina, Toro de Lidia; Martín-Burriel *et al.,* 1999 y 2003). Se construyeron los árboles filogenéticos mediante los métodos de Neighbour-Joining, según la metodología descrita para las razas cubanas.

CAPITULO IV: DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE LAS RAZAS BOVINAS CUBANAS ESTUDIADAS CON RESPECTO A LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE

IV.1. Introducción

En el área de Centroamérica y el Caribe no existe abundante información referente a la caracterización molecular de rebaños autóctonos. En Cuba se han desarrollado estudios de polimorfismo bioquímico de las proteínas bovinas, ya sean lácteas o sanguíneas, de interés productivo o sanitario (Fernández, 1980; Pérez-Beato y Fernández, 1981; Pérez-Beato y Granado, 1981; Ronda *et al*., 1981; Gutiérrez *et al*., 1989), en las razas precursoras de nuevos cruzamientos con fines genéticos y en los mismos cruzamientos. No fue hasta 1996, con la realización de un proyecto de investigación en esta temática en el CENSA (Uffo y Martínez, 2002), que se comenzaron los estudios de genética molecular en este campo con el objetivo de determinar la estructura genética de las razas Siboney, Cebú y Criollo de Cuba a través de la tipificación de los genes que codifican para las proteínas lácteas.

IV. 2. Materiales y métodos

En este experimento se utilizaron las condiciones de reacción descritas para las seis proteínas principales de la leche y su posterior digestión con enzimas de restricción específicas (apartado III. 2). Los programas de análisis estadísticos utilizados fueron el Biosys-1 (Swofford y Selander, 1989) y el GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995) para la determinación de las frecuencias alélicas y los parámetros del equilibrio de Hardy-Weinberg, respectivamente.

IV.3. Resultados y discusión

Las frecuencias alélicas de todas las proteínas lácteas (Tabla 10) fueron calculadas a partir de los genotipos obtenidos para cada individuo (Anexo X.1).

Tabla 10. Frecuencias alélicas de las diferentes variantes de las proteínas lácteas

Variantes	Grupo genético		
	Criollo de Cuba	Siboney de Cuba	Cebú Cubano
CASA1			
B	0.42	0.36	0.05
C	0.58	0.64	0.95
CASB			
A	0.90	0.69	0.90
B	0.10	0.31	0.10
CASA2			
A	1.00	1.00	1.00
CASK			
A	0.70	0.78	0.84
B	0.30	0.22	0.16
LAA			
A	0.39	0.44	0.40
B	0.61	0.56	0.60
LGB			
A	0.30	0.20	0.24
B	0.70	0.80	0.76

Es la primera vez que se realizan estudios a nivel de ADN en los *loci* de las proteínas lácteas en el ganado bovino cubano. Aunque no ha sido posible identificar suficientes referencias de estudios realizados en la región, se han desarrollado algunas investigaciones a nivel proteico que permiten evaluar los resultados, además de compararlos con los descritos para un grupo de razas bovinas españolas.

IV.3.1. Variación intra-raza. Análisis de *loci* individuales

Del análisis de los *loci* de las proteínas lácteas en las tres razas de ganado bovino cubano estudiadas, se observó la presencia de los alelos que más frecuentemente se describen en la mayoría de las poblaciones de la especie bovina (Tabla 10), resultados que serán analizados por *loci* individuales.

IV.3.1.1. α_{s1}-caseína

En la Figura 1 se muestran fotos de la amplificación y la digestión del amplicón.

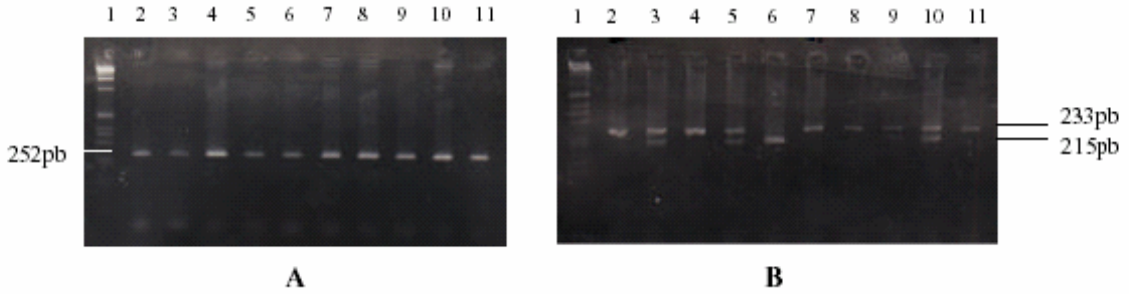


Figura 1: A: Gel de electroforesis agarosa 2%, TBE 0.5X, resultado de la PCR de CASA1, Línea 1: MPM 100pb, líneas2 -11, productos amplificados de 252pb.
B: Perfiles de digestión de amplicones de CASA1 con *Hph*I, gel de agarosa 4%, TBE 0.5X. Línea 1: MPM 100pb, líneas 2, 4, 7, 8, 11: muestras con genotipo $CASA1^{B}/CASA1^{B}$, líneas 3, 5, 10: muestras con genotipo $CASA1^{B}/CASA1^{C}$; línea 6: muestra con genotipo $CASA1^{C}/CASA1^{C}$.

El alelo $CASA1^{C}$ presentó frecuencias más elevadas en el ganado Cebú, menor en el Siboney e inferiores en el Criollo (Tabla 10). Estas altas frecuencias no son comunes en las razas del género *Bos taurus*, y nuestros resultados son muy diferentes a los encontrados en la mayoría de las razas pertenecientes a dicho género, donde el alelo más difundido es el $CASA1^{B}$, con frecuencias muy cercanas a 1.0, lo que ocurre en la mayoría de los rebaños *Bos taurus,* con excepción de algunos como Jersey, Guernsey, Normande, Italian Brown, Reggiana y Mondenese con valores inferiores (0.75-0.85). Tal comportamiento fue comprobado también en 10 razas de ganado autóctono portugués por Beja-Pereira *et al.*, (2002) en las que las frecuencias de la variante B varían entre 0.58 y 0.80.

En nuestro ganado Cebú apareció el alelo $CASA1^{C}$ con una frecuencia de 0.95. Esto se corresponde con el hecho de que en el género *Bos indicus*, este alelo es predominante con respecto al $CASA1^{B}$ (ν=0.90) (Grosclaude *et al.,* 1976), y como una excepción, se ha encontrado con una frecuencia igualmente elevada en Holstein Sueco (Lundén *et al.,* 1997). Recientemente, Litwinczuk y Król (2002) en un estudio llevado a cabo en ganado de carne (Limousine, Hereford y Simmental)

encontraron frecuencias alélicas en proporciones inversas a las reportadas hasta ahora para el ganado lechero, específicamente para la CASA1.

El valor de frecuencia para el alelo $CASA1^C$ en el rebaño Criollo cubano confirma la presencia de genes *Bos indicus* en su genofondo, como evidencia de que en algún momento fue cruzado con ganado Cebú. Con respecto al origen de la raza, nuestro resultado se corresponde con los obtenidos por Escoda *et al.*, (1981), quienes describen frecuencias elevadas del alelo B en ganado autóctono venezolano (0.81-0.95) y destacan la ausencia del ganado Cebú y la influencia del ganado Pardo Suizo como uno de sus ancestros, en la creación del ganado tipo Carora, por lo que las frecuencias de $CASA1^C$ son bajas. Nuestros resultados a su vez son similares a los obtenidos por Ripoli *et al.*, (1999) quienes analizaron la formación de un plantel base de ganado bovino criollo argentino para la producción lechera y evaluaron el efecto de la selección en las frecuencias génicas de diferentes *loci*, donde se evidenció un aumento significativo de la variante $CASA1^C$ en dicho rebaño y no así en los restantes *loci* analizados. En la población Siboney las frecuencias elevadas del alelo $CASA1^C$ son el resultado de la presencia del Cebú en su creación.

Algunos resultados obtenidos en España, realizados en las razas Rubia Gallega (Morena) y Asturiana de los Valles, además de la Parda Alpina y tres rebaños de Frisona Ibérica, muestran que para el *locus* CASA1 el alelo más frecuente fue el $CASA1^B$ (Osta, 1994), con frecuencias similares a las descritas por Lien *et al.*, (1993). Esta proteína aparece también como monomórfica para dicho alelo en la mayoría de las razas europeas seleccionadas para la producción lechera (Erhardt, 1993 y 1996; Ikonen *et al.*, 1996).

Teniendo en cuenta que las elevadas frecuencias del alelo $CASA1^C$ son típicas de animales acebuados, se puede considerar este alelo como un marcador del ganado Cebú en general, pues el comportamiento observado para las frecuencias génicas no es único de nuestro ganado.

IV.3.1.2. β-caseína

Como resultado de la digestión de los fragmentos amplificados se observaron en las tres razas analizadas los tres genotipos posibles, que se muestran en la Figura 2. La talla del fragmento de 25pb es similar a la de los cebadores utilizados y no es posible diferenciarlos.

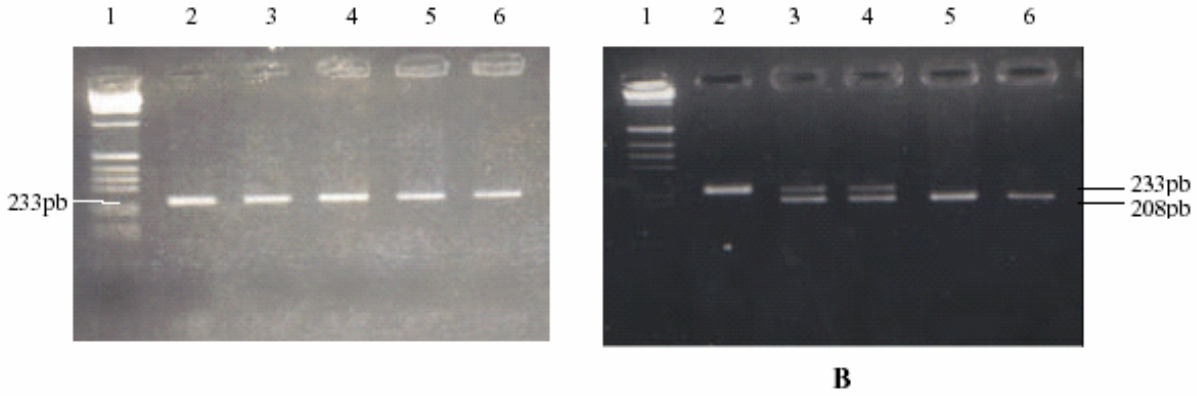


Figura 2: A: Gel de eletroforesis agarosa 2%, TBE 0.5X, resultado de la PCR de CASB. Línea 1: MPM 100pb, líneas 2-6, productos amplificados de 233pb.
B: Perfiles de digestión de amplicones de CASB con *Msp*I, gel de agarosa 4%, TBE 0.5X. Línea 1: MPM 100pb, línea 2: muestra con genotipo $CASB^{B}/CASB^{B}$; líneas 3, 4: muestras con genotipo $CASB^{A}/CASB^{B}$; líneas 5, 6: muestras con genotipo $CASB^{A}/CASB^{A}$

La variante más frecuentemente observada en las razas cubanas estudiadas es la $CASB^{A}$ (Tabla 10). Estos resultados coinciden con los descritos por Escoda *et al.*, (1981) quienes encontraron frecuencias muy elevadas del alelo A en la raza Carora venezolana y en un grupo de animales Cebú, en el cual este alelo estaba prácticamente fijado (ν=0.99). En las poblaciones europeas estudiadas por Osta (1994), aparece una frecuencia baja del alelo $CASB^{B}$ (de 0.03 a 0.10), excepto para la Parda Alpina en que la frecuencia de $CASB^{B}$ fue algo superior (0.37). Van Eenennaam y Medrano, (1991) reportan valores similares a los encontrados en nuestras muestras para algunas poblaciones de ganado Holstein.

La diferencia entre las variantes A y B de esta proteína ha sido la más estudiada debido a que es este el alelo ($CASB^{B}$) que proporciona a la leche características idóneas para la producción de quesos (Jacob y Puhan, 1992; Osta, 1994). Esta consideración se ha generalizado entre los

diferentes grupos de investigación y nuestros resultados no son diferentes a los descritos por otros autores (Escoda *et al.*, 1981; Van Eenennaam y Medrano, 1991; Litwinczuk y Król, 2002).

IV.3.1.3. α_{s2}-caseína

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos de la tipificación de la CASA2 en nuestro ganado. A pesar de que esta proteína resulta monomórfica para la mayoría de las razas nos interesó su estudio para conocer si en las razas cubanas se comportaba de la misma manera.

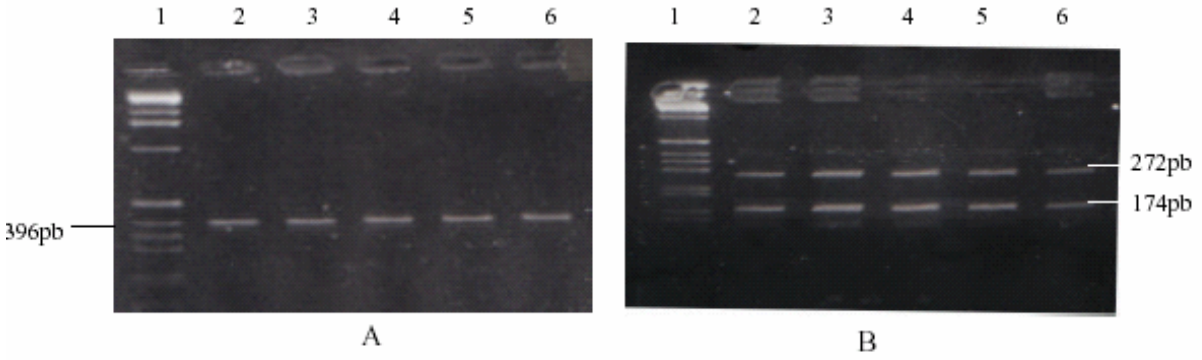


Figura 3. A: Gel de electroforesis agarosa 2%, TBE 0.5X, resultado de la PCR de CASA2, Línea 1: MPM 100pb, líneas2 -6, productos amplificados de 396pb.
B: Perfiles de digestión de amplicones de CASA2 con *Mnl*I, gel de agarosa 4%, TBE 0.5X. Línea 1: MPM 100pb, líneas 2-6: muestras con genotipo $CASA1^{A}/CASA1^{A}$

Para este *locus* el alelo $CASA2^{A}$ resultó fijado en las tres razas cubanas analizadas, como ocurre en la raza Rubia Gallega y Frisona (Osta *et al.*, 1995). Estos autores señalan que los restantes rebaños ibéricos estudiados presentaban una elevada frecuencia de esta variante; aunque el alelo $CASA2^{D}$, aparece con muy baja frecuencia en todos ellos, pero más elevadas en la Parda Alpina (ν=0.07), Asturiana de los Valles (ν=0.06), y otros rebaños de Frisona (ν=0.01), y con valores ligeramente superiores en las razas autóctonas francesas Montbèliarde y Vosgiènhe (Grosclaude *et al.*, 1988). Resultados similares han sido descritos por Ikonen *et al.*, (1996) y Erdhardt en el mismo año, quienes encuentran el alelo A prácticamente fijado en las razas Ayrshire Finlandesa (ν=0.991) y Limpurger alemana (ν=0.984).

Los resultados obtenidos para esta proteína y la información adquirida de las fuentes bibliográficas indican que no es factible su empleo en estudios de biodiversidad, a menos que se desee comprobar si realmente se mantiene este comportamiento monomórfico.

IV.3.1.4. κ-caseína

En la Figura 4 se muestran la imagen de la electroforesis del fragmento amplificado y los resultados de la PCR y la digestión, respectivamente.

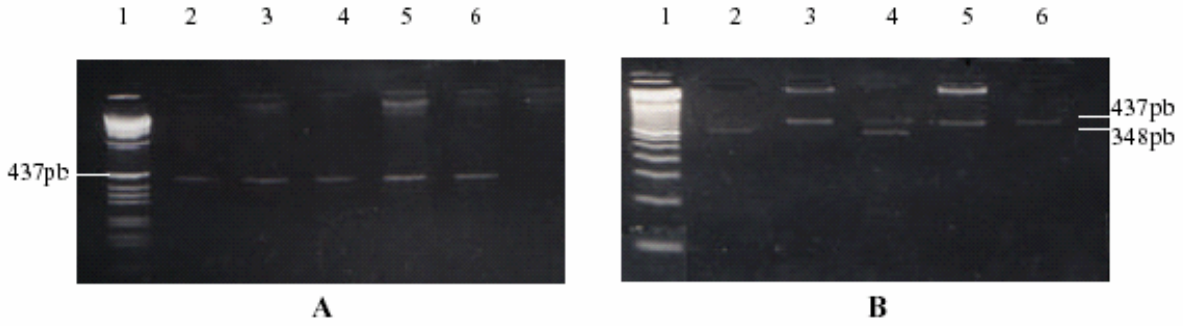


Figura 4. A: Gel de electroforesis agarosa 2%, TBE 0.5X, resultado de la PCR de CASK, Línea 1: MPM 100pb, líneas2 -6, productos amplificados de 473
B: Perfiles de digestión de amplicones de CASK con *Hind*III, gel de agarosa 4%, TBE 0.5X. Línea 1: MPM 100pb, línea 2: muestra con genotipo $CASK^{B}/CASK^{B}$, línea 4: muestra con genotipo $CASK^{A}/CASK^{B}$, líneas 3, 5-6: muestras con genotipo $CASK^{A}/CASK^{A}$

Como resultado de la tipificación del *locus* CASK se tiene que nuestros rebaños muestran como alelo más frecuente al $CASK^{A}$, con valores de frecuencias de 0.70 en el Criollo, 0.78 el Siboney y 0.84 el Cebú. La mayor frecuencia del alelo A ha sido una característica común en la mayoría de las poblaciones de ganado de leche estudiada (Zardowny y Kuhnlein, 1990; Osta, 1994). Escoda *et al*., (1981) también describen frecuencias elevadas de la variante A en ganado Cebú (ν=0.90). Las frecuencias intermedias sólo han sido descritas en la raza Parda Alpina (Osta, 1994).

Nuestro ganado de manera general, ha sido seleccionado para la producción de cantidad de leche y no así para mejorar las aptitudes queseras de la leche como las poblaciones analizadas por Malik *et al*., (1997) quienes estudiaron, por medio del uso de la PCR seguida de la hibridación con sondas de oligonucleótidos específicas (SSOP), dos grupos de animales con genes *Bos indicus*: la raza

Sahiwal y un cruce ($^1/_2$ Friesian, ¼ Jersey, ¼ Hariana). Las frecuencias alélicas calculadas mostraron mayor abundancia del alelo $CASK^A$ (ν=0.625) para el ganado Sahiwal, a diferencia del cruce que mostró más abundancia del alelo $CASK^B$. El incremento de la frecuencia del $CASK^B$ en el cruce fue atribuido a la presencia de genes exóticos provenientes del Jersey, en el cual se reportan altas frecuencias de dicho alelo (ν=0.88; Tambasco, 1998). Esta mayor presencia de la variante B en la raza Jersey puede estar relacionada con la selección ejercida hacia la producción de leche con calidad óptima para la manufactura de quesos, donde se ha demostrado que los quesos de mayor calidad son los confeccionados con leche proveniente de vacas con genotipo $CASK^B/CASK^B$ (Marzali y Kg-Kwai-Hang, 1986).

En otros rebaños autóctonos indios como Tharparkar y Red Sindhi, se refiere la ausencia total del genotipo $CASK^B/CASK^B$. En el ganado Cebú investigado predomina la variante A de esta proteína, con valores de frecuencia elevadas (0.84), semejante a los resultados de Escoda *et al.*, desde 1981 para ganado con genes cebú. Beja-Pereira *et al*., (2002) encontraron en ganado portugués el alelo A como más frecuente en 8 de las 10 razas analizadas; en las Mirandesa y Marinhoa la variante B apareció con frecuencias de 0.75 y 0.95, respectivamente, lo cual atribuyen a la deriva genética dada por la dispersión geográfica de esos rebaños.

Las elevadas frecuencias del alelo $CASK^A$, de forma similar a lo descrito para la mayoría de las razas lecheras, evidencian las potencialidades para la producción de leche de las razas cubanas estudiadas aquí, lo que puede ser útil como indicador de selección para cantidad de leche.

IV.3.1.5. α-lactoalbúmina

En la siguiente figura se muestran los resultados obtenidos para la amplificación y digestión del gen de la α-lactoalbúmina.

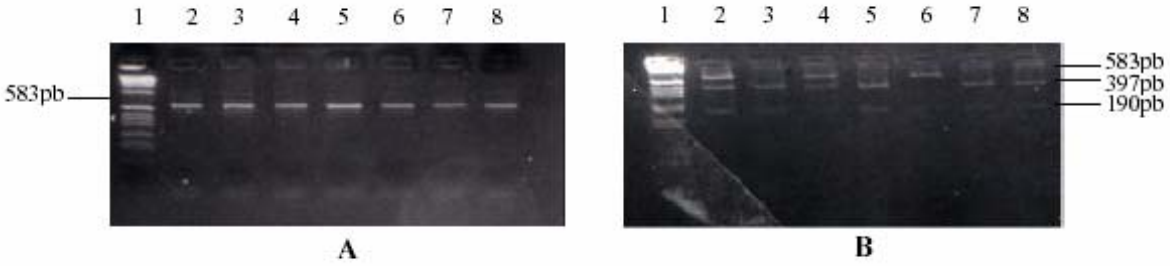


Figura 5. A: Gel de electroforesis agarosa 2%, TBE 0.5X, resultado de la PCR LAA, Línea 1: MPM 100pb, líneas 2-8, productos amplificados de 583pb
B: Perfiles de digestión de amplicones de LAA con *Msp*I, gel de agarosa 4%, TBE 0.5X. Línea 1: MPM 100pb, líneas 2, 4: muestras con genotipo LAA^A/LAA^B; líneas 3, 5, 7, 8: muestras con genotipo LAA^B/LAA^B; línea 6: muestra con genotipo LAA^A/LAA^A

En nuestros rebaños resultó el alelo más frecuente el LAA^B, con valores relativamente elevados de frecuencias para el alelo A (ν=0.39-0.44), que es un indicio de la presencia de genes *Bos indicus* (Eigel *et al.*, 1984), en la creación de nuestro ganado autóctono. El alelo LAA^A fue descrito como marcador racial en el cruce Cebú Cubano-Holstein Friesian por Pérez-Beato y Granado (1981). Se conoce que, aunque el Criollo proviene de animales de la especie *Bos taurus* introducidos en el continente en 1493, ha ocurrido el mestizaje del Criollo Cubano con el Cebú, fundamentalmente procedente de Jamaica, hecho que está evidenciado por la presencia del cromosoma sexual acrocéntrico característico de la especie *Bos indicus* (Sánchez *et al.*, 1977). Esta es una diferencia sustancial con el ganado autóctono europeo donde se ha descrito esta proteína como monomórfica para la variante B (Osta *et al.*, 1995). Igualmente, es una diferencia con otros ganados bovinos Criollo del continente, pues se ha determinado con evidencias paleontológicas, evolutivas, bioquímicas, citogenéticas y moleculares que el Criollo Argentino no presenta esta característica propia del *Bos indicus*, lo que sugiere que la introgresión de dichas razas en el ganado argentino no tuvo una influencia importante en su constitución genética (Bouzat *et al.*, 1999). En el rebaño Siboney analizado, se detectó la presencia del alelo A, elemento lógico si tenemos en cuenta que

esta raza es el resultado de sucesivos cruces que se han estabilizado en el $^{5}/_{8}$ Holstein-$^{3}/_{8}$ Cebú, y que en este último también encontramos el alelo A (ν=0.40).

Grosclaude, (1988) determinó las frecuencias alélicas de la α-lactoalbúmina en 20 razas francesas, en 18 de las cuales esta proteína aparece como monomórfica para el alelo B; en las dos restantes, Limousine y Vosgienne, ambas con genes *Bos indicus* en su genofondo, apareció la variante A en muy bajas frecuencias (ν=0.01).

En las razas explotadas en España, estudiadas por Osta en 1994, todos los animales presentaron el alelo LAA^{B}. Sin embargo, sólo dos animales incluidos en un test de comparación internacional promovido por la ISAG, mostraron variación como heterocigotos. Estos animales se correspondieron con la especie *Bos indicus*. En un estudio genómico de las proteínas de la leche, Threadgill y Womack en 1990, demostraron la presencia del alelo LAA^{A} como característica de los rebaños acebuados, y más específicamente en la raza Brahman asiática.

En el caso de la variante A de la α-lactoalbúmina, como el de la $CASA1^{C}$, se puede utilizar como marcador racial para la caracterización de rebaños. Este alelo es un elemento típico que caracteriza y distingue nuestro ganado autóctono de las razas lecheras europeas, evidenciando la presencia de genes cebú en las tres razas cubanas.

IV.3.1.6. β-lactoglobulina

Los resultados de la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la β-lactoglobulina, contenido entre el exón IV y el intrón IV del gen (Figura 6).

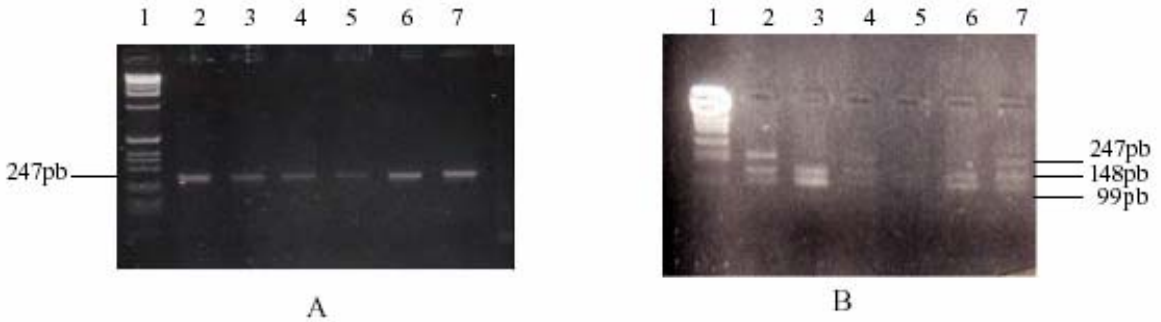


Figura 6. A: Gel de electroforesis agarosa 2%, TBE 0.5X, resultado de la PCR de LGB, Línea 1: MPM 100pb, líneas 2-7, productos amplificados de 247pb
B: Perfiles de digestión de amplicones de LGB con *Hae*III, gel de agarosa 4%, TBE 0.5X. Línea 1: MPM 100pb, líneas 2, 3,7: muestras con genotipos LGB^A/LGB^B, líneas 3, 5: muestras con genotipo LGB^A/LGB^A.

El alelo B de esta proteína aparece con frecuencias parecidas en los tres rebaños analizados (Siboney: 0.80, Cebú: 0.76 y Criollo: 0.70). En el caso del Criollo, estos valores fueron semejantes a los descritos por Pérez-Beato y Fernández (1981), al analizar el polimorfismo bioquímico de esta proteína en un rebaño de esta raza.

Similares han sido los resultados encontrados por otros autores en razas españolas, europeas y norteamericanas (Osta, 1994; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1990; Van Eenennaam y Medrano, 1991). También en poblaciones venezolanas (Escoda *et al.*, 1981) se describe el alelo LGB^B como el más frecuente de esta proteína en el ganado Cebú (ν=0.93) y en siete de las 10 razas autóctonas portuguesas analizadas por Beja-Pereira *et al.*, (2002). Litwinczuk y Król (2002) encontraron más frecuentemente la variante B, pero en razas especializadas en la producción de carne (Hereford, 0.703 y Simmental, 0.621), solamente en la raza Limousin fue el LGB^A el alelo ligeramente más frecuente (ν=0.650).

En el caso de esta proteína no es posible establecer diferencias entre razas de orígenes diferentes por no haber identificado en la literatura suficientes resultados que nos permitan evaluar la prevalencia de una variante u otra en ganado cebú.

Al realizar el análisis de los genes de las proteínas lácteas, Threadgill y Womack en 1990 encontraron que el alelo LGB^B (en carácter de homocigosis) apareció en todos los animales estudiados de las razas Jersey y Hereford, así como en el 50% de los animales de la raza Brahman. Se debe tener en cuenta que el aspecto importante a considerar de esta proteína, para su empleo como marcador para el mejoramiento, es el efecto que se le atribuye a su variante B sobre la calidad de la leche, aspecto que se considera conveniente comprobar en futuros estudios.

IV.3.2. Diversidad genética de las proteínas lácteas en las poblaciones cubanas

Para los *loci* de las proteínas lácteas analizadas se ha estudiado un conjunto de parámetros como medida de la estructura genética de estas poblaciones: los valores de heterocigosidades medias observada (Hobs) y esperada (Hesp), número medio de alelos (A), porcentaje de *loci* polimórficos ($P_{0.95}$) que se muestran en la Tabla 11. En las tres razas se observan más individuos heterocigotos que los esperados según las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cual puede ser un indicio de la selección en los rebaños estudiados que originen índices de consanguinidad (F) que no son significativamente diferentes de cero.

Tabla 11. Valores de heterocigosidades medias observada (Hobs) y esperada (Hesp), número medio de alelos (A), porcentaje de *loci* polimórficos ($P_{0.95}$) para los *loci* de las proteínas lácteas, coeficiente de consaguinidad (F).

	Cebú	Siboney	Criollo
Hobs	0.230 (0.100)	0.355 (0.103)	0.344 (0.086)
Hesp	0.211 (0.076)	0.340 (0.074)	0.334 (0.081)
A	1.8 (0.2)	1.8 (0.2)	1.8 (0.2)
$P_{0.95}$	66.7%	83.3%	83.3%
Ftotal	-0.09	-0.04	-0.03

Cinco de los seis *loci* analizados resultaron ser polimórficos en las tres razas, aunque en el Cebú el porcentaje de *loci* polimórficos es inferior debido a que el *locus* α_{S1}-caseína presenta el alelo C prácticamente fijado. El número medio de alelos por *locus* coincide en los tres rebaños, sin que aparecieran alelos diferentes en ninguno de ellos. Esto se debe a que los métodos de detección de las variantes genéticas de las proteínas lácteas analizadas son específicos para la diferenciación

entre dos alelos determinados, lo cual no permite la identificación de alelos raros. Como ya hemos mencionado anteriormente, nuestros resultados no se ven afectados, dada la baja frecuencia de aparición de dichos alelos.

Utilizando los valores de las frecuencias alélicas se determinaron las posibles desviaciones de las proporciones de Hardy-Weinberg (Anexo X.2), donde la mayoría de los *loci* para las tres razas se encuentran en equilibrio. No obstante, el ganado Cebú analizado no está en equilibrio para el *locus* CASB ($p<0.001$) con un exceso de homocigotos A. El Siboney aparece en desequilibrio para los *loci* LGB ($p<0.05$) debido a un exceso de homocigotos B y LAA ($p<0.001$) en el cual los individuos heterocigotos se encuentran en exceso. Estos resultados se confirman al analizar los valores de coeficientes F, donde coinciden los *loci* en desequilibrio para $p<0.05$ y $p<0.001$, según sea el caso. Los valores del coeficiente F se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Valores de coeficiente de consanguinidad por *locus*

	Valores de F por *locus*		
	Cebú	Siboney	Criollo
CASA1	-0.042	0.019	-0.044
CASB	0.645 ***	0.018	0.109
CASK	0.053	-0.005	-0.126
LAA	-0.250	-0.529 ***	-0.032
LGB	-0.227	0.406 **	-0.028

** $p<0.05$, *** $p<0.001$

La falta de equilibrio en el rebaño Cebú Cubano en el *locus* β-caseína puede ser un elemento que confirme el efecto de la selección ejercida sobre algún alelo por estar relacionado con algún carácter productivo a favor del cual se esté seleccionando. Así existe la posibilidad de que se haya incrementado la presencia de ciertos alelos que no sea posible detectar por el método empleado, y que estén afectando las condiciones del equilibrio en esta raza. En la raza Siboney se observa mayor número de *loci* en desequilibrio, donde las desviaciones pueden tener su origen en el hecho de que los animales provenientes de un cruzamiento y que por los efectos de la selección natural

hayan sobrevivido los individuos más resistentes y adaptados de la población, los heterocigóticos (Kidd *et al*., 1980); en esta población también se observan valores de heterocigosidades más elevados.

Del análisis de la estructura genética de los *loci* de las proteínas de la leche se pueden señalar tres elementos importantes. En primer lugar, se han identificado alelos que serán útiles en la caracterización de nuestras razas, específicamente, $CASA1^{C}$ y LAA^{A}, los que se pueden considerar como marcadores de la raza cebú. En segundo lugar, debido al control ejercido sobre el material genético que se ha propagado, específicamente el semen para inseminación artificial, no ha sido posible la identificación de consanguinidad en las poblaciones estudiadas a través de los métodos estadísticos utilizados y que la selección ejercida a favor de la producción de leche en nuestra ganadería, puede haber favorecido la presencia de alelos relacionados con los parámetros de calidad de la leche. Sería conveniente comprobar este último aspecto, a través de la realización de estudios de relación entre los genotipos y las características productivas en nuestro ganado.

IV.5. Conclusiones parciales

✓ Las frecuencias de $CASA1^{C}$ (ν=0.58) y LAA^{A} (ν=0.39) confirman la presencia de genes *Bos indicus*, en el ganado Criollo de Cuba.

✓ En las tres razas, cinco de los seis loci estudiados resultaron polimórficos, con un porcentaje de loci polimórficos que osciló entre 66.7 y 83.3%, lo que indica alta variabilidad en las tres poblaciones.

✓ El rebaño Criollo de Cuba analizado se encuentra en equilibrio genético para todos los *loci*, como evidencia de que es una población estabilizada, a diferencia del Siboney de Cuba, raza en formación con elevada influencia de la selección, que aparece en desequilibrio para los loci LGB y LAA. El Cebú Cubano esta en desequilibrio para el CASB.

CAPÍTULO V: DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LOS *loci* MICROSATELITES

V.1. Introducción

Para estudios poblacionales y de caracterización de razas se han utilizado distintos métodos. En la actualidad estos se basan en la tipificación de microsatélites, debido a las ventajas y posibilidades que brindan estos marcadores (Pépin *et al.,* 1995; Ellegren *et al.,* 1997; MacHugh *et al.,* 1997; Martín-Burriel *et al.,* 1999; Kim *et al.,* 2001).

Los estudios anteriores de caracterización genética de poblaciones bovinas pertenecientes a las tres razas objeto del presente trabajo (Cebú, Siboney y Criollo) fueron realizados mediante el análisis de polimorfismo bioquímico en sistemas sanguíneos y lácteos (Fernández, 1980; Pérez-Beato y Fernández, 1981; Fernández *et al.,* 1983). Las desventajas de estos métodos han sido superadas por los métodos moleculares, más sensibles, más específicos y abarcadores de gran parte del genoma. No se ha empleado este tipo de marcadores de ADN en la determinación de la estructura genética de los rebaños con que cuenta actualmente nuestra ganadería.

Se han publicado estudios de biodiversidad en ganado europeo basados en el análisis de marcadores microsatélites (Moazami-Gouzardi *et al.,* 1997; McHugh *et al.,* 1998; Martín-Burriel *et al.,* 1999; Edwards *et al.,* 2000; Kantanen *et al.,* 2000). Así, el proyecto RESGEN, subvencionado por la Comisión Europea y en el que participan 16 países de Europa (5 miembros y el resto colaboradores), recomienda un conjunto de 30 microsatélites para ser utilizados en estudios de biodiversidad en la especie bovina (http://www.projects.roslin.ar.uk/cdiv/markers.html). Contando con esta información y con la posibilidad de disponer de material genético de las razas cubanas, el objetivo de este experimento fue la determinación de la estructura genética del Cebú Cubano, el Siboney de Cuba y el Criollo de Cuba, mediante la tipificación de los 30 *loci* microsatélites recomendados.

V.2. Materiales y métodos

Los materiales y métodos han sido descritos en el apartado III.3 de este documento. La nomenclatura utilizada para la designación de los diferentes alelos se basó en la estandarización realizada por los miembros del proyecto RESGEN (http://www.eaap.org/resgen.htm). Los controles alélicos empleados fueron muestras de talla conocida para cada *locus* microsatélite.

Se utilizaron las distancias genéticas D_A (Nei *et al.,* 1983) para la construcción de los árboles filogenéticos, por el método de Neighbour-Joining (NJ)(Saitou y Nei, 1987), basado en el principio de "mínima evolución", método muy eficiente de reconstrucción de filogenias para la obtención del mejor árbol (Saitou y Imanishi, 1989; Penny *et al*., 1992; Rzhetsy y Nei, 1992); la fiabilidad del árbol obtenido se examinó por un test de "bootstrap" con 1000 réplicas de remuestreo de cada *locus* (Felsentein, 1985) .

V.3. Resultados y discusión

En el anexo X.3 aparecen los datos primarios obtenidos de la tipificación de los 30 *loci* microsatélites. El rango de tallas alélicas de los productos de PCR estuvo en concordancia con los descritos para dichos *loci* (http://www.androclu.vet.uu.nl.RESGEN). Las tallas y las frecuencias de los alelos identificados en las poblaciones cubanas, se muestran en el Anexo X.4.

Las diferencias de frecuencias alélicas de marcadores moleculares del tipo microsatélite han sido descritas como la mejor opción para dilucidar las relaciones genéticas entre diferentes razas (MacHugh *et al.,* 1996; Kantanen *et al.,* 2000; Kim *et al.,* 2001; Martín-Burriel *et al.,* 2003).

V.3.1. Variación intra-razas

La distribución total de alelos por razas fue de 221 para el Cebú, 232 para el Siboney y 219 en el Criollo, 136 de los cuales son compartidos entre las razas y 88 de ellos aparecen en dos de ellas, específicamente. El número de alelos identificados por *locus* varió entre 6 (INRA63,

INRA005) y 18 (TGLA53), con un promedio de número de alelos por *locus* de 10.3, lo que demuestra el elevado grado de polimorfismo de los *loci* analizados en las poblaciones cubanas. Los alelos predominantes en cada *locus* fueron diferentes entre las distintas poblaciones cubanas, excepto los correspondientes a 215pb del INRA023, 119pb del TGLA126 y 244pb del SPS115, los cuales fueron los más frecuentes para dichos *loci* en las tres poblaciones cubanas.

En la Tabla 13 se muestran los alelos específicos encontrados en las tres poblaciones cubanas estudiadas, donde se identificaron un total de 78 alelos de este tipo. La población que más alelos propios mostró es el Criollo de Cuba con 29, seguida del Cebú Cubano con 27 y finalmente el Siboney de Cuba con 22, distribuidos en 27 de los 30 *loci* analizados. En los *loci* TGLA227 y TGLA53 aparecen cuatro alelos "únicos" en el Criollo y el Siboney, respectivamente. La mayoría de los alelos específicos mostraron valores de frecuencias inferiores a 0.05, sin embargo se han encontrado seis alelos de este tipo en el Criollo de Cuba, cinco en el Cebú Cubano y cuatro en el Siboney de Cuba, con frecuencias superiores a 0.1.

Una combinación de los marcadores descritos aquí, en los que se han encontrado alelos específicos, podría ser útil para futuros estudios de asignación racial, al menos de aquellos que presentan frecuencias relativas más elevadas. En nuestro caso, se trata de los 15 alelos con frecuencias mayores de 0.1. Blott *et al.,* (1999) recomiendan como marcadores de elección para diferenciación de poblaciones, aquellos que están fijados para alelos distintos en diferentes razas, es decir, que poseen alelos raza-específicos.

Tabla 13. Alelos específicos encontrados en las poblaciones cubanas comparadas entre sí.

Locus	Raza	Alelo	Frecuencia	*Locus*	Raza	Alelo	Frecuencia
INRA63	Cebú	179	0.080	ETH152	Siboney	207	0.073
INRA5	Cebú	147	0.020	ETH225	Cebú	141	0.050
ILSTS005	Cebú	182	0.060	HEL5	Criollo	149	0.010
		188	**0.110**			157	0.020
					Siboney	161	0.060
ETH10	Siboney	223	0.042	CSSM66	Cebú	197	0.070
	Criollo	213	0.073		Criollo	177	0.021
						191	0.073
INRA35	Cebú	120	**0.112**	INRA32	Cebú	156	0.020
		124	0.031			160	**0.235**
		128	0.010		Siboney	164	0.043
	Siboney	96	**0.133**		Criollo	158	0.080
		98	0.061				
		100	**0.122**				
HEL9	Criollo	171	0.054	BM1824	Cebú	193	0.082
		173	**0.120**		Siboney	187	0.050
ETH3	Cebú	97	0.010	HEL13	Cebú	166	0.010
		113	0.050		Siboney	194	0.034
	Siboney	121	0.020		Criollo	180	0.031
		123	**0.110**				
	Criollo	105	**0.177**				
INRA37	Cebú	116	**0.240**	ILSTS006	Cebú	285	0.010
	Criollo	134	0.022		Criollo	291	0.073
						301	0.021
BM1818	Cebú	272	0.030	CSRM60	Siboney	109	**0.120**
	Criollo	252	0.011		Criollo	91	0.011
		254	0.011				
		256	0.011				
ETH185	Cebú	238	0.021	MM12E6	Cebú	111	0.010
	Siboney	240	0.011			133	0.010
					Siboney	129	0.031
HAUT24	Cebú	112	0.031	TGLA126	Siboney	117	0.020
	Criollo	106	**0.160**				
		108	0.085				
HAUT27	Cebú	128	**0.110**	TGLA53	Criollo	149	**0.191**
		140	0.010		Siboney	173	0.030
		142	0.010			185	0.020
	Siboney	166	0.050			191	0.020
		170	0.010			197	0.020
	Criollo	138	0.087		Cebú	153	0.010
		154	0.033				
TGLA122	Cebú	158	0.020	TGLA227	Siboney	95	0.041
	Siboney	162	0.010		Criollo	93	0.064
		168	0.020			97	0.026
						99	0.064
						101	**0.167**
SPS115	Criollo	250	**0.191**				
		252	0.032				

Se determinaron cinco descriptores clásicos de la variabilidad genética en cada una de las razas analizadas (Tabla 14). Las tres poblaciones presentaron altos valores de heterocigosidad, el que fue superior en el Criollo de Cuba (0.78). Por el contrario esta raza presentó el menor número

medio de alelos por *locus* (A=7.3), mientras que la población Siboney fue la de mayor índice (A=7.7). Las tres poblaciones presentaron polimorfismo en el 100% de los *loci* analizados, al considerar que la frecuencia del más común de los alelos fuera inferior al 95% ($P_{0.95}$), valor de probabilidad recomendado cuando el tamaño de la muestra es mayor o igual a 50 individuos. Estos parámetros indican una alta variabilidad genética en las tres poblaciones cubanas.

Tabla 14. Indicadores de variabilidad en las tres razas cubanas analizadas por medio de la tipificación de 30 microsatélites (los errores estándar se muestran entre paréntesis)

Raza	Hobs	Hesp	A	$P_{0.95}$	F
Cebú	0.71 (0.03)	0.72 (0.03)	7.4 (0.4)	100	0.014
Siboney	0.73 (0.03)	0.76 (0.02)	7.7 (0.4)	100	0.039
Criollo	0.78 (0.02)	0.76 (0.01)	7.3 (0.4)	100	-0.026

Hobs: Heterocigosidad media observada
Hesp: Heterocigosidad media esperada
A: Número medio de alelos
$P_{0.95}$: Porcentaje de *loci* polimórficos
F: Coeficiente de consanguinidad

Los valores de coeficiente de consanguinidad (F) no fueron diferentes de cero significativamente ($p>0.05$), lo que indica que en las tres poblaciones cubanas no hay indicios de consanguinidad.

Del test exacto de probabilidades para la determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) mediante el programa GENEPOP se obtuvieron los valores de heterocigosidades medias observadas y esperadas que se muestras por locus en el anexo X.4. Todas las poblaciones mostraron desviaciones de las proporciones de equilibrio en más de un *locus* ($p<0.05$), específicamente, el Cebú Cubano presentó un 23.3% de *loci* fuera de esta condición de equilibrio, mientras que el Siboney y el Criollo mostraron un 40% de los *loci* en desequilibrio. En la Tabla 15 aparecen los valores de P calculados en cada *locus* y en cada población. Un total de 10 *loci* se encuentran en equilibrio HW en todas las poblaciones cubanas analizadas. Por otra parte, los *loci* HEL5, HAUT24 y TGLA227 presentan desviaciones de las condiciones de equilibrio en las tres razas. La diferenciación genética entre las razas fue altamente significativa para todos los *loci*.

Tabla 15. Valores de P correspondientes a las desviaciones del equilibrio HW para cada *locus* codominante entre las razas cubanas, determinados por test exactos de probabilidades (GENEPOP)

Loci	*Valores de P*		
	Cebu	*Siboney*	*Criollo*
INRA63	0.888	0.059	0.809
INRA005	0.708	0.630	0.712
ETH225	**0.021**	0.423	0.375
ILSTS005	0.371	**0.000**	0.076
HEL5	**0.000**	**0.001**	**0.000**
HEL1	0.072	0.449	**0.022**
INRA035	0.894	0.954	**0.009**
ETH152	0.658	**0.032**	0.385
INRA023	0.195	0.419	0.446
ETH10	0.894	**0.014**	**0.007**
HEL9	0.077	0.458	0.192
CSSM66	0.158	0.140	0.658
INRA032	0.052	0.408	**0.038**
ETH3	0.078	**0.006**	0.055
BM2113	0.195	0.068	0.329
BM1824	0.601	**0.027**	0.096
HEL13	0.985	**0.014**	0.211
INRA37	0.900	0.990	0.392
BM1818	0.100	0.484	0.394
ILSTS006	0.206	0.628	0.160
MM12E6	0.329	0.065	**0.017**
CSRM60	0.210	**0.013**	**0.035**
ETH185	**0.014**	0.578	0.321
HAUT24	**0.000**	**0.006**	**0.043**
HAUT27	0.616	0.753	**0.012**
TGLA227	**0.002**	**0.000**	**0.000**
TGLA126	0.113	**0.000**	**0.020**
TGLA122	**0.000**	**0.000**	0.297
TGLA53	0.459	0.721	0.590
SPS115	**0.021**	0.087	**0.000**

Resulta difícil establecer las causas exactas de las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg. En principio, si se trata de poblaciones de alguna manera seleccionadas, con tamaño efectivo de la población pequeño y no panmícticas, no debe esperarse que estas se encuentren en equilibrio; no obstante, se evalúan las desviaciones de las condiciones de equilibrio para estimar los diferentes procesos que pueden estar ocurriendo en las poblaciones y permitir así una caracterización más completa de las mismas (MacHugh, 1996). Así por ejemplo, los *loci* que se encuentran en desequilibrio en más de una población, en este caso HEL 5, HAUT24 y TGLA227, pueden indicar la presencia de alelos nulos no detectados o la existencia de

caracteres ligados a QTL, elementos que deben ser comprobados antes de tomarlos como ciertos.

De acuerdo con los valores de heterocigosidades observadas y esperadas en los diferentes *loci* y en las poblaciones en general (anexo X.4), la falta de equilibrio podría deberse más a un exceso de heterocigosis que a su defecto. Si se considera que la tasa de mutación es relativamente poco frecuente en este tipo de poblaciones, y que la selección produce normalmente un descenso de la variabilidad genética de una población, este exceso de heterocigosidad podría deberse a un proceso dirigido de migración entre poblaciones de la misma raza que estén ubicadas en diferentes regiones geográficas. También se debe considerar que los animales que han sobrevivido a las difíciles condiciones de alimentación y sanitarias que ha sufrido la ganadería nacional en las últimas décadas han sido los más resistentes y adaptados, es decir, los heterocigóticos.

Con respecto al Criollo, la obtención de las muestras se realizó en dos momentos, el primero en el año 2000 (34 individuos) y el segundo en el 2002 (16 individuos), o sea, se llevó a cabo un muestreo cronológico, factor que tiende a incrementar las desviaciones de las condiciones de equilibrio (MacHugh, 1996).

Otro proceso por el cual se produce una variación en los valores de heterocigosidad es la disminución en el tamaño efectivo de la población en las últimas generaciones (llamado efecto de "cuello de botella"). En poblaciones que han experimentado una disminución reciente en su tamaño efectivo se presenta una reducción del número de alelos, que ocurre más rápidamente que en la diversidad genética. Así, en una población que ha sufrido este proceso, la diversidad genética es mayor que la esperada en el equilibrio (Luikart *et al.,* 1998).

Se ha desarrollado un método gráfico para determinar reducciones recientes en el tamaño efectivo de la población, que no requiere de datos históricos del tamaño de las poblaciones o niveles de variación genética; éste sólo requiere de las medidas de las frecuencias alélicas de entre 5 y 20 *loci* polimórficos en aproximadamente 30 individuos (Luikart *et al*., 1998). Este

método se aplicó para determinar la distribución de frecuencias alélicas, que al agruparse en 10 clases de frecuencias y expresarse los resultados en forma de histogramas debe mantener la forma normal de L. Al reducirse al azar el número de individuos en la población, los alelos con bajas frecuencias (<0.1), se espera que sean más abundantes que los de frecuencias medias y superiores, que se pierden rápidamente (Nei *et al.,* 1976), variando así la distribución normal de la forma a la que nos referimos previamente. En nuestro caso, la distribución de alelos de los microsatélites codominantes en 10 clases diferentes no mostró desviación de la forma normal en ninguna de las razas (Figura 7).

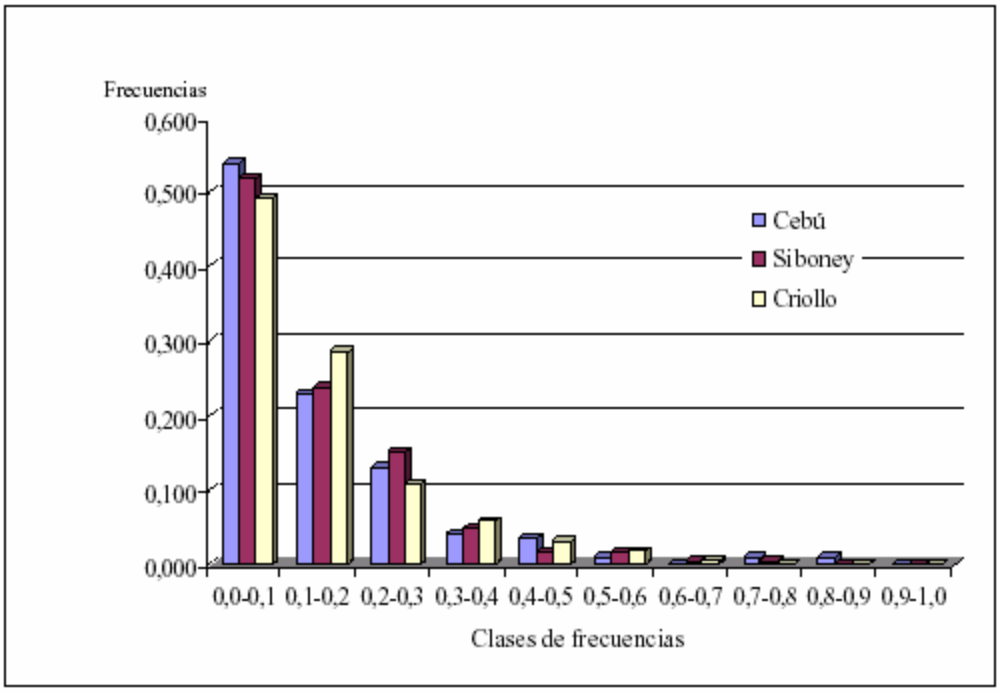


Figura 7. Distribución de frecuencias por clases en cada población.

La forma normal de la distribución de frecuencias indica que no han ocurrido "cuellos de botella" recientes en los grupos genético analizados aquí; sin embargo la población de ganado bovino en Cuba sufrió una reducción considerable durante los primeros años de la década de los 90' y en estos momentos se encuentra en un periodo de recuperación de la masa ganadera nacional. Podría ser que el efecto producido sea aún indetectable ya que Luikart *et al.,* (1998) consideran como reciente el fenómeno producido en las pasadas decenas de generaciones, lo

que en el caso de bovinos supondría más de 50 años y el tiempo transcurrido en el que se considera probable la existencia de "cuello de botella" en la ganadería cubana es mucho menor.

En la Tabla 16 se muestra el número de *loci* con exceso de heterocigotos esperados en las condiciones de equilibrio de mutación y deriva y del modelo TPM (EHE), el número de *loci* observados con exceso de heterocigotos (EHO) y el número de *loci* observados con defecto de heterocigotos (DHO). Además, en la misma Tabla aparecen los valores de P obtenidos con los diferentes test. En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas entre los valores observados y esperados, para $p>0.05$.

Tabla 16. Número de *loci* que muestran exceso o deficiencia de heterocigotos y sus probabilidades (asumiendo TPM)

Raza	EHE	EHO	DHO	P_{SD}	P_{WD}	P_{WE}
Cebú	17.73	17	13	0.088	0.372	0.634
Siboney	17.82	21	9	0.288	0.820	0.185
Criollo	17.71	20	10	0.100	0.949	0.052

EHE: Número de *loci* con exceso de heterocigotos esperados
EHO: Número de *loci* con exceso de heterocigotos observados
DHO: Número de *loci* con defecto de heterocigotos observados
P_{SD}: Probabilidades obtenidas del test de diferencias estandarizadas
P_{WD}: Probabilidades de deficiencia de heterocigotos obtenidas con el test de rango de Wilcoxon
P_{EW}: Probabilidades de exceso de heterocigotos obtenidas con el test de rango de Wilcoxon

El Siboney de Cuba es la que mostró mayores valores de heterocigosidad observada (Hobs) (Tabla 14) y exceso de heterocigotos observados (Tabla 16), población que consideramos aún como una raza en formación, aunque sea reconocida como tal, cuya variabilidad es elevada. Esta es una información valiosa para el empleo de su genofondo por la riqueza genética que posee.

V.3.2. Relaciones genéticas entre razas

Se estableció que la diferencia en la distribución alélica es altamente significativa ($p<0.001$) entre las tres poblaciones cubanas, como resultado del test exacto de probabilidades de Fisher realizando las comparaciones por pares de razas. Utilizando el programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995), se aplicó un método estadístico para establecer la diferenciación génica, planteando como hipótesis nula que la composición alélica es semejante a la asignación poblacional, es decir, que no haya diferenciación entre las poblaciones.

El mayor valor de distancias entre nuestras poblaciones se obtuvo entre el Cebú Cubano y Criollo de Cuba (0.2923), pero el Siboney de Cuba presentó valores de distancia muy semejantes con el Cebú y con el Criollo (0,2449 y 0.2315, respectivamente). Estos valores (Tabla 17) se obtuvieron para verificar la diferenciación entre las poblaciones, utilizando los valores de la distancia modificada de Cavalli-Sforza (D_A), cuando la deriva genética es la principal causa de la diferenciación evolutiva. Se ha demostrado que la D_A es más adecuada que otras medidas de distancias, para recobrar la topología real del árbol evolutivo de poblaciones estrechamente relacionadas (Kantanen *et al.,* 2001).

Tabla 17. Matriz de distancias D_A entre las tres razas bovinas cubanas obtenidas a partir de frecuencias de *loci* de los microsatélites

	Cebú Cubano	Siboney de Cuba
Siboney de Cuba	0.2449	
Criollo de Cuba	0.2923	0.2315

En la Figura 8 se muestra el árbol resultante de la distancia D_A (Nei *et al.,* 1983) por el método de Neighbour-Joining (NJ)(Saitou y Nei, 1987); la fiabilidad del árbol obtenido se examinó por un test de "bootstrap" con 1000 réplicas de remuestreo de cada *loci* (Felsentein, 1985). El método de NJ está basado en el principio de "mínima evolución", existiendo evidencias de que es un método muy eficiente de reconstrucción de filogenias para la obtención del mejor árbol (Saitou y Imanishi, 1989; Rzhetsy y Nei, 1992).

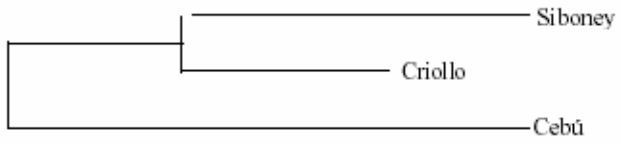


Figura 8. Dendograma que muestra las relaciones genéticas entre las razas cubanas estudiadas. Árbol filogenético construido a partir de las distancias D_A por el método de Neighborn-Joining.

En el árbol, construido por medio del programa PHYLLIP, el Criollo y el Siboney se encuentran ubicados en una misma rama en señal de cercanía genética, mientras que ambos están alejados del Cebú cubano. Esta ubicación en los árboles se corresponde con la

composición genética de las tres razas, si se tiene en cuenta que tanto el Siboney como el Criollo contienen genes de *Bos taurus*, a pesar de que no tengan la misma procedencia racial (el Siboney se obtuvo a partir de Holstein Canadiense y el Criollo es descendiente de razas españolas). Es lógico además, encontrar al Cebú alejado de las dos primeras, si se considera como una raza pura, en cuyo genofondo solo hay genes de *Bos indicus*, con caracteres de resistencia que lo diferencian de las razas taurinas.

Otra confirmación de la diferenciación poblacional se obtuvo al realizar el análisis factorial de correspondencias (Benzécri, 1973; Escofer y Pagès, 1990), utilizado para describir asociaciones entre dos variables cualitativas. La Figura 9 muestra la representación de cada uno de los individuos en un gráfico tridimensional, donde se observa que los animales aparecen agrupados por razas muy bien definidos.

En los anexos X.5.1 y X.5.2 se muestran dos representaciones gráficas de las relaciones individuales. En estos árboles se aprecian los animales pertenecientes a las poblaciones Cebú y Criollo ubicados en dos grupos bien definidos, mientras que los individuos Siboney están distribuidos en tres subgrupos, a lo largo de todo el árbol. Esta subdivisión en la población Siboney puede estar originada por la presencia de individuos procedentes de diferentes rebaños. Este árbol se construyó utilizando el paquete informático TREEVIEW y el método de N-J, mediante el estadístico de alelos compartidos (Minch, 1997), con el programa MICROSAT. Así, se obtuvo una matriz de distancias en las que cada individuo se consideró como una unidad taxonómica operacional (Bowcock *et al.,* 1994), utilizando la elevada variabilidad de los microsatélites, cuya combinación de alelos es diferente para cada individuo.

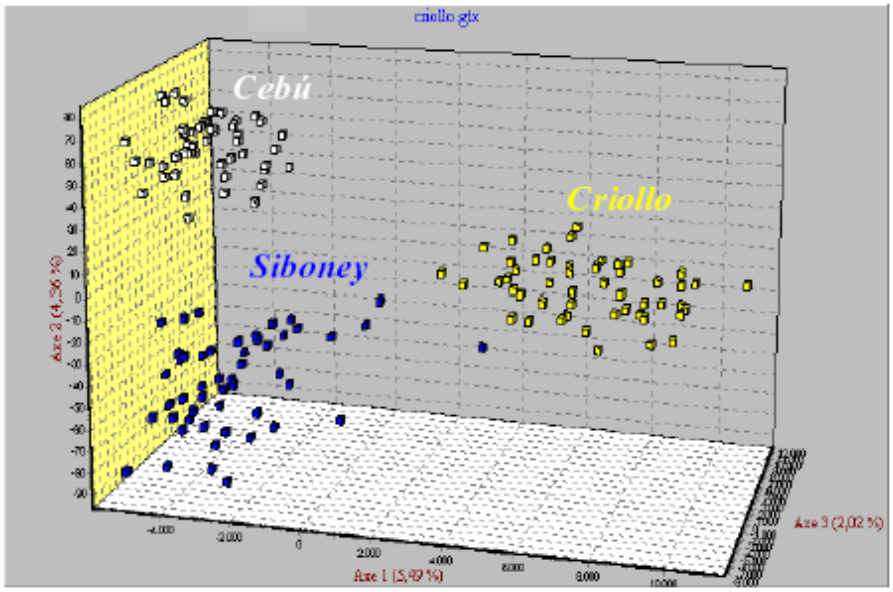


Figura 9. Agrupación de individuos por razas.

Cada individuo se consideró a partir de sus datos de genotipo, según posea o no una variante distinta (alelo). Aquí, la estimación de la variabilidad se asemeja a la interpretación del análisis de componentes principales, pero con la diferencia de que las variables y las observaciones se representan sobre la misma escala de un gráfico común que facilita mucho la ubicación de las similitudes de las observaciones muestreadas agrupadas (Fundora *et al.,* 1992). De esta forma, los individuos se representan como una nube de puntos en un hiperespacio que tiene tantas dimensiones como modalidades (alelos) en cada variable (*locus*). Mediante una serie de algoritmos el programa GENETIX (GENETIX, Montpellier, France), representa a cada individuo en un espacio tridimensional, lo que nos muestra una vez más que hay una elevada diferenciación entre las poblaciones cubanas al no identificarse ubicaciones cruzadas de los individuos en las poblaciones.

Se confirmó una vez más que las razas más distantes son el Cebú y el Criollo (700 generaciones), a partir de los valores de tiempos de divergencia (Tabla 18) entre las tres razas cubanas. Estos indican el tiempo transcurrido desde la separación de dos especies, sin que

hayan sufrido selección ni deriva genética. Cuando se trata de poblaciones domesticadas o seleccionadas, como los grupos genéticos objeto del presente estudio, la determinación de estos parámetros es útil como un elemento más de diferenciación poblacional. El cálculo se basó en la determinación de las distancias D_{TL} (Tomiuk y Loeschcke, 1991, 1995), para la estimación de la distancia entre dos poblaciones.

Tabla 18. Tiempos de divergencia estimados para las tres razas de ganado bovino cubano basados en las distancias D_{TL} estimadas para los 30 microsatélites.

Razas	D_{TL}	Tiempos de divergencia (generaciones)	95% IC*
Cebú vs Siboney	0.137	489	453,525
Cebú vs Criollo	0.196	700	657,742
Siboney vs Criollo	0.166	592	550,635

*95% IC: intervalo de confianza para una probabilidad del 95% para los tiempos de divergencia

Estos resultados permiten la comparación de las distancias calculadas con valores reales, aunque en ocasiones de sobreestiman los tiempos de divergencia debido al efecto que la selección pueda haber ejercido sobre las diferentes razas o poblaciones.

Según la estructura y las distancias genéticas entre las tres poblaciones de ganado bovino cubano, se demostró que hay una amplia variabilidad en ellas y que son tres grupos genéticos independientes. Sin embargo, resultó interesante compararlas con un grupo de razas españolas que tomamos como referencia para indagar sobre las posibles relaciones entre ellas.

V.3.3. Comparación con razas españolas

Al realizar la comparación de las tres poblaciones cubanas con un conjunto de razas ibéricas se identificó un número total de alelos igual a 306, superior a los descritos por Martín-Burriel *et al.,* (1999, 2003) para las razas españolas (Asturiana de los Valles, Asturiana de los Montes, Morenas, Casta, Betizu, Pirenaica, Toro de Lidia y Menorquina), que mostraron 279 alelos identificados en total.

El menor valor de número de alelos por *locus* encontrado en nuestras razas fue de 6 (INRA63, INRA005), mientras que en las razas españolas fue de 2 (ILSTS005). En ambos casos el *locus* más polimórfico fue el TGLA53, del cual en las poblaciones cubanas se identificaron 18 alelos

mientras que en las españolas mostró 14 alelos (Martín-Burriel *et al.,* 1999). Las poblaciones cubanas mostraron un número medio de alelos por *locus* (10.3) superior a las razas españolas (8.6). Este resultado muestra la riqueza en la variabilidad genética de los grupos genéticos cubanos, lo que justifica la necesidad de mantenerlas.

Durante el estudio comparativo con las ocho razas ibéricas, se observó que el Criollo, el Cebú y el Siboney presentan heterocigosidades observadas y esperadas superiores a las encontradas en las razas ibéricas (Hobs: 0.512-0.680; Hesp: 0.550-0.69), mayor número medio de alelos por *locus* (A: 8.6) y mayor porcentaje de *locus* polimórficos ($P_{0.95}$: 96.7-100%). Las causas de esta menor variabilidad en el ganado español se han atribuido a los sistemas de reproducción aislados en algunos casos, en otros al efecto Whalund, al flujo genético entre algunas de estas razas o a que sean poblaciones que hayan estado genéticamente aisladas por condiciones geográficas específicas, por ejemplo en una isla. Las muestras de las tres razas cubanas analizadas en el presente trabajo son procedentes de rebaños genéticos cuyo sistema y programa de reproducción han estado controlados, por lo que el flujo genético entre ellas se supone que no haya sido frecuente, de aquí que sean muy diferentes entre sí.

De los 78 alelos específicos encontrados en las tres razas cubanas, fueron identificados 51 alelos diferentes (Tabla 19) al compararlas con las razas españolas. La población que más alelos específicos muestra es el Cebú cubano con 20 alelos, seguida del Siboney de Cuba con 19 y finalmente el Criollo que presenta 12 alelos propios. No es posible comparar nuestros resultados con otros previamente publicados porque no existe la certeza de que sea la misma nomenclatura de alelos. Con el desarrollo del proyecto RESGEN se secuenciaron muestras controles a las cuales se les determinó su talla y a partir de estas se corrigieron los resultados llevados a cabo anteriormente por diferentes grupos de investigación. Las conclusiones del proyecto no han sido publicadas.

Tabla 19. Alelos diferentes encontrados en las razas cubanas comparadas con ocho razas españolas.

Locus	Raza	Alelo	Frecuencia	*Locus*	Raza	Alelo	Frecuencia
INRA5	Cebú	147	0.020	ETH225	Cebú	141	0.050
ILSTS005	Cebú	182	0.060	HEL5	Criollo	149	0.010
		188	0.110			157	0.060
INRA35	Cebú	120	0.112	INRA32	Cebú	156	0.020
		124	0.031			160	0.235
		128	0.010		Siboney	164	0.043
	Siboney	96	0.133		Criollo	158	0.080
		98	0.061				
		100	0.122				
HEL9	Criollo	171	0.054	BM1824	Cebú	193	0.082
		173	0.120		Siboney	187	0.050
ETH3	Cebú	113	0.050	HEL13	Cebú	166	0.010
	Siboney	121	0.020		Criollo	180	0.031
		123	0.110		Siboney	194	0.034
	Criollo	105	0.177				
INRA37	Cebú	116	0.240	ILSTS006	Cebú	285	0.010
BM1818	Cebú	272	0.030	CSRM60	Criollo	91	0.011
	Criollo	252	0.011		Siboney	109	0.120
		254	0.011				
		256	0.011				
ETH185	Cebú	238	0.021	MM12E6	Cebú	111	0.010
	Siboney	240	0.011			133	0.010
HAUT27	Siboney	166	0.050	TGLA126	Siboney	117	0.020
		170	0.010				
TGLA122	Siboney	162	0.010	TGLA53	Criollo	149	0.191
		168	0.020		Siboney	173	0.030
						185	0.020
						191	0.020
						197	0.020
					Cebú	156	0.010

Se calcularon los valores de distancias genéticas D_A sobre la base de las frecuencias alélicas de 21 de los 30 microsatélites para comparar las tres razas cubanas con las ocho españolas, a través de la reconstrucción de filogenias por el método de Neighbour-Joining. En este caso fue necesario reducir el número de *loci* para la construcción de los árboles, debido a que solo se disponía de información para esas ocho razas españolas (Martín-Burriel *et al.,* 1999).

En la Figura 10 se muestra el dendograma donde las tres razas cubanas aparecen formando un grupo bien diferenciado del resto y más cercanas a las Morenas, que son razas del noroeste de la Península Ibérica de donde presuntamente partieron los colonizadores a las Américas. Estas a su vez están cercanas a las Asturianas. Es interesante destacar que el Cebú está mucho más alejado, lo que demuestra una vez más la diferencia en cuanto a sus características genéticas con respecto a las razas españolas que son de origen *Bos taurus*. Esto concuerda con el hecho

de que los valores de D_A obtenidos entre esta y las restantes razas son los más elevados. Resultados similares se han descrito para diferentes razas provenientes de *Bos taurus* y *Bos indicus* (Loftus, 1992; MacHugh, 1996).

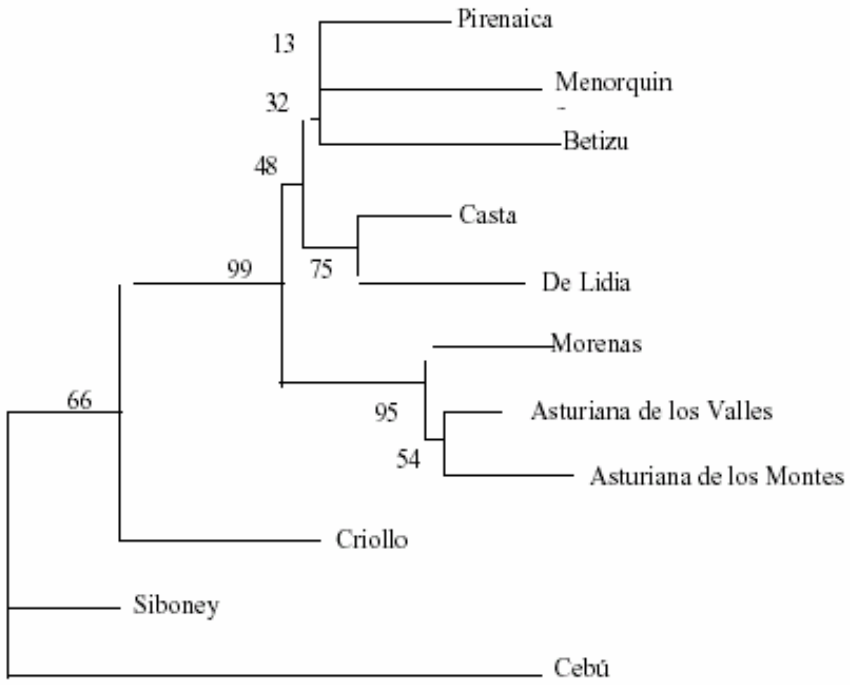


Figura 10. Dendogramas que muestran las relaciones genéticas entre las razas cubanas estudiadas y ocho razas españolas. Árboles filogenéticos construidos a partir de las distancias D_A (A) por el método de Neighborn-joining (N-J), para los *loci* microsatélites.

En la siguiente Tabla aparecen la matriz de distancias D_A, que permitió estimar la diferenciación genética entre las tres razas cubanas y las razas ibéricas.

Tabla 20. Matriz de distancias D_A entre las tres razas bovinas cubanas y ocho razas españolas.

	Ast. Valles	Morenas	Ast. Montes	Casta	Betizu	Pirenaica	De Lidia	Menorq.	Cebú	Siboney
Morenas	0.073									
Ast. Montes	0.083	0.108								
Casta	0.152	0.163	0.188							
Betizu	0.219	0.234	0.257	0.162						
Pirenaica	0.137	0.162	0.155	0.124	0.150					
De Lidia	0.201	0.212	0.218	0.106	0.182	0.140				
Menorq.	0.177	0.226	0.238	0.165	0.187	0.142	0.175			
Cebú	0.451	0.415	0.464	0.377	0.423	0.427	0.437	0.439		
Siboney	0.251	0.259	0.278	0.269	0.280	0.288	0.239	0.235	0.269	
Criollo	0.254	0.261	0.234	0.208	0.237	0.227	0.276	0.265	0.287	0.218

Del cálculo de las distancias D_{TL} (Tabla 21), los mayores tiempos de divergencia en generaciones se obtienen, entre el Cebú y las razas españolas de origen *Bos taurus*, lo que puede estar relacionado con el hecho de que son razas que a través de los años han sido seleccionadas con objetivos diferentes, lo que ha contribuido aun más a la diferenciación entre ellas. La magnitud de las distancias entre el Criollo y el Siboney con algunas razas españolas (Asturianas y Morenas) son menores que con el resto de las razas españolas.

Tabla 21. Tiempos de divergencia estimados entre el ganado bovino cubano y ocho razas españolas, basados en las distancias D_{TL} estimadas para 21 microsatélites

Poblaciones	D_{TL}	Tiempo generaciones	CI 95%
Cebu vs Casta	0,307	1096	5196, 5767
Cebu vs Astvalle	0,460	1642	7571, 8857
Cebu vs Morena	0,340	1214	5535, 6607
Cebu vs Astmontes	0,429	1532	7089, 8232
Cebu vs Betizu	0,475	1696	8053, 8910
Cebu vs Pirenaica	0,356	1271	6000, 6714
Cebu vs De Lidia	0,403	1439	6839, 7553
Cebu vs Menorquina	0,433	1546	7339, 8125

Tabla 21. Tiempos de divergencia estimados entre el ganado bovino cubano y ocho razas españolas, basados en las distancias D_{TL} estimadas para 21 microsatélites (cont.)

Poblaciones	D_{TL}	Tiempo generaciones	CI 95%
Siboney vs Casta	0,272	971	4571, 5142
Siboney vs Astvalle	0,192	685	3107, 3750
Siboney vs Morena	0,170	607	2750, 3321
Siboney vs Astmontes	0,234	835	3785, 4571
Siboney-Betizu	0,417	1489	7125, 7767
Siboney-Pirenaica	0,322	1150	5428, 6071
Siboney-De Lidia	0,386	1378	6535, 7250
Siboney-Menorquina	0,387	1382	6625, 7196
Criollo-Casta	0,335	1196	5625, 6339
Criollo-Ast. Valles	0,190	678	3107, 3678
Criollo-Morena	0,208	742	3357, 4071
Criollo-Ast. Montes	0,217	775	3517, 4232
Criollo-Betizu	0,401	1432	6732, 7589
Criollo-Pirenaica	0,335	1196	5589, 6375
Criollo-De Lidia	0,396	1414	6642, 7500
Criollo-Menorquina	0,379	1353	6375 7160

Los resultados de la determinación de la estructura genética de los *loci* microsatélites en las tres poblaciones cubanas, muestran que existe elevada variabilidad genética en ellas. La utilización de este tipo de marcadores brinda la posibilidad de contar con una tecnología molecular de avanzada con gran aplicabilidad en el campo de la genética, y que puede contribuir grandemente a acelerar la obtención de los resultados deseados en los proyectos genéticos del país. También se sientan las bases para la caracterización racial, al contar con los perfiles alélicos de las tres razas cubanas.

V.3.4. Conclusiones parciales

- ✓ Hay una elevada variabilidad en las tres poblaciones cubanas, dado por los valores de heterocigosidades, número medio de alelos por *locus*, porcentaje de *loci* polimórficos y los coeficientes de consanguinidad.
- ✓ Se identificaron alelos específicos para cada población, útiles para la caracterización racial
- ✓ Se confirmó la cercanía genética entre el ganado Criollo de Cuba y las razas españolas Morena y Asturianas.

CAPITULO VI. DISCUSION GENERAL

De los resultados obtenidos de esta investigación, para determinar la estructura genética de los *loci* de las proteínas lácteas y de los microsatélites en las tres poblaciones cubanas, se han identificado tres elementos fundamentales en los que se puede resumir la importancia de este trabajo.

En primer lugar, se identificó un grupo de alelos que pueden ser utilizados como **marcadores raciales** de las poblaciones estudiadas. Por una parte, la ocurrencia de elevadas frecuencias del alelo $CASA1^{C}$ y la presencia en nuestras razas del alelo LAA^{A}, son elementos que permiten la identificación de genes de ganado cebú en nuestras poblaciones (Escoda *et al.*, 1981; Grosclaude *et al.*, 1976; Sánchez *et al.*, 1977). Por otra parte, la identificación de 51 alelos específicos de los *loci* microsatélites, que no han sido descritos en la literatura consultada, distribuidos en las tres razas cubanas, permitirá contar con un perfil alélico específico para cada raza.

Estos resultados son de gran utilidad para los genetistas y los criadores de ganado bovino. El hecho de que en cada una de las razas cubanas existan alelos "únicos", es un elemento importante para la realización de estudios de caracterización racial, que permitirán discriminaciones entre individuos de una raza u otra. Aquí los genetistas tiene una herramienta para la planificación de los cruzamientos entre razas, el diseño de nuevos cruzamientos y la evaluación de la selección genética, por la identificación de alelos característicos de *Bos indicus*, que pueden estar asociados con características de resistencia.

En segundo lugar, se tiene la **gran diversidad genética en tres poblaciones cubanas analizadas**, de suma importancia para la ganadería cubana. El Criollo de Cuba, ganado autóctono cubano, descendiente de los primeros bovinos introducidos en el país en épocas de la colonización, en cuyo genofondo hay valiosa información acerca de los procesos de adaptación al ambiente tropical y de producción en condiciones difíciles.

En cambio el Cebú cubano, es la base genética que ha aportado la resistencia a las nuevas razas cubanas que contienen sus genes y que se sigue usando como genotipo de resistencia al ambiente tropical. Por su parte, el Siboney de Cuba es una raza sintética en la cual se combinan las características productivas del ganado Holstein y las de rusticidad del Cebú.

Los valores de los indicadores utilizados para la caracterización poblacional (Hobs, Hesp, A, $P_{0.95}$ y F) evidencian una elevada variabilidad en cada una de las razas cubanas estudiadas, lo que permite a los genetistas manejar adecuadamente esta información para ser utilizada al trazar estrategias de cruzamientos y programas de mejora genética, así como en el mantenimiento y conservación de la diversidad genética.

El Siboney de Cuba es la población con mayor porcentaje de *loci* fuera de las condiciones de equilibrio, tanto para los *loci* de las proteínas lácteas como de los microsatélites, lo que explica el hecho de que éste sea el grupo genético de mayores valores de heterocigosidad y por haber sido sometido a una mayor selección originada por su condición de raza sintética, contando aún con amplias posibilidades de explotación de su heterosis.

Como tercer elemento de interés, está **la confirmación de la estrecha relación del Criollo de Cuba con algunas razas españolas**. La menor distancia genética encontrada entre el Siboney y el Criollo es una evidencia de que comparten genes de la misma especie (*Bos taurus*) aunque provenientes de razas diferentes. Esto constituye una información útil si se trata de investigar las relaciones de nuestro ganado con sus ancestros, sobre todo del ganado Criollo. En este caso, la confirmación de la cercanía filogenética con las razas Asturianas y Morenas permite corroborar las rutas de migración de los colonizadores hacia América, pues dichas razas están ubicadas geográficamente en zonas donde entonces se encontraban los principales puertos de navegación de la península. Nuestros resultados contribuyen también a corroborar la composición genética de las razas españolas que se utilizaron como material de referencia (Martin-Burriel *et a*l., 1999 y 2000).

Este análisis filogenético ofrece también la posibilidad de la realización de estudios de la biodiversidad del ganado bovino cubano, al permitir la comparación de sus genofondos propios con otros de la región y de Europa. Esta información contribuirá a la elaboración del Informe Nacional a la FAO sobre el Estado de los Recursos Genéticos y a la confección de los informes regionales y mundiales, aportando elementos basados en la utilización de marcadores moleculares que enriquece la información que ya se posee de nuestras razas bovinas.

Además de estos tres elementos fundamentales, la utilización de las técnicas moleculares en la ganadería cubana tiene otras posibilidades de aplicaciones. Tanto las proteínas lácteas como los microsatélites, se están haciendo cada vez más imprescindibles en la caracterización de animales valiosos ya sea por su desempeño productivo o porque se presuma que contengan en su genoma combinaciones de genes difíciles de reproducir en un futuro. Una aplicación actual muy importante en nuestra ganadería es la selección de individuos para el programa de fertilización *in vitro* y clonación bovinas.

Por estos métodos moleculares es posible hoy en Cuba, identificar los genotipos que portan los animales preseleccionados por sus características productivas y recomendar que sean seleccionados finalmente o rechazados por su valor genético. También, conociendo los patrones alélicos de los individuos que se seleccionen, es posible realizar una comparación individual (identificación de individuos) una vez que se obtenga la descendencia clonada, incluso en edades tan tempranas del desarrollo como en el embrión. De hecho, algunos de los animales incluidos en esta investigación pertenecen al grupo de las madres de sementales de la raza Siboney que han sido preseleccionas para ser donantes de células para la clonación y/o fertilización *in vitro*. Este es un elemento que contribuye en gran medida a incrementar la eficiencia en la selección de los individuos y a la utilización de la amplia gama de recursos necesarios para estas investigaciones.

Otra de las aplicaciones inmediatas que tiene la utilización de estos marcadores, es la determinación de paternidad en ganado bovino con una probabilidad de exclusión del 99% (Osta, 1999). Estos métodos son relativamente costosos si se comparan con los tradicionales de grupos sanguíneos, pero están plenamente justificados si se trata de animales valiosos. En esta categoría de animales valiosos se pueden incluir las donantes de células para la clonación o los sementales para la fertilización *in vitro*, de los cuales, en algunos casos, ya se cuenta con sus genotipos, por lo que se pueden utilizar como referencia e incluso, como controles positivos.

También es posible la introducción a mediano plazo, de la selección asistida por marcadores para la producción de leche en los programas de mejora, dado que en las tres razas se identificaron alelos que e describen con efectos que favorecen una mejor composición de la leche. Este aspecto es importante pues, si bien es cierto que el país está necesitado de incrementar la producción de leche, esta debe ser una leche con adecuada calidad. La determinación de los genotipos de las proteínas lácteas contribuirá también a reducir los intervalos entre generaciones al brindar la posibilidad de selección en edades muy tempranas de desarrollo y en ambos sexos. Los costos se pueden reducir utilizando eficientemente los recursos e insumos de que dispone nuestra ganadería para el mantenimiento de los animales que potencialmente pueden ser mejores para la producción de leche, mediante la integración del comportamiento reproductivo, sanitario y de manejo.

El hecho de poder contar con la metodología de identificación de marcadores moleculares para la determinación de las características genéticas de razas de interés, coloca a Cuba en un lugar ventajoso con relación a otros países de la región, aspecto que está avalado por la experiencia alcanzada en el tema. Así, la realización de estos estudio en América Latina ha estado muy limitada, ya que se han desarrollado solo algunos estudios de caracterización molecular de ganado bovino criollo en Argentina, México y Uruguay (Giovambattista *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2000; Postiglioni et al., 2002), y existen pocos resultados publicados de investigación relacionadas con estudios de biodiversidad en la región a

través de marcadores moleculares. Este primer reporte de utilización de la metodología en ganado bovino cubano, constituye una información disponible para incluir en proyectos regionales de estudios de biodiversidad, o en otros de carácter más abarcador, tales como los que se llevan a cabo actualmente financiados por diferentes organismos internacionales, y quienes han mostrado interés en comparar sus recursos genéticos con los de América.

CAPITULO VII. CONCLUSIONES GENERALES

1. En las poblaciones bovinas estudiadas existen alelos, tanto de las proteínas lácteas como de los microsatélites, que permiten establecer un patrón racial molecular, característico para cada una de ellas.

2. Existe una alta variabilidad genética en el Criollo de Cuba, el Cebú Cubano y el Siboney de Cuba, importante para el diseño y control de los programas de mejoramiento genético.

3. El Cebú Cubano se encuentra más alejado filogenéticamente del Siboney y del Criollo de Cuba y este último más cercano de las razas españolas, que se reportan como las que probablemente fueron introducidas en América en épocas de la colonización.

4. Está disponible la metodología de análisis de marcadores moleculares para la caracterización del ganado bovino cubano, tanto para estudios de biodiversidad como para otras aplicaciones de interés económico.

CAPITULO VIII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de asociación entre las características productivas y genéticas del ganado bovino cubano, que sirva de base para la introducción de la selección asistida por marcadores en la ganadería nacional.
2. Extender este estudio a otras razas cubanas de interés genético.
3. Introducir la tecnología de marcadores moleculares en la estrategia de inventario, mantenimiento y conservación de recursos genéticos nacionales.
4. Introducir los tests de paternidad basados en marcadores microsatélites, al menos par casos excepcionales.
5. Vincularnos a estudios de comparación racial de nuestro ganado con otros grupos genéticos autóctonos del continente americano o de Europa.

CAPITULO IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aleandri, R; Buttazzoni, L. G; Schneider, J. C; Carili, A; Davoli, R (1990): The effects of milk protein polymorphism on milk components and cheese-producing ability. *J. Dayri Sci*. 73:241-255.
2. Alexander L. J., Beattie C. W., Hayes G., Pearse M. J., Stewart A. F., MacKinlay A. G., (1992): Isolation and characterization of the bovine beta-lactoglobulin gene. *Genbank submission number X14710*.
3. Alexander L.J., Stewart A.F., MacKinlay A.G., Kapelinskaya T.V., Tkach T.M., Gorodetsky S.I. (1988): Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. *European Journal of Biochemistry*, *178*, 395-401.
4. Ali, S; Clark, J. (1988): Characterization of the gene encoding ovine β-lactoglobulin. Similarity to the genes for retinol binding protein and other secretory proteins. *J. Mol. Biol.* 199:415.
5. Al-mariri, A; Tibor, A; Lestrate, P; Mertens, P; De Bolle, X; Letesson, J.J (2002): Yersinia enterocolitica as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding Brucella abortus bacterioferritin or P39 antigen. *Infect. Immun.*, 70:1915-1923.
6. Alves, B.C; Hossepian de Lima, V.F; Teixeira, C.M; Moreira-Filho, C.A. (2003): Use of primers derived from a new sequence of the bovine Y chromosome for sexing *Bos taurus* and Bos indicus embryos. *Theriogenology*. 59(5-6):1415-9.
7. Aschaffenburg, R; Drewry, J (1955): Ocurrence of differente beta-lactoglobulins in cow's milk. *Nature*, 176, 218-221
8. Aschaffenburg, R; Drewry, J (1957): Genetics of the beta-lactoglobulins of cow's milk. *Nature*, 180:376-379.
9. Aschaffenburg, R; Thymann, M (1968): Genetic variants of casein in Indian and African Cebu cattle. *Comp. Biochem. Physiol. 25:177.*
10. Ayala, F.J. (1984): Molecular polymorphism: How much is there and why is there so much? *Developmental Genetics*, 4:379-391.
11. Baker, C.J., Perry, A., Bannister, J.L., Weinrich, M.T., Abernethy, R.B., Calambokidis, J., Lien, J., Lambertsen, R.H., Urbain Ramirez, J., Vasquez, E., Clapham, P.J., Alling, A., O'Brien, S.J. y Palumbi, S.R. (1993). Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8239-8243.
12. Baranji, M; Bosze, Z. B; Bucherger, J; Krause, I (1993): Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian Spoted and Hungarian Grey cattle: a possible new variant of β-lactoglobulin. *J. Dairy Sci*., 76:630-636.
13. Barendse, W., Armitage, S. M; Kossarek, L. M; Shalom, A.; Kirkpatrick, B. W, *et al* (1994): A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics* 6:227-235. Nature Genetics 6 pp.227-235.
14. Barroso, A; Dunner, S.; Cañón, J. (1999): Polimorfismo genético de las lactoproteínas de los rumiantes domésticos-Revisión. *ITEA*, Vol 95ª, Nº 2, 143-179.
15. Barroso, A; Dunner, S; Cañon, J (1999a): A multiplex PCR-SSCP test to genotype bovine beta-casein alleles A1, A2, A3, B and C. *Anim. Genet*. 30(4):322-3.
16. Barroso, A; Dunner, S; Cañon, J (1999b): Technical note: use of PCR-single-strand conformation polymorphism analysis for detection of bovine beta-casein variants A1, A2, A3 and B. *J. Anim. Genet.* 77(10):2629-32.
17. Base de Datos Cattle Diversity (CadBase), Disponible online en: http://www.ir.bbsrc.ac.uk/cdiv_www.
18. Beja-Pereira, A; Erhardt, G; Matos, C; Gama, L; Ferrand, N (2002): Evidence of the geographical cline of casein haplotypes in Portuguese cattle breeds. *Animal Genetics*, 33 (4):295.

19. Bell, K; Hopper, K.E, McKenzie, H.A. (1981): Bovine alpha-lactalbumin C and alpha S-, beta- and kappa-caseins of Bali (Banteng) cattle, *bos (Bibos) javanicus*. *Aust J Biol Sci.*;34 (2):149-59.
20. Bell K. (1962): One-dimensional starch-gel electrophoresis of bovine skim-milk. *Nature*, *195*, 705-706.
21. Bell K., McKenzie H.A., Murphy, W.H., Shaw D.C. (1970): ß-lactoglobulin droughtmaster: a unique protein variant. *Biochimica et Biophysica Acta*, 214, 427-436.
22. Benzécri, J. P. (1973) : L'Analyse des Données: T. 2, I' Analyse des correspondances. Paris: Dunod.
23. Bergensen, O (1990): An AluI polymorphism near the 5' end of the goat eIV globin gene. *REVISA,* 21:339
24. Berovides, V.; Alfonso, A. (1987): Los genes en las poblaciones. Ed. Universidad de la Habana, La Habana, 277pp.
25. Berta, P; Hawkins, J. R; Sinclair, A. H; Taylor, A; Griffiths, B. L; Goodfellow, P. N; Fellows, M (1990): Genetic evidence equating SRY and testis-determining factor. *Nature*, 348: 448-450.
26. Bhattacharya, TK; Kumar, P; Jpshi, JD; Kumar, S (2003): Estimation of inbreeding in cattle using RAPD markers. *J. Dairy Sci.* 70(1):127-9.
27. Biotechnology Information Organization (BIO) (2000): What is the Biotechnology? Disponible online en http://www.bio.org/aboutbio/guide2000/whatis.html
28. Bishop, M. D; Kappes, S. M; Keele, J.W, Stone, R.T; Sunden, S. L. F; Hawkins, G.A; Solinas-Toldo, S; Fries, R; Grosz, M. D; Yoo, J; Beattie, C. W. (1994): A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136: 619-639.
29. Bleck, G.T.; Bremel, R. D. (1993): Sequence and single base polymorphism of the bovine αLA 5'-flanking region. *Gene* 126: 213-218.
30. Blott, S: C; Williams, J. L; Haley, C. S (1999): Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity* 82: 613-619.
31. Bolla, P; Caroli; A; Rizzi, R.; Barcoli, D.; Pedro, O. (1992): Effect of milk genetic markers on the lactation avive in dairy cattle. *XXIII International Conference on Animal Genetics*, Interlaken, Switzerland, 101.
32. Bonsing, J; Ring, J.M.; Stewart, A. F; MacKinlay, A. G, (1988): Complete nucleotide sequence of the bovine β-casein gene. *Aust. J. Biol. Sci.*41:527.
33. Botstein, D.; White, R.L; Skolnick, M, Davis, R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment lenght polymorphism. *Am. J. Hum. Genet. 32:314-331.*
34. Bouniol, C; Printz, C; Mercier, C (1993): Bovine as2-casein D is generated by exon VIII skipping. *Gene, (Abst)* 128:289-292.
35. Bouzat, J.L., Giovambattista, G., Golijow, C.D., Dulout, F.N., M.M. Lojo, (1998): Conservation genetics of native breeds: the Argentine Creole Cattle. *Interciencia* 23: 151-157.
36. Bowcock, A. M; Ruiz-Linares, A; Tomhorde, J; Minch, E; Kidd, J, R; Cavalli-Sforza, L. L (1994): High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 36:455-457.
37. Bradley, D.G., MacHugh, D.E., Loftus, R.T., Sow, R.S., Hoste, C.H. y Cunningham, E.P. (1994). Zebu-taurine variation in Y chromosomal DNA: a sensitive assay for genetic introgression in West African trypanptolerant cattle populatious. *Animal Genetics*, **25**: 7-12.
38. Braunitzer G. ; Chen R. ; Schrank B. ; Stangl A. (1972) : Automatische sequenz analyse eines proteins (b-lactoglobulin AB). *Hoppe-Seyler's Zeitung für Phisiologie und Chemie*, *353*, 832-834.
39. Braunschweig M, Stranzinger G, Puhan Z. (1999): A PvuII PCR-RFLP test for the bovine beta-lactoglobulin D allele. *Anim Genet*. 1999 30(1):76.

40. Brezinsky L.S., Kemp J.; Teale A.J. (1993a). ILSTS005: a polymorphic bovine microsatellite. *Animal Genetics* 24:73.
41. Brezinsky L.S., Kemp J.; Teale A.J. (1993b). ILSTS006: a polymorphic bovine microsatellite. *Animal Genetics* 24:73.
42. Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B; Mercier, J.C., Pélissier, J. P ; Das, B. C (1977) : Complete aminoacid sequence of the precursoss of ovine caseins. *FEBS Lett*, 76:274-279.
43. Brunner R. M; Sanftleben, H; Goldammer, T; Kuhn, C; Weikard, R, Weikard, R; Kata, S. R; Womack, J. E; Schwein, M (2003): The telomeric region of BTA18 containing a potential QTL region for health in cattle exhibits high similariry to the HSA19q region in humans small star, filled. *Genomics*, 81(3):270-8.
44. Buchanan, F. C; Thue, T. D. (1998): Intrabreed polymorphic information content of microsatellites in cattle and sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 78: 425-428.
45. Buchberger, J; Dovc, P (2000): Lactoprotein genetic variants in cattle and cheese making ability. *Food, Technology and Biotechnology*, 38:91-98.
46. Buddle, B (1996): Development of vaccines against TB, Immunology of bovine tuberculosis. Disponible online en: http://www.maf.govt.nz/MAFnet/rural-nz/research-and-development/research-results/1995-1996/
47. Bumstead, N; Palyga, J. (1992): A preliminary linkage map of the chicken genome. *Genomics*, 13:690-697.
48. Ciampolini, R.; Moazami-Goudarzi, K.; Vaiman, D.; Dillmann, C.; Nazzanti, E.; Faulley, J.L.; Leveziel, H; Cianci, D. (1995): Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian Beef Cattle Breeds. *J. Anim. Sci.*, 73: 3259-3268.
49. Clark, A. J; Bessos, H; Bishop, J. O; Brown, P; Harris, S; Lathe, R; McClenaghan, M; Prowse, C; Simons, J. P; Whitelaw, C. B: A; Wilmut, I (1989): Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep. *BioTechnology*, 7:487-490.
50. Clarke, B. (1975): The causes of biological diversity. *Sci. Amer*. 233(2):50-60.
51. Collins, S. F. (1992): Positional cloning: let's not call it reverse any more. *Nature Genetics*, Vol. 1: 3-6.
52. Cornide, Maria T; Arencibia, A; Bervides, V; Calvo, D; Canales, E; *et al.,* (2002): Marcadores moleculares, nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Ed. Félix Varela, Ciudad de la Habana, Cuba.
53. Cornuet J. M.; Luikart G. (1997): Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.
54. Corradini C. (1969) : Distribuzione delle varianti genetiche delle caseine as1, b, k nel latte di vacche di razza Frisona. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia , 21*, 166-170.
55. Cowan C. M, Dentine M. R, Coyle T. (1992): Chromosome substitution effects associated with kappa-casein and beta-lactoglobulin in Holstein cattle. *J Dairy Sci.*; 75(4):1097-104.
56. Craighead, L., Pasetkan, D., Reynolds, H. V., Vyse, E. R. y Strobeck, C. (1995): Microsatellite analysis of paternity and reproduction in Artic Grizzly Beans. *The Journal of Heredity*, 86: 255-261
57. Cunningham, E. P; Meghen, C. M (2001): Biological identification systems: genetic markers. *Rev Csi Tech* 20(2):491-99.
58. Cushwa, W.T.; Medrano, J. F. (1996): Applications of the random amplified polymorphic ADN (RAPD) assay for genetic analysis of livestock species. *Animal Biotechnology* 7(1): 11-31.
59. Chamberlain, J. S; Gibbs, R. A; Ranier, J. E; Nguyen, P. N; Farwell, N. J; Caskey, C. T (1988): Delection screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acid Research*, 16:1141-1156.

60. Chen, H. H (1997): Mapping the chicken genome. *Poultry Sci.*, 76:1101-1107.
61. Chianese L., Di Luccia A., Mauriello R., Ferrara L., Zehender G., Addeo F. (1988): Polimorfismo biochimico delle proteine del latte in bovine di razza Podolica. *Zootecnica e Nutrizione Animale*, 14, 189-197.
62. Chung E.R., Kim D.K. (1999): DNA genotyping of a-lactalbumin gene in Korean Holstein population using PCR-RFLP technique. *Korean Journal of Dairy Science*, *21*(2), 89-94.
63. Dall'Olio, S.; Davoli, R; Milc, J; Russo, V. (1999): Studio del polimorfismo a-lattalbumina (+15) in sette razze bovine italiane. *"Proceedings Società Italiana delle Scienze Veterinarie"*, Montecatini Terme, Italy, 53, 393-394.
64. Damiani G., Budelli E., Florio S., Caroli A., Pagnacco G. (2000): Polymorphism within sine BOV-A2 of k-casein and steroid 21-hydroxylase in some bovine breeds. *Zootecnica e Nutrizione Animale*, 145-148.
65. Davis, W; Harbitz, I.; Fries, R.; Stranzinger, G.; Hauge, J. G. (1988): Porcine malignant hyperthermia carrier detection and chromosomal assignment using linkage probe. *Anim. Genetics.* 19:203-212.
66. Debeljak, M; Susnik, S; Marinsek-Logar, R; Medrano, J.F; Dovc, P (2000): Allelic differences in bovine kappa-casein gene wich may regulate gene expression. *Pflugers Arch*, 439(3 Suppl):R4-6.
67. Di Rienzo, A; Peterson, A. C; Garza, J. C; Valdes, A. M; Slatkin, M; Freimer, N. B (1994): Mutational processes of simple sequence repeat loci in human population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 91: 3166-3170.
68. Dietrich, W.; Katz, H.; Lincoln, S. E.; Shin, H. S; Friedman, J; Dracapoli, N. C; Lander, E. S (1992): A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* 131:423-447.
69. Dietz, A. B., Womack, J. E., Swarbrick P. A.; Crawford, A. M. (1993): Assignment of five polymorphic ovine microsatellites to bovine syntenic groups. *Animal Genetics*, 24: 433- 436.
70. Distl, O (2000): Lameness, Chapter 19. Breeding for disease resistance in farm animals. CAB Internacional 2000, eds. RFE Axford, SC Bishop, FW Nicholas, JB Owen, 397-411. Disponible online en: http://www.cabi-publishing.org/bookshop/ReadingRoom/0851993257/3257ch19.pdf.
71. Edward, C. J; Gaillard, C; Bradley, D. G; MacHugh, D. E (2000): Y-specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species. *Animal Genetics 31(2):127-130.*
72. Edwards, A; Hammond, H. A; Jin, L; Caskey, C. T; Charkraborty, R. (1992): Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, 12: 241-253.
73. Eigel, W. N; Butler, J. E; Erstrom, C. A; Farrel, H. M; Harwalker, V. R; Jenness, R; Whitney, R (1984): Nomenclture of protein of cow's milk: fith revision. *J. Dayri Sci,* 67:1599-1631.
74. Ellegren, H; Moore, S; Robinson, N; Byrne, K (1997): Microsatellite evolution: a reciprocal study of repeat lenghts at homologous loci in cattle and sheep. *Mol. Biol. Evol, 14(8):854-860.*
75. Erhardt G., Döring C., Senft B., Grandke R. (1992): A new αs1-casein variant in cow's milk. *Intern. Soc. Anim. Gen.* (I.S.A.G.) Conference, Interlaken (Switzerland), 3-7 August 1992.
76. Erhardt, G (1993): A new α_{S1}-casein allele in bovine milk and its ocurrence in different breeds. *Anim. Genet*. 24:65-66.
77. Erhardt, G (1996): Detection of a new k-casein variant in milk of Pinzgauer cattle. *Anim. Genet*., 27:105-107.
78. Erwin, T. R. (1991): An evolutionary basis for conservation strategies. *Science* **253**, 750-752.
79. Escoda, A. B; Alvarez, L.O; Yerez, S (1981): Estudio de los polimorfismos genéticos de las proteínas de la leche producida en algunas hacienda de la zona de Carora. *Rev. Facultad Agronomía (LUZ),* 6(2):714-716.

80. Escofier B., Pagès J, (1990) : Analyses factorielles simples et multiples. Paris: Dunod
81. Estivill, X; Chillon, M; Casals, T (1989): Molecular heterogeneity for cystic fibrosis in southern European populations. *Lancet*, 1404.
82. Falaki, M; N. Gengler; M. Sneyers; A. Praudi; S. Massart; A. Formigoni; A. Burny; D. Portilit, R. Renaville (1997): Relationship of polymorphism for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for italian Holstein- Freisian bulls. *J. Dairy Sci.* 79:1446-1453.
83. FAO (1993a): An Integrated Global Programme to Establish the Genetic Relations among the Breeds of each Domestic Animal Species (Report of a working group, June 1993), Food and Agriculture Organization of the United Nations.
84. FAO (1993b): In: World Watch List for Domestic Animal Diversity (ed. by R.T. Loftus & B. Scherf), 1st edn, FAO, Rome.
85. FAO, (1999): The global strategy for the management of farm animal genetics resources. Executive brief. Ed. FAO, 44p.
86. FAO, (2002): Conservation of farm animal biodiversity: history and prospects: animal genetic resources information, *Agri,* 32:1-12.
87. Felsestein, I. (1993): PHYLIP (Phylogeny inference package) v. 3.5c. Department of Genetics, The University of Washing-ton, Seattle, Washington
88. Fernández, Maria H (1980): Asociación de los genotipos de amilasa con dos caracteres de importancia económica en vacas R_1 (Holstein-Cebú-Cebú), *Revta. Cub. Cienc. Veter*. 155-160.
89. Fernández, Maria H; Granado, A; Pérez-Beato, O (1983): Polimorfismo de seis sistemas sanguíneos y cinco lácteos en vacas de la raza Criollo de Cuba. *Revta. Cub. Cienc. Veter*. 14(4):253-260.
90. Ferreira, M. A.; Grattapaglia, D. (1995): Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética (2^{nd} ed.) Embrapa.
91. Ferreti, L; Leone, P; Sgaramella, V (1990): Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucl. Acid Res*. 18(23):6829-6833.
92. Formaggioni, P; Summer, A; Malacarne, M; Mariani, P (1999): Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in bos genus. Università degli Studi di Parma Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Vol. XII, Disponible online en: http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/
93. Fries, R.; Eggen, A; Atranzinger, G (1990): The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics*, 8:403-406.
94. Fries, R; Eggen, A; Womack, J. E. (1993): The bovine genome map. Mamm Genome.;4 (8):405-28.
95. Fundora, Z; Vera, R; Yaber, E; Barrios, O (1992): La estadística multivariada en sanidad vegetal. Editado por el CID-IISV.
96. Furet, J. P; Mercier, J. C; Soulier, S; Gaye, P ; Hue-Delahaie, D ; Vilotte, JC (1990) : Nucleotide sequence of ovine kappa-casein cDNA. *Nucleic Acid Res*earch, 18:5286-70.
97. Gallagher, D. S. Jr; Der, J. N., Womack, J. E. (1994): Chromosome conservation among the advanced pecerans and determination of the primitive Bovid Karitype. *Journal of Heredity*, 85: 204-210.
98. Gaye, P; Hue-Delahaie, D; Mercier. J C; Soulier, S; Vilotte, J. L; Furet, J. P (1987): Complete nucleotide sequence of ovine alpha-lactalbumin mRNA. *Biochemie*, 69:601-608.
99. GENETIX, logiciel sous Windows^{TM} pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
100. Georges, M; Massey, J. M. (1992): Polymorphic DNA markers in Bovidae. Patent WO 92/13102.

101. Georges, M; Nielsen, D; Mackinnon, M; Mishra, A; Okimoto, R; Pasqino, A. T; Sargeant, L. S; Sorensen, A; Steele, M. R.; Zhao, Y; Womack, J. E; Hoeschle, J. (1995): Mapping quantitative trait loci controling milk production in dairy catlle exploiting progeny testing. *Genetics*, 139:907-920.

102. Giovambattista, G; Ripoli, M,V; De Lucas, JC; Mirol, PM; Lirón, JP; Dulout, FN (2000): Male-mediated introgression of *Bos indicus* genes into Argentine and Bolivian Creole cattle breeds. *Animal Genetics, 31:302-305.*

103. Gorodetsky, S. I; Kalendi, A. A (1987): Nucleotide sequence analysis of cow kappa-casein cDNA. *Genetika*, 596-604.

104. Graml, V. R; Buchberger, J; Klostermeyer, H; Prchner, F (1986) : Pleiotropie wirkungen von ß-lactoglobulin und casein genotipen auf milchfett und milchproteinmengen der bayerischen fleckviehs und braunviehs. *Z. Tierzucht. ZuchtBiol*., 103:353-360.

105. Granado, A (1980): Caracterización del cruce F1 (Holstein x Cebú) mediante la utilización de polimorfismo bioquímico genético. *Revta. Cub. Cienc. Vet*. 11(3):273-280.

106. Granado, A; Rodríguez de la Vega; Maria H. Fernández (1974): Polimorfismo de la transferrina y de la hemoglobina en en relación con la producción lechera. *Revta. Cub. Cienc. Vet*. 153-158.

107. Grisat, B; Coppieters, W; Farnir, F; Karim, L; Ford, C; Berzi, P; Cambisano, N; Mni, M; Reid, S; Simon, P; Spelman, R; Georges, M; Snell, R (2002): Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in yhe bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res*, 12(2):222-31.

108. Grodzicker, T.; Williams, J.; Sharp, P.; Sambrook, J. (1974): Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.* 39:439-446.

109. Groenen, M. A. M, Dijkhof, R. J. M; Verstege, A. J. M; Van der Poll, J. J (1993): The complete nucleotide sequences of the bovine α_{S1}-casein gene. *Gene*, 123:187-189.

110. Grosclaude F, Mahe MF, Ribadeau-Dumas B. (1973): Primary structure of alpha casein and of bovine beta casein. Correction. *Eur J Biochem*. 3;40(1):323-4.

111. Grosclaude F, Mahe MF, Voglino GF. (1974): The beta E variant and the phosphorylation code of bovine caseins. *FEBS Lett*. 1;45(1):3-5

112. Grosclaude F., Mahé M. F., Mercier J. C., Bonnemaire J., Teissier J.H. (1976a) : Polymorphisme des lactoprotéines de Bovinés Népalais. II. Polymorphisme des caséines "as-mineures"; le *locus* as2-Cn est-il lié aux *loci* as1-Cn, b-Cn et k-Cn? *Annales de Génétique et de Sélection Animale*, *8*, 481-491.

113. Grosclaude F., Pujolle J., Garnier J., Ribadeau-Dumas B. (1966): Mise en évidence de deux variants supplémentaires des protéines du lait de vache: αs1-CnD et LgD. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*, *6*, 215-222.

114. Grosclaude, F (1988): Le polymorphisme genetique des principales lactoproteines bovines. Relation avec la queantite, la compisition et les aptitudes fromageres du lait. *Inra Prod. Anim*. 1(1):5-17.

115. Grosclaude, F ; Joudrier, P ; Mahé, M. F (1978) : Polimorphisme de la caséine as2 bovine : étroite liasion du locus as2-Cn avec les locis as1-Cn, ß-Cn et K-Cn ; mise en evidence d'une deletion dans le variant as2.Cn D. *Ann Genet. Sel. Anim*. 10 :313-315.

116. Grosclaude, F; Mahé, H. F; Mercier, J. C; Bonnemaire, J; Tiessier, J. H (1976b): Polymorphismes des lactoproteines des bovines nepalais. I. Misse en evidence, chez le yak et caractérisation de deux noveaux variants: beta.lactoblobuline Dyak et caséine α_{s1}E. *Ann. Genet. Sel. Anim.*, *8*:461-466.

117. Gutiérrez, Maritza; Pérez-Beato, O; Morais, M; Milanés, M (1989): Características adaptativas de vacas Criollo de Cuba. Rev. Salud Anim. 11(2):155-160.
118. Guyton, A. A (1980): Tratado de fisiología médica. Interamericana 5ª edición (México) 1159pp.
119. Hall, L; Craig, R. K; Edbrooke, M. R; Campbell, P. N (1982): Comparison of the nucleotide sequence of cloned human an guinea-pig pre.alpha.lactalbumin cDNA with that of chicken pre-lyzosyme cDNA suggest evolution from a common ancestral gene. *Nucleic Acid Res*. 10: 3503-3515.
120. Hall, S.J.G.; Ruane, J. (1993): World Watch List for Domestic Animal Diversity (1st edn), Food and Agriculture Organization of the United Nations.
121. Hall, S.J.G; Bradley, D.G. (1995): Conserving livestock breed biodiversity. *Tree*, 10 (7): 267-270.
122. Hamada, H., Seidman, M., Howard, B.H. y Gorman, C.M.(1984): Enhanced gene expression by the poly(dT-dG).poly(dC-dA) sequence. *Mol. Cell. Biol.* 4,2622-2630
123. Hansen C, Shrestha JN, Parker RJ, Crow GH, McAlpine PJ, Derr JN (2002): Genetic diversity among Canadienne, Brown Swiss, Holstein, and Jersey cattle of Canada based on 15 bovine microsatellite markers. *Genome,* 45(5):897-904.
124. Hayes, H. C; Petit, E. J. (1993): Mapping of the α-lactoglobulin gene and of an immunoglobulin M haevy chain-like sequence to homologous cattle, sheep and goat chromosomes. *Mammalian Genome* 4:207.
125. Heaton MP, Harhay GP, Bennett GL, Stone RT, Grosse WM, Casas E, Keele JW, Smith TP, Chitko-McKown CG, Laegreid WW. (2002): Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mammalian Genome.*;13(5):272-81.
126. Hill, J.P (1993): The relationship between β-lactoglobuline phenotypes and milk composition in New Zealand Dairy Catlle. *J. Dairy Sci.* 76:281-286.
127. Hillel, J; Y, Plotzky; A, Haberfeld; U. Lavi; A. Cahaner; A. J. Jeffreys (1989): DNA fingerprints of poultry. *Animal Genetics*, 20:145-155
128. Hunt G. J, Page R. E Jr (1995): Linkage map of the honeybee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics*. 139(3):1371-82.
129. Hurley, W. L; Schuler, L. A (1987): Molecular cloning and nucleotide sequence of a bovine alpha-lactalbumin cDNA. *Gene*, 61:119-122.
130. Ikonen, T; Ruottinen, O; Erhardt, G; Ojala, M (1996): Allele frequencies of the major milk protein in the Finish Ayrshire and detection of a new k-casein variant. *Anim. Genet*., 27, 179-181.
131. Jador, M; Laloux, J; Burny, A; Kettman, R (1992): Detection of bovine ß-lactoglobulin genomic variants by the polymerase chain reaction method and molecular hybridization. *Animal Geneticcs*, 23:7-79.
132. Jakob, E; Puhan, Z (1992): Technological properties of milk as influenced by genetic polymorphism of milk proteins. A review. *Int. Dairy Journal* 2:157-178.
133. Jamieson, A. C; Vandeyar, M. A; Kang, Y. C; Kinsella, J. E; Batt, C. A (1987): Cloning and nucleotide sequence of the bovine beta-lactoglobulin gene. *Gene*, 61: 85-90.
134. Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Thein, S.L. (1985a): Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature,* 314:76-79.
135. Jeffreys, A.J; J. Hillel; G. Bulfield; D. Morton; V. Wilson; Z. Wong; S. Harris (1987). The implications of hypervariable DNA regions for animal identification. *Animal Genetics*, 18 (Suppl): 141-142.
136. Jolles, P; Loucheux-Lefebvre & hensehen, A (1978): Structural relatedness of k-casein and fibrinogen g-chain. *J. Mol.Evol.* 11:271-277.

137. Jones WK, Yu-Lee LY, Clift SM, Brown TL, Rosen JM. (1985): The rat casein multigene family. Fine structure and evolution of the beta-casein gene. *J. Biol. Chem*. 10; 260(11):7042-50

138. Jordan SA, Humphries P. (1994): Single nucleotide polymorphism in exon 2 of the BCP gene on 7q31-q35. *Hum. Mol. Genet*.; 3(10):1915.

139. Kaminski, S. (1996): Dde I RFLP at the 5' region of bovine kappa-casein gene. *Journal of Applied Genetics*, *37*(2), 173-178.

140. Kantanen, J; Olsaker, I; Adalsteinsson, S; Sanderberg, K; Eythorsdottir, E; Pirhonen, K; Holm, L. E (1999): Temporal changes in genetic variation of north European cattle breeds. *Animal Genetics 30(1):16-27.*

141. Kantanen, J; Olsaker, I; Holm, L. E; Lien, S; Vikki, J; Brusgaard; Eythorsdottir, E; Danell, B; Adalsteinsson, S (2000): Genetic diversity and population structure of 20 North European Catle Breds. J. Heredity, 91(6):446-457.

142. Kashi, Y., King, D. y Soller, M. (1997): Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *TIG* , **13**, 74-78.

143. Kaukinen J, Varvio SL. (1993). Eight polymorphic bovine microsatellites. *Animal Genetics* 24:148.

144. Kehrli, M.E. Jr; Shuster, D. Dietz, E.; M.; Ackermann, M. R.; Gilbert, R.; Pohlenz, J. (1992): Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) among cattle: molecular biology, immunology and clinical phenotypes. *XXIII International Conference on Animal genetic. Interlaken*:44.

145. Kemp, S.J., Mishida, O., Wambugu, J., Rink, A., Longeri, M.L., Ma, R.Z., Da, Y., Lewin, H.A., Barendse, W. y Teale, A.J. (1995): A panel of polymorphic bovine, ovine, and caprine microsatellite markers. *Animal Genetics*, 26: 299-306.

146. Kenelly J. J; Glim, D.R; Ozimek, L (2000): Milk composition in the cow. Disponible online en: http//www.ansci.cornell.edu/tmplobs/doc173.pdf

147. Kidd, K. K; Stone, W. H; Crimella, C; Carenzi, M; Casati, M; Rognoni, G (1980): Immunogenetic and population genetic analyses of Iberian cattle. *Anim Blood Groups Biochem Genet*., 11(1):21-38.

148. Kiddy C.A., Thompson M.P., Johnston J.O., Pepper L. (1963): Genetic control of αs and β-casein. *Journal of Dairy Science*, 46, 626-627.

149. Kim, K. S; Tanabe, Y; Park; C. K; Ha, J. H (2001): Genetic variability in East Asian dogs using microsatellite loci análisis. *J. Hered*., 92:398-403.

150. Klauzinska, M; Siadkowska, E; Groshowska, R; Zwierzchowski, L; Zurkowski, M (2001): Polymorphism of molecular-genetic systems in the Polish red cattle. *Tsitol. Genet*. 35(1):58-60.

151. Koczan, D; Hobon, G.; Seyfert, H. M. (1991): Genomic organization of the bovine α_{s1}-casein gene. *Nucl. Acid Res*. 19:5 591-5596.

152. Koreth, J.; O´Leary, J. J.; McGee, J. O´D. (1996): Microsatellite and genomic analysis. Review article. *J. of Pathology* 178:239-48

153. Kumagai, I.; Tamaki, E; Kakinuma, S; Miura, K. I (1987): Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding pre-alpha-lactoglobulin. *Biochemie*, 101:511-517.

154. Lange, K.; Boenhke, M. (1982). How many polymorphic genes will it take to span the human genome? *Am. J. Hum. Genet*, 34: 842-845.

155. Larsen B., Thymann M. (1966): Studies on milk protein polymorphism in Danish cattle and the interaction of the controlling genes. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *7*, 189-205.

156. Larsen N. S; Nielsen, V. H (1992): Evaluation of a single strand conformational polymorphism (SSCP) with the porcine growth hormone gene. *XXIII International Conference on Animal Genetic. Interlaken, Suiza, p.68.*

157. Leveziel, H; Metenier, L; Guerin, G; Cullen, P; Provot, C; Bertaud, M; Mercier, J.C (1991): Restriction fragment length polymorfphism of aovine casein genes: close linkage between the a_{s1}-; a_{s2}-; ß and ?-casein loci. *Animal genetics*, 22:1-10.

158. Levèziel, H; Rodellar, C; Leroux, C; Pepin, L; Grohs, C; Vaiman, D; Mahé, M. H; Martin, P; Grosclaude, F. (1994): A microsatellite within the bovine κ-casein gene reveals a polymorphism correlating strongly with polymorphisms previously describes at the protein as well as the DNA level. *Anim. Genetics*, 25:223-228.

159. Levèziel; JP, Fuiel, H; Metehnier, L; Mahe, M. F; Choplain, J; Furei, J. P; Paboeuf, G; Mercier, J. C; Grosclaude, F. (1988): Identification of the two common alleles of the bovine kappa-casein locus by the RFLP technique, using enzyme HindIII. *Gènètique, Selection and Evolution*, 20:247-254.

160. Lien, S; Kaminski, S; Alestrom, P; Rogne, S (1993): A simple and powerful method for linkage analysis by amplification of DNA from single sperm cell. *Genomics*, 16(1):41-44.

161. Lien, S; P, Alestrom; H, Klungland; S, Rogne (1992): Detection of multiple β-casein (CASB) alleles by amplification created restriction sites. *Animal Genetics*, 23:333-338.

162. Lien, S; Rogne, S (1993): Bovine casein haplotypes: numbers, frequencies and applicability as genetic markers. *Anim Genet.* , 24:373-376.

163. Lindblad-Toh, K; Winchester, E; Daly, MJ; Wang, DG; Hirschhorrn, JN, *et al.*, (2000): Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphism in mouse. *Nat. Genet*. 24: 381-386.

164. Lindersson, M; A, Lundín; L. Andersson (1995): Genotyping bovine milk proteins using allele discrimination by primer length and automated DNA sizing technology. *Anim. Genetics*. 26:67-72.

165. Litt, M; Luty, J.A (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44: 397-401.

166. Litwinczuk, Z; Król, J (2002): Polymorphism of main milk proteins in beef cattle maintained in East-Central Poland. *Animal Science Papers and Report*, Vol 20 (suppl. 1):33-40.

167. Loftus, R. T; MacHugh, D. E; Ngere, O. L; Balain, D. S; Badi, A. M; Bradley, D. G; Cunningham, E. P (1994): Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. Anim. Genet., 25:365-271.

168. López, D (1998): Cruzamientos en Cuba: Experiencias y perspectivas. Disponible online en: http://www.alpa.org.ve/publicac/criollo/CapIV.pdf.

169. Luikart, G; Allendorf, F. W; Cornuet, J. M; Sherwin, W. B (1998): Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J. Heredity*, 89:238-247.

170. Lundén, A; Lindersson, M (1998): α-lactoalbumin polymorphism in relation to milk lactose. Proccedings of the 8^{th} World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Vol 25, 47-50.

171. Lundén, A; Nilson, M; Janson, L (1997): Marked effect of beta-lactoglobulin polymorphism on the retio of casein to total protein milk. *J. Dayri Sci.,* 80(11):2996-3005.

172. MacHugh, D.E (1996): Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias, Universidad de Dubblin, Irlanda

173. MacHugh, D.E; Loftus, R.T; Bradley, D.G; Sharp, P.M; Cunningham, P (1994): Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 22; 256(1345):25-31.

174. MacHugh, DE; Shriver, MD; Loftus, RT; Cunninham, P; Bradley, DG (1997): Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus and Bos indicus*). *Genetics 146:1071-1086.*

175. MacKinlay A.G., Wake R.G. (1965): Fractionation of S-Carboxymethyl-k-casein and characterization of the components. *Biochimica et Biophysica Acta, 104*, 167-180.

176. Mahé, M. F; Miranda, G; Queval, R; Bado, A; Zafindrajoana, P : Groscalude, F (1999) : Genetic polymorphism of milk proteins in African *Bos taurus* and *Bos indicus* populations. Characterization of variants α_{s1}-Cn H and k-Cn J. *Genetics, Selection and Evolution*, 31:239-53.

177. Malik, S; Sidhu, N. S; Kumar, S; Kumar, A; Rani, R (1997): Kappa-casein alleles in Zebu and cross-bred (1/2 Friesian, ¼ Jersey, ¼ Hariana) cattle form India using polymerase chain reaction and sequence-specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP). *Genet. Anal.*, 14(2):61-3.

178. Manson W, Carolan T, Annan WD. (1977): Bovine alpha s_0 casein; a phosphorylated homologue of alpha s_1 casein. *Eur. J. Biochem.*; 78(2):411-7.

179. Mao, F. C; R. D. Bremel y M. R.Dentine (1991): Serum concentrations of the milk proteins α-lactalbumin and β-lactoglobulin in pregnancy and lactation: correlations with milk and fat yields in dairy catlle. *J. Dairy Sci* 74:2952-2958.

180. Mariani P. (1983): Sulla presenza di una terza k-caseina nel latte di vacche di razza Bruna. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 34, 174-181.

181. Marletta D., Rando A., Senese C., Mariani P., D'Urso G. (1996): Identificazione dell'allele quantitativo a s1-Cn G in bovini di razza Modicana. *Proceedings Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, Perugia, Italy, *50*, 461-462.

182. Marlund, S; H, Ellegren; S, Erisson; K, Sandberger; L, Andersson (1994); Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics*, 25:19-23.

183. Marskovtsova, L; Marjoram, P; Tavare, S (2000): The age of a unique event polymorphism. Genetics, 156:401-409.

184. Martin, M. A (2000): Agricultural Biotechnology: What's all the fuss about? Purdue Agricultural Economics Reports, March, 2000. Disponible online: http://www.agcom.purdue.edu/extensio/Paer/paer0300.pdf.

185. Martin, P; Groscalude, F (1993): Improvement of milk protein quality by gene technology. *Livest. Prod. Sci.* 35:95-115.

186. Martin, P; Szymanowska, M; Zwierzchowski, Leroux, C (2002): The impact of genetic polymorphism on the protein composition of ruminant milks. *Reprod. Nutr. Dev*. 42: 433-459.

187. Martin-Burriel, I (1997): Detección de marcadores de DNA en la especie bovina para estudios de cartografía y biodiversidad. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

188. Martin-Burriel, I; García-Muro, E; Reta, M; Rodellar, C; Zaragoza, P (2003): Genetic variability and population relationships of endangered Spanish cattle breeds. *J. Animal Sci*, (en prensa).

189. Martin-Burriel, I; García-Muro, E; Zaragoza, P (1999): Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites. *Animal Genetics, 30:177-182.*

190. Marzali, S. A; Ng-Kwai-Hang,, K. F (1986): Relationships between milk protein polymorphism and cheese yielding capacity. *J. Dairy Sci*., 69:1193-1201.

191. McLean DM, Graham ER, Ponzoni RW, McKenzie HA. (1984): Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J Dairy Res.*; 51(4):531-46.

192. Medrano, J. F. (1992): Mejoramiento de la calidad de la leche. *Mundo ganadero* 3(12):25-35.

193. Medrano, J. F; Sharrow, L (1991): Genotyping of bovine β-casein loci by restriction site modification of polymerase chain reaction (PCR) amplified genomic DNA. *J. Dayri Sci.*, 74 (suppl), 282.
194. Medrano, JF; Aguilar-Córdova, E. (1990): Polymerase chain reaction amplification of bovine βLg genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Animal Biotechnology*, 1(1):73-77
195. Menéndez-Buxadera A.; Planas, T. (1996): El comportamiento del ganado criollo en Cuba. MINAGRI-CIMA: Rencontres caraibes recherche agronomique developpement rural utilization des populations bovines locales pour la production de viande dans la caribe, 3-6 Dec 1996, Pointe a Poitr, Guadalupe
196. Mercier J. C., Grosclaude F. (1993) : Génétique moléculaire des protéines du lait et de leurs gènes. In Biologie de la lactation, INRA Éditions, Versailles, France, 319-347.
197. Mercier, J. C; Brignon, G; Ribadeau-Dumas, B. (1973) : Structure primarie de la caséine kB bovine. Sequence complete. Eur. J. Biochem., 23 :41.
198. Mercier, J. C; Chobert, J. M (1976): Comparative study of the amino acid sequences of the caseinomacropeptides from seven species. *Fed. Eur. Biol. Soc. Lett.* 72:208.
199. Mercier, J. C; Groscalude, F.; Martin, P (1991): La caseine K et la famille multigenique des trois caseines "sensibles au calcium" polymorphisme, biosynthese y evolution. *SFG* 7, Nº 3, I-VIII.
200. Mercier, J. C; Grosclaude, F; Ribadeau-Dumas, B. (1971) : Primary structure of bovine s1 casein. Complete sequence. *Eur J Biochem*. 11;23(1):41-51.
201. Mercier, J. C; Vilotte, J. L. , Provot, C (1990): Structure and function of milk protein genes. In: H. Gelderman (ed): *Genome analysis in domestic animals*. VCH, Weinhein Germany.
202. Mercier, J.C y J. L. Vilotte (1993): Structure and function of milk protein genes. *J. Dairy Sci*. 76:3079-3098.
203. Meyer, H. (1966): Zum Polymorphismus der β-laktoglobuline in deutschen rinderrassen. *Zuchthygiene*, *1*(2), 49-56.
204. Michalak W. (1969): [Hereditary polymorphism of milk proteins in some breeds of cattle raised in Poland. II.]. "Biuletyn Zaktadu Hodowli Doswiadczalnej *Zwierzat. Pol. Akad. Nauk, Warsaw*", *15*, 89-111.
205. Minch, E (1997): MICROSAT 1.5b, Stanford, CA: Stanford University.
206. Miranda G., Anglade P., Mahé M.F., Erhardt G. (1993): Biochemical characterization of the bovine genetic k-casein C and E variants. *"Animal Genetics", 24*, 27-31.
207. Moazami-Goudarzi K, Laloe D, Furet JP, Grosclaude F. (1997): Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Anim. Genet*., 28(5):338-45
208. Mohr U, Koczan D, Linder D, Hobom G, Erhardt G. (1994) : A single point mutation results in A allele-specific exon skipping in the bovine alpha s1-casein mRNA. *Gene*. 10;143 (2):187-92.
209. Mommens G.W., Coppieters A. et al. (1994): Dinucleotide repeat polymorphism at the bovine MM12E6 and MM8D3 loci. *Animal Genetics* 25:368.
210. Moore, S. S; Byrne, K. (1993): Dinucleotide polymorphism at the bovine calmodulin independent adenylcyclase locus. *Animal Genetics* 24:150.
211. Moore, S. S; Byrne, K; Berger, K.T; Barendse, W; McCarthy, F; Womack, J.E; Hetzel, D.J. (1994): Characterisation of 65 bovine microsatellites. *Mammalian Genome* 5:84-90.
212. Moran, C (1993): Microsatellite repeats in pigs (*Sus domesticus*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes. *J. Heredity*, 84:274-280.

213. Moyzis, R. K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L.,Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L. y Wu, J.R.(1988): A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG)n present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**: 6622-6626.

214. Mukhopadhyaya, PN; Mehta, HH; Rathod, RN (2000): A method for the simulation of normal, carrier and affected controls for PCR-RFLP screening of a genetic disease in dairy cattle. *Mol. Cell. Probes,* 14(6):381-4.

215. Mullis, K.; Faloona, F. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 55:335-350.

216. Nakhasi HL, Grantham FH, Gullino, PM. (1984): Expression of kappa-casein in normal and neoplastic rat mammary gland is under the control of prolactin. *J. Biol. Chem.* 10;259(23):14894-8.

217. Nei M, Tajima F, Tateno Y. (1983): Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J Mol Evol.*; 19(2):153-70.

218. Nei, M (1987): Molecular evolutionary genetics, Columbia University Press, New York.

219. Nei, M; Chakraboty, R; Fuerst, P. A (1976): Infinite allele model wih varying mutation rate. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.,* 73:4164-4168.

220. Nei, M; Tajima, F; Tateno, Y (1983): Accuracy of estimated distance from a small trees from molecular data. *J. Mol. Evol.*, 19:153-170.

221. Ng-Kwai-Hang K. F, Hayes J. F, Moxley J. E, Monardes H. G. (1984): Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle. *J Dairy Sci.*; 67(4):835-40.

222. Ng-Kwai-Hang KF, Zadworny D, Hayes JF, Kuhnlein U. (1991): Identification of kappa-casein genotype in Holstein sires: a comparison between analysis of milk samples from daughters and direct analysis of semen samples from sires by polymerase chain reaction. *J Dairy Sci.;* 74(8):2410-5.

223. Ng-Kwai-Hang, K. F; Monardes, A. G; Hayes, J. F (1990): Association between genetic polymorphism of milk protein and production traist during three lactations. *J. Dayri Sci.*, 73:3414-3420.

224. Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J. F; Moxley, J. E; Monardes, H. G. (1987): Variation in milk protein concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors. *J. Dairy Sci.* 70:563-570.

225. Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J. F; Moxley, J. E; Monardes, H. G. (1986): Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constitutents in Holstein Friesian. *J. Dairy Sci.* 69:22-26

226. Norin, P.A., Moore, J.J., Chakraborty, R., Jin, L., Goodall, J. y Woodruff, D.S. (1994): Kind selection, social structure, gene flow, and the evolution of chimpanzees. *Science*, 265: 1193-1201.

227. O'Brien, S.J. (1994): A role for a molecular genetics in biological conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5748-5755.

228. O'Brien, S.J., Roelke, M.E., Marker, L., Newman, A., Winkler, C.A., Meltzer, D., Colly, L., Evermann, J.F., Bush, M. y Wildt, D.E . (1985): Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science*, 227: 1428-34

229. Okimoto, R; Dogson, J. B (1996): Improved PCR amplification of multiple specific alleles (PAMSA) using internally mismatched primers. *Bio Techniques*, 21:20-26.

230. Orita, M., Imahara, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Seyika, T. (1989): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2766-2770.

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

232. Osta, R; Marcos, S; Martin, I; García-Muro, E; Zaragoza, P. (1995): Caracterización genética de proteínas lácteas en ganado vacuno mediante análisis de DNA. VI Jornadas sobre producción animal. Vol. Extra, N°16, Tomo I.

233. Osta, R; García-Muro, E.; Zaragoza, P.; Rodellar, C.; Zarazaga, I. (1993): Milk protein genotyping in bovine embryos using PCR. 9na Reunion AETE-Lyon, 10-11, Septiembre.

234. Ota, T (1993): DISPAN, genetic distance and phylogenetic analysis. University Park, PA: molecular data. *J. Mol. Evol.*, 19:153-170.

235. Papiz, M. Z; Sawyer, L; Eliopolus, E. E; North, A.C.T; Findlay, J. B. C; Sivaprasadarao, R; Jones, T. A; Newcomer, M. E; Kraulis, P. J (1986): The structure of beta-lactoglobulin and its similarity toplasma retinol-binding protein. *Nature*, 324:383-385.

236. Parejo, JC; Padilla, JA; Rabasco, A; Sansinforiano, ME; Martinez-Trancon, M (2002): population structure in the endangered Blanca Cacerena bovine breed demostrated by RAPD analysis.

237. Penny, D; Hendy, M. D; Steel, M. A (1992): Progress with methods for constructing evolutionary trees. *Tree,* 7: 73-79.

238. Pépin, L; Amigues, Y; Lépingle, A; Berthier, LJ; Bensaid, A; Vaiman, D (1995): Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), capra hircus (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity 74:53-61.*

239. Pérez-Beato, O; Fernández, Maria H (1981): Distancia genética y heterocigosis en ganado tropical. Reporte preliminar. *Rev. Salud Anim*. 3(2): 161-168.

240. Pérez-Beato, O; Granado, A (1982): El alelo α-La^A como marcador genético en el cruce Cebú Cubano- Holstein Friesian. *Rev. Salud Animal*, 4(1):145-148.

241. Permiakov, S.E; Uversky, V.N; Veprintsev, C.B; Cherskaya, A.M; Brooks, C.L; Permyakoz, E.A; Berliner, L.J. (2001): Mutating aspartater in the calcium-binding site of alpha-lactalbumin: effects on the protein stability and cation binding. *Protein End* 14(10):785-89.

242. Peterson, R.F; Kopfler, F.C (1966): Detection of new types of b-Cn by polyacrilamide electrophoresis at acid pH: a proposed nomencalture. *Biochem. Biophys. Res. Com.,* 322:388-390.

243. Petrushko S.A. (1970): Polymorphism of bovine $\alpha s1$-caseins and some aspects of its use in selection. *Voprosy Genetiki i Selektsii* 147-154.

244. Piironen, T; Ojala, M; Niini, T; Syväoja, E. L; Setälä, J (1992): Effects of milk protein genetic variants and lactation stage on renneting properties of bovine milk. 43rd *Annual Meeting of the European Association of Animal Prodution, Madrid, Abstacts*. Vol.2:46-7.

245. Pinder S.J, Perry B.N, Skidmore C.J, Savva D (1991): Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of the polymerase chain reaction. *Anim Genet*. 1991; 22(1):11-20.

246. Piry, S; Luikart, G; Cornuet, J. M (1999): BOTTLENECK: A program for detecting recent effective population size reductions from allele frequency data. Copyright © 1997-1998, INRA, URLB, Laboratoire de Modélisation et Biologie Evolutive, All rights reserved.

247. Prada, N (1983): Programa nacional de mejoramiento genético vacuno. *Revista ACPA* 3(2):20.

248. Préaux, G; Braunitzer, G; Schrank, B; Stangl, A. (1979): The aminoacid sequence of goat b-lactoglobulin. *Hoppe-Seyler's Zeitung für Phisiologie und Chemie*, *360*, 1595

249. Prinzenberg EM, Anglade P, Ribadeau-Dumas B, Erhardt G. (1998): Biochemical characterization of bovine alpha s1-casein F and genotyping with sequence-specific primers. *J Dairy Res.* 65(2):223-31.

250. Prinzenberg EM, Hiendleder S, Erhardt G. (1997): A trinucleotide repeat polymorphism is present in bovine CSN1S1. *Anim Genet*.;28(5):379-80

251. Prinzenberg, EM; Krause, I; Erhardt, G (1999): SSCP analysis at the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, A1). *Anim. Biotechnol.* 10(1-2):49-62.

252. Provot C, Persuy MA, Mercier JC. (1995) : Complete sequence of the ovine beta-casein-encoding gene and interspecies comparison. *Gene*. 10; 154(2):259-63.

253. Proyecto MoDAD, FAO. Disponible online en: http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html

254. Rahali, V; Menard, J. L (1991): Influence des variants génétiques de la ß-lactoglobuline et la ?-caseine sur la composition du lait et son aptitude fromagere. *Le Lait*, 71 :275-297.

255. Rando A., Mariani P., Fiorella A., Di Gregorio P., Ramunno L., Masina P. (1995): Un allele quantitativo della caseina αs1 di bovino. *Proceedings Associazione Scientifica di Produzione Animale*, Grado, Italy, *11*, 175-176.

256. Rando A., Ramunno L., Di Gregorio P., Davoli R., Masina P. (1992): A rare insertion in the bovine αs1-casein gene. *Animal Genetics*, *23* (Suppl.1), 55 (abstr.).

257. Rando A., Ramunno L., Di Gregorio P., Fiorella A., Davoli R., Masina P. (1993): Localizzazione di siti polimorfi nella regione di DNA che contiene il gene della caseina as1 di bovino. *Proceedings Associazione Scientifica di Produzione Animale*, Bologna, Italy, *10*, 617-620.

258. Rando, A; Di Gregorio, P; Ramuno, L; Mariani, P; Fiorella, A; Senese, C; Marletta, D; Masina, P (1998): Characterization of the CSN1A^{G} allele of the bovine α_{s1}-casein locus by the insertion of a relict of a long interspersed element. *J. Dairy Sci.*, 81:1735-1742.

259. Raymond M, Rousset F, 1995. GENEPOP (ver. 1.2): A population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.

260. Ribadeau Dumas B, Brignon G, Grosclaude F, Mercier JC. (1972): Primary structure of bovine beta casein. Complete sequence. *Eur J Biochem.*; 25(3):505-14.

261. Rijnkels M, Wheeler DA, de Boer HA, Pieper FR. (1997a): Structure and expression of the mouse casein gene locus.Mamm Genome. 8(1):9-15.

262. Rijnkels, M; P. M. Koriman; H. A. de Boer y F. K. Peeper (1997b): Organization of the bovine casein gene locus. *Mamm. Genome*, 8:148-152.

263. Rincon G, D'Angelo M, Gagliardi R, Kelly L, Llambi S, Postiglioni A. (2000): Genomic polymorphism in Uruguayan Creole cattle using RAPD and microsatellite markers. *Res Vet Sci*. 69(2):171-4.

264. Ripoli, M V; Giovambattista, G; De Luca, J. C ; Labarta, F ; Echenique, J; Casas, S ; Carrizo, E ; Sanchez Mera, M; Duluot, F. N (1999) : Formación de un plantel base de ganado bovino criollo argentino para la producción lechera. Efecto sobre las frecuencias génicas de los loci de la kappa caseína, alfa s_1 caseína y prolactina. Arch Zootec. 48(181):101-106.

265. Robiatille, G; Petitcelrc, D (2000): Expression polymorphism of kappa-casein gene in Holstein cows. *J. Dairy Res.* 67(1):107-11.

266. Rodellar, C; R. Osta; H. Levèziel; C. Elduque; I. Zarazaga y P. Zaragoza (1992): Identificación de las variantes genéticas de caseína mediante la técnica de PCR/RFLP's en razas bovinas españolas. *Jornadas Feria Internacional Ganadera. Zafra, España*.

267. Rodriguez-Zas, S. L; Southey, B.R; Heyen, D .W, Lewin, H.A. (2002): Detection of quantitative trait loci influencing dairy traits using a model for longitudinal data. *J Dairy Sci*., 85(10):2681-91.
268. Ronda, R; Pérez-Beato, O; Granado, A; Fernández, Maria H (1981): Variabilidad y distancias genéticas de razas y cruces bovinos en Cuba. *Rev. Salud Anim*. 3(3):129-141.
269. Rosenberg, S.M., Longerich, S., Gee, P. y Harris, R.S. (1994): Adaptative mutation by deletions in small monomucleotide repeats. *Science*, **265**: 405-407.
270. Russell, N. D.; Rios, J; Erosa. G; Remmenga, M. D; Hawkings, D. E (2000): Genetic differenciation among geographically isolated populations of Criollo cattle and their divergence from other Bos taurus breeds. *J. Anim. Sci.* 78:2314-2322.
271. Russo V., Mariani P. (1978): Polimorfismo delle proteine del latte e relazioni tra varianti genetiche e caratteristiche di interesse zootecnico, tecnologico e caseario. *Rivista di Zootecnia e Veterinaria*, *6*(5, 6), 289-304, 365-379.
272. Rzhetsky, A; Nei, M. (1992): Statistical properties of the ordinary least-squares, generalized least-squares, and minimum-evolution methods of phylogenetic inference.
273. Saiki, R. K., D.H. Gelfand, S. Stoeffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis y H. H. Erlich (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science,* 239:487-491.
274. Saiki, R. K; Schare, S; F. Faloona; K. Mullis; G. Horn; H. A. Erlich y N. Arneheim (1985): Enzymatic amplification of β-globin genomic and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350-1354.
275. Sánchez, A; Betancourt, A ; Gutiérrez, C (19773) : Cromosomas del ganado Criollo. Congreso Panamericano de Veterinaria y Zoonosis. Colombia.
276. Sartore, G y I. Stasio (1984): Prospects for the selection of dairy cattle on the basis of frequencies of specific genetic variants. *Industria del latte*, 20:55-56.
277. Savva, D; Pinder S. J; Skidmore, C. J (1990): Genotyping the ß-casein locus in cattle using PCR. Proccedings of the 4th World Congress on genetics applied to Livestock Production, Edinburg, Julio, 245-247.
278. Schlieben S, Erhardt G, Senft, B. (1991): Genotyping of bovine kappa-casein (kappa-CNA, kappa-CNB, kappa-CNC, kappa-CNE) following DNA sequence amplification and direct sequencing of kappa-CNE PCR product. *Anim Genet*.; 22(4):333-42.
279. Schnabel RD, Ward TJ, Derr JN.: (2000): Validation of 15 microsatellites for parentage testing in North American bison, Bison bison and domestic cattle. *Anim Genet*., 31(6):360-6.
280. Seibert B., Erhardt G., Senft B. (1987): Detection of a new k-casein variant in cow's milk. *Animal Genetics*, *18*, 269-272.
281. Seibert, B; Erhardt, G; Senft, B (1985): Procedure simultaneous phenotypnig of genetic variants in cow's milk. *Anim. Blood Grps. And Bioch. Genet*., 16:183-191.
282. Seidel, GE Jr (2003): Economics of selection for sex: the most important trait. *Theriogenology*, 59(2):585-98.
283. Serikawa, T. Kuramoto, T., Hilbert, P. Mori, M.Yamada, J., Dubay, C.J., Lindpainter, K., Ganten, D., Guenet, J-L, Lathrop, G.M. y Beckman, J.S.(1992). Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics,* 131: 701-721.
284. Shuster, D. E; Kehrli, M. E.; Ackermann, M. R.; Gilbert, R. O. (1992): Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein catlle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:9225-29.
285. Smith, C. W; Martin, S. D.; Rothlein, R (1989): Comparative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J. Chin. Invest*. 83:2008-2017.

286. Sneath, P. H. A; Sokal, R. R (1973): Numerical Taxonomy. San Francisco, CA. WH Friedman & Company.
287. Soitou, N; Nei, M (1987): The neighbor-joininig metod: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4:406-425.
288. Solinas Toldo S., Fries R. et al. (1993). Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes. *Mammalian Genome* 4:720-727.
289. Soulier, S; Mercier, J. C; Vilotte, J. L; Anderson, L; Clarck, A. J; Provot, C (1989): The bovine and ovine genomes contain multiple sequences homologous to the a-lactoalbumin-encoding-gene. *Gene*, 83:331-338.
290. Stallings, R.L. (1994). Distribution of Trinucleotide microsatellites in different categories of mamalian genomic sequence: Implications for human genetic diseases. *Genomics,* 21,116-121.
291. Steele, M.R.; Georges, M. (1991). Generation of bovine multisite haplotypes using random cosmid clones. *Genomics*, 10: 889-904.
292. Steffen P., Eggen A. et al. (1993). Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Animal Genetics* 24 121-124.
293. Stewart, A. F; Bonsing, J; Beatti, C. W; Shah, F; Willis, I. M; MacKinlay, A. G (1987): Complete nucleotide sequences of bovine alpha-s2-and beta casein cNDAs: comparison with related sequences in other species. *Mol Biol. Evol.* 4:231-241.
294. Swaisgood, H. E. (1975): Primary sequence of kappa-casein. *J. Dayri Sci.* 45:1.
295. Swofford, D. L; Selander, R. B (1989): BIOSYS-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemila systematics. Release 1.7. Chmpaing, IL, Ilinois Natural History Survey.
296. Takeda, H; Takami, M; Oguni, T; Tsuji, T; Yoneda, K; Sato, H; Ihara, N; Itoh, T; Kata, SR; Womack, JE; Moritomo, Y; Sugimoto, Y; Kunieda, T (2002): Positional cloning of the gene LIMBIN responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism. PNAS, vol 99(16):10549-554. Disponible online en http//www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.15233378899.
297. Tambasco, M. D (1998): Deteção de polimorfismo dos genes de kappa-caseína e beta-lactoglobulina em animais da raça Jersey. Monografia: Universidad Federal de São Carlos, SP.
298. Tammen, I; Klippert, H; Kuczka, A; Treviranus, A; Pohlenz, J; Stober, M; Simon, D; Harlizius, B (1996) *Res. Vet. Sci.* 60(3):218-21.
299. Tejedor, T; Rodellar, C; Zaragoza, P (1986): Análisis de la variabilidad genética en razas bovinas, mediante estudios electroforéticos. *ITEA*, 35:133:255-237.
300. Thieven, U.; Solinas-Toldo, S.; Friedl, R; Masabanda, J; Fries, R; Barendse, W; Simon, D; Harlizius, B. (1997): Polymorphic CA-microsatellites for the integration of the bovine genetic and physical map. *Mammalian Genome* 8:52-55.
301. Thompson, M; Kiddy, C.A (1964): Genetic polymorphism in casein of cow's milk. III. Isolation and properties os as1-caseins A, B and C. *J. Dayri Sci*, 47:633.
302. Threadgill, D.W; Womack, J. E (1990): Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucl. Acid Research*, 18, 6935-6942.
303. Todd , JA. (1992): La carte des microsatellites est arrivee! *Hum Mol Genet.*; 1(9):663-6. Review.
304. Tomiuk, J; Gudbrandtsen, B; Loeschcke, V (1998): Population differentiation through mutation and drift-A comparison of genetic identity measures. *Genetica*, 102/103:545-558.
305. Tomuik, J; Loeschcke, V (1991): A new measure of genetic identity between populations of sexual and asexual species. *Evolution*, 45:1685-1694.
306. Tomuik, J; Loeschcke, V (1995): Genetic identity combining mutation and drift. *Heredity*, 74:607-615.

307. Trieu-Cout, P; Gripon, J. C (1981): Electrofocusing and two-dimensional electrophoresis of bovine caseins. *J. Dayri Res*. 48:303-310.
308. Uffo, Odalys; Martínez, Siomara (2002): Amplificación por PCR de los genes que codifican para la α-lactoalbúmina β-lactoglobulina y la κ-caseína bovinas en una recordista y parte de su descendencia *Rev Salud Animal* (2002) 24(1):22-26.
309. Usha, A. P; Simpson, S. P; Williams, J. L. (1995): Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Anim. Genet*. 26(3):155-61.
310. Vaiman, D.; Mercier, D; Moazami-Goudarzi, K; Eggen, A; Ciampolini, R; Lepingle, A; Velmala, R; Kaukinen, J; Varvio, S. L; Martin, P.; *et al.* (1994). A set of 99 cattle microsatellites: characterisation, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome* 5:288-297.
311. Vaiman, D; Osta, D; Mercier, D; Grohs, C; Leveziel, H. (1992): Characterisation of five new bovine microsatellite repeats. *Animal Genetics* 2:537.
312. Van der Berg, G; Escher, J. T. M; Koning, P. J; Bovenhuis, H (1990): Genetic polymorphism of kappa-casein and ß-lactoglobulin in relation to milk composition and processing properties. *Neth. Milk. Dayri J*., 46:145-168.
313. Van Ee nennaam, A. L; Medrano, J. F (1991): Differences in allelic protein expresión in milk of heterozygous k-casein cows. *J. Dayri Sci*, 74:1491-1496.
314. Velmala RJ; Vilkki HJ; Elo KT; de Koning DJ; Maki-Tanila AV (1999): A search for quantitative trait loci for milk production traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. *Anim Genet*., 30(2):136-43.
315. Vilotte, J. L,; Soulier, S; Mercier, J. C; Gaye, P; Hue-Delahaie, D; Furet, J. P. (1987): Complete nucleotide sequence of bovine α-lactalbumin gene: comparison with its rat counterpart. *Biochimie* 69: 609-620
316. Vilotte, J. L; Soulier, S; Printz, C; Mercier, J. C. (1991): Sequence of the goat α-lactalbumin-encoding gene: comparison with the bovine gene and evidence of related sequences in the goat genome. *Gene (Amst)* 98:271.
317. Vilotte, J. L; Soulier, S. (1992): Isolation and characterization of the mouse α-lactoalbumin-encoding gene: interspecies comparison, tissue- and stage -specific expression. *Gene* 119:287.
318. Vilotte, J.L ; Soulier, S ; Mercier, J. C. (1993): Complete sequence of a bovine alpha-lactalbumin pseudogene: the region homologous to the gene is flanked by two directly repeated LINE sequences. *Genomic*.; 16(2):529-32.
319. Voelker G. R., Bleck G. T., Wheeler M. B. (1997): Single-base polymorphisms within the 5'-flanking region of the bovine a-lactalbumin gene. *Journal of Dairy Science*, 80, 194-197.
320. Voglino, G. E (1972): A new b-casein variant in Piedmon cattle. *Anim Blood Grps. And Biochem. Genet*. 3:61-63.
321. Weber, J. L; May, P. E. (1989): Abundant class of DNA polymorphism which can be typed using the PCR. *Amer. J. Human Genet*. 44:388-396.
322. Weissenbach, J; Gyapay, G; Dib, C. *et al*., (1992): A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*, 359,794-801.
323. Womack, J. E. (1993): The goals and status of the bovine gene map. *J. Dairy Sci*. 76:1199-1203.
324. Zaragoza, P; Rodellar; Osta, R; Elduque, C; Marcos, S; Vázquez; F. J; Romero, A; García, E; Zarazaga, I (1994): Ingeniería genética y Biotecnología: nuevas perspectivas en Veterinaria. Publicaciones del Gobierno de Aragón, Zaragoza, España.
325. Zardowny, D; Kühnlein, U (1990): The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dayri cattle using the polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.*, 80:631-634.

326. Zeleny, R; Bernereuther, A; Schimmel, H;<Pawels, J (2002): Evaluation of PCR-based beef sexing methods. *J. Agric. Food. Chem*, 50(15):4169-75.

327. Zhou, J.F., Zadworny, D., Kuhnlein, U. (1996): Sequence analysis of the β-lactoglobulin locus in Holsteins identifies two new restriction fragments length polymorphisms. *Canadian Journal of Animal Science*, *76*, 299-303.

328. Zsolnai A, Fesus L. (1997): Simultaneous analysis of bovine kappa-casein and BLAD alleles by multiplex PCR followed by parallel digestion with two restriction enzymes. *Anim Genet*.; 27(3):207-9.

Anexo X.1. Datos primarios de la tipificación de las proteínas de la leche

Población Cebú de Cuba

Individuo	CASK	CASB	LGB	CASA1	LAA
Cebu1	, 0102	0101	0102	0303	0101
Cebu2	, 0102	0101	0202	0303	0101
Cebu3	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu4	, 0101	0101	0102	0203	0101
Cebu5	, 0102	0101	0202	0303	0101
Cebu6	, 0202	0101	0202	0303	0101
Cebu7	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu8	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu9	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu10	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu11	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu12	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu13	, 0102	0202	0202	0303	0101
Cebu14	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu15	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu16	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu17	, 0101	0101	0102	0203	0101
Cebu18	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu19	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu20	, 0102	0101	0102	0303	0101
Cebu21	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu22	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu23	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu24	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu25	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu26	, 0102	0101	0202	0303	0101
Cebu27	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu28	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu29	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu30	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu31	, 0101	0102	0202	0303	0101
Cebu32	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu33	, 0101	0101	0102	0203	0101
Cebu34	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu35	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu36	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu37	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu38	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu39	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu40	, 0101	0101	0101	0303	0101
Cebu41	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu42	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu43	, 0102	0102	0202	0303	0101
Cebu44	, 0101	0101	0102	0203	0101
Cebu45	, 0102	0101	0102	0303	0101
Cebu46	, 0101	0101	0102	0303	0101
Cebu47	, 0101	0202	0202	0303	0101
Cebu48	, 0102	0101	0102	0303	0101
Cebu49	, 0101	0101	0202	0303	0101
Cebu50	, 0102	0101	0202	0303	0101

Población Siboney de Cuba

Individuo	CASK	CASB	LGB	CASA1	LAA
Siboney1	, 0101	0202	0202	0202	0101
Siboney2	, 0102	0101	0202	0202	0101
Siboney3	, 0101	0101	0202	0202	0101
Siboney4	, 0101	0202	0102	0203	0101
Siboney5	, 0101	0101	0102	0203	0101
Siboney6	, 0102	0202	0202	0202	0101
Siboney7	, 0102	0202	0202	0203	0101
Siboney8	, 0101	0102	0102	0203	0101
Siboney9	, 0101	0101	0102	0303	0101
Siboney10	, 0101	0101	0102	0202	0101
Siboney11	, 0202	0102	0102	0203	0101
Siboney12	, 0101	0102	0202	0303	0101
Siboney13	, 0101	0102	0202	0203	0101
Siboney14	, 0101	0101	0101	0202	0101
Siboney15	, 0101	0102	0101	0203	0101
Siboney16	, 0102	0101	0101	0203	0101
Siboney17	, 0101	0102	0101	0303	0101
Siboney18	, 0101	0102	0102	0202	0101
Siboney19	, 0102	0102	0202	0203	0101
Siboney20	, 0102	0101	0202	0202	0101
Siboney21	, 0102	0101	0202	0202	0101
Siboney22	, 0102	0101	0202	0202	0101
Siboney23	, 0101	0101	0202	0202	0101
Siboney24	, 0102	0101	0202	0303	0101
Siboney25	, 0102	0101	0101	0203	0101
Siboney26	, 0101	0101	0202	0203	0101
Siboney27	, 0101	0101	0202	0202	0101
Siboney28	, 0101	0102	0202	0202	0101
Siboney29	, 0101	0101	0202	0202	0101
Siboney30	, 0102	0102	0202	0202	0101
Siboney31	, 0101	0102	0202	0203	0101
Siboney32	, 0101	0102	0202	0203	0101
Siboney33	, 0000	0102	0000	0203	0101
Siboney34	, 0202	0101	0000	0303	0101
Siboney35	, 0101	0101	0202	0203	0101
Siboney36	, 0101	0102	0202	0202	0101
Siboney37	, 0101	0102	0202	0203	0101
Siboney38	, 0101	0101	0202	0000	0101
Siboney39	, 0101	0101	0102	0203	0101
Siboney40	, 0101	0101	0202	0202	0101
Siboney41	, 0101	0101	0202	0203	0101
Siboney42	, 0102	0102	0202	0202	0101
Siboney43	, 0102	0102	0000	0202	0101
Siboney44	, 0102	0102	0202	0000	0101
Siboney45	, 0101	0102	0202	0203	0101
Siboney46	, 0102	0101	0102	0203	0101
Siboney47	, 0101	0202	0202	0202	0101
Siboney48	, 0101	0101	0202	0303	0101
Siboney49	, 0101	0102	0202	0203	0101
Siboney50	, 0102	0102	0202	0000	0101

Población Criollo de Cuba

Individuo	CASK	CASB	LGB	CASA1	LAA
Criollo1	, 0102	0101	0102	0203	0101
Criollo2	, 0102	0101	0202	0303	0101
Criollo3	, 0102	0101	0202	0203	0101
Criollo4	, 0102	0101	0102	0202	0101
Criollo5	, 0101	0101	0102	0303	0101
Criollo6	, 0102	0101	0202	0303	0101
Criollo7	, 0102	0101	0102	0203	0101
Criollo8	, 0202	0102	0102	0203	0101
Criollo9	, 0102	0101	0202	0303	0101
Criollo10	, 0101	0101	0202	0303	0101
Criollo11	, 0102	0101	0102	0303	0101
Criollo13	, 0102	0101	0202	0303	0101
Criollo14	, 0101	0101	0102	0203	0101
Criollo15	, 0101	0101	0202	0303	0101
Criollo16	, 0101	0101	0102	0203	0101
Criollo17	, 0102	0102	0202	0203	0101
Criollo18	, 0101	0101	0202	0203	0101
Criollo19	, 0101	0101	0202	0303	0101
Criollo20	, 0102	0101	0202	0303	0101
Criollo21	, 0101	0101	0102	0203	0101
Criollo22	, 0101	0101	0102	0303	0101
Criollo23	, 0101	0101	0102	0203	0101
Criollo24	, 0102	0101	0202	0203	0101
Criollo25	, 0101	0101	0102	0203	0101
Criollo26	, 0101	0101	0202	0303	0101
Criollo27	, 0102	0101	0202	0203	0101
Criollo28	, 0101	0101	0102	0000	0101
Criollo29	, 0102	0102	0202	0303	0101
Criollo30	, 0102	0102	0202	0000	0101
Criollo31	, 0102	0101	0202	0203	0101
Criollo32	, 0101	0101	0101	0203	0101
Criollo33	, 0102	0101	0202	0203	0101
Criollo34	, 0101	0101	0202	0303	0101
Criollo35	, 0101	0101	0101	0202	0101
Criollo36	, 0102	0101	0102	0203	0101
Criollo37	, 0102	0102	0202	0203	0101
Criollo38	, 0101	0101	0101	0202	0101
Criollo39	, 0101	0101	0202	0203	0101
Criollo40	, 0202	0202	0102	0202	0101
Criollo41	, 0102	0101	0101	0203	0101
Criollo42	, 0101	0101	0202	0202	0101
Criollo43	, 0102	0102	0102	0203	0101
Criollo44	, 0102	0102	0102	0303	0101
Criollo45	, 0101	0101	0102	0203	0101
Criollo46	, 0101	0101	0102	0202	0101
Criollo47	, 0101	0101	0102	0202	0101
Criollo48	, 0202	0102	0202	0202	0101
Criollo49	, 0101	0101	0102	0203	0101
Criollo50	, 0102	0101	0202	0203	0101

Anexo X.2. Resultados del análisis del Equilibrio de Hardy-Weinberg
Población Cebú de Cuba

Locus	Clases	Frecuencias Observadas	Frecuencias Esperadas	?²	Grados de libertad	P
CASK						
	AA	39	38.667			
	AB	10	10.667			
	BB	1	0.667			
				0.003	1	0.959
CASB						
	AA	46	44.152			
	AB	2	5.697			
	BB	2	0.152			
				13.837	1	0.000
LGB						
	AA	1	3.030			
	AB	23	18.939			
	BB	26	28.030			
				1.526	1	0.217
CASA1						
	BB	0	0.061			
	BC	4	3.879			
	CC	46	46.061			
				0.000	1	1.000
LAA						
	AA	5	7.879			
	AB	30	24.242			
	BB	15	17.879			
				2.175	1	0.140

Población Siboney de Cuba

Locus	Clases	Frecuencias Observadas	Frecuencias Esperadas	$?^2$	Grados de libertad	P
CASK						
	AA	36	30.959			
	AB	16	16.082			
	BB	2	1.959			
				0.000	1	1.000
CASB						
	AA	24	23.697			
	AB	21	21.606			
	BB	5	4.697			
				0.001	1	0.982
LGB						
	AA	5	1.839			
	AB	9	15.323			
	BB	33	29.839			
				6.302	1	0.012
CASA1						
	BB	20	19.677			
	BC	21	21.645			
	CC	6	5.677			
				0.001	1	0.975
LAA						
	AA	2	7.412			
	AB	32	21.176			
	BB	9	14.412			
				9.962	1	0.002

Población Criollo de Cuba

Locus	Clases	Frecuencias Observadas	Frecuencias Esperadas	$?^2$	Grados de libertad	P
CASK						
	AA	23	24.186			
	AB	23	20.629			
	BB	3	4.186			
				0.301	1	0.583
CASB						
	AA	40	39.464			
	AB	8	9.072			
	BB	1	0.492			
				0.039	1	0.844
LGB						
	AA	4	4.186			
	AB	21	20.629			
	BB	24	24.186			
				0.000	1	1.000
CASA1						
	BB	8	8.387			
	BC	24	23.226			
	CC	15	15.387			
				0.003	1	0.955
LAA						
	AA	7	7.247			
	AB	24	23.505			
	BB	18	18.247			
				0.000	1	1.000

Anexo X.3. Datos primarios de la tipificación de los 30 loci microsatélites Población Cebú de Cuba

	INRA63	INRA005	ETH225	ILSTS005	HEL5	HEL1	INRA035	ETH152	INRA023	ETH10	HEL9	CSSM66
Cebú 1	178184	118126	158158	183189	149151	106108	104104	193193	198210	209213	149165	181187
Cebú 2	184184	118122	144148	183189	149151	106108	102104	193193	208210	209219	151155	181195
Cebú 3	178186	120122	144148	179183	149151	108108	102102	193193	206214	213213	155163	181187
Cebú 4	184186	118120	150158	183189	163165	104108	104128	193193	198198	209213	155157	185187
Cebú 5	184184	118124	148158	179183	149149	102108	102120	193193	206214	209213	153155	199199
Cebú 6	178186	116118	148158	185189	149151	102108	104110	193193	210214	209213	153165	183195
Cebú 7	184184	116120	156158	187189	163165	108108	104104	193193	194210	209209	155165	179195
Cebú 8	184184	116122	144158	185189	165165	106108	104110	193199	212214	213219	155157	179199
Cebú 9	184184	118124	146152	183183	149165	106108	104122	193199	208214	209213	155165	179195
Cebú 10	178184	120122	158158	183185	151151	108108	104124	193193	206214	213213	155165	185199
Cebú 11	178184	116122	156158	183187	151153	104108	104122	193193	210214	213219	151155	185199
Cebú 12	184184	118118	140152	183183	151151	100108	104106	193197	210214	213213	000000	185199
Cebú 13	184184	118118	148158	185185	151151	108108	104104	193193	198214	219219	155165	181187
Cebú 14	178184	120120	142158	183187	151165	100108	104120	193197	000000	209213	155155	185197
Cebú 15	178178	120122	140158	183187	165165	102108	104120	193193	194208	213213	163165	181197
Cebú 16	178178	116120	146158	183187	149149	106108	110120	193193	212214	209213	153161	181181
Cebú 17	182184	116120	154158	179187	149149	104110	102104	193197	194210	213219	149151	181197
Cebú 18	184184	116118	142158	179183	149153	108108	104104	193199	208210	209217	149151	181181
Cebú 19	178184	116122	156158	179187	149149	104110	110124	193193	194210	213213	155155	181197
Cebú 20	178186	118120	148158	179187	153153	102108	104110	193193	210214	209213	153165	179199
Cebú 21	178184	118118	156158	183189	151151	102108	104110	193193	194210	219219	151163	179185
Cebú 22	184184	116120	156158	189189	149153	108108	104120	193195	198214	209219	153163	179185
Cebú 23	184184	116120	142148	189189	151151	108116	110120	195197	214214	209219	000000	185199
Cebú 24	000000	122126	142158	187187	151153	108116	104110	193197	194214	209209	149157	183199
Cebú 25	178184	118120	140158	187187	149153	110112	102124	193193	208210	213219	143151	179195
Cebú 26	184184	116124	156158	187187	151151	108110	104104	193193	196214	209213	149153	179195
Cebú 27	180184	118120	156158	187187	151161	102108	102104	193193	214216	209209	149153	179181
Cebú 28	184186	118118	154158	185187	151151	108112	102104	193193	196214	209209	151163	195199
Cebú 29	184184	118120	142158	187187	151153	108112	104110	193197	196214	209213	159163	187195
Cebú 30	184184	118120	156158	187189	149151	106108	000000	193193	198210	209213	151163	181181
Cebú 31	178184	116118	156158	187189	149149	102108	104110	193197	212214	213219	149151	195199
Cebú 32	178178	118122	156158	187187	153153	102108	110120	193193	196214	209213	149151	181181
Cebú 33	184184	116122	156158	185189	151151	108108	104104	193193	196214	213213	149161	195199
Cebú 34	184184	118122	156158	187189	151151	102108	102104	193193	214214	213219	151161	195197
Cebú 35	184184	116120	156158	187191	153163	108108	102110	193197	196204	209209	149151	179195
Cebú 36	184184	116118	140158	185187	149149	108108	104110	193193	212214	213213	151161	195199
Cebú 37	184184	118120	148158	185191	151151	112112	122122	193197	208214	209209	149151	181181
Cebú 38	184184	118120	140158	187191	149149	102106	102102	193193	204214	213219	143149	181195
Cebú 39	184184	118118	148158	187191	149149	112112	104122	193199	208210	209219	149151	179179
Cebú 40	184184	116118	140158	187191	151153	104108	110120	193197	212214	209219	147149	179181
Cebú 41	176184	116118	156158	187189	151151	102108	104104	193197	204210	213219	143151	183185
Cebú 42	184184	122124	148158	183185	153153	106108	108110	193193	214216	209219	149151	183183
Cebú 43	184184	116118	148158	183185	149151	102108	110110	193193	214214	209213	149151	179199
Cebú 44	182184	118120	148158	187187	151153	106108	104104	193193	212214	209213	147149	181183
Cebú 45	184184	116118	158158	187187	153153	108112	120120	193197	198214	209219	151163	181197
Cebú 46	178184	116118	140158	183187	151151	108108	110120	193193	208214	209209	151161	179183
Cebú 47	184184	118124	156158	183189	149163	108108	102104	193193	194216	209209	143151	179197

	INRA63	INRA005	ETH225	ILSTS005	HEL5	HEL1	INRA035	ETH152	INRA023	ETH10	HEL9	CSSM66
Cebú 48	184184	118122	156158	187191	151151	106108	110110	193193	198210	213219	151161	181183
Cebú 49	182184	116118	148156	187187	153153	108108	104104	193197	214214	213213	159161	179185
Cebú 50	178184	116122	148158	187187	151153	108112	104104	193193	196214	219219	151151	181183

	INRA032	ETH3	BM2113	BM1824	HEL13	INRA37	BM1818	ILSTS006	MM12E6	CSRM60	ETH185	HAUT24
Cebú 1	180182	162182	129129	135141	185185	119123	262264	293297	99121	95095	214226	122124
Cebú 2	182192	178180	115125	129129	183185	119123	258264	295299	99115	93095	232236	126126
Cebú 3	180192	158186	115125	129135	185185	125127	260264	295297	99115	95095	226236	124124
Cebú 4	180182	158186	97101	135141	183185	125127	258266	293297	99115	95113	226236	128128
Cebú 5	180180	178178	115125	139139	183185	115115	258262	293297	121131	93095	000000	120124
Cebú 6	180182	162178	101115	133141	185187	115127	258262	287295	123131	93095	226228	120120
Cebú 7	180182	162178	115125	129135	185187	115127	260264	293295	131131	95095	226230	120120
Cebú 8	180182	178180	115115	129141	187187	115125	258260	293295	121123	95107	226228	120120
Cebú 9	180188	162186	101117	135141	185187	115125	258264	293295	123123	95095	228236	122122
Cebú 10	180192	162186	115117	139141	185187	119127	260264	289297	121131	95103	222238	114114
Cebú 11	180182	162178	115117	133141	183185	115115	258264	289289	99107	93095	214214	126126
Cebú 12	182182	176184	115117	135139	187197	115119	258264	289293	131131	95095	230230	000000
Cebú 13	180182	162178	115117	137139	183193	121123	262264	293295	125131	95097	228236	126126
Cebú 14	180180	000000	115117	129141	187187	119123	258270	295297	125131	95095	230230	116120
Cebú 15	180182	178184	113115	129141	185167	119127	262270	295297	99131	95107	232232	120124
Cebú 16	182182	162178	101117	129135	183193	123127	258270	295299	99123	95107	214228	120124
Cebú 17	180180	162182	101117	129133	183187	123123	258262	287295	117123	95107	228234	122126
Cebú 18	180182	162178	115117	135141	183187	123129	258262	289295	99123	95095	232236	124126
Cebú 19	180180	178178	115129	129133	185187	123123	258262	287295	117123	95107	228232	120126
Cebú 20	180192	178178	115115	129139	185187	115127	258262	285289	121127	95095	226228	120120
Cebú 21	180188	162182	101115	129141	183187	123127	258264	287289	115121	95095	214230	120126
Cebú 22	180180	162178	115115	129135	187187	115123	262268	293299	121131	95107	226238	126126
Cebú 23	180180	176178	113115	133135	185187	123123	258262	293299	99115	95107	226228	118118
Cebú 24	180182	184198	113115	129133	183183	119129	262264	289289	99111	95095	226228	120120
Cebú 25	180182	176178	113115	129141	183183	123123	264264	289299	99117	95095	222222	126126
Cebú 26	180180	178182	115129	133135	185187	123125	260262	283295	99115	95097	226234	120126
Cebú 27	178182	186186	115117	133135	183187	119123	262264	293297	117123	95097	214226	120126
Cebú 28	180188	178186	101125	135141	183187	115123	262264	293297	121121	95097	214230	124126
Cebú 29	182192	162178	113117	129135	183187	119127	260266	293297	107123	95095	226226	120126
Cebú 30	180182	176184	115119	129141	187187	123125	258262	293297	000000	95095	226226	124124
Cebú 31	178180	178186	115115	135141	183187	115123	258264	295299	99121	95095	214214	120120
Cebú 32	182192	178180	115117	135141	187193	000000	260264	295295	99115	95097	226230	000000
Cebú 33	180182	178186	101115	135139	000000	115123	258260	293297	121123	95095	214226	120120
Cebú 34	178180	162180	115117	135139	183187	115119	262264	293297	99123	95097	214234	122124
Cebú 35	180182	176186	115117	135139	183183	123123	262268	293297	99131	95103	226234	120120
Cebú 36	000000	178198	115117	129135	185185	123129	260262	295297	99123	95095	234236	120122
Cebú 37	180180	178182	117117	129141	185191	123129	258260	295299	123123	95095	000000	126126
Cebú 38	180182	162186	101115	127139	183191	115123	260264	295295	121123	95095	222226	122122
Cebú 39	180182	162178	115115	135139	185187	123123	258262	293293	99131	95107	226230	126126
Cebú 40	178180	162180	115125	129129	183183	123123	258262	293295	117117	95095	214234	120124
Cebú 41	178182	162178	101115	129135	183185	123127	260262	293297	115123	97107	228234	118126
Cebú 42	180182	162186	115117	139139	183185	115123	262264	295295	131131	103103	232234	120126
Cebú 43	180192	180180	101117	133135	185187	115115	262264	295297	121133	95095	226230	126126
Cebú 44	178180	180180	101115	129135	187187	115115	258264	295295	99115	95095	232234	118118

	INRA032	ETH3	BM2113	BM1824	HEL13	INRA37	BM1818	ILSTS006	MM12E6	CSRM60	ETH185	HAUT24
Cebú 45	180182	162180	115119	129135	185185	000000	258262	289295	99115	95107	226226	126126
Cebú 46	180182	162162	115119	127135	185185	115123	260264	295297	99115	95095	214228	120126
Cebú 47	180192	162186	119125	135135	183183	123123	260264	289297	121123	95095	226230	120124
Cebú 48	180182	180184	115119	127141	183187	123125	260264	289297	117121	95095	226230	124126
Cebú 49	180180	180182	115117	127141	187187	115123	260264	289289	115121	95097	226230	114122
Cebú 50	178182	180182	101115	127141	187187	123125	264266	289293	99121	95097	226236	122122

	HAUT27	TGLA227	TGLA126	TGLA122	TGLA53	SPS115
Cebú 1	148148	77077	115117	137151	160172	242246
Cebú 2	128148	77077	117121	137145	160168	242246
Cebú 3	148148	77077	117125	151153	160160	244246
Cebú 4	148150	77083	115115	143149	160170	246248
Cebú 5	150152	77077	117125	149149	158160	244246
Cebú 6	148150	77077	119119	143159	156160	246246
Cebú 7	148148	77077	121125	137151	160162	244244
Cebú 8	148150	77081	121125	149159	160168	244246
Cebú 9	146148	77077	119119	157157	160162	242244
Cebú 10	144150	77079	115115	157157	160168	244248
Cebú 11	146148	77077	115119	137149	160162	244248
Cebú 12	128144	77079	115123	143153	172174	242248
Cebú 13	148148	77077	119123	137137	160160	244256
Cebú 14	148148	81083	115115	143149	160170	256256
Cebú 15	128148	77077	115119	155155	162170	244248
Cebú 16	150150	77077	117119	137145	160162	248256
Cebú 17	146148	77081	117123	137155	160168	244244
Cebú 18	128146	77077	119119	137149	160168	244244
Cebú 19	146146	77077	117123	137137	162166	244246
Cebú 20	148150	77077	119119	143157	160162	244244
Cebú 21	148152	77077	119119	143153	160168	246246
Cebú 22	128152	77079	119119	151151	160172	242242
Cebú 23	148148	77079	117125	149157	172172	242244
Cebú 24	128152	77077	115117	147157	160160	244244
Cebú 25	148150	77081	115115	145145	162166	244244
Cebú 26	148148	77077	115123	143143	162168	242246
Cebú 27	128140	77077	115117	137143	160170	244244
Cebú 28	148152	000000	115115	137157	170170	242244
Cebú 29	148148	81083	119125	143151	168168	242256
Cebú 30	148150	77077	119119	137145	160166	242242
Cebú 31	128152	77079	123125	137137	162172	244248
Cebú 32	148148	77077	119123	145151	172184	242244
Cebú 33	128150	77077	123125	137149	162174	244244
Cebú 34	148152	77077	115115	137137	166168	244244
Cebú 35	148150	77077	123125	137149	160160	244248
Cebú 36	148148	77077	115125	137137	160168	242242
Cebú 37	150152	77079	000000	143145	160168	242244
Cebú 38	144148	77079	115115	149153	162168	256256
Cebú 39	128148	77079	119125	145145	162170	256256
Cebú 40	146148	77081	121123	149149	160162	246248
Cebú 41	148150	77077	117121	143153	160162	248248

	HAUT27	TGLA227	TGLA126	TGLA122	TGLA53	SPS115
Cebú 42	150150	77077	115125	143151	160168	248248
Cebú 43	152152	77077	119121	137137	158160	248256
Cebú 44	128148	77077	115117	137151	160168	244256
Cebú 45	148148	77077	119123	149149	162170	242244
Cebú 46	146148	77077	115123	137153	162168	244244
Cebú 47	142148	77077	117119	143153	166170	248256
Cebú 48	150152	77077	119121	137145	158160	248248
Cebú 49	152152	77077	115125	143143	162168	244248
Cebú 50	152152	77077	115123	137137	160168	244244

Población Siboney de Cuba

	INRA63	INRA005	ETH225	ILSTS005	HEL5	HEL1	INRA035	ETH152	INRA023	ETH10	HEL9	CSSM66
Siboney 1	184184	118122	150158	181181	151161	104104	102102	193197	206214	219221	157167	183189
Siboney 2	178182	118122	148150	181181	149161	104104	100106	197197	204206	209219	161167	183189
Siboney 3	176178	118122	140150	181183	163165	104108	102102	193209	206214	209219	159167	183195
Siboney 4	184186	120122	144152	183183	151161	110110	98102	197205	194214	217219	157163	183195
Siboney 5	178184	122122	148150	183187	161161	104106	96106	199201	208208	219221	147151	183185
Siboney 6	178178	120120	140158	181187	151165	106112	106106	199205	210214	213219	161167	193195
Siboney 7	176178	118120	148152	181183	149151	104104	106108	199201	206208	209213	155159	181195
Siboney 8	176184	118122	150158	181183	149151	104112	102102	193199	208214	209209	161163	189193
Siboney 9	176186	118122	150158	183187	149151	106116	96102	193197	208214	209217	163167	179183
Siboney 10	186186	118122	158158	181183	149149	106106	100102	193193	194214	209213	153163	181195
Siboney 11	176178	120120	140148	183183	149165	102104	96106	199199	208218	219219	151159	183195
Siboney 12	178184	120122	140148	181181	149161	100106	102106	193193	194214	209209	147153	195199
Siboney 13	178178	118122	144148	181181	161161	110112	96098	193205	208210	217223	151155	195199
Siboney 14	178184	118120	158158	181187	161165	104104	96106	000000	204208	213217	151159	187189
Siboney 15	178184	118120	158158	183189	163165	104106	000000	193193	198206	219221	151155	187195
Siboney 16	176176	118120	144150	181181	163165	110112	96102	197199	206218	213219	155159	181187
Siboney 17	176186	118122	150158	181181	161163	106116	104106	193197	208214	209217	161165	181185
Siboney 18	176178	120120	140152	181181	161161	106110	100102	197201	206208	213217	151165	179189
Siboney 19	178178	118118	144158	181181	161161	104104	98106	195203	204208	211217	151155	195199
Siboney 20	178178	118120	140158	181181	159161	106114	100102	199205	210214	213219	161165	193195
Siboney 21	178178	118118	148150	181181	151161	104110	102106	199205	208208	209219	149161	183187
Siboney 22	176178	120122	140140	181181	159161	104110	104104	197199	208214	217217	151159	179185
Siboney 23	178178	120122	158158	183187	151151	104106	102104	193197	208214	000000	161165	195195
Siboney 24	178178	120122	158158	183183	161161	106112	100102	195199	198210	213213	161165	193195
Siboney 25	176184	120120	150152	183187	161161	104114	102106	193193	196210	209209	155163	183199
Siboney 26	176178	118118	148148	181181	151161	106112	106106	199199	000000	213213	159161	181195
Siboney 27	178178	118120	148158	183189	161163	106112	100102	195201	206208	217217	155161	183189
Siboney 28	178184	118120	144150	187187	161161	104112	100102	000000	204214	217217	151161	187185
Siboney 29	178184	118120	144150	187187	161161	104112	96106	197201	208214	219219	157161	179185
Siboney 30	176178	118122	140150	187187	159161	104112	102106	197199	206210	219219	151165	183193
Siboney 31	176184	120122	158158	187187	159161	104112	102106	193201	204208	209221	151165	185199
Siboney 32	178186	120120	156158	187187	161161	100116	104106	193197	000000	209219	155155	189187
Siboney 33	178184	120120	148154	183183	161165	104112	106106	195201	214214	209219	151155	187195
Siboney 34	178184	120120	148154	181183	163165	100116	96096	193193	214214	213213	161163	193199
Siboney 35	176184	120120	150158	183183	165165	104112	96102	193193	194210	213213	149165	189187
Siboney 36	178184	118122	140140	183183	151161	104112	98102	209209	208208	217217	151163	187195
Siboney 37	176178	118122	150150	183189	161161	104104	102104	195209	210210	217217	155155	195195
Siboney 38	178178	120122	148150	183187	161161	104104	106106	197199	210214	213221	149155	195189

	INRA63	INRA005	ETH225	ILSTS005	HEL5	HEL1	INRA035	ETH152	INRA023	ETH10	HEL9	CSSM66
Siboney 39	178186	118120	148158	183187	161161	104106	102104	197199	194214	213221	155165	181189
Siboney 40	176178	118118	148158	181183	151161	104110	98106	199209	210214	213219	155163	183189
Siboney 41	178178	118118	148150	183183	149151	100110	98102	197199	210214	209213	149151	183199
Siboney 42	176178	120120	150152	181181	151161	100104	102106	193199	210214	213225	151165	179195
Siboney 43	176178	118118	148150	181183	161165	104110	100104	197209	196208	219219	161163	181181
Siboney 44	176176	120122	146150	183187	161165	100108	100100	197199	214214	000000	161163	195199
Siboney 45	178178	120122	146150	183183	151151	100108	102102	199201	196210	213213	151161	181195
Siboney 46	178184	118120	144150	181181	159161	100114	102104	193209	198210	225225	153165	195199
Siboney 47	176178	118120	140150	181187	159161	102104	96102	193201	208210	209221	151151	195199
Siboney 48	178178	120122	148152	183187	149149	100104	96106	193197	206208	219221	155159	193195
Siboney 49	176178	122122	140152	183183	149151	100106	100106	195211	204206	213221	159165	183187
Siboney 50	176178	120122	140152	181181	149149	104106	96100	193197	204206	209225	159159	181181

	INRA032	ETH3	BM2113	BM1824	HEL13	INRA37	BM1818	ILSTS006	MM12E6	CSRM60	ETH185	HAUT24
Siboney 1	182184	101129	127137	180182	193193	123131	260264	283283	115119	95095	228232	126126
Siboney 2	180184	115117	137139	188190	191193	127131	260264	295297	121131	95105	228230	124124
Siboney 3	184186	115117	127141	178180	193195	131131	260262	283283	119123	95105	222230	124126
Siboney 4	182182	115119	135137	180182	189193	131131	262264	283297	119131	101105	228230	124124
Siboney 5	184186	115117	139141	180188	193195	131131	258264	295297	119119	97105	232234	126126
Siboney 6	180184	115117	139141	178188	191193	119131	260264	289295	119125	105105	228234	118120
Siboney 7	184186	117125	125139	180188	183193	131131	262264	289295	115131	95095	230232	124126
Siboney 8	182186	125125	125137	180188	191193	131131	260264	293295	119123	105105	226228	120124
Siboney 9	182186	117125	139141	180188	193193	127131	260264	287295	121131	95097	232232	120124
Siboney 10	166186	115115	129135	180190	183183	127131	260262	295297	121123	105109	222234	120124
Siboney 11	180182	123125	135139	178188	189193	129131	262264	295297	119123	103105	228228	128128
Siboney 12	166166	115117	125135	180182	191193	129129	260260	295297	121123	95109	222228	120124
Siboney 13	184184	115117	139141	178180	191193	127127	258264	287297	119131	95109	222232	120124
Siboney 14	184184	125125	139141	180182	189193	127127	000000	283287	127131	95095	230230	122126
Siboney 15	182198	117117	135135	178182	183191	119131	262262	293295	121131	95095	228230	120124
Siboney 16	180182	117119	133135	178186	191193	131131	256264	289297	99131	103103	228230	120126
Siboney 17	182186	117125	139141	180188	193193	131131	260264	289289	121131	95099	228232	120128
Siboney 18	182186	115123	135137	182186	189193	131131	260264	283289	123131	105105	214228	122122
Siboney 19	178186	101125	125127	180190	189193	127129	258264	295295	121131	109109	222236	126128
Siboney 20	182184	115117	137139	178186	193193	131131	260264	295297	99119	105105	228236	122128
Siboney 21	184186	117125	125139	178188	189189	125131	258262	283297	99119	99099	228236	118118
Siboney 22	182186	117117	129141	180182	189193	127131	262264	283287	115119	95099	222228	126124
Siboney 23	176184	115125	135139	178180	000000	127125	000000	289295	115123	101109	228236	126126
Siboney 24	182186	115117	137139	180182	193193	125131	262264	283295	99123	105107	228228	126124
Siboney 25	182186	123123	139141	178180	189193	129131	262264	293297	119131	107109	222222	126126
Siboney 26	184186	101123	135135	182186	189193	123131	258264	293297	115119	107109	228236	126128
Siboney 27	184186	125127	135135	178186	193193	129131	260264	283295	123131	107109	230236	124128
Siboney 28	000000	123127	137135	178178	000000	123131	000000	289295	000000	95099	222230	124124
Siboney 29	184184	101121	137139	178180	189193	129131	258260	295297	115119	101105	214228	124124
Siboney 30	186186	117117	139141	178182	193193	127129	260264	297297	115119	103105	230232	118122
Siboney 31	184186	117123	135139	180182	193193	131131	258264	289295	99131	105105	222236	118126
Siboney 32	000000	123125	135139	180182	000000	131131	262264	293295	115121	101101	220228	122122
Siboney 33	182184	117117	135137	180182	183187	127127	260264	287293	115131	95105	222228	122122
Siboney 34	000000	115123	137141	180188	193193	127131	260264	295297	99121	95105	222230	122124
Siboney 35	166182	117125	139141	180182	193195	127127	256264	295297	119121	95095	222232	118118

	INRA032	ETH3	BM2113	BM1824	HEL13	INRA37	BM1818	ILSTS006	MM12E6	CSRM60	ETH185	HAUT24
Siboney 36	182184	121129	139141	180182	193193	131131	262264	293295	119129	101101	230232	120126
Siboney 37	182182	127129	125129	182182	189193	131131	264264	289297	119127	95105	232234	122124
Siboney 38	184186	127129	125141	182188	000000	127131	264264	289293	121131	95099	232234	124126
Siboney 39	184186	117129	125129	180188	000000	123127	264268	287297	121131	101105	232234	120120
Siboney 40	182184	123125	135141	178182	189191	127131	262264	283297	119131	95099	230232	122126
Siboney 41	180182	117119	137139	180182	193193	123127	260264	289295	119121	103101	228230	124124
Siboney 42	182184	123125	129141	178182	193193	131131	258258	283289	131131	99105	222236	118122
Siboney 43	182182	117125	141141	180182	189189	127127	264264	295297	129129	95109	230236	118122
Siboney 44	184184	117119	141141	178180	189191	127131	000000	295295	131131	101101	232232	118118
Siboney 45	180182	117117	139141	180182	191193	127129	258260	295297	119121	101109	232232	122126
Siboney 46	182184	117117	139141	178178	193193	127131	258262	295297	115121	101109	222234	120120
Siboney 47	184186	117125	135135	178178	191193	125127	260264	297297	99131	95101	228230	118122
Siboney 48	182182	117125	125141	180182	191193	127131	260264	283295	115123	95105	222230	122122
Siboney 49	182184	115117	139141	178182	189193	121127	260264	283295	119121	95095	228236	118122
Siboney 50	184184	115117	139141	178182	000000	127131	000000	287297	115121	95105	220234	118122

	HAUT27	TGLA227	TGLA126	TGLA122	TGLA53	SPS115
Siboney 1	148152	89089	115117	143163	168200	244244
Siboney 2	148148	77087	115115	143151	166184	244244
Siboney 3	148148	77077	115117	149151	160168	244248
Siboney 4	152152	85087	115119	143151	166168	244248
Siboney 5	152170	79079	115119	143143	168200	242248
Siboney 6	152152	85089	115117	151161	168170	244244
Siboney 7	148152	77089	115121	143149	170180	244248
Siboney 8	148148	77087	115117	143153	164174	244248
Siboney 9	148158	87087	115115	145157	166174	242246
Siboney 10	158166	77077	119121	149149	174194	244244
Siboney 11	148148	93093	113113	143151	162174	244256
Siboney 12	158166	77089	115121	151153	166176	244244
Siboney 13	148152	77085	115119	143151	166168	244244
Siboney 14	152152	77077	115115	143143	166168	242244
Siboney 15	152166	85087	115117	137153	166168	244248
Siboney 16	152152	85085	117121	143143	162174	244248
Siboney 17	148158	85085	115115	143157	166174	244244
Siboney 18	152152	77085	117121	143143	166168	244244
Siboney 19	152152	85093	115117	143151	162160	244244
Siboney 20	152152	77085	115117	151161	166170	244244
Siboney 21	152152	87089	115115	143149	162188	242244
Siboney 22	152152	87089	115123	143143	164168	244244
Siboney 23	152152	77087	117123	145169	166168	244244
Siboney 24	152152	85089	115123	143143	166174	244244
Siboney 25	152152	000000	115123	145161	166168	244244
Siboney 26	152152	85085	117121	143151	168194	244244
Siboney 27	152152	77077	115117	137151	162162	244244
Siboney 28	152152	79087	117121	143143	168172	244244
Siboney 29	152158	79079	121121	151161	168172	244244
Siboney 30	148152	77089	117117	143143	170182	244244
Siboney 31	148152	81083	115115	149169	166176	244244
Siboney 32	152158	85085	115115	147147	166176	244244

	HAUT27	TGLA227	TGLA126	TGLA122	TGLA53	SPS115
Siboney 33	148152	77089	115123	147147	162166	244244
Siboney 34	152158	81089	115125	143161	162166	244244
Siboney 35	152158	77087	115121	147149	164166	244244
Siboney 36	152152	77089	115115	149151	166166	244244
Siboney 37	152252	77089	115117	143157	166184	244244
Siboney 38	152152	77087	115123	145151	168184	244244
Siboney 39	152152	85085	115121	143143	162184	244246
Siboney 40	152152	77077	115115	143151	170174	248248
Siboney 41	152156	85085	115115	143161	166168	246246
Siboney 42	148152	79083	121123	157161	168184	248248
Siboney 43	152152	77077	115117	147147	172184	244248
Siboney 44	152152	77089	115115	143143	164166	244246
Siboney 45	148156	77087	115117	153153	166168	244244
Siboney 46	152152	77089	115117	153155	164168	244244
Siboney 47	152166	87089	115115	153155	166168	244246
Siboney 48	152152	87093	115115	149151	168168	248248
Siboney 49	152166	77077	115115	143145	164168	242248
Siboney 50	148152	89089	115117	143163	168200	244244

Población Criollo Cubano

	INRA63	INRA005	ETH225	ILSTS005	HEL5	HEL1	INRA035	ETH152	INRA023	ETH10	HEL9	CSSM66
Criollo 1	176178	120124	152158	183183	149151	106112	104104	199199	208214	219219	155167	183183
Criollo 2	176184	122124	148148	183183	163165	100112	104110	199199	212212	213215	147149	195199
Criollo 3	176184	120124	140152	183183	149151	104106	104104	199203	214214	219219	147163	183189
Criollo 4	176184	116120	140152	183187	151161	106112	104104	199199	214214	215217	147159	187195
Criollo 5	178184	116120	150158	183187	149163	100112	110122	199199	198212	213219	163171	183187
Criollo 6	178184	116120	150158	183187	151151	100112	110122	199199	198212	213219	155167	183187
Criollo 7	178184	116118	148158	183187	149151	100112	104110	199199	198210	219219	151167	183189
Criollo 8	176178	116118	140158	183187	149151	106108	102104	199203	198214	217219	163171	193195
Criollo 9	176176	120124	140148	181183	149151	106110	102104	000000	206208	219219	163171	181183
Criollo 10	176178	116116	148148	183183	149151	112112	104110	197199	198212	219219	163165	187195
Criollo 11	176184	116122	150158	183183	149163	110112	102106	199203	212218	219219	163165	183195
Criollo 12	178178	118120	148150	187187	151151	104106	104110	199199	212212	219221	163165	181193
Criollo 13	184184	118120	148148	181183	151151	100104	104104	199203	198214	219221	167167	183195
Criollo 14	178178	116120	140152	183183	149151	104110	104104	199203	198212	219219	167169	187193
Criollo 15	178184	116124	148148	183187	151165	110110	110110	197199	206210	215221	155159	179181
Criollo 16	178184	116122	140148	181183	147149	110110	110110	199203	208212	213219	159169	179189
Criollo 17	184184	116120	148152	183191	149151	110110	102104	197199	214214	215219	151149	177181
Criollo 18	178184	116116	148158	183183	163165	106112	110110	199203	206212	215219	163167	187193
Criollo 19	178184	116120	148148	183187	149151	110112	110110	197203	000000	000000	151159	177189
Criollo 20	178184	116118	148158	181183	149151	106110	104110	199203	210214	219221	159165	187189
Criollo 21	178184	116118	148148	187191	149151	000000	104110	201203	208214	219219	155159	185191
Criollo 22	176176	116116	148158	181183	149165	104110	122122	197199	212212	219219	151171	189195
Criollo 23	176178	122122	148158	183187	151163	100110	104104	199203	198214	219219	151159	185189
Criollo 24	176178	116116	140148	183187	153165	106110	104110	197199	212214	219219	151155	181181
Criollo 25	178182	118122	148158	183183	163165	100112	102104	199199	198212	219219	159165	187195
Criollo 26	176178	120122	140152	183187	149153	100110	102104	197199	198214	219219	151159	000000
Criollo 27	176178	116116	148148	183187	149165	110110	104110	199203	212212	219219	163171	187191
Criollo 28	176182	116120	148150	187191	151165	104110	102104	199203	210214	215219	147159	187191

	INRA63	INRA005	ETH225	ILSTS005	HEL5	HEL1	INRA035	ETH152	INRA023	ETH10	HEL9	CSSM66
Criollo 29	176182	120124	140150	183187	151165	100104	102110	199203	198212	215219	165165	185189
Criollo 30	176178	122124	148148	183183	149151	110110	104104	203205	198216	211219	155159	189195
Criollo 31	178182	116116	140148	181183	149151	110110	104110	199203	214214	219219	000000	185189
Criollo 32	176178	116124	148158	183187	149151	110110	122122	199199	198214	219219	151169	181191
Criollo 33	176178	116120	146148	183183	149149	100110	104104	197205	198214	219221	147159	187191
Criollo 34	176178	116124	158158	181187	151165	104110	104122	197199	214214	213221	159163	187191
Criollo 35	178178	120122	140148	183183	161161	110110	104110	199205	210214	221221	147159	187199
Criollo 36	176184	120122	148158	183187	149153	100114	110110	193197	214214	213221	169171	181183
Criollo 37	176184	122122	158158	187187	155165	100114	102110	193199	198198	213221	159171	183195
Criollo 38	176178	120124	152158	183183	149151	106112	104104	199199	208214	219219	155167	183183
Criollo 39	176184	118120	140148	183183	149149	100114	102104	199203	198206	221221	000000	181195
Criollo 40	176178	116122	158158	187187	149151	104106	102104	197199	198212	213221	147153	183195
Criollo 41	176176	116118	148158	183187	151165	104110	102110	199203	198198	219221	153171	181185
Criollo 42	176178	118120	150158	183183	165165	100100	102110	199201	214214	221221	000000	185193
Criollo 43	176176	116118	148158	183187	149151	110110	110110	199199	210210	219221	157171	185193
Criollo 44	176176	120120	148150	187191	151165	104110	102104	199203	214214	213219	143155	185199
Criollo 45	176176	120122	158152	183187	151151	100104	104104	199203	210214	213221	157169	181185
Criollo 46	176184	118122	144158	183187	151165	110112	102110	193203	198206	213223	143171	185187
Criollo 47	176178	118124	146150	183187	163165	110112	102110	193203	198206	213223	155157	185191
Criollo 48	176176	120122	152158	181183	151165	112112	104104	197203	214214	213221	163165	185187
Criollo 49	176176	118120	148150	183187	153155	106112	102102	193201	198214	211223	143171	183185
Criollo 50	176176	116118	148150	191191	151151	104112	102110	199203	206214	213221	143165	193199

	INRA032	ETH3	BM2113	BM1824	HEL13	INRA37	BM1818	ILSTS006	MM12E6	CSRM60	ETH185	HAUT24
Criollo 1	180182	117125	135141	180182	181193	125127	260266	291293	115121	103103	222232	116122
Criollo 2	180180	115117	139129	180188	191193	125125	260266	289293	115131	99113	222222	120122
Criollo 3	180182	117125	139139	178180	181193	125129	260264	293295	119131	93103	222222	108116
Criollo 4	180182	115117	127141	180188	191193	127133	260260	293295	115131	99101	222222	128116
Criollo 5	178184	117129	125127	182188	191193	125131	000000	293293	000000	93105	228230	108122
Criollo 6	178184	117129	127127	182188	191193	127131	260260	293293	131131	93105	228230	108122
Criollo 7	180184	105117	129135	182188	191193	125125	260264	291293	117119	97099	230232	108122
Criollo 8	160180	115125	137139	178180	183183	123133	260262	291293	131131	97103	222232	116122
Criollo 9	180180	105117	135141	182188	187187	127131	260264	293295	107131	93103	232234	106116
Criollo 10	160184	125127	135141	182188	185193	127131	260266	291299	121131	93105	222236	120122
Criollo 11	180180	115117	135135	178180	193193	131131	250264	297297	115121	101101	000000	120120
Criollo 12	000000	115117	127135	180188	189193	125125	262264	293297	117117	99099	232234	116116
Criollo 13	180180	119119	139139	180182	000000	123123	000000	295297	115131	000000	000000	116116
Criollo 14	160160	000000	135141	178188	189193	127131	262264	293295	115121	103105	230234	116120
Criollo 15	180180	105117	139141	182188	185193	125131	260262	295297	131131	93097	228232	106106
Criollo 16	180180	115129	139139	178180	187193	127131	260262	295301	131131	93097	230234	120122
Criollo 17	160182	115117	135139	180188	191193	123127	260266	291293	115131	99113	220222	106106
Criollo 18	178180	115117	127141	188188	191191	125127	256266	295297	131131	101103	230234	106116
Criollo 19	000000	105117	127139	180188	191193	000000	262264	293293	115131	000000	000000	120120
Criollo 20	180184	117119	127139	180188	191193	127127	256260	297299	117131	93105	232234	120120
Criollo 21	184184	117127	133139	178178	187193	125131	000000	293293	117131	93099	222228	120120
Criollo 22	184184	115117	139139	180182	191193	131131	260268	297301	131131	93103	222232	108120
Criollo 23	180184	105117	127141	188188	183191	125125	260264	293297	115131	97101	222232	106116
Criollo 24	180184	115117	129139	180188	183193	125131	260262	295297	115131	93099	232234	106116
Criollo 25	180182	117125	135141	180182	181193	125127	260266	291293	115121	103103	222232	116122

	INRA032	ETH3	BM2113	BM1824	HEL13	INRA37	BM1818	ILSTS006	MM12E6	CSRM60	ETH185	HAUT24
Criollo 26	184186	101123	135135	182186	189193	123131	258264	293297	115119	107109	228236	126128
Criollo 27	184186	125127	135135	178186	193193	129131	260264	283295	123131	107109	230236	124128
Criollo 28	000000	123127	137135	178178	000000	123131	000000	289295	000000	95099	222230	124124
Criollo 29	184184	101121	137139	178180	189193	129131	258260	295297	115119	101105	214228	124124
Criollo 30	186186	117117	139141	178182	193193	127129	260264	297297	115119	103105	230232	118122
Criollo 31	184186	117123	135139	180182	193193	131131	258264	289295	99131	105105	222236	118126
Criollo 32	000000	123125	135139	180182	000000	131131	262264	293295	115121	101101	220228	122122
Criollo 33	182184	117117	135137	180182	183187	127127	260264	287293	115131	95105	222228	122122
Criollo 34	000000	115123	137141	180188	193193	127131	260264	295297	99121	95105	222230	122124
Criollo 35	166182	117125	139141	180182	193195	127127	256264	295297	119121	95095	222232	118118
Criollo 36	000000	115119	125135	180182	189189	123125	262262	295297	121127	97101	230232	106122
Criollo 37	182184	115117	129139	178180	185193	125131	252264	295297	117131	99103	222234	118128
Criollo 38	000000	115117	129139	178188	183193	131131	258260	299299	117131	99103	222234	000000
Criollo 39	180182	105119	125137	178182	185187	125129	262264	293297	107117	99113	222230	120122
Criollo 40	180182	105117	000000	188180	187197	125127	260264	293297	131131	000000	228230	120120
Criollo 41	160182	105115	127135	182180	183185	125131	262264	291295	115121	95101	228230	116126
Criollo 42	180180	117117	127135	178180	189193	127131	258264	293295	107117	101105	222234	108120
Criollo 43	000000	117117	000000	182180	185193	000000	258264	000000	127131	000000	000000	000000
Criollo 44	180182	117119	135135	180182	189191	123125	260264	293293	121127	95099	230232	106108
Criollo 45	180184	105117	125139	180182	185193	121131	256264	293295	131131	93103	222222	120122
Criollo 46	180182	105117	129141	180182	189191	131131	262264	293295	107131	93101	222236	108128
Criollo 47	180184	105117	129129	182188	185193	123125	264268	293295	107117	93101	228232	116122
Criollo 48	180182	115117	129141	178190	183189	123131	260262	293297	131131	93105	232240	106106
Criollo 49	180182	115117	125139	182188	181193	127131	164268	293297	127131	103103	232234	118120
Criollo 50	180180	105115	125139	182188	185193	123125	256262	293293	131131	93103	232234	116128

	HAUT27	TGLA227	TGLA126	TGLA122	TGLA53	SPS115
Criollo 1	144148	81087	115115	153161	158160	246246
Criollo 2	148158	87097	115115	151161	160166	248248
Criollo 3	138148	83087	115115	151153	160180	244246
Criollo 4	144148	85087	115123	143151	152164	244250
Criollo 5	144148	97099	115115	151155	158160	248250
Criollo 6	144148	97099	115123	151155	152160	250256
Criollo 7	144148	85097	115115	153161	152160	248256
Criollo 8	144148	87091	115115	143155	158160	244248
Criollo 9	138150	81099	115123	153161	160160	244250
Criollo 10	144150	000000	115123	151153	152180	244250
Criollo 11	148154	000000	000000	151155	158162	244248
Criollo 12	148154	81099	115123	143143	160162	244256
Criollo 13	146148	000000	000000	143151	160160	244246
Criollo 14	146148	85091	115123	151155	160180	244250
Criollo 15	148150	85085	115123	143151	160182	000000
Criollo 16	138148	85085	115115	151153	182184	244248
Criollo 17	144148	81085	115123	143143	158160	244256
Criollo 18	144148	000000	000000	143153	162164	248248
Criollo 19	144148	000000	115115	151155	160160	244244
Criollo 20	138154	95095	115115	143151	152158	244244
Criollo 21	146148	85099	115123	143155	152160	242244
Criollo 22	144148	81087	115115	153161	158160	246246

	HAUT27	TGLA227	TGLA126	TGLA122	TGLA53	SPS115
Criollo 23	138150	87087	115115	151151	158158	244250
Criollo 24	144148	87091	115115	153161	160182	244250
Criollo 25	144148	000000	000000	143143	160182	244250
Criollo 26	144148	85085	121121	151161	152160	244244
Criollo 27	138148	85089	115115	151155	152164	244244
Criollo 28	144148	81085	115115	151161	152164	000000
Criollo 29	144148	85085	115121	000000	000000	244256
Criollo 30	000000	000000	000000	151161	152152	244250
Criollo 31	144148	83085	115125	137143	160160	244244
Criollo 32	138148	81081	115115	143143	160160	244248
Criollo 33	000000	85091	115115	155161	152160	244244
Criollo 34	148150	85087	115115	143151	152152	244248
Criollo 35	148150	81081	123125	151153	152164	244250
Criollo 36	148150	87099	115123	143143	152172	250250
Criollo 37	144148	83085	115125	143161	164164	244244
Criollo 38	144148	85099	121123	143161	162182	244250
Criollo 39	144148	91097	121123	000000	158162	244244
Criollo 40	144148	85085	121123	153155	160160	244250
Criollo 41	148150	000000	115115	143161	152162	244250
Criollo 42	000000	81087	121123	143161	000000	246246
Criollo 43	144148	000000	121123	143155	152162	246250
Criollo 44	148150	87099	115123	151161	162166	252252
Criollo 45	144148	87099	115125	161161	164182	246252
Criollo 46	144150	81099	115115	143143	160160	244248
Criollo 47	144148	81099	115115	143143	158160	244248
Criollo 48	138148	99099	115115	153161	160160	248250
Criollo 49	148150	85085	115115	143151	158160	244244
Criollo 50	148150	000000	115115	143151	160162	246246

Locus: INRA63

Población	Alelos							
	176	178	180	182	184	186	Hobs	Hesp
Cebú	0.010	0.194	0.010	0.031	0.704	0.051	0.408	0.468
Siboney	0.240	0.510	0.000	0.010	0.170	0.070	0.680	0.655
Criollo	0.429	0.316	0.000	0.041	0.214	0.000	0.714	0.676

Locus: INRA005

Población	Alelos							
	116	118	120	122	124	126	Hobs	Hesp
Cebú	0.220	0.370	0.200	0.140	0.050	0.020	0.880	0.760
Siboney	0.000	0.340	0.400	0.260	0.000	0.000	0.660	0.663
Criollo	0.337	0.153	0.245	0.163	0.102	0.000	0.816	0.774

Locus: ETH225

Población	Alelos											
	140	142	144	146	148	150	152	154	156	158	Hobs	Hesp
Cebú	0.070	0.050	0.030	0.020	0.140	0.010	0.020	0.020	0.170	0.470	0.940	0.728
Siboney	0.140	0.000	0.070	0.020	0.180	0.240	0.080	0.020	0.010	0.240	0.800	0.829
Criollo	0.122	0.000	0.010	0.020	0.398	0.112	0.082	0.000	0.000	0.255	0.776	0.749

Locus: ILSTS005

Población	Alelos								
	179	181	183	185	187	189	191	Hobs	Hesp
Cebú	0.060	0.000	0.200	0.110	0.400	0.170	0.060	0.700	0.759
Siboney	0.000	0.400	0.360	0.000	0.210	0.030	0.000	0.420	0.672
Criollo	0.000	0.082	0.551	0.000	0.306	0.000	0.061	0.653	0.598

Locus: HEL5

Población	Alelos									Hobs	Hesp
	147	149	151	153	155	159	161	163	165		
Cebú	0.000	0.270	0.400	0.200	0.000	0.000	0.010	0.040	0.080	0.440	0.726
Siboney	0.000	0.140	0.170	0.000	0.000	0.060	0.450	0.060	0.120	0.640	0.735
Criollo	0.010	0.276	0.367	0.041	0.020	0.000	0.031	0.071	0.184	0.816	0.755

Locus: HEL1

Población	Alelos									Hobs	Hesp
	100	102	104	106	108	110	112	114	116		
Cebú	0.020	0.120	0.050	0.100	0.560	0.040	0.090	0.000	0.020	0.720	0.656
Siboney	0.100	0.020	0.370	0.170	0.030	0.100	0.140	0.030	0.040	0.820	0.799
Criollo	0.167	0.000	0.135	0.115	0.010	0.354	0.188	0.031	0.000	0.750	0.787

Locus: INRA035

Población	Alelos												Hobs	Hesp
	96	98	100	102	104	106	108	110	120	122	124	128		
Cebú	0.000	0.000	0.000	0.133	0.439	0.010	0.010	0.204	0.112	0.051	0.031	0.010	0.673	0.739
Siboney	0.133	0.061	0.122	0.316	0.092	0.265	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.776	0.793
Criollo	0.000	0.000	0.000	0.194	0.408	0.010	0.000	0.316	0.000	0.071	0.000	0.000	0.612	0.698

Locus: ETH152

Población	Alelos									Hobs	Hesp
	193	195	197	199	201	203	205	209	211		
Cebú	0.810	0.020	0.130	0.040	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.360	0.328
Siboney	0.271	0.063	0.208	0.219	0.094	0.010	0.052	0.073	0.010	0.792	0.823
Criollo	0.052	0.000	0.125	0.510	0.031	0.250	0.031	0.000	0.000	0.792	0.664

Locus: INRA023

Población	Alelos												
	194	196	198	204	206	208	210	212	214	216	218	Hobs	Hesp
Cebú	0.071	0.071	0.082	0.031	0.031	0.082	0.163	0.061	0.378	0.031	0.000	0.898	0.809
Siboney	0.052	0.031	0.031	0.073	0.125	0.240	0.167	0.000	0.260	0.000	0.021	0.854	0.830
Criollo	0.000	0.000	0.240	0.000	0.073	0.042	0.083	0.198	0.344	0.010	0.010	0.667	0.779

Locus: ETH10

Población	Alelos										
	209	211	213	215	217	219	221	223	225	Hobs	Hesp
Cebú	0.380	0.000	0.390	0.000	0.010	0.220	0.000	0.000	0.000	0.620	0.662
Siboney	0.198	0.010	0.240	0.000	0.177	0.229	0.094	0.010	0.042	0.625	0.817
Criollo	0.000	0.021	0.146	0.073	0.021	0.500	0.208	0.031	0.000	0.604	0.685

Locus: HEL9

Población	Alelos																
	143	147	149	151	153	155	157	159	161	163	165	167	169	171	Hobs	Hesp
Cebú	0.042	0.021	0.177	0.250	0.073	0.146	0.031	0.021	0.073	0.083	0.083	0.000	0.000	0.000	0.938	0.866
Siboney	0.000	0.020	0.040	0.180	0.030	0.160	0.030	0.110	0.160	0.100	0.120	0.050	0.000	0.000	0.920	0.882
Criollo	0.043	0.076	0.022	0.087	0.022	0.087	0.033	0.163	0.000	0.120	0.098	0.076	0.054	0.120	0.957	0.912

Locus: CSSM66

Población	Alelos													
	177	179	181	183	185	187	189	191	193	195	197	199	Hobs	Hesp
Cebú	0.000	0.170	0.240	0.090	0.100	0.050	0.000	0.000	0.000	0.140	0.070	0.140	0.840	0.857
Siboney	0.000	0.050	0.110	0.140	0.060	0.100	0.110	0.000	0.070	0.260	0.000	0.100	0.920	0.866
Criollo	0.021	0.021	0.115	0.135	0.135	0.156	0.104	0.073	0.073	0.125	0.000	0.042	0.958	0.895

Locus: INRA032

Población	Alelos												
	158	160	162	166	176	178	180	182	184	186	198	Hobs	Hesp
Cebú	0.020	0.000	0.235	0.000	0.051	0.286	0.133	0.071	0.051	0.133	0.020	0.857	0.825
Siboney	0.000	0.000	0.000	0.043	0.011	0.011	0.064	0.309	0.330	0.223	0.011	0.766	0.748
Criollo	0.000	0.080	0.000	0.000	0.000	0.034	0.489	0.227	0.170	0.000	0.000	0.727	0.681

Locus: ETH3

Población	Alelos												
	97	101	105	113	115	117	119	121	123	125	127	129	Hobs	Hesp
Cebú	0.010	0.130	0.000	0.050	0.450	0.200	0.050	0.000	0.000	0.070	0.000	0.040	0.860	0.736
Siboney	0.000	0.040	0.000	0.000	0.160	0.350	0.040	0.020	0.110	0.190	0.040	0.050	0.800	0.804
Criollo	0.000	0.000	0.177	0.000	0.208	0.417	0.094	0.000	0.000	0.052	0.021	0.031	0.938	0.746

Locus: BM2113

Población	Alelos									
	125	127	129	133	135	137	139	141	Hobs	Hesp
Cebú	0.000	0.050	0.240	0.090	0.280	0.010	0.130	0.200	0.900	0.804
Siboney	0.090	0.030	0.050	0.010	0.200	0.120	0.250	0.250	0.880	0.817
Criollo	0.117	0.138	0.128	0.011	0.191	0.064	0.223	0.128	0.787	0.853

Locus: BM1824

Población	Alelos								
	178	180	182	186	188	190	192	Hobs	Hesp
Cebú	0.071	0.510	0.306	0.000	0.031	0.000	0.082	0.776	0.640
Siboney	0.240	0.300	0.260	0.050	0.120	0.030	0.000	0.920	0.775
Criollo	0.188	0.292	0.229	0.000	0.271	0.021	0.000	0.917	0.761

Locus: HEL13

Población	Alelos											
	167	181	183	185	187	189	191	193	195	197	Hobs	Hesp
Cebú	0.010	0.000	0.286	0.286	0.357	0.000	0.020	0.031	0.000	0.010	0.653	0.715
Siboney	0.000	0.000	0.057	0.000	0.011	0.193	0.136	0.568	0.034	0.000	0.636	0.624
Criollo	0.000	0.031	0.073	0.146	0.104	0.125	0.167	0.344	0.000	0.010	0.896	0.808

Locus: INRA37

Población	Alelos									Hobs	Hesp
	115	119	121	123	125	127	129	131	133		
Cebú	0.240	0.104	0.010	0.406	0.083	0.115	0.042	0.000	0.000	0.750	0.753
Siboney	0.000	0.020	0.010	0.050	0.040	0.290	0.090	0.500	0.000	0.600	0.660
Criollo	0.000	0.011	0.065	0.109	0.293	0.163	0.043	0.293	0.022	0.783	0.791

Locus: BM1818

Población	Alelos											Hobs	Hesp
	250	252	254	256	258	260	262	264	266	268	270		
Cebú	0.000	0.000	0.000	0.000	0.240	0.160	0.250	0.270	0.030	0.020	0.030	0.980	0.787
Siboney	0.000	0.000	0.000	0.022	0.122	0.244	0.167	0.433	0.000	0.011	0.000	0.867	0.717
Criollo	0.011	0.011	0.011	0.044	0.033	0.311	0.200	0.288	0.056	0.033	0.000	0.933	0.787

Locus: ILSTS006

Población	Alelos										Hobs	Hesp
	283	285	287	289	291	293	295	297	299	301		
Cebú	0.010	0.010	0.040	0.160	0.000	0.220	0.290	0.200	0.070	0.000	0.840	0.803
Siboney	0.150	0.000	0.070	0.130	0.000	0.080	0.310	0.260	0.000	0.000	0.860	0.794
Criollo	0.000	0.000	0.000	0.010	0.073	0.438	0.177	0.240	0.042	0.021	0.750	0.720

Locus: MM12E6

Población	Alelos													Hobs	Hesp
	99	107	111	115	117	119	121	123	125	127	129	131	133		
Cebú	0.224	0.020	0.010	0.122	0.071	0.000	0.173	0.184	0.020	0.010	0.000	0.153	0.010	0.857	0.850
Siboney	0.071	0.000	0.000	0.122	0.000	0.235	0.173	0.102	0.010	0.020	0.031	0.235	0.000	0.918	0.836
Criollo	0.000	0.083	0.000	0.125	0.125	0.042	0.083	0.000	0.000	0.042	0.000	0.500	0.000	0.667	0.709

Locus: CSRM60

Población	Alelos											Hobs	Hesp
	91	93	05	97	99	101	103	105	107	109	113		
Cebú	0.000	0.040	0.720	0.090	0.000	0.000	0.040	0.000	0.100	0.000	0.010	0.500	0.467
Siboney	0.000	0.000	0.290	0.020	0.080	0.140	0.050	0.260	0.040	0.120	0.000	0.660	0.812
Criollo	0.011	0.261	0.023	0.080	0.148	0.148	0.182	0.102	0.000	0.000	0.045	0.909	0.845

Locus: ETH185

Población	Alelos											Hobs	Hesp
	214	220	222	226	228	230	232	234	236	238	240		
Cebú	0.135	0.000	0.042	0.292	0.125	0.135	0.073	0.094	0.083	0.021	0.000	0.813	0.848
Siboney	0.020	0.020	0.160	0.010	0.250	0.180	0.180	0.080	0.100	0.000	0.000	0.860	0.838
Criollo	0.000	0.011	0.261	0.000	0.102	0.136	0.261	0.193	0.023	0.000	0.011	0.841	0.805

Locus: HAUT24

Población	Alelos										Hobs	Hesp
	106	108	112	114	116	120	122	124	126	128		
Cebú	0.000	0.000	0.031	0.010	0.052	0.313	0.115	0.146	0.313	0.021	0.458	0.774
Siboney	0.000	0.000	0.000	0.000	0.140	0.140	0.200	0.240	0.210	0.070	0.620	0.822
Criollo	0.160	0.085	0.000	0.181	0.064	0.298	0.138	0.021	0.011	0.043	0.681	0.829

Locus: HAUT27

Población	Alelos														Hobs	Hesp
	128	138	140	142	144	146	148	150	152	154	156	158	166	170		
Cebú	0.110	0.000	0.010	0.010	0.030	0.080	0.440	0.170	0.150	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.660	0.743
Siboney	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.190	0.000	0.640	0.000	0.020	0.090	0.050	0.010	0.460	0.561
Criollo	0.000	0.087	0.000	0.000	0.261	0.033	0.446	0.130	0.000	0.033	0.000	0.011	0.000	0.000	0.750	0.714

Locus: TGLA227

Población	Alelos												Hobs	Hesp
	77	79	81	83	85	87	89	91	93	95	97	99		
Cebú	0.827	0.082	0.061	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.306	0.309
Siboney	0.327	0.061	0.020	0.020	0.204	0.163	0.163	0.000	0.041	0.000	0.000	0.000	0.633	0.800
Criollo	0.000	0.000	0.154	0.038	0.308	0.167	0.013	0.064	0.000	0.026	0.064	0.167	0.718	0.826

Locus: TGLA126

Población	Alelos							Hobs	Hesp
	113	115	117	119	121	123	125		
Cebú	0.000	0.276	0.133	0.255	0.071	0.133	0.133	0.714	0.809
Siboney	0.020	0.540	0.200	0.040	0.120	0.070	0.010	0.660	0.654
Criollo	0.000	0.670	0.000	0.000	0.091	0.193	0.045	0.477	0.509

Locus: TGLA122

Población	Alelos													Hobs	Hesp
	137	143	145	147	149	151	153	155	157	159	161	163	169		
Cebú	0.290	0.160	0.100	0.010	0.150	0.090	0.070	0.030	0.080	0.020	0.000	0.000	0.000	0.640	0.845
Siboney	0.020	0.380	0.050	0.070	0.090	0.160	0.070	0.020	0.040	0.000	0.070	0.010	0.020	0.688	0.810
Criollo	0.011	0.319	0.000	0.000	0.000	0.255	0.117	0.117	0.000	0.000	0.181	0.000	0.000	0.809	0.781

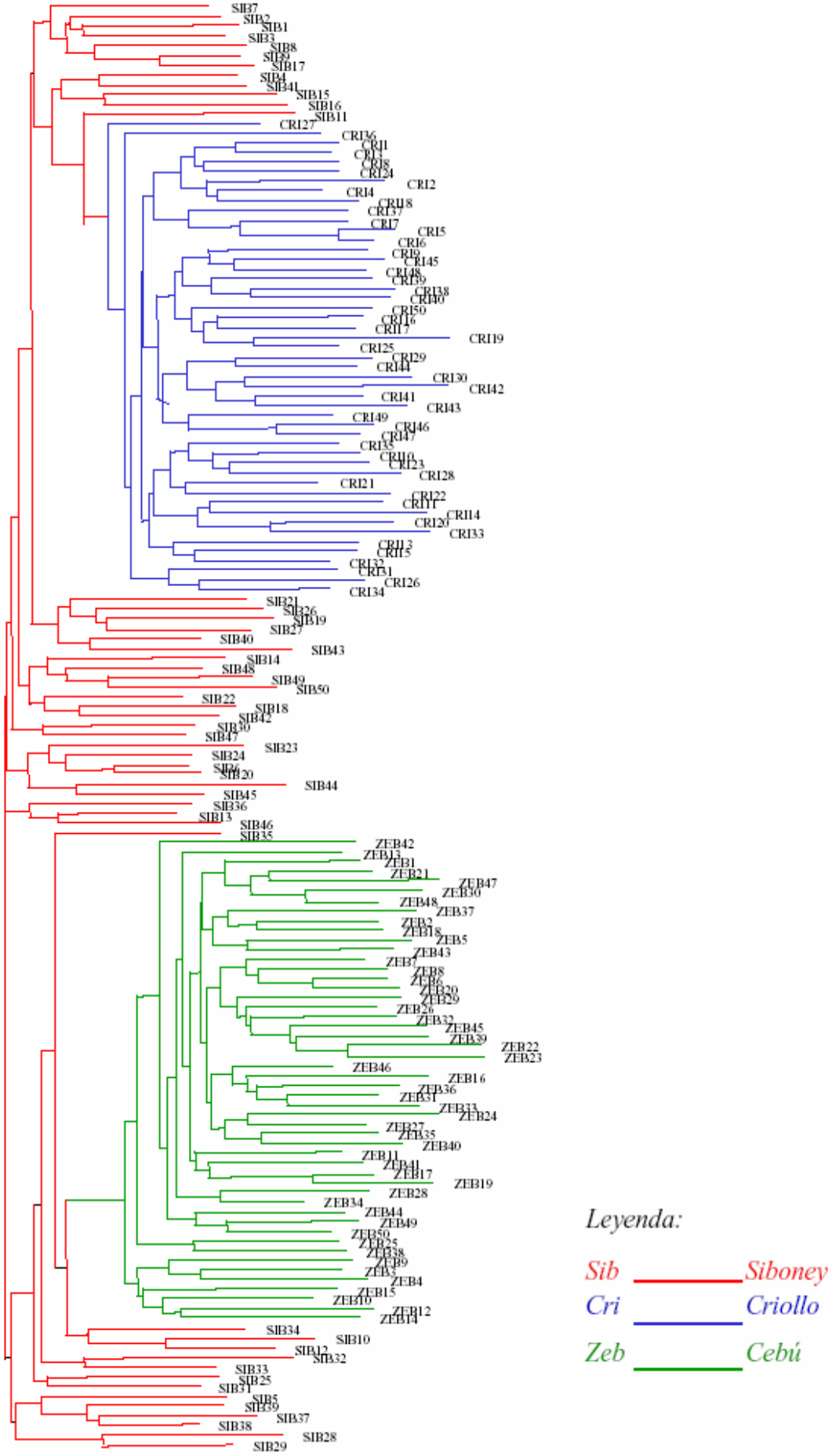
Locus: TGLA53

Población	Alelos																			
	152	156	158	160	162	164	166	168	170	172	174	176	180	182	184	188	194	200	Hobs	Hesp
Cebú	0.000	0.010	0.030	0.360	0.180	0.000	0.050	0.180	0.090	0.070	0.020	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.860	0.797
Siboney	0.000	0.000	0.000	0.020	0.090	0.060	0.250	0.250	0.050	0.030	0.080	0.030	0.010	0.010	0.060	0.020	0.020	0.020	0.940	0.856
Criollo	0.191	0.000	0.117	0.372	0.096	0.085	0.021	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.032	0.064	0.011	0.000	0.000	0.000	0.745	0.797

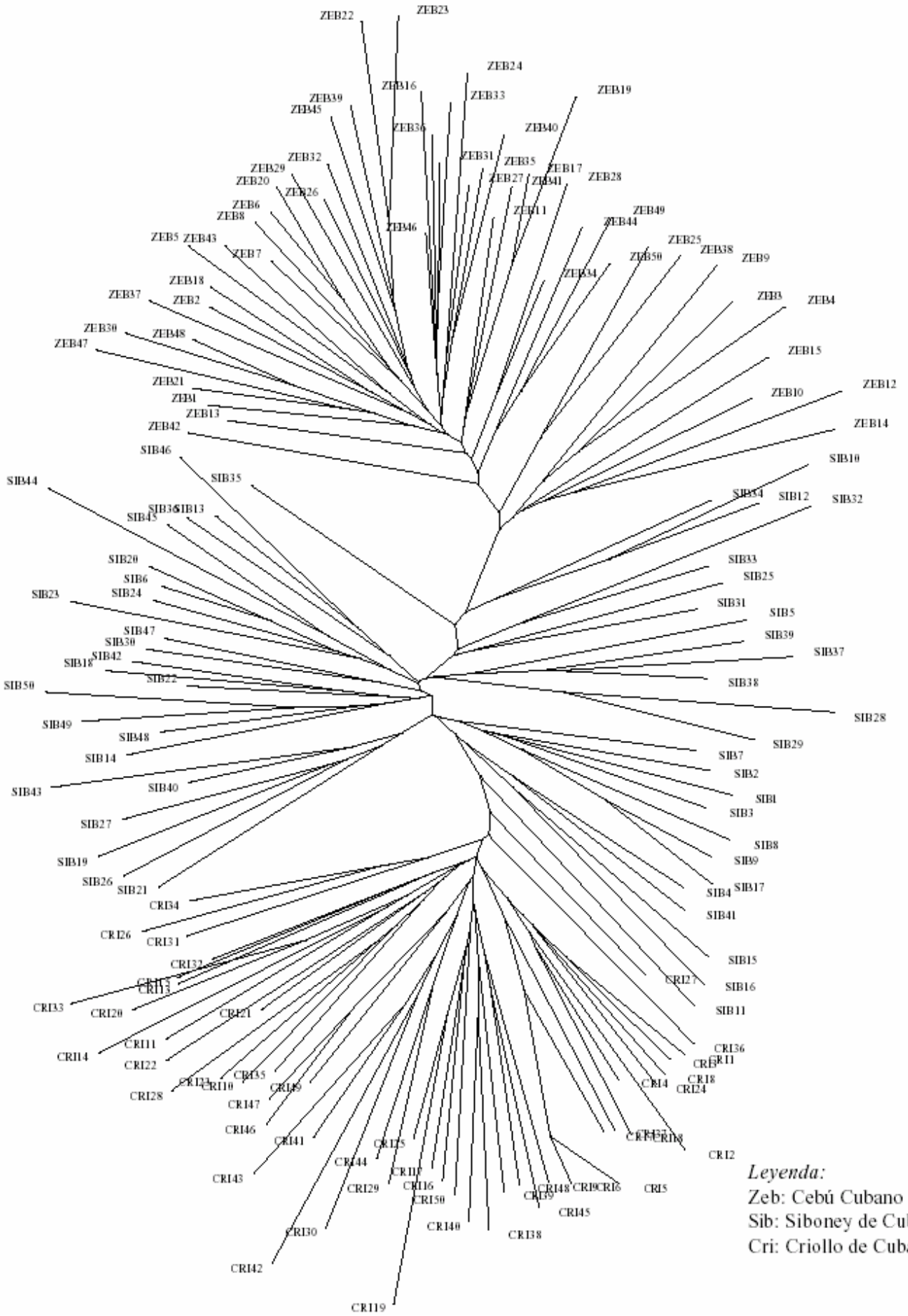
Locus: SPS115

Población	Alelos								
	242	244	246	248	250	252	256	Hobs	Hesp
Cebú	0.170	0.400	0.130	0.180	0.000	0.000	0.120	0.560	0.755
Siboney	0.050	0.730	0.060	0.150	0.000	0.000	0.010	0.320	0.443
Criollo	0.011	0.457	0.106	0.149	0.191	0.032	0.053	0.660	0.724

Anexo X.5.1. Representación gráfica (análisis de conglomerados) de las relaciones entre individuos



Anexo X.5.2. Representación gráfica radial de las relaciones entre individuos



Leyenda:
Zeb: Cebú Cubano
Sib: Siboney de Cuba
Cri: Criollo de Cuba