

Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas

O. Uffo¹, I. Martín-Burriel², S. Martínez¹, R. Ronda¹, R. Osta², C. Rodellar² & P. Zaragoza²

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA),

San José de las Lajas, apartado 10, CP 32 700, La Habana, Cuba

²Laboratorio de Genética Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza,
Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza, España

Resumen

En el presente estudio se presentan los primeros resultados de la determinación de la estructura genética de tres poblaciones de ganado bovino autóctono cubano: Criollo de Cuba, Cebú Cubano y Siboney de Cuba, para los *loci* de seis proteínas lácteas (CASA1, CASAB, CASA2, CASK, LAA y LGB). Se analizaron un total de 150 individuos (50 por cada raza), mediante análisis de ADN por PCR-RFLP. Se calcularon las frecuencias alélicas para cada *locus* así como condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg. Fueron identificados los alelos CASA1^C y LAA^A como evidencia de la presencia de genes de *Bos indicus* en las tres poblaciones cubanas. Se comprobó la existencia de elevada variabilidad en cada población lo que constituye un elemento importante para trazar estrategias de mejoramiento y/o conservación genética.

calculated for each locus as well as conditions of Hardy-Weinberg equilibrium. The CASA1^C and LAA^A alleles were identified as evidence of the presence of *Bos indicus* genes in the three Cuban populations. It was proven that the existence of high variability in each population constitutes an important means to establish strategies for improvement and/or genetic conservation.

Abreviaturas:

CASA1: α_{s1} -caseina.

CASAB: β -caseina.

CASA2: $s2$ -caseina.

CASK: κ -caseina.

LAA: α -lactoalbúmina.

LGB: β -lactoglobulina.

Palabras clave: polimorfismo, PCR-RFLP.

Summary

The present study shows the first results of the genetic structure determination of three populations of Cuban autochthonous bovine livestock: Criollo de Cuba, Cebú Cubano and Siboney de Cuba, for the six major milk proteins loci (CASA1, CASAB, CASA2, CASK, LAA and LGB). A total of 150 individuals (50 for each population) were analysed, by means of DNA analysis by PCR-RFLP. The allelic frequencies were

Introducción

La selección en la especie bovina se ha basado principalmente en la mejora de caracteres cuantitativos como leche, grasa y proteínas controlados por múltiples *loci*. Si además tenemos en cuenta que para conseguir mejorar estos caracteres se actúa principalmente controlando los machos y que las medidas se hacen en individuos adultos, resulta sencillo entender que el progreso genético es lento y costoso.

Los avances producidos acerca del estudio de la importancia de algunos genes sobre

caracteres productivos, permite en este momento priorizar lo que podríamos llamar “*caracteres cualitativos*” relacionados especialmente con la calidad. Por otra parte, determinados marcadores se consideran herramientas fundamentales para conocer genes de interés económico como los denominados QTLs (Rodriguez-Zas *et al.*, 2002) de aplicación directa en los programas de mejora a través de la Selección Asistida por Marcadores (MAS) (Boichard, 1998; Kenelly *et al.*, 2000; Lara *et al.*, 2002; Grisat *et al.*, 2002; Brunner *et al.*, 2003).

Las proteínas de la leche han sido muy investigadas en países del continente Americano, por su gran potencial de uso en este tipo de Selección Asistida por Marcadores, así como para la caracterización y diferenciación de poblaciones. (Golijow *et al.*, 1999; Kemenes *et al.*, 1999; Lara *et al.*, 2002).

Las proteínas lácteas bovinas incluyen cuatro caseínas (α_{s1} , β , α_{s2} , κ -caseínas) y dos proteínas séricas (α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina), cada una de las cuales muestra como mínimo dos variantes genéticas (Eigel *et al.*, 1984). Se han publicado numerosos estudios de asociación de algunas de estas variantes con las características tecnológicas de la leche (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1986; Grosclaude, 1988; Aleandri *et al.*, 1990; Formaggioni *et al.*, 2000). También han sido identificadas variantes genéticas de dichas proteínas que son típicas de razas específicas. Así la variante A de la α -lactoalbúmina se considera como marcador racial de ganado *B. indicus* (Threadgill y Womack, 1990).

El genotipo de las proteínas lácteas hoy puede determinarse a partir de distintos tipos de muestras de las que se puede obtener ADN y por distintas técnicas de genética molecular (PCR/RFLP, SSCP, SNPs,...) puede determinarse el genotipo de todos los animales sin distinción de sexo, edad o estado fisiológico. Esto supone una gran herramienta pues podemos obtener la información de los machos desde su

nacimiento o incluso en estado embrionario (Osta, 1994).

En el área de Centroamérica y el Caribe no existe abundante información referente a la caracterización por técnicas molecular de rebaños autóctonos. Recientemente se han publicado trabajos de caracterización de diferentes ganados criollos de Latinoamérica que contribuyen al conocimiento del potencial genético de los mismos y brindan la posibilidad de realizar estudios de comparación con sus ancestros europeos (Bonvillani *et al.*, 2000; Veli *et al.*, 2004). En Cuba se han desarrollado estudios de polimorfismo bioquímico a nivel proteico (Fernández, 1980; Pérez-Beato y Fernández, 1981; Pérez-Beato y Granado, 1981; Ronda *et al.*, 1981; Gutiérrez *et al.*, 1989), en las razas bovinas precursoras de nuevos cruzamientos.

En Cuba se ha trabajado para incrementar la potencialidad productiva lechera del ganado bovino existente en el país y para desarrollar paralelamente una explotación adecuada a las condiciones tropicales. Para ello, se han mantenido núcleos de animales identificados como razas autóctonas resistentes al ambiente cálido y húmedo del trópico como el Criollo de Cuba (*Bos taurus*) y el cebú Cubano (*Bos indicus*), 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.

Estas poblaciones autóctonas suponen una fuente de información genética que hoy es desconocida y que resulta esencial para los estudios de caracterización genética así como para los estudios de diferenciación y evolución con otras poblaciones.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar la estructura genética de las razas Criollo de Cuba, Cebú Cubano y Siboney de Cuba a través de los *loci* de seis proteínas lácteas (αs_1 -caseina, β -caseina, αs_2 -caseina, κ -caseina, α -lactoalbúmina y α -lactoglobulina).

Materiales y Métodos

Un total de 150 muestras pertenecientes a las razas Criollo de Cuba, Cebú y Siboney de Cuba fueron analizadas en el presente estudio. De cada raza se tomaron 50 muestras intentando que la selección se realizara al azar. Todas estaban ubicadas en dos empresas genéticas del oeste de La Habana. De las razas cebú y Criollo el total de las muestras provenían de hembras en edad reproductiva, mientras que del Siboney se tomaron, además de las hembras, ocho machos de los que se encontraban en prueba de progenie.

El ADN fue extraído de sangre periférica (Osta, 1994) y de semen en el caso de los individuos machos de la raza Siboney (Lien *et al.*, 1993). Las muestras de ADN fueron tipificadas usando el método PCR/RFLP. Concretamente para la amplificación se utilizó el procedimiento propuesto por los siguientes autores: α_{s1} -caseína (Lien *et al.*, 1993), β -caseína (Medrano y Sharow, 1991), α_{s2} -caseína, κ -caseína y α -lactoalbúmina (Osta, 1994) y β -lactoglobulina (Medrano y Aguilar-Cordova, 1989). Para ello se preparó una mezcla de reacción que contenía: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1,5 mM MgCl₂, 0,1% de Triton X-100, 0,2 mM de dNTPs, 75 pmol de cada uno de los oligonucleótidos específicos para cada caso y una unidad de la Taq Polimerasa (Promega) en un volumen final de 50 μ l.

La digestión fue realizada con distintos enzimas de restricción (Tabla 1). Para cada reacción se tomaron 10 μ l del producto PCR en un volumen final de 15 μ l, con 1U de cada

enzima, 1,5 μ l 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 37°C durante 3h (Osta, 1994). Los fragmentos de restricción fueron separados en geles de agarosa al 3% en buffer TBE 0,5x y teñidos con bromuro de etidio (0,5 mg/ml).

Para la caracterización genética de cada una de las poblaciones se utilizó el programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1989).

Resultados y Discusión

Variación intra-raza. Análisis de *loci* individuales

El análisis de los *loci* de las proteínas lácteas en las poblaciones estudiadas muestra la presencia de los alelos más frecuentes en la mayoría de las poblaciones bovinas. Todos los *loci* fueron polimórficos en las tres razas excepto el *locus* CASA2. En todos los casos los *loci* fueron dialélicos. Las frecuencias alélicas se muestran en la tabla 2. A continuación pasamos a comentar los resultados para cada uno de los *loci* individualmente.

α_{s1} -caseína

El *locus* CASA1 mostró dos alelos CASA1^B y CASA1^C, con elevadas frecuencias génicas, diferentes en las tres razas. El alelo CASA1^C presentó una frecuencia muy elevada (0,95)

Tabla 1. Enzimas de restricción para cada fragmento de proteína amplificado.

Locus	Enzima
CASA1	<i>HphI</i>
CASB	<i>MspI</i>
CASA2	<i>MnII</i>
CASK	<i>HindIII</i>
LAA	<i>MspI</i>
LGB	<i>HaeIII</i>

en el ganado Cebú, e inferior en Siboney (0,64) y en Criollo (0,58). Estas altas frecuencias no son comunes en las razas del género *Bos taurus*, y nuestros resultados son 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 (Osta, 1994; Erhardt, 1993 y 1996; Ikonen *et al.*, 1996). Existen algunas excepciones como Jersey, Guernsey, Normande, Italian Brown, Reggiana y Mondenese con valores inferiores a 0,75-0,85 (Grosclaude *et al.*, 1976). Similares a estos resultados fueron los obtenidos en 10 razas de ganado autóctono portugués por Beja-Pereira *et al.*, (2002) en las que la frecuencia del alelo CASA1^B varían entre 0,58 y 0,80. Litwiñczuk y Król (2002) en un estudio llevado a cabo en ganado de carne (Limousine, Hereford y Simmental) encontraron frecuencias alélicas similares a las observadas en *Bos indicus* para el locus CASA1.

Los valores de frecuencias para el alelo CASA1^C tanto en el Criollo Cubano como en

el Siboney confirman la presencia de genes *Bos indicus* en su genofondo. En el primero es una evidencia de que en algún momento este fue cruzado con ganado Cebú y en el segundo son el resultado de la presencia del Cebú en la creación de la raza. Así, se puede considerar este alelo como marcador del ganado acebiado cubano.

β -caseína

Las tres razas estudiadas mostraron dos alelos en el locus CASB, siendo el alelo más frecuente CASB^A (0,90 a 0,69, tabla 2). Estos resultados coinciden con los descritos por Escoda *et al.*, (1981) quienes encontraron frecuencias muy elevadas del alelo CASB^A en la raza Carora venezolana y en un grupo de animales Cebú, en el cual este alelo estaba prácticamente fijado ($v=0,99$). Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Osta (1994) en razas españolas con una frecuencia del alelo CASB^B baja (de 0,03 a 0,10), excepto en Parda Alpina en que la

Tabla 2. Frecuencias alélicas de las proteínas lácteas α_{s1} -caseína, β -caseína, α_{s2} -caseína, κ -caseína, α -alactoalbúmina, β -lactoglobulina en tres razas bovinas cubanas.

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

frecuencia de CASB^B fue algo superior (0,37). Van Eenennaam y Medrano, (1991) y Litwinzuk y Krol, (2002) encontraron valores similares en ganado Holstein. La diferencia entre las variantes A y B de esta proteína ha sido muy estudiada ya que el alelo (CASB^B) proporciona a la leche características idóneas para la producción de quesos (Jacob y Puhan, 1992).

α_{s2} -caseína

Para este *locus* el alelo CASA2^A resultó fijado en las tres razas cubanas analizadas, como ocurre en la población española Rubia Gallega (Osta *et al.*, 1995). Estos mismos autores señalaron que en las razas Parda Alpina, Asturiana de los Valles y Frisona el alelo CASA2^A fue muy frecuente (0,93-0,99), observándose valores ligeramente superiores en razas autóctonas francesas Montbéliarde y Vosgienne (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 ($v=0,991$) y Limpurger alemana ($v=0,984$).

κ -caseína

La tipificación del *locus* CASK mostró dos alelos en las tres razas estudiadas. El alelo predominante fue CASK^A, con valores de frecuencias de 0,70 en Criollo, 0,78 en Siboney y 0,84 en Cebú (Tabla 2). 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) describieron frecuencias elevadas de la variante A en ganado Cebú ($n=0,90$) y Lara *et al.* (2002) encontraron frecuencias de 0,78 en ganado Pantaneiro.

En distintos estudios de caracterización de razas bovinas se ha observado que el alelo CASK^B presenta mayores frecuencias en razas originadas de *Bos taurus* que en las de

Bos indicus (Backer and Manwell, 1980, Golijow *et al.*, 1996, Del Lama y Zago, 1996, Tambasco, 1998, Kememes *et al.*, 1999, de Lama *et al.*, 2002). En las poblaciones cubanas analizadas aquí este alelo aparece con valores de 0,30 en Criollo y 0,22 en Siboney, las que se encuentran en el rango de 0,34 a 0,49 descrito para la mayoría de las razas *Bos taurus* y de 0,07 a 0,09 en razas *Bos indicus*.

En el ganado Cebú investigado hasta el momento predomina la variante A de esta proteína, con valores de frecuencia elevadas (0,84) (Escoda *et al.*, 1981), con lo que concuerdan nuestros resultados. Beja-Pereira *et al.* (2002) encontraron en ganado autóctono portugués el alelo CASK^A más frecuente en 8 de las 10 razas analizadas; en las razas Mirandesa y Marinhoa el alelo CASK^B mostró frecuencias de 0,75 y 0,95, respectivamente, lo cual atribuyen a la deriva genética dada por la dispersión geográfica de esos rebaños.

α -lactoalbúmina

Las frecuencias génicas observadas son intermedias en las tres razas (0,56 a 0,61, tabla 2). La frecuencia tan alta del alelo LAA^A ($n=0,39-0,44$) 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 español 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 americano, 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 LAA^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 LAA^A ($n=0,40$). Consideramos que este es un elemento típico que caracteriza y distingue nuestro ganado autóctono de las razas lecheras europeas que presumiblemente le dieron origen, evidenciando una vez más la presencia de genes *Bos indicus* en nuestras razas, por lo que se puede utilizar también la variante A de la α -lactoalbúmina como marcador racial para la caracterización del ganado cubano. Esto concuerda con el hecho de que en algunas de 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 acebados, y más específicamente en la raza Brahman asiática.

β -lactoglobulina

El alelo LGB^B de esta proteína aparece con frecuencias similares en los tres rebaños analizados (Siboney: 0,80, Cebú: 0,76 y Criollo: 0,70, tabla 2). En el caso del Criollo, estos valores fueron semejantes a los descritos por Pérez-Beato y Fernández (1981).

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 ($n=0,93$) y en siete de las 10 razas autóctonas portuguesas analizadas por Beja-Pereira *et al.*, (2002). Litwiñczuk 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 ($n=0,650$).

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 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 el aspecto importante a considerar de esta proteína, para su empleo como marcador para la mejora, debido al efecto que se le atribuye al alelo LGB^B sobre la calidad de la leche.

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 ($P_{0.95}$) e índice de fijación (F): que se muestran en la tabla 3. 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 ejercida sobre los rebaños estudiados que originen índices de consanguinidad (F) con valores negativos; aunque estos no son significativamente diferentes de cero.

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 aparezcan 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.

Utilizando los valores de las frecuencias alélicas se determinaron las posibles desviaciones de las proporciones de Hardy-Weinberg, 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 (Tabla 4).

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

Tabla 3. Valores de heterocigosidades medias observada (*Hobs*) y esperada (*Hesp*), número medio de alelos (*A*), porcentaje de *loci* polimórficos ($P_{0.95}$) y coeficientes de fijación (FC) en tres razas bovinas cubanas para los *loci* de las proteínas lácteas.

	Cebú	Siboney	Criollo
<i>Hobs</i>	0,230 (0,100)	0,355 (0,103)	0,344 (0,086)
<i>Hesp</i>	0,211 (0,076)	0,340 (0,074)	0,334 (0,081)
<i>A</i>	1,8 (0,2)	1,8 (0,2)	1,8 (0,2)
$P_{0.95}$	66,7%	83,3%	83,3%
FC	-0,09	-0,04	-0,03

Tabla 4. Valores de coeficiente de consanguinidad por *locus*.

	Valores de F por <i>locus</i>		
	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

** $P<0,05$.

*** $P<0,001$.

loci en desequilibrio, donde las desviaciones pueden tener su origen en el hecho de que los animales son provenientes de un cruzamiento y que por los efectos de la selección natural hayan sobrevivido los individuos más resistentes y adaptados de la población, posiblemente los heterocigotos (Kidd *et al.*, 1980), insertado en esta población también se observan valores de heterocigosidades más elevados.

Conclusiones

En las poblaciones bovinas estudiadas existen alelos cuyas frecuencias génicas permiten establecer un patrón racial molecular, característico para cada una de ellas y que pueden ser utilizados como marcador de las razas provenientes de *B. indicus*.

Consideramos que existe una alta variabilidad genética en el Criollo de Cuba, en el Cebú Cubano y el Sibonmey de Cuba, importante para el diseño y control de los programas nacionales de selección genética.

Lista de Referencias

- Aleandri R, L.G. Buttazzoni, J.C. Schneider, A. Carili & R. Davoli.** 1990. The effects of milk protein polymorphism on milk components and cheese-producing ability. *J. Dayri Sci.* 73: 241-255.
- Barker, A.C.M. & C. Manwell.** 1980. Chemical classification of cattle. I breed groups. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* 11: 127-150.
- Beja-Pereira A., G. Erhardt, C. Matos, L. Gama & N. Ferrand.** 2002. Evidence of the geographical cline of casein haplotypes in Portuguese cattle breeds. *Animal Genetics*, 33(4): 295.
- Bonvillani A.G, M.A. Di Renzo & I.N. Tiranti.** 2000. Genetic polymorphism of milk protein loci in Argentinian Holstein cattle. *Genet. Mol. Biol.*, vol. 23, no. 4, 819-823. ISSN 1415-4757
- Bouchard D.** 1998. QTL detection with genetic markers in dairy cattle: a review. *Proc. 49th annual Meeting of the European Association for Animal Prduction*. Warsaw. Poland.
- Bouzat J.L., G. Giovambattista, C.D. Golijow, F.N. Dulout & M.M. Lojo.** 1999. Conservation genetics of native breeds: the Argentine Creole Cattle. *Interciencia* 23: 151-157.
- Del Lama S.N. & M.A. Zago.** 1996. Identification of κ -casein and β -lactoglobulin genotypes in Brazilian *Bos indicus* and *Bubalus bubalis* population. *Braz. J. Genet* 19: 73-77.
- Eigel W.N, J.E Butler, C.A. Erstrom, H.M. Farrel, V.R. Harwalker, R. Jenness & R. Whitney.** 1984. Nomenclature of protein of cow's milk: fifth revision. *J. Dayri Sci*, 67: 1599-1631.
- Erhardt G.** 1996. Detection of a new κ -casein variant in milk of Pinzgauer cattle. *Anim. Genet.*, 27: 105-107.
- Erhardt G.** 1993. A new α_{S1} -casein allele in bovine milk and its occurrence in different breeds. *Anim. Genet.* 24: 65-66.
- Escoda A.B, L.O. Alvarez & S. Yerez.** 1981. Estudio de los polimorfismos genéticos de las proteínas de la leche producida en algunas haciendas de la zona de Carora. *Rev. Facultad Agronomía (LUZ)*, 6(2): 714-716.
- Fernández M.H.** 1980. Asociación de los genotipos de amilasa con dos caracteres de importancia económica en vacas R₁ (Holstein-Cebú-Cebú), *Revta. Cub. Cienc. Veter.* 155-160.
- Golijow C.D., G. Giovambattista, M.V.R. Poli, F.N. Dulot & M.M. Lojo.** 1999. Genetic variability and population structure in loci related to milk production traits in native Argentine Creole and Commercial Argentine Holstein cattle. *Braz. J. Genet*, 22: 395-398.

- Grosclaude F., M.F. Mahé, J.C. Mercier, J. Bonnemaire & J.H. Teissier.** 1976. 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.
- Grosclaude F.** 1988. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relation avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait. Inra Prod. Anim. 1(1): 5-17.
- Gutiérrez M., O. Pérez-Beato, M. Morais & M. Milanés.** 1989. Características adaptativas de vacas Criollo de Cuba. Rev. Salud Anim. 11(2): 155-160.
- Ikonen T., O. Ruottinen, G. Erhardt & M. Ojala.** 1996. Allele frequencies of the major milk protein in the Finish Ayrshire and detection of a new κ -casein variant. Anim. Genet., 27, 179-181.
- Jacob E. & Z. Puhan.** 1992. Technological properties of milk as influenced by genetic polymorphism of milk proteins. A review. Int. Dairy Journal. 2: 157-178.
- Kememes P.A., L.C.A. Reginato, A.J.M. Rosa, I.V. Parker, G.A. Razook, L.A. Figueredo, N.A. Silva, M.A.L. Etchegaray & L.L. Coutinho.** 1999. κ -casein, β -Lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzerá, Camcu, Charolais, Canchin an Santa Gertrudis cattle. Genet. Mol. Biol. 22: 539-541.
- Kidd K.K., W. H. Stone, C. Crimella, M. Carenzi, M. Casati & G. Rognoni.** 1980. Immunogenetic and population genetic analyses of Iberian cattle. Anim Blood Groups Biochem Genet., 11(1): 21-38.
- Lara M.A.C, L.T. Gama, G. Bufarrah, J.R.B. Sereno, E.M.L. Celegato & U.P. de Abreu.** 2002. Genetic polymorphism at the κ -casein locus in Pantaneiro cattle. Arch. Zootec. 51: 99-105.
- Lien S., S. Kaminski, P. Alestrom & S. Rogne.** 1993. A simple and powerful method for linkage analysis by amplification of DNA from single sperm cell. Genomics, 16(1): 41-44.
- Litwińczuk Z & J. Król.** 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.
- Medrano J.F. & L. Sharow.** 1991. Genotyping of bovine β -casein loci by restriction site modification of polymerase chain reaction (PCR) amplified genomic DNA. J. Dairy Sci., 74 (suppl), 282.
- Medrano J.F. & E. Aguilar-Córdova.** 1990. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -Lg genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. Animal Biotechnology, 1(1): 73-77.
- Ng-Kwai-Hang K.F., A.G. Monardes & J.F. Hayes.** 1990. Association between genetic polymorphism of milk protein and production traits during three lactations. J. Dairy Sci., 73: 3414-3420.
- 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.
- Osta R., S. Marcos, I. Martín, E. García-Muro & P. Zaragoza.** 1995. Caracterización genética de proteínas lácteas en ganado vacuno mediante análisis de DNA. VI Jornadas sobre producción animal. Vol. Extra, N°16, Tomo I.
- Pérez-Beato O. & A. Granado.** 1982. El alelo α -La^A como marcador genético en el cruce Cebú Cubano- Holstein Friesian. Rev. Salud Animal, 4(1): 145-148.

- Pérez-Beato O. & M.H. Fernández.** 1981. Distancia genética y heterocigosis en ganado tropical. Reporte preliminar. Rev. Salud Anim. 3(2): 161-168.
- Rahali V. & J.L. Menard.** 1991. Influence des variants génétiques de la lactoglobuline et de la κ-caseine sur la composition du lait et son aptitude fromagère. Lait 71: 275-297.
- Ripoli, MV., G. Giovambattista, J.C. De Luca, F. Labarta, J. Echenique, S. Casas, E. Carrizo, M. Sanchez Mera & F.N. Duluot.** 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 κ-caseína, α_1 -caseína y prolactina. Arch Zootec. 48(181): 101-106.
- Rodriguez-Zas S.L., B.R. Southey, D.W. Heyen & H.A. Lewin.** 2002 Detection of quantitative trait loci influencing dairy traits using a model for longitudinal data, J. Dairy Sci. 85: 2681-2691
- Sánchez A., A. Betancourt & C. Gutiérrez.** 1977. Cromosomas del ganado Criollo. Congreso Panamericano de Veterinaria y Zoonosis. Colombia.
- Sartore G. & 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.
- Swofford D.L & R.B. Selander.** 1989. BIOSYS-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematic. Release 1.7. Champaign, IL, Illinois Natural History Survey.
- Tambasco M.D.** 1998. Detecao de polymorphism dos genes de κ-casina, β-lactoglobulina em animais da raca Jersey. Monografia: Universidad Federal de Sao Carlos. S.P.
- Threadgill D.W & J.E. Womack.** 1990. Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. Nucl. Acid Research, 18, 6935-6942.
- Uffo O. & S. Martínez.** 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 24(1): 22-26
- Van Eenennaam A.L. & J.F. Medrano.** 1991. Differences in allelic protein expression in milk of heterozygous κ-casein cows. J. Dairy Sci., 74: 1491-1496.
- Veli E., E. Rivas, V. Rivas, M. Verastegui & S. Pastor.** 2004, Evaluacion de la variabilidad de genes de kappa caseina en poblaciones de bovinos criollos de ticlos y huaschao, región ancash online en: www.inia.gob.pe/genetica/zoogeneticos/Articulo_V_Congreso.pdf
- Zardowny D & U. Kühnlein.** 1990. The identification of the κ-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. Theor. Appl. Genet., 80: 631-634.