POLIMORFISMO DE LOS GENES k-CASEINA, β-LACTOGLOBULINA Y α-LACTOALBUMINA EN RAZAS BOVINAS CRIOLLAS COLOMBIANAS

JAIME ANIBAL ROSERO ALPALA

CODIGO: 7407002

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE POSGRADOS

PALMIRA

2009

POLIMORFISMO DE LOS GENES k-CASEINA, β-LACTOGLOBULINA Y α-LACTOALBUMINA EN RAZAS BOVINAS CRIOLLAS COLOMBIANAS

JAIME ANIBAL ROSERO ALPALA

CODIGO: 7407002

Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar el titulo de

Magister en Ciencias Agrarias, con énfasis en Producción Animal Tropical.

DIRECTORA:

LUZ ANGELA ALVAREZ F. ***Zoot., MSc., Ph.D.***

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE POSGRADOS

PALMIRA

2009

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
LINEA DE INVESTIGACIÓN PRODUCCIÓN ANIMAL TROPICAL

En Palmira a los 07 días del mes de Diciembre de 2009, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores HEIBER CARDENAS y JAVIER BENAVIDES

Para calificar la Tesis de Grado de:

JAIME ANIBAL ROSERO ALPALA

Titulada:

"Polimorfismo de los genes k-caseína, β-lactoglobulina y α-lactoalbumina en razas bovinas criollas colombianas" bajo la dirección de la profesora Luz Ángela Álvarez Franco.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los docentes HEIBER CARDENAS y JAVIER BENAVIDES, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA X

REPROBADA ____

HEIBER CARDENAS

JAVIER A. BENAVIDES M.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

SECRETARÍA

RESOLUCION No. 137 DE 2009

(Acta No. 023 de diciembre 11)

"Por la cual se otorga distinción **MERITORIA** al Trabajo de Tesis del estudiante **JAIME ROSERO ALPALA,** del Programa de Maestría en Ciencias Agrarias"

EL CONSEJO DE FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, SEDE PALMIRA,
en uso de sus atribuciones legales, y

CONSIDERANDO:

Que según el literal d, Artículo 57 del Acuerdo 008 de 2008 del Consejo Superior Universitario, los Consejos de Facultad podrán otorgar la distinción MERITORIA a las tesis de Especialidades, Maestrías o Doctorados que hayan sido propuestos unánimemente por los jurados.

Que los jurados, Doctores Heiber Cárdenas y Javier Antonio Benavides, sustentaron la solicitud de distinción MERITORIA ante el Consejo de Facultad de Ciencias Agropecuarias, del Trabajo de Tesis titulado: "**Polimorfismo de los genes κ-caseína, β-lactoglobulina y α-lactoalbúmina en razas bovinas criollas colombianas**", realizado por el estudiante de Maestría en Ciencias Agrarias, Línea de Investigación Producción Animal Tropical **JAIME ROSERO ALPALA,** bajo la dirección de los profesores Luz Ángela Álvarez y Jaime Eduardo Muñoz Flórez.

Que el Consejo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en su sesión No. 022 realizada el 30 de noviembre de 2009, analizó la solicitud y encontró argumentos académicos válidos para otorgar la distinción.

RESUELVE:

Artículo 1º: Otorgar distinción MERITORIA al Trabajo de Tesis titulado: ": "**Polimorfismo de los genes κ-caseína, β-lactoglobulina y α-lactoalbúmina en razas bovinas criollas colombianas**", realizado por el estudiante de Maestría en Ciencias Agrarias, Línea de Investigación Producción Animal Tropical **JAIME ROSERO ALPALA.**

Artículo 2º: Entregar la presente Resolución en Nota de Estilo al estudiante de. Maestría en Ciencias Agrarias, Jaime Rosero Alpala.

COMUNÍQUESE Y CUMPLASE

Dada en la ciudad de Palmira, a los once (11) días del mes de diciembre de 2009.

MARIO AUGUSTO GARCÍA DÁVILA
Decano

VICTORIA EUGENIA QUINTERO
Secretaria de Facultad

Dedicatoria

Ésta investigación la dedico de todo corazón al noble trabajo de los criadores de ganado criollo y en general a todos los campesinos, quienes a pesar de las asperezas ambientales, tecnológicas y violencia en Colombia siguen cumpliendo su Inconmensurable labor

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme ser su herramienta para hacer su voluntad y misionero por un mundo mejor.

A los Profesores; LUZ ANGELA ALVAREZ y JAIME EDUARDO MUÑOZ, por su valiosa amistad y constante colaboración en la dirección de esta investigación.

A los criadores de ganado criollo colombiano y otras persona relacionadas a este tarea: Juan Manuel Gonzales y Julia Arias (Blanco Orejinegro), Rafael Torrijo y Fransico Ramon (Caqueteño), Germán Martínez (Sanmartinero), Arturo Cabrera (Costeño con cuernos), Rodrigo Salas (Romosinuano), Carlos V Duran (Lucerna), José Antonio Velásquez (Velásquez) y Pablo Canay y Arcesio Salamanca (Casanareño)

A quienes me acompañaron en las labores de muestreo del ganado criollo en las diferentes regiones de Colombia; Julia Carvajal, Leonardo Paz, NiniJohana Vivas, Viviana Soto, Andrés Posso y Darwin Hernández.

A quienes con su amistad hicieron sentir en familia mi paso por el laboratorio de biología molecular; Natalia Serna, Andrés M. Posso, Juliana Cuetia, Ana Morillo, Yacenia Morillo, Adriana Díaz, Mónica Martínez, Margarita Morales, Fredy Betancur y demás compañeros del laboratorio.

Por la financiación de esta investigación; al Grupo de Investigación en Diversidad Biológica, Grupo de Investigación en Recursos Zoogenéticos y a la Dirección de investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia. Palmira-DIPAL. Al programa de becas Estudiantes sobresalientes de posgrado Universidad Nacional de Colombia y al Programa de becas estudiantes sobresalientes de posgrado. Escuela de posgrados UNAL-Palmira por la financiación de mis estudios.

A mi Padre Segundo Rosero y Madre María Alpala y mis hermanas; Olga, Alba, Gladys, Amparo, Deisy y Mairely. Por ser el estandarte de mi vida.

A mis amigos y compañero de estudio por los momentos inolvidables que he vivido con ustedes; Leonardo Paz, Juliana Carvajal, Ana Morillo, Yacenia Morillo, Ifigenia Hurtado, Diana Velásquez, Dora Tobar, Sandra Pulido, Ana Teresa Mosquera, Carlos Patiño y Oswaldo Puerto, Giovanni Lugo. A todos quien de alguna manera contribuyeron en mi formación académica, ética y moral en la consecución de este reto en mi vida…. Muchas gracias.

La facultad y los jurados de tesis

no se harán responsables de las ideas emitidas por el autor.

Articulo 24, resolución 04 de 1974.

CONTENIDO

Pag.

INTRODUCCION 16

1. REVISION DE LITERATURA 19

1.1 LAS RAZAS BOVINAS CRIOLLAS COLOMBIANAS.....19

1.2 BANCO DE ADN, COMO METODO DE CONSERVACION DE LOS RECURSOS ZOOGENÉTICOS. 26

1.3 LA LECHE BOVINA Y SUS COMPONENTES 26

1.4. LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE 28

1.4.1 Kappa-Caseína (κ-CN) 28

1.4.2 Beta-Lactoglobulina (β-LG) 30

1.4.3 Alpha-Lactoalbúmina (α-LA).....33

1.5 FRECUENCIAS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE LAS PROTEINAS DE LECHE EN DIFERENTES RAZAS BOVINAS. 34

2. MATERIALES Y METODOS 41

2.1 LOCALIZACION.....41

2.1.1Toma de muestras 41

2.1.2 Extracción de ADN.....41

2.1.3. Conformación del Banco de ADN 42

2.1.4 Marcadores genéticos.....42

2.1.5 Amplificación.....43

2.1.6 Genotipificación 45

2.1.7 Análisis De Datos.....46

3. RESULTADOS 47

3.1 BANCO DE ADN DEL GANADO CRIOLLO COLOMBIANO. 47

3.2 IDENTIFICACIÓN DE ALELOS 47

3.3 FRECUENCIA ALÉLICA DE *K*-CN. 47

3.4. FRECUENCIAS ALÉLICAS DE β-LG 54

3.5. FRECUENCIAS ALÉLICAS DE α–LA.....55

3.7. HETEROCIGOSIDAD OBSERVADA (H_O) y ESPERADA (H_e) y EQUILIBRIO HARDY WEINBERG (EHW). 58

3.8. DIFERENCIACIÓN Y ESTRUCTURA GENÉTICA 59

3.8.1 Análisis de Varianza Molecular.....59

3.8.2 Distancia genética.....63

3.9 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO 64

4. DISCUSION 65

4.1 FRECUENCIA ALÉLICA DE LOS GENES κ-CN, β-LG, α-LA.....65

4.2 DIVERSIDAD GENÉTICA.....75

4.3 DIFERENCIACIÓN Y ESTRUCTURA GENÉTICA 78

5. CONCLUSIONES 80

BIBLIOGRAFIA 83

INDICE DE CUADROS

Pag.

Cuadro 1. Frecuencia genética de los alelos de las proteínas de la leche en diferentes estudios en Norte América, Europa, África y Asia. 37

Continuación. Cuadro 1. Frecuencia genética de los alelos de las proteínas de la leche en diferentes estudios en Norte América, Europa, África y Asia. 38

Cuadro 2. Frecuencia genética de los alelos de las proteínas de la leche en diferentes estudios en Sur América, y el Caribe. 39

Continuación. Cuadro 2. Frecuencia genética de los alelos de las proteínas de la leche en diferentes estudios en Sur América, y el Caribe. 40

Cuadro 4. Marcadores genéticos usados, secuencia de los cebadores y tamaño de amplificado. 43

Cuadro 5. Composición de la solución de PCR para κ-CN, β-LA y α-LA 45

Cuadro 6. Distribución de las muestras de acuerdo con la raza y localización por sitio de muestreo del ganado criollo colombiano. N= numero de muestras. 49

Cuadro 8. Estadística descriptiva de κ-CN, β-LG y α-LA para las diez razas de ganado criollo y colombiano y dos razas comerciales: Número de muestras (N), Número promedio de alélos (NA) y promedio (NPA). 57

Cuadro 9. Valores estimados de Heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) para κ-CN, β-LG, α-LA, en diez razas de ganado criollo colombiano y dos razas comerciales e índice de fijación (FIS). 59

Cuadro 10. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) entre y dentro de diez razas de ganado criollo Colombiano y dos comerciales para tres loci.....60

Cuadro 11. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) entre y dentro de grupos; Criollos vs razas colombianas (sintéticas), Producción de leche vs Producción de carne, Andinos vs costa norte, Andinos vs Llanos, Costa norte vs Llanos, Criollos vs Brahman, Criollos vs Holstein. 62

Cuadro 12. Valores de distancia genética para el GCC y dos razas comerciales; Brahman y Holstein.....63

Cuadro 13. Desequilibrio de ligamiento entre genes pareados en GCC y en las razas comerciales Brahman (BRAH) y Holstein (HOLS).....64

INDICE DE FIGURAS

Figura. 1. Distribución de la población del ganado criollo colombiano en los censos del año 1999 y del año 2003 (Total por raza)……..21

Figura 2. Sitios de muestreo de las razas criollas colombianas…… 50

Figura 3. Patrones de corrida para siete variantes alélicas de k-CN en el GCC mediante SSCP……. 51

Figura 4. Patrones de corrida para dos variantes alélicas de β-LG (izquierda) y α–LA (derecha) en el GCC mediante SSCP……. 51

Figura 5. Distribución de frecuencias alélicas de k-CN en el ganado criollo colombiano y dos razas control comerciales……54

Figura 6. Distribución de frecuencias alélicas de β-LG en el ganado criollo colombiano y dos razas comerciales……. 55

Figura 7. Distribución de frecuencias alélicas de α–LA en el ganado criollo colombiano y dos razas comerciales. ……56

Figura 8. Comparación de la frecuencia de alelo de interés k-CN B en diferentes razas comerciales en Colombia y el GCC. …….. 66

Figura 9. Comparación de la frecuencia de alelo de interés k-CN B en diferentes razas comerciales en el mundo y el GCC. …….. 67

Figura 10. Comparación de la frecuencia de alelo de interés k-CN B en diferentes razas de Sur América y el Caribe y el GCC…..……68

Figura 11. Comparación de la frecuencia de alelo de interés β-LG B en diferentes razas a nivel mundial y el GCC. ……72

Figura 12. Comparación de la frecuencia de alelo de interés β-LG B en diferentes razas de Sur América y el Caribe y el GCC. ……73

Figura 13. Comparación de la frecuencia de alelo de interés α–LA B en diferentes razas de Sur América y el Caribe y el GCC. ……75

LISTA DE ABREVIATURAS

AMOVA	Análisis de varianza molecular
BON	Raza Bovina criolla Blanco orejinegro
BRAH	Raza Bovina control Brahman
CAS	Raza Bovina criolla Casanareño
CQT	Raza Bovina criolla Caqueteño
CCC	Raza Bovina criolla Costeño con cuernos
ChS	Raza Bovina criolla Chino Santandereano
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
FIS	Coeficiente de endogamia
FST	Coeficiente de diferenciación
He	Heterocigocidad esperada
Ho	Heterocigocidad observada
HOLS	Raza bovina control Holstein
HR	Humedad relativa
HV	Raza Bovina criolla Hartón del Valle
LUC	Raza Bovina colombiana Lucerna
N	Número de individuos
NA	Número de alelos
NPA	Número promedio de alelos
PCR	Técnica de amplificación de fragmentos de ADN denominada: Reacción en cadena de la polimerasa.
PCR-SSCP	Técnica molecular denominada: Reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismos conformacionales de cadena única
ROMO	Raza Bovina criolla Romosinuano
SM	Raza Bovina criolla Sanmartinero
TBE	Tris Borato EDTA, utilizado en la solución como conductor de la electricidad en la electroforesis
α-LA	Alpha-Lactoalbúmina
β-LB	Beta-Lactoglobulina
κ-CN	Kappa-Caseína
GCC	Ganado criollo Colombiano
QTL	Loci de una característica cuantitativa
PTA	Valor predicho de producción
VEL	Raza Bovina colombiana Velásquez

RESUMEN

Se tomaron 354 muestras de sangre de ocho razas bovinas criollas (30 individuos por raza): Blanco Orejinegro (BON), Caqueteño (CQT), Casanareño (CAS), Costeño con Cuernos (CCC), Chino Santandereano (ChS), Hartón del Valle (HV), Romosinuano (ROMO) y Sanmartinero (SM), dos colombianas Lucerna (LUC) y Velásquez (VEL) y dos controles Brahman (BRAH) y Holstein (HOLS). Con el fin de estimar la frecuencia, parámetros poblacionales mediante los genes de las proteínas de la leche: k-caseína, β -lactoglobulina y α-lactoalbúmina, se amplificó un fragmento de 453 pb para k-caseína (k-CN), 262 pb para β–Lactoglobulina (β-LG) y 166 pb para α-Lactoalbumina (α-LA). Los alelos se identificaron mediante la técnica PCR-SSCP. Se encontró mayor frecuencia para las variantes de k-CN A (0.39) y B (0.41), n comparación a I (0.038), G (0.095), A^1 (0.025), E (0.006) y N (0.01). El alelo de interés k-CN B presentó alta frecuencia en las razas CCC (0.81), ROMO (0.66), CQT (0.55), ChS (0.48), y VEL (0.43). La variante de interés B de β -LG fue encontrada en alta frecuencia en las razas: CQT (0.717), LUC (0.65), HV (0.68), ChS (0.633), ROMO (0.567) y CCC (0.533). Con excepción de BON, todas las razas criollas presentaron altos valores de frecuencia para el alelo B de α-LA. El valor de diversidad genética promedio (H_e) para el ganado criollo colombiano (GCC) fue de 0.476. Se observó entre las razas de GCC una diferenciación genética altamente significativa (F_{ST} = 0.077). Estos resultados sugieren que el GCC constituye un recurso genético que alberga gran diversidad genética en cuanto a proteínas de la leche.

Palabras clave: Marcadores moleculares, PCR-SSCP, proteínas leche, variantes genéticas, bovinos criollos.

ABSTRACT

354 blood samples from eight creole bovine breeds (30 individuals per breed): Blanco Orejinegro (BON), Caqueteño (CQT), Casanareño (CAS), Costeño con Cuernos (CCC), Chino Santandereano (ChS), Hartón del Valle (HV), Romosinuano (ROMO) and Sanmartinero (SM), two Colombians breeds Lucerna (LUC) and Velásquez (VEL) and two controls breeds Brahman (BRAH) and Holstein (HOLS) were evaluated. A fragment of 453 bp for k-casein (k-CN), 247 to 262 bp for β-lactoglobulin (β-LG) and 166 bp for α-lactalbumin (α-LA) were amplified. Alleles were identified by PCR-SSCP technique. More frequency was found for k-CN A (0.391) and B (0.46) variants, in comparison with I (0.038), G (0.095), A^1 (0.025), E (0.006) and N (0.006) variants. The k-CN B interest allele presented high frequency in CCC (0.81), ROMO (0.66), CQT (0.55), ChS (0.48), and VEL (0.43) breeds β-LG B interest variant was a high frequency in the CQT (0.717), LUC (0.65), HV (0.68), ChS (0.633), ROMO (0.567) and CCC (0.533) breeds. With exception of the BON breed, the creole breeds showed high values for the frequency of the B allele of α-LA. The average value of genetic diversity (H_e) for the Colombian creole cattle (GCC) was 0.476. A genetic differentiation highly significant between GCC breeds (FST = 0.077) was observed. These results suggest that the GCC constitutes a genetic resource that lodges a wide diversity in terms of milk proteins.

Key words: Molecular markers, PCR-SSCP, milk proteins, genetic variants, creole cattle.

INTRODUCCION

Colombia es considerado uno de los países más megadiversos en recursos zoogenéticos, puesto que en cada una de las regiones naturales y en las cuencas hidrográficas de los ríos Orinoco y Amazonas, prácticamente posee una raza bovina criolla (*Bos taurus*) adaptada. Tales razas son: el **Romosinuano** y **Costeño con Cuernos**, en la Costa Atlántica (zona Norte), el **Chino Santandereano** y el **Blanco Orejinegro** en la zona montañosa de clima medio, el **Hartón del Valle** en el Valle del Río Cauca, el **Sanmartinero** y el **Casanareño** en las planicies orientales u Orinoquia Colombiana (Martínez, 1992), el **Caqueteño** en la zona amazónica del Caquetá (MADR-ASOCRIOLLO, 2003) y entre los pocos esfuerzos genéticos de combinar razas europeas con ganados criollos están las razas sintéticas **Lucerna** y **Velásquez** (ASOCRIOLLO, 2007).

Los bovinos criollos son descendientes directos de los animales introducidos en la época de la conquista en 1493. Durante cuatro siglos abastecieron de carne, leche, vestido y trabajo a los colombianos, más tarde la necesidad de aumentar la producción conllevó a una importación desmedida de razas bovinas con mejores habilidades de producción pero con baja capacidad de adaptación al trópico, lo cual redujo dramáticamente la población criolla (Casas y Valderrama, 1998). Se estima que el 16 % de las especies de mamíferos y el 30% de las aves, corren peligro de extinción, sin embargo en términos absolutos, el número de razas en riesgo es mayor para las especies de mamíferos (881 razas) que para especies de aves (610 razas) (FAO, 2007).

La alta demanda de productos pecuarios en países en desarrollo, ha propiciado una inminente intensificación de los sistemas pecuarios dependientes cada vez más especies élite altamente productivas, a costa de una disminución de especies menos productivas pero genéticamente valiosas (FAO, 2003). .

Las colecciones o bancos de ADN, son una alternativa de conservación de recursos zoogenéticos (Egito *et al.,* 2005), puesto que se consideran la base para estudios y evaluaciones para genes de intres economico, cuyo destino final es generar alternativas económicas que contribuyan a proteger la seguridad alimentaria de países en desarrollo (Notter, 1999; FAO, 2003; Segura-Correa y Montes-Pérez, 2001).

Entre los genes de interés económico con alto potencial se encuentran los relacionados con las proteínas de la leche. La calidad de la leche está gobernada por factores ambientales como estado de lactancia, alimentación y manejo y factores genéticos asociados directamente con la proporción de las proteínas de la leche (caseínas) y las proteínas del suero (β-Lactoglobulina y α-lactoalbúmina) (Grasselli *et al.,* 1997; Heck *et al.,* 2009). Se ha encontrado que la variante B de k-caseína (k-CN) presenta alta asociación con el contenido de proteína en la leche y un efecto positivo sobre las propiedades de coagulación y producción de queso (Van-Eenennaam y Medrano, 1991a; Heck *et al*., 2009).

El genotipo BB de β-Lactoglobulina (β–LG) está asociado con un alto porcentaje de caseínas en la leche y mayor contenido de grasa y rendimiento quesero (Aleandri *et al.,* 1990; Caroli *et al*., 2009), mientras que el genotipo AA de β-LG con una alta producción de leche total (Ng-Kwai-Hang *et al.,* 1984). Por su parte en α–Lactoalbúmina (α-LA), se han identificado las variantes A y B (Farrell *et al.,* 2004); las vacas de ganado Holstein con la variante A presentan altos valores para producción de leche, proteína y grasa y las que tienen B muestran alto porcentaje de proteína y grasa (Bleck y Bremel, 1993).

Dichas características tiene implicaciones económicas a nivel mundial en ganados comerciales, la identificación de los alelos de interés en razas menos comunes es una alternativa perentoria. En cuanto los genes que afectan la calidad de la leche

se ha reportado trabajos en el ganado criollo Hartón del Valle (Díaz *et al,* 2006; Naranjo *et al*, 2007), pero nó en otras razas bovinas criollas colombianas.

Por consiguiente se pretende conformar un banco de ADN de una muestra representativa del ganado criollo colombiano GCC y determinar los parámetros poblacionales mediante tres genes de las proteínas de la leche k-caseína, β-lactoglobulina y α-lactoalbúmina, estimar la frecuencia y las diferencias en diez razas criollas, dos colombianas y dos foráneas para dichos genes mediante la técnica molecular PCR-SSCP.

1. REVISION DE LITERATURA

1.1 LAS RAZAS BOVINAS CRIOLLAS COLOMBIANAS

Las razas bovinas criollas son el producto de un largo proceso de selección natural a partir de los bovinos introducidos por Cristóbal Colón en el año de 1493. Los primeros bovinos criollos que llegaron a América arribaron a la isla La Española (hoy Santo Domingo) y de allí entraron a Colombia por Santa Marta formando el primer núcleo ganadero del país. Los descendientes de esas importaciones coloniales adquirieron características adaptativas de gran importancia, como tolerancia al calor y la humedad, resistencia a ciertas enfermedades infecciosas, alta eficiencia reproductiva y longevidad, lo cual incrementó su valor como recurso genético (López *et al.,* 2001; Pinzón, 1984; Vásquez, 2005). Las razas criollas han sido sometidas constantemente a cruzamientos graduales de absorción hacia ganado cebuino o taurino, ocasionando disminución en las poblaciones puras e introgresión con razas foráneas tanto *Bos taurus* como *Bos indicus* (Casas y Valderrama, 1998).

Colombia posee varias razas reconocidas como ganado criollo: Romosinuano (ROMO) y Costeño con Cuernos (CCC) en la Costa Atlántica, Blanco Orejinegro (BON) y Chino Santandereano (ChS) en la zona montañosa, Hartón del Valle (HV) en el Valle del río Cauca, Casanareño (CAS) y Sanmartinero (SM) en la Orinoquía y en la zona amazónica del Caquetá el Caqueteño (CQT) (Martínez, 1992; Martínez, 2004, MADR-ASOCRIOLLO, 2003). También, se reconocen dos razas colombianas formadas por cruzamiento con ganado criollo: la raza Velázquez en el departamento de Caldas y Lucerna en el Valle del Cauca (ASOCRIOLLO, 2007). Algunas de las características externas comunes en las razas criollas colombianas son el pelaje de color amarillo, excepto en el BON, presencia de cuernos, excepto en el ROMO, orejas pequeñas, piel pigmentada y ombligo corto (Martínez, 1999).

La población de ganado criollo según el inventario nacional paso de 23.415 individuos en el año 1999 (Martínez, 1999) a 20.102 individuos (16.224 hembras y 3878 machos) en el 2003, sin incluir el reporte de la raza criolla Casanareño (MADR-ASOCRIOLLO, 2003). Teniendo en cuenta el estado de amenaza de la población con base en el numero de hembras en estado reproductivo y la relación entre sexos según la FAO, 1998**,** ninguna de las razas criollas se encuentra clasificada en estado *normal* (10.000 hembras; relación entre sexos superior a 50:1 o 1.000 hembras y 20 machos) o *insegura* (entre 5.000-10.000 hembras; relación 50:1). La mayoría de ganados criollos se encuentra clasificada como *vulnerable* (1.000-5.000 hembra; relación 50:1), en peligro (100-1.000 hembra; relación inferior 30:1) y critica (menos de 100 hembra; relación no inferior 5:1) (Martínez, 1999). Así las razas Lucerna (6727 animales) y Casanareño (5.663) se encuentra clasificada como *"inseguras",* Blanco Orejinegro (3968), Romosinuano (3173), Hartón del valle (2049), Costeño Con Cuernos (1522) y Velásquez (1454) como *"vulnerables",* la raza Sanmartinero (765), Chino Santandereano (393) y Caqueteño (51) como *"Critico*" (Martínez, 1999; MADR -ASOCRIOLLO, 2003). En la Figura 1 se compara el tamaño poblacional del GCC de 1999 y con el del año 2003.

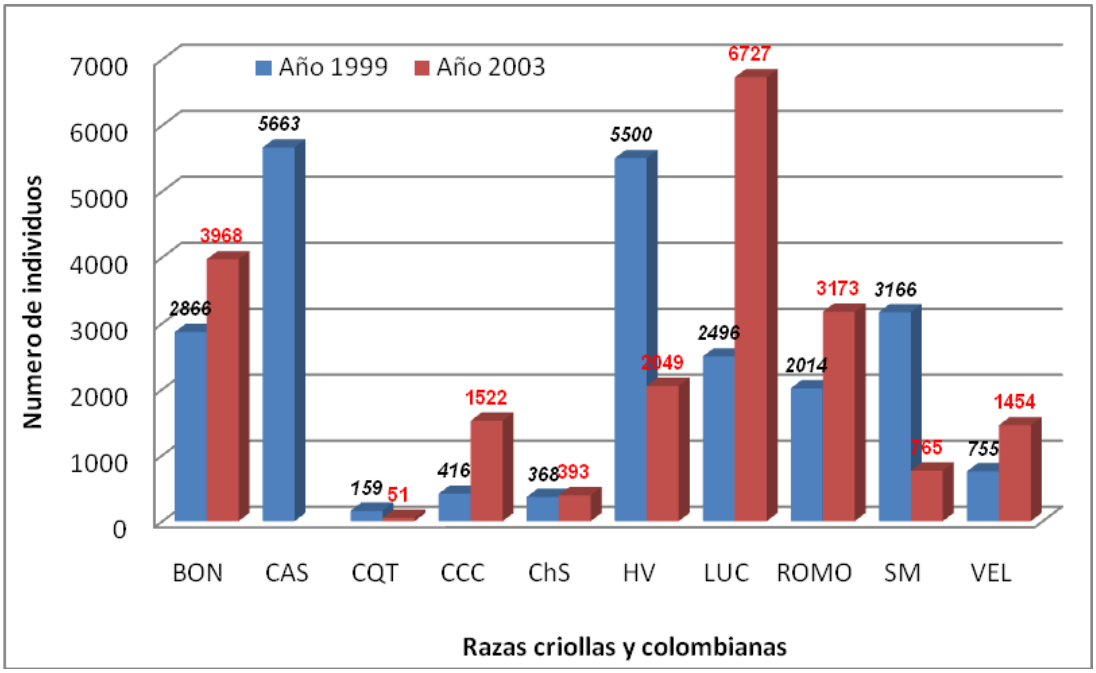

Figura. 1. Distribución de la población del ganado criollo colombiano en los censos del año 1999 y del año 2003 (Total por raza). Fuente: Martínez, (1999); MADR-ASOCRIOLLO, (2003).

La raza ***Blanco Orejinegro*** es reconocida por su capacidad de producción de carne y leche bajo condiciones desfavorables del trópico; su hábitat natural se encuentra en las estribaciones de la cordillera central y occidental, entre 800 y 1800 m.s.n.m., con temperaturas que oscilan entre 18 y 24ºC (zona cafetera o zona media) (López *et al.,* 2001). La población efectiva pasó de representar el 12% del ganado criollo del país en 1999 con 2866 animales (Buitrago y Gutiérrez, 1999) a 3968 animales en el 2003 (MADR-ASOCRIOLLO, 2003). Las vacas poseen una gran habilidad materna, se ha estimado que la hembra retiene hasta el 65% de su leche residual y una producción de leche promedia 9.78 Kg./día en lactancias de 235 días (Buitrago y Gutiérrez, 1999). Los machos son más precoces que las hembras llegando a la pubertad entre los 14 y 16 meses con pesos entre 206 a 234 Kg. (Munévar, 1989).

En las sabanas inundables de los departamentos de Arauca y Casanare habita la raza ***Casanareño*** cuyo principal uso es la producción de carne en forma extractiva y extensiva tradicional (ASOCRIOLLO, 2007). El porcentaje de preñez es de 87.6%, natalidad de 82.6%, edad al primer servicio de 25 meses y primer parto de 34-36 meses; la ganancia diaria de peso es de 700 g, el peso de hembras adultas es de 380-470 Kg. y machos de 520-610 Kg. (CORPOICA, 2006). La producción de leche está entre 750-1080 litros con una duración de 180 a 270 días y un ternero cada 365 días (MADR, 2003).

La raza ***Caqueteño*** habita en condiciones del Caquetá con temperatura media anual de 26°C y HR de 88%. Es la raza con la menor población, su población se encuentra clasifica como "*critico*", puesto que hasta 1999 solo se conservaban dos explotaciones con tan solo 159 animales (Martínez, 1999) y para el 2003 solo se reporta una población con 51 animales (MADR-ASOCRIOLLO, 2003). La edad al primer parto es de 38 meses, con intervalos entre partos de 455 días y una tasa de natalidad de 79%. Las crías nacen con pesos alrededor de 30 Kg. y el peso adulto alcanza hasta 700 Kg en machos y 400 Kg. en hembras (CORPOICA, 2006). La producción de leche, se ha estimado en 945 Kg. en 245 días de lactancia en ordeño con ternero (CORPOICA, 2006).

El ***Costeño con Cuernos***, habita las llanuras costeras, está adaptado a temperaturas alrededor de 27.5°C con 1233 mm de precipitación anual (Wilkins *et al*, 1993). Su población aumentó levemente, pasando de 416 animales en el año 1999 (Martínez, 1999) a 1522 animales en el 2003 (MADR-ASOCRIOLLO, 2003). Está clasificada como doble propósito y sus caracteres fenotípicos raciales están bien definidos (Sotolongo, 1999). Se considera una de las razas con mejores características de producción de leche para el trópico bajo (CORPOICA, 2006), con una producción promedio mayor de 9 Kg. por ordeño y una duración de 238 días de lactancia (Ossa, 1999).

En el Valle de Lebrija (Santander) se encuentra la raza ***Chino Santandereano*** considerada en situación “crítica” por la reducción de la población, pues pasó de 606 animales en 1986 a 368 animales en 1999 y en el 2003 su población se mantiene en 393 animales (MADR-ASOCRIOLLO, 2003). El promedio de edad al primer parto es 32 meses (DAD-IS, 2007), el porcentaje de natalidad es de 65% (Vargas, 1999), la producción promedia de leche en lactancias de 225 días, es de 750 L/vaca/lactancia en ordeño con ternero (Vargas, 1999) y 4.03 Kg./vaca/día (CORPOICA, 2006).

El ganado criollo ***Hartón del Valle*** se desarrolló en el valle geográfico del rio Cauca, desde el nacimiento del rio Cauca en el macizo Colombiano y la Virginia Risaralda y entre la división de aguas de la Cordillera Central y la cordillera Occidental (Casas y Valderrama, 1998), donde la altitud promedia es de 950 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 24°C (16-32°C) y una precipitación comprendida entre 644 a 1636 mm por año. Esta región está clasificada como bosque seco tropical (Casas y Valderrama, 1998). Hasta el año 1999 su población era de 5500 animales (Martínez, 1999), mientras que en el último reporte su población disminuyó a 2049 animales (MADR-ASOCRIOLLO, 2003). La fertilidad ha sido reconocida por los ganaderos, reportándose natalidad del 93.1% (Gonzales y Arango, 1974). La edad al primer servicio es de 22.5 meses, al primer parto es de 32.22 meses, el intervalo entre partos está entre 360 y 390 días (Tobar y Varela, 1989; Casas y Valderrama, 1998), en los toros se observa gran actitud sexual y muy poca discriminación racial (Casas y Valderrama, 1998). El peso de los terneros al nacimiento es 28 y 30 Kg. para hembras y machos respectivamente; en crianza de terneros sin ordeño alcanzó pesos a los 8 meses de 180 Kg. en hembras y de 200 Kg. en machos (Archila y Bernal, 1983). Tobar y Varela (1989) reportan producción de leche de 1362 Kg. en 245 días (5.55 Kg/día). En un sistema de doble ordeño y sin ternero se han reportado promedios de 2045 Kg. en 280 días de lactancia (7.3 Kg/día) (Archila y Bernal, 1983), de 2200 Kg en 280 días (7.85 Kg/día) (Casas y Valderrama, 1998; Álvarez, 1999) y de 1956 Kg

en 298 días de lactancia (6.56 Kg/día) (Ortiz, 1993). Sin embargo Casas y Valderrama (1998) señala que se alcanzado producciones de hasta 3400 Kg. en lactancias de 280 días con un contenido de grasa del 5%, un 3.6% de proteína y 12.5% de sólidos totales.

El ganado ***Romosinuano***, está bien adaptado a las condiciones del Valle del Sinú, zona climatológica de Bosque Seco Tropical (BST), con temperatura media de 27,5ºC; 83% de HR (Martínez, 1998). Registró un aumento en la población pasando de 2014 animales en el año 1999 (Martínez, 1999) a 3173 animales (MADR-ASOCRIOLLO, 2003). La longevidad y fertilidad del ganado compensan el aparente retraso en su desarrollo con vacas mayores de 15 años con más de 12 partos. Se ha encontrado promedios de producción de leche de 6.91 Kg./día con duración de lactancia de 243 días (Triviño, 1999).

La Raza ***Sanmartinero*** está adaptada a las sub-regiones del Orinoco, zonas de Bosque Húmedo Tropical y Muy Húmedo Tropical, en suelos con altos contenidos de Aluminio, temperatura media de 26ºC, HR de 87% en época lluviosa y 55% en la época seca (Martínez y González, 2000). Existían 3.166 cabezas de ganado, (Martínez, 1999) y el último reporte pasó a solo 765 animales (MADR-ASOCRIOLLO, 2003). La edad al primer parto es de 38 meses, el intervalo entre partos de 469 días, la natalidad de 75.4% (Martínez, 1999). Es una raza predominantemente para carne, sin embargo los reportes de producción de leche están alrededor de 6.91 Kg./día, con lactancias de 243 días (Martínez, 1999). Mientras que en el Centro de investigación (C.I) Turipaná la producciones vario entre 4–7 L/vaca /día (CORPOICA-TURIPANA, 2007).

La raza ***Velásquez*** es producto de la hibridación del ganado criollo Romosinuano (25%), el Cebú Rojo (25%) y el Red Poll (50%) que aportaron fertilidad y adaptación al medio tropical cálido Colombiano, rusticidad y resistencia a parasitosis y precocidad y producción de carne, respectivamente (CORPOICA,

2006). Según Martínez, (1999) la población mostró un descenso en número de efectivos pasando 3083 animales en 1986 a 755 animales puros en año de 1999, sin embargo para el año 2003 su población aumentó levemente a 1454 animales (MADR-ASOCRIOLLO, 2003). La edad al primer parto es de 35±5 meses, el peso promedio de las crías al nacimiento es de 39 Kg. en machos y 37 Kg. en hembras, a la edad adulta los machos pesan entre 750 y 850 Kg., y las hembras 450 y 500 Kg. (Velásquez, 1999). La producción promedio de leche es de 4 Kg./día, con una duración de la lactancia de 264 días (Velásquez, 1999).

El núcleo de la raza ***Lucerna*** se originó en la hacienda "Lucerna", en Bugalagrande, (Valle del Cauca), desde donde se ha promocionado y fomentado para diferentes regiones del país (ASOCRIOLLO, 2007). Es uno de los pocos esfuerzos genéticos de combinar razas del norte de Europa con ganados criollos, generando así la raza sintética, formada por Hartón del Valle (30%), Holstein (40%) y Shorthorn (30%) (CORPOICA, 2006). Es la única raza que ha tenido un aumento significativo de su población en los últimos años pasando de 2496 animales puros en 1999 a 6727 animales en el 2003 (MADR-ASOCRIOLLO, 2003). El tamaño es mediano, con una alzada promedio de 1.28 m, con peso promedio al nacimiento en los machos de 39 Kg. y 37 en las hembras. A edad adulta los machos pesan entre 750 y 850 Kg. y las hembras 450 y 500 Kg. (CORPOICA, 2006). La producción anual de leche por vaca es de 2925 Kg, con un 3.8 % de grasas butiro-métrica, con un promedio 9.75 Kg de leche por día (CORPOICA, 2006). Esta raza a través de los años mejoró su producción de leche, pasando de 2193 kg./vaca/año en 1972 a 2922 Kg./vaca/año en 1990 (Duran y Manrique, 1999). Una producción promedio diaria de 20.36 Kg/día, que corresponde a la producción más alta de las razas criollas y colombianas, con una duración de lactancia de 260 días (Duran y Manrique, 1999).

1.2 BANCO DE ADN, COMO METODO DE CONSERVACION DE LOS RECURSOS ZOOGENÉTICOS.

A mediados de 1940 se potencio el almacenamiento y la trasferencia de ADN, las biotecnologías reproductivas han contribuido a la trasferencia del material genético *in vivo* e *in vitro*. La conservación *ex situ* incluye la criopreservación de semen, óvulos, embriones, células somáticas y ADN (FAO, 2007). Las técnicas de conservación son viables y económicamente accesibles, aunque en la actualidad no es posible recuperar las poblaciones o individuos a partir de ADN, el almacenamiento de este han sido útil para estudios de población, las investigaciones epidemiológicas y otros (Egito *et al.,* 2005).

Las células de los mamíferos contienen cerca de 30.000 genes. Cuando se considera dicha información genética se valora y se justifica el almacenamiento de una muestra representativa de una población o de un individuo (Egito et al., 2005).

La importancia de la conservación de recursos genéticos animales en bancos de ADN también posibilita el hallazgo de genes o alelos de interés a futuro. En casos más extremos se puede recuperar genes o alelos y hasta animales completos a través de tecnologías como la trangenesis o la clonación. (López., 2009).

1.3 LA LECHE BOVINA Y SUS COMPONENTES

La leche bovina es una mezcla compleja de agua, lactosa, grasa, proteínas y otros componentes menores. El 95% del nitrógeno total es proteico que es equivalente a unos 35g. de proteína por Kg. de leche (Gonzales de Llano, 1990, Goff *et al*., 1993, Walstra *et al,* 1999). El 80% de la fracción proteica está formada por un tipo de fosfoproteínas acídicas ricas en prolina, denominadas caseínas, mientras que la otra porción está representada por proteínas no fosforiladas o proteínas del suero (OEA/GTZ, 2003). De acuerdo a su movilidad electroforética las caseínas

pueden dividirse en: αS1, αS2, β y κ-caseína mientras que las proteínas del suero incluyen la β-lactoglobulina, α-lactoalbúmina, lactoferina y varias enzimas que constituyen la fracción remanente (Ron *et. al.,* 1994). La relación entre las proteínas del suero y las caseínas es de 1500:1 (De Wit, 1981).

Los constituyentes de la leche influyen en las propiedades tecnológicas de la misma y la fracción proteica juega un papel crucial por su diversidad, complejidad, concentración y proporción (Molina *et al*., 2003). El contenido y las propiedades de las caseínas determinan la producción de queso, porque estas proteínas forman la matriz de la masa del queso (Swaisgood, 1993; Plowman y Creamer, 1995; Braunschweig *et al.,* 2000). Las caseínas denominadas calcio sensitivas: αS1, αS2 y β-Caseína, están agregadas en una larga estructura micelar en suspensión coloidal con calcio y mantienen esa estructura por interacción con la *κ*-caseína (*k*-CN), la cual parece estabilizar dicha estructura (Ginger y Grigor; 1999; Vaiman, 1999). La micela tiene forma de pequeñas partículas esféricas de 30–300 nm de diámetro, estabilizada por puentes de hidrogeno, enlaces iónicos y de calcio (Walstra *et al*., 1999). La k-CN representa entre el 12 y 15 % de las caseínas lácteas (Grasselli *et al*., 1997; Fox y Brodkorb, 2008). La precipitación de las caseínas tiene lugar a pH de 4,6 y a temperaturas de 20°C, seguido de una ruptura química provocada por quimosina o pepsina en la porción hidrofílica de la κ-CN (Swaisgood, 1993; Plowman and Creamer, 1995). La formación del queso es principalmente gobernada por β-CN y *k*-CN, mientras las otras dos caseínas probablemente determinen la habilidad de las micelas para transportar $CaPO_4$ coloidal (Vaiman, 1999). Un incremento en la proporción de las caseínas como α_{S1}-CN, β-CN y k-CN aumenta la producción de queso (Bobe *et al.,* 1999).

Existen evidencias que el comportamiento químico de la leche, particularmente en la fabricación de queso está influenciado por las características genéticas de las vacas (Benavides, 2003). La detección del polimorfismo genético de las proteínas lácteas ofrece nuevas explicaciones puesto que las variantes genéticas de las

principales proteínas lácteas tienen efectos directos sobre la composición y las propiedades tecnológicas de la leche (Puhan y Jakob, 1993; Caroli *et al.,* 2009).

Las proteínas del suero son termoestables y se desnaturalizan a altas temperaturas, dicha inestabilidad se debe en parte a la ausencia de fosforo, bajo contenido en prolina y alto contenido en cisteína, cistina y metionina (González de Llano, 1990)

1.4. LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE

1.4.1 Kappa-Caseína (κ-CN)

Las caseínas representan el 80 % de la proteína de la leche en los bovinos y otras especies productoras de leche para consumo (Fox y Brodkorb, 2008). El gen de κ-CN ha sido extensamente estudiado en bovinos por su papel en la estabilización de las caseínas, su interacción con *β*-LG y por su efecto positivo desde el punto de vista del procesamiento de la leche (Ng-Kwai-Hang K.F *et al*, 1984; Swaisgood, 1993; Plowman y Creamer, 1995; Fox y McSweeney, 1998; Braunschweig *et al*., 2000; Fox y Brodkorb., 2008), principalmente por la determinación de la estabilidad física de algunos productos lácteos durante el tratamiento térmico y concentración sobre todo en las primeras etapas en la fabricación de queso (Walstra *et al*., 1999).

Los reportes indican que la proporción de *k*-CN es inversamente proporcional al tamaño de las micelas, además la *k*-CN es el sustrato específico de la quimosina (cuajo) durante la primera fase de coagulación (Belitz y Grosch, 1997).

Las variantes A y B de *κ*-CN son las más comunes y están presentes en todas las razas con frecuencias variables, sin embargo otras diez variantes han sido descritas (A^1, C, E, F^1, F^2 G^1, G^2, H, I, J) en diferentes regiones del mundo (Mahé *et al.,* 1999; Farrell *et al*., 2004;; Prinzenberg *et al*., 1999). La estructura primaria de la κ-CN posee 169 aminoácidos. Las dos formas comunes, κ-CN A y κ-CN B difieren en los codones 136 y 138 (Farrell *et al*., 2004).

La variante κ-CN B ha sido favorecida en programas de mejoramiento por su alta asociación con el contenido de proteína en la leche y el efecto positivo sobre las propiedades de coagulación y producción de queso, comparada con κ-CN A (Van-Eenennaam y Medrano, 1991a; Walsh, 1997; Prinzenberg *et al*., 1999); la frecuencia del alelo κ-CN B, en diversas razas bovinas fluctúa entre 0.15 a 0.81 (Ordas, 1992).

Las diferencias en las cargas eléctricas entre las variantes de *k*-CN también influyen en la interacción entre las micelas de caseína. La variante B de *k*-CN respecto a la variante A, se caracteriza por tener menos cargas negativas asociadas a menor tiempo de coagulación e incremento en la firmeza de la cuajada, en relación con la variante A de k-CN (Schaar, 1984). Se considera que la firmeza del coágulo está relacionado con el tamaño de la micela, lo que explicaría que la leche de vacas con la variante B de k-CN contienen un 40 % mas micelas pequeñas, comparado con la leche de la variante A, lo que significa un aumento en la densidad del coagulo por generar mayor retención de sólidos en la cuajada y por ende un mayor rendimiento (Jakob y Puhan, 1995).

En general, la variante B de k-CN ha sido reconocida por la superioridad en las cualidades de la leche en las razas de ganado Europeo respecto a la κ-CN A (Lunden *et al*., 1997; Wedholm *et al*., 2006; Heck *et al.,* 2009); el alelo B de k-CN

está asociado con un menor tiempo de cuajo, proporción más alta de proteína, mayor estabilidad a la congelación y mayor rendimiento en la elaboración de quesos (5-10%), menor tiempo de coagulación y cuajada más consistente (Lunden *et al,* 1997). Dichas características ha convertido este genotipo en un criterio de selección para mejorar la producción de leche para la industria (Lyn y McAllister, 1986; MacLean 1987; Van-Eenennaam y Medrano, 1991b). El genotipo homocigoto de κ-CN BB ha mostrado ser superior en el porcentaje de grasa y proteína, mientras que el genotipo heterocigoto κ-CN AB es mejor para características de producción sugiriendo un efecto de heterosis (Freyer *et al.,* 1999). Recientes reportes indican que las vacas con el genotipo k-CN BB tiene un 20% mas k-CN que vacas con el genotipo k-CN AA (Heck *et al*., 2009).

Así mismo, los quesos provenientes de leche de vacas BB de k-CN, mostraron un mayor contenido de proteína (0.13%) respecto a AA o AB (Ng-Kwai-Hang K.F *et al.,* 1984). Por los resultados superiores y consistentes encontrados en grupos de animales con haplotipos que contienen la variante κ-CN B, se ha inferido que el gen de la κ-CN es un QTL o un gen mayor para contenidos de caseína (Brawnshweig *et al*., 2000).

Las otras variantes de κ-CN han sido pobremente investigadas respecto a las características de producción. La leche de animales con *κ*-CN C, *κ*-CN G^1 (Prinzenberg *et al*., 1999b) y k-CN E han mostrado una baja coagulación (Ikonen *et al*., 1997; Hallén *et al.,* 2007; Caroli *et al*., 2009).

1.4.2 Beta-Lactoglobulina (β-LG)

La β-Lactoglobulina (β-LG) representa cerca del 50% de la proteína del suero y el 12% de la proteína total de la leche de los bovinos (Fox & McSweenwey, 1998, Liu *et al.,* 2007) y la de mayor proporción en varias especies no rumiantes (Pérez y

Calvo, 1995). La β-LG está compuesta de una secuencia 162 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 18.4 kDa (Kontopidis *et al.,* 2004).

Debido a su gran valor nutritivo puede ser usada para la fortificación de bebidas y jugos de fruta gracias a su gran solubilidad y estabilidad (Grasselli *et al.,* 1997). Últimamente se demostrado que β-LG presenta una mediana capacidad antioxidante respecto a la vitamina E y probucol, lo que incrementa su importancia a nivel nutricional (Lin *et al.,* 2007).

El gen de β-LG bovina consiste de una unidad transcripcional de 4724 pb de longitud y siete exones; ha sido mapeado en el cromosoma número 11 (11q28) en bovinos y en caprinos (Bawden y Nicholas, 1999). Las variantes genéticas de β-LG tienen un rango natural de ocurrencia que difiere una de otra por la sustitución de un aminoácido. En las razas *Bos taurus* las variantes predominantes son: A (Gln 59, Asp64 y Val 118) y B (Gln 59, Gly 64 y Ala 118) y la variante de baja frecuencia C (His 59, Gly 64 y Ala 118) (Paterson, Otter, & Hill, 1995). Otras nueve variantes (C, D, E, F, G, H, I, J, W) de esta proteína han sido identificadas y secuenciadas (Farrell *et al*., 2004).

Manderson *et al*., (1999) desnaturalizaron β-LG mediante espectroscopía y explicaron que la variante C es más termoestable que la B y la A. En la leche con la variante A se ha encontrado mayor estabilidad al calor que la leche con la variante B (Bikker *et al.,* 2000).

Está demostrado que el genotipo β-LG BB está asociado con un alto porcentaje de caseínas en la leche y mayor rendimiento de queso (Aleandri *et al*., 1990, Lunden *et al.,* 1997). Mientras que el alelo A de β-LG tiene un efecto negativo sobre la proporción de β-LG (Wedholm *et al*, 2006), sin embargo otros autores hallaron que el alelo A de β-LG incrementa aditivamente la proporción de β-LG en la proteína total de la leche (Bobe *et al*, 1999; Heck *et al*., 2009).

Se ha encontrado mayor estabilidad en las proteínas de la leche en animales con el genotipo AA de β-LG asociada al BB de k-CN (Paterson *et al*., 1999), que para el AA de β-LG con el AA de k-CN (Robitaille *et al*., 2005). Así mismo Heck *et al,* (2009) demostraron los efectos compartidos entre las variantes genéticas de k-CN y de β-LG y sugieren que la selección por genotipos B de β-LG y los genotipos k-CN B dará como resultado vacas que producen leche deseable para la industria de quesera.

Imafidon *et al.,* (1991) observaron que los animales con genotipos BB de β-LG producían leche con proteína mas termoestable que otros genotipos (AA ó AB), independiente del genotipo de *k*-CN. De la misma manera los genotipos BB de β-LG, han sido asociados con un mayor contenido de grasa, mientras que el genotipo β-LG AA ha sido asociado con una alta producción de leche total y un incremento de las proteínas del suero (Ng-Kwai-Hang *et al*., 1984).

El alelo B de β-LG se considera superior al alelo A por su efecto directo sobre la resistencia mecánica de los geles debido a la formación de enlaces cruzados, agregación de las proteínas del suero y los productos de la hidrólisis del cuajo o a un aumento en el tamaño de la micela de caseína causado por la inserción de β-LG B a su superficie (Meza-Nieto *et al.,* 2007). Aun cuando sólo β-LG B se encontró asociado con caseína antes de la adición de cuajo, tanto β-LG A y β-LG B, ya sea solos o mezclados, tienen una profunda influencia en la resistencia mecánica y la cinética de la coagulación de caseína, inducida por cuajo en los geles (Meza-Nieto *et al*., 2007).

Por otra parte Szulc y Pawelska-Góral, (2008) demostraron que era posible aumentar aún más la proporción de proteína y/o de caseína, en vacas lactantes con el genotipo BB de β-LG, mediante la adición de metionia protegida en la dieta, dando como resultado un incremento significativo en el contenido de proteína cruda y caseína. Así mismo se ha intentado mejorar la interacción k-CN-β-LG,

adicionando proteína de suero purificada, sin embargo solo incremento la cantidad y el tamaño de los complejos *k*-CN-β-LG, mientras que la adicción de *k*-CN no genero ningún efecto sobre las micelas de caseína (Donato *et al*, 2007).

1.4.3 Alpha-Lactoalbúmina (α-LA)

La Alpha-Lactoalbúmina (α-LA) es una calcio metaloproteina que en las células del epitelio mamario, forma un complejo con la β-1,4 galactosiltransferasa, para formar la enzima lactosa sintasa, la cual sintetiza lactosa en el interior de la vesícula secretora del aparato de Golgi. La formación de este complejo es necesaria para la síntesis de la lactosa (Bawden y Nicholas, 1999). La secuencia genómica de α-LA bovina comprende una unidad transcripcional de aproximadamente 2Kb contenido en cuatro exónes (Vilotte *et al*., 1987), en el cromosoma 5 (5q21) (Hayes *et al*., 1993). La α-LA y la lactosa producidas por el complejo son secretadas en la leche. La reacción catalizada por la lactosasintasa es: UDP-Galactosa + Glucosa => Galactosa-glucosa (Lactosa) + UDP (uridine difosfato) (Kroeker *et al*., 1985; Bleck y Bremel, 1994; Voelker *et al*., 1997; Bawden y Nicholas, 1999; Wheeler *et al.,* 2003). La estructura proteica de α-LA contiene 142 aminoácidos; La variante α-LA A posee el aminoácido Gln en la posición 10 de la proteína madura, mientras que α -LA B tiene una Arginina (Farrell *et al*., 2004).

Las vacas de ganado Holstein con la variante A presentaron altos valores predichos (PTA) para producción de leche, proteína y grasa, mientras que el alelo B se asocia con altos PTA para porcentaje de proteína y grasa (Bleck y Bremel, 1994).

1.5 FRECUENCIAS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE LAS PROTEINAS DE LECHE EN DIFERENTES RAZAS BOVINAS.

La producción especializada de leche a nivel mundial está basada en razas de alto potencial genético; en Colombia el 3.3% son ganaderías especializadas que producen el 52% de la leche y el 39.5% son de "doble propósito" que producen el 48% de la leche (Olivera, 2003). La raza Holstein, se caracteriza por sus altos volúmenes de producción de leche, pero es catalogada de baja calidad debido a su menor concentración de sólidos totales, grasa y proteína (Benavides., 2003). Esto ha generado expectativa sobre mejores alternativas para la producción de leche con calidad en otras razas de ganado (Munizaga *et al*., 2004).

Aunque una de las alternativas para mejorar la calidad de la leche es cambiar de trayectoria en los esquemas de selección en razas especializadas lecheras (Heck *et al.,* 2009; Solarte-Portilla *et al.*, 2009), otra alternativa es explorar características de calidad de la leche en otras razas.

El uso de métodos avanzados de electroforesis, la tecnología del ADN, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los marcadores moleculares han mostrado resultados en la identificación y caracterización de genotipos de interés tales como las variantes genéticas de la proteína de leche (Díaz *et al*., 2006).

En la actualidad se ha convertido en una necesidad el mejoramiento asistido por marcadores moleculares, por la efectividad y la alta correlación con caracteres cualitativos y cuantitativos (Dentine, 1999). Blake., (2008) sugiere que las nuevas tecnologías moleculares de selección genética y genómica ofrecen un mayor potencial en ganancia genética que los esquemas nucleares, ovulación múltiple y transferencia de embriones. Si bien las técnicas en reproducción animal tales como inseminación artificial, y la trasferencia de embriones han contribuido

enormemente en la producción ganadera, también ha afectado de forma contundente su variabilidad genética (Pimentel de Mello *et al.,* 2003).

Existe una abundante gama de técnicas moleculares modernas y marcadores genéticos usados para evaluar directa o indirectamente variaciones en la información genética de individuos y poblaciones, tales como: polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs- Restriction fragment length polymorphism), polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPDs- Random amplified polymorphic DNA), número variable de repeticiones en tándem (VNTRs- Variable Number of Tandem Repeats) o minisatélites, simple repeticiones en tándem (STRs - Simple tandem repeats) o microsatélites y polimorfismo de nucleótido simple (SNP- Single nucleotide polimorphism) (Bedoya et al., 2001).

El uso de la PCR-SSCP (Reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismos conformacionales de cadena única) también ha sido propuesto como técnica para la detección de mutaciones en el ADN (Orita *et al.,* 1989). Por su alta efectividad, sensibilidad y bajo costo la técnica PCR-SSCP ha sido implementada en Colombia (Naranjo, 2005) y aplicada con éxito en la identificación de variantes del gen de k-CN (Barroso *et al.*, 1998; Díaz *et al.,* 2006; Naranjo *et al*, 2007; Prinzenberg *et al.,* 1999; Vivas y Vinasco, 2006), β-LG (Díaz *et al.,* 2006) y de α-LA (Kazmer *et al.,* 2001; Díaz *et al.,* 2006).

Existe una amplia información en el ganado bovino usando marcadores moleculares los que ha permitido estimar relaciones intra e interespecíficas entre poblaciones muy relacionadas (Bedoya *et al*., 2001).

Debido a la importancia para la industria de lácteos, el polimorfismo de las proteínas de la leche ha sido extensamente estudiado (Ng-Kwai-Hang *et al*, 1984; Van-Eenennaam y Medrano., 1991; Voelker *et al*., 1997; Kemenes *et al*., 1999;

Beja-Pereira *et al*., 2002; Postiglioni *et al.,* 2002; Lirón *et al*., 2002; Celik, 2003; Solarte-Portilla *et al.*,2009; Uffo *et al*., 2006; Díaz *et al*, 2006).

Se sabe que las variantes genéticas no aparecen al azar, y su frecuencia es variable; mientras que unas se hallan en todas las razas, otras resultan exclusivas para una raza (Lin y McAllister., 1986; Gonzáles de Llano., 1990).

En el cuadro 1 y 2, se observa frecuencia genética de los alelos de las proteínas de la leche en diferentes estudios en el mundo. La variante A de k-CN tiene una alta frecuencia en la mayoría de razas, mientras la variante B predomina en la raza Jersey (Van-Eenennaam y Medrano., 1991), Marinhoa, Mirandesa (Beja-Pareja *et al*, 2002) e Italian Brown (Caroli *et al*., 2004; Martini *et al*., 2007) en algunas razas criollas de Uruguay (Postiglioni *et al.,* 2002) y Bolivia como la raza Chaqueño y Yacumeño (Lirón *et al*., (2002)

Para β-LG las frecuencias de las variantes A y B tiene una relación aproximada de 1:1 en la mayoría de las razas; sin embargo, en la raza Jersey y Guernsey, Holstein de Mexico, Shorthorn lechero y la mayoría de los ganados criollos de América predomina la variante B como se observa en los cuadros 1 y 2 (Van-Eenennaam y Medrano, 1991; Kemenes *et al*., 1999; Postiglioni *et al*., 2002; Lirón *et al*., 2002; Benavides, 2003; Uffo *et al*., 2006; Díaz *et al*, 2006).

En tanto que la variante A de α-LA predomina el ganado Holstein de EEUU, Guernsey, Red Angus, Ayrshire (Voelker *et al*., 1997; Heck *et al*., 2009), al igual que en las razas criollas cubanas (Uffo et al, 2006), Uruguayas (Postiglioni et al., 2002) y Criolla colombiana Hartón del Valle (Díaz *et al*, 2006) como se observa en los Cuadros 1 y 2.

Cuadro 1. Frecuencia genética de los alelos de las proteínas de la leche en diferentes estudios en Norte América, Europa, África y Asia.

RAZA	Frecuencia génica						Fuente
	k-CN		β-LG		α-LA		
	A	B	A	B	A	B	
Holstein (USA)	0.82	0.18	0.43	0.57	0.63	0.37	Van-Eenennaam y Medrano, (1991); Voelker *et al.,* (1997)
Holstein (USA)	0.74	0.26	0.38	0.61	0	1	Ng-Kwai-Hang *et al.,* (1984)
Holstein (Australia)			0.51	0.49			Gonzalez de Llano., (1990)
Holstein (Portugal)	0.67	0.28	0.46	0.54			Beja-Pereira *et al.,(*2002)
Holstein (India)	0.66	0.34	0.27	0.72			Patel *et al.,* (2006)
Holstein (Mexico)	0.95	0.1	0.47	0.53	0.34	0.67	Barreras *et al.,* (2001)
Holstein (Holanda)	0.59	0.39	0.58	0.41	0	1	Heck et al., (2009)
Guernsey (USA)	0.73	0.27	0.21	0.79	0.96	0.04	Van-Eenennaam y Medrano, (1991); Voelker *et al.,* (1997)
Jersey (USA)	0.14	0.86	0.37	0.63	1.0		Van-Eenennaam y Medrano, (1991); Voelker *et al.,* (1997)
Shorton Lechero (USA)	0.89	0.11	0.31	0.69		-	Van-Eenennaam y Medrano, (1991)
Reggina (Italia)	0.48	0.59	0.55	0.44			Caroli *et al.,* (2004)
Reggina 1971 (Italia)	0.53	0.46	0.52	0.46			Caroli *et al.,* (2004)
Italian Fresian (Italia)	0.72	0.17	0.43	0.56			Caroli *et al.,* (2004)
Italian Brown (Italia)	0.34	0.65	0.34	0.65			Caroli *et al,* (2004); Martini *et al,* 2007
Brown Swiss (Turkia)			0.44	0.56			Celik, (2003)
Yaroslavl (Rusia)	0.5	0.5					Sulimova *et al,* (2007)
Holstein (Grecia)	0.94	0.06	0.52	0.48			Tsiaras *et al.,* (2005)
Rubia Gallega (España)	0.47	0.53					Viana *et al.,* (2001)
Hungarian Spotted (Hungria)	0.75	0.22	0.47	0.51			Baranyi *et al.,* (1993)

Continuación. Cuadro 1. Frecuencia genética de los alelos de las proteínas de la leche en diferentes estudios en Norte América, Europa, África y Asia.

RAZA	Frecuencia génica						Fuente
	k-CN		β-LG		α-LA		
	A	B	A	B	A	B	
Swedish Red y White (Suecia)	0.83	0.17	0.333	0.67			Lunden *et al,* (1997)
Alentejana (Portugal)	0.55	0.45	0.431	0.569			Beja-Pereira *et al.,* (2002)
Arouquesa (Portugal)	0.68	0.39	0.635	0.37			Beja-Pereira *et al.,* (2002)
Barrosa (Portugal)	0.57	0.43	0.314	0.686			Beja-Pereira *et al.,* (2002)
Cachena (Portugal)	0.58	0.43	0.37	0.62			Beja-Pereira *et al.,* (2002)
Marinhoa (Portugal)	0.25	0.75	0.53	0.47			Beja-Pereira *et al.,* (2002)
Maronesa (Portugal)	0.61	0.39	0.6	0.4			Beja-Pereira *et al*., (2002)
Mertolenga(Portugal)	0.74	0.25	0.16	0.83			Beja-Pereira *et al.,* (2002)
Mirandesa (Portugal)	0.05	0.95	0.37	0.63			Beja-Pereira *et al.,* (2002)
Borgou (Benin)	0.22	0.35	0.19	0.78			Ceriotti *et al.,* (2004)
Sombra (Benin)	0.24	0.76	0.22	0.78			Ceriotti *et al.,* (2004)
Lagune (Benin)	0.25	0.75	0.49	0.51			Ceriotti *et al.,* (2004)
Modicana (Ital)	0.16	0.79	0.12	0.88			Ceriotti *et al.,* (2004)
Azaouak (Nigeria)	0.02	0.2	0.04	0.96			Ceriotti *et al.,* (2004)
Adamawa (Niger)	0.13	0.12	0.07	0.93			Ceriotti *et al.,* (2004)
Sudanese-Perul (Benin)	0.29	0.19	0.1	0.9			Ceriotti *et al.,* (2004)
Hungarian Grey (Hungria)	0.64	0.36	0.2	0.75			Baranyi *et al.,* (1993)
Dutch (Hungria)	0.83	0.17	0.525	0.48			Bovenhui *et al.,* (1991)
Swedish Red (Suecia)	0.71	0.13	0.39	0.58			Hallén *et al.,* (2009)

Cuadro 2. Frecuencia genética de los alelos de las proteínas de la leche en diferentes estudios en Sur América, y el Caribe.

RAZA	Frecuencia génica						Fuente
	k-CN		β-LG		α-LA		
	A	B	A	B	A	B	
Holstein (Colombia)	0.76	0.24					López *et al.,* (1999)
Holstein (Colombia)	0.8	0.2					Solarte-Portilla *et al*, (2009)
Hartón de Valle (Colombia)	0.45	0.3	0.38	0.62	0.14	0.86	Díaz *et al.,* (2006)
Normando (Colombia)	0.34	0.66					Campo *et al.,* (2007)
Cubano (Cuba)	0.7	0.3	0.3	0.7	0.39	0.61	Uffo *et al.,* (2006)
Siboney (Cuba)	0.78	0.22	0.2	0.8	0.44	0.56	Uffo *et al*., (2006)
Cebú (Cuba)	0.84	0.16	0.24	0.76	0.4	0.6	Uffo *et al*., (2006)
Pantaneiro (Brasil)	0.78	0.22					Lara *et al.* (2002)
Nelore (Brasil)	0.91	0.09	0.4	0.6			Kemenes *et al*., (1999)
Gyr (Brasil)	0.93	0.07	0.37	0.63			Kemenes *et al.,* (1999)
Guzerá (Brasil)	0.92	0.08	0.34	0.36			Kemenes *et al*., (1999)
Caracu (Brasil)	0.68	0.32	0.57	0.43			Kemenes *et al.,* (1999)
Charolais (Brasil)	0.48	0.52	0.55	0.45			Kemenes *et al.,* (1999)
Canchim (Brasil)	0.63	0.37	0.4	0.6			Kemenes *et al*., (1999)

Continuación. Cuadro 2. Frecuencia genética de los alelos de las proteínas de la leche en diferentes estudios en Sur América, y el Caribe.

RAZA	Frecuencia génica						Fuente
	k-CN		β-LG		α-LA		
	A	B	A	B	A	B	
Sta Gertrudis (Brasil)	0.85	0.15	0.17	0.83			Kemenes *et al.,* (1999)
Peruano (Perú)	0.57	0.43					Veli *et al.,* (2005)
Uruguay (Uruguay)	0.51	0.49	0.49	0.51	0.28	0.72	Postiglioni *et al.,* (2002)
Argentino (Argentina)	0.7	0.3	0.358	0.642			Poli *et al.,* (2002)
Argentino (Argentina)	0.61	0.39	0.346	0.654			Lirón *et al.,* (2002)
Argentino (Argentina)	0.65	0.35	0.533	0.47			Martínez *et al*., (2003)
Patagonico (Argentina)	0.61	0.4	0.845	0.155			Martínez *et al.,* (2003)
Argentino (Argentina)	0.59	0.44					Ripoli *et al.,* (1999)
Saavedreño (Bolivia)	0.56	0.44	0.175	0.825			Lirón *et al*., (2002)
Chaqueño (Bolivia)	0.36	0.65	0.397	0.603			Lirón *et al.,* (2002)
Yacumeño (Bolivia)	0.43	0.57	0.483	0.517			Lirón *et al.,* (2002)
Cusqueño (Bolivia)	0.7	0.3	0.4	0.6			Lirón *et al.,* (2002)

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 LOCALIZACION

El presente estudio se llevo a cabo en dos fases; Toma de muestras (muestreo del ganado criollo y colombiano) y genotipificación en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, Valle del Cauca.

2.1.1Toma de muestras

Se obtuvieron 354 muestras de sangre de ocho razas bovinas criollas (30 individuos por raza): Blanco orejinegro (BON), Caqueteño (CQT), Casanareño (CAS), Costeño con cuernos (CCC), Chino Santandereano (Ch.S), Hartón del Valle (HV), Romosinuano (ROMO) y Sanmartinero (SM), dos colombianas Lucerna (LUC) y Velásquez (VEL) y dos razas comerciales como controles Brahman y Holstein (Cuadro 3).

2.1.2 Extracción de ADN

El ADN se extrajo a partir de 5 ml de sangre tomada mediante punción en la vena coccígea, utilizando el protocolo de extracción Salting Out (Miller *et al,* 1988). La calidad de ADN se evaluó en geles de agarosa al 0.8% en TBE 0.5X (0.045 M tris-borato, 0.001 M EDTA, pH 8.0) y tinción con bromuro etidio. Se usaron 2 µl de ADN con 2 µl de azul de bromofenol (0.25% de azul de bromofenol y 30% de glicerol en agua). Las muestras se corrieron a 80V durante 45 minutos, usando electroforesis horizontal (Cámara BioRad wide mini sub-cell GT). Los geles se fotografiaron bajo luz ultravioleta usando una cámara digital (Kodak EDAS 290). La cuantificación de ADN se realizó por comparación de ADN con concentración conocida del bacteriófago Lambda.

Cuadro 3. Numero de nuestras por raza y localización de los sitios de muestreo.

Raza	N	Localización	
		Finca	**Municipio- Departamento**
Blanco orejinegro	30	El Medio	Popayán –Cauca
Caqueteño	30	San Isidro-Villa Meri	Florencia y Morelia- Caquetá
Casanareño	30	Chaparral	Arauca-Arauca
Costeño con cuernos	30	Villa Soco	Campeche –Atlántico
Chino Santandereano	30	Ojo de agua , Los pozos y El Trofeo	San Gil y San Alberto -Santander
Hartón del Valle	30	Banco ADN	UNAL
Lucerna	30	Lucerna	Valle de Cauca
Romosinuano	30	La Bonanza	Sincerin -Bolívar
Sanmartinero	30	Corinto –IRACA	Sanmartín-Meta
Velásquez	30	África	La Dorada- Caldas
Brahman	24	Banco ADN	UNAL
Holstein	30	Banco ADN	UNAL

2.1.3. Conformación del Banco de ADN

Una vez el ADN fue cuantificado, se calculo la concentración por cada muestra y el ADN se diluyo a 20ng/µL. Las muestras fueron debidamente marcadas siguiendo un número consecutivo, la raza y el sexo y la procedencia, dicha información también se registró y guardó en una hoja de Excel versión 2007 de Microsoft Office (ANEXO 1). Las muestras se almacenaron en cajas plásticas para tubos de centrifuga de 1.5 mL. a -20°C, y posteriormente a -80°C.

2.1.4 Marcadores genéticos

Para la identificación de las variantes genéticas de las proteínas de la leche en las 12 razas de ganado en estudio se usaron marcadores específicos para k-CN, β –LG, α-LA. Los detalles de las secuencias de los cebadores y de su producto de amplificación se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Marcadores genéticos usados, secuencia de los cebadores y tamaño de amplificado.

Marcador	Secuencia	Tamaño	Fuente
k-CN	sentido- 5´ -TGT GCT GAG TAG GTA TCC TAG TTA TGG-3´ antisentido, 5´-GCG TTG TCT TCT TTG ATG TCT CCT TAG-3´	453 pb	Barroso *et al.,* (1998)
β –LG	sentido, 5´ -GTC CTT GTG CTG GAC ACC GAC TAC A-3´ antisentido, 5´-CAG GAC ACC GGC TCC CGG TAT ATG A-3´	262 pb	Ron *et al.,* (1994)
α-LA	sentido, 5´ -CTC TTC CTG GAT GTA AGG CTT-3´ antisentido, 5´-AGC CTG GGT GGC ATG GAA TA-3´	166 pb	Medrano y Aguilar-Cordova, (1990)

2.1.5 Amplificación

Para la amplificación de κ-CN se usó la metodología descrita por Barroso *et al*., (1998) y adaptada por Díaz *et al*., (2006). Se amplificó un fragmento de 453 pb localizado en el cromosoma 6 del ganado bovino; se tomaron entre 20-50 ng de ADN y se mezclaron en una solución buffer de PCR (Cuadro 5) que contenía los cebadores: sentido- 5´-TGT GCT GAG TAG GTA TCC TAG TTA TGG-3´; antisentido, 5´-GCG TTG TCT TCT TTG ATG TCT CCT TAG-3. Las muestras fueron sometidas a un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 94°C y luego 35 ciclos a 94°C por un minuto, 65°C por un minuto y 72°C por dos minutos con una extensión final de 72°C por 5 minutos, en un termociclador marca PTC -100TM (MJ Research, Inc-USA).

Para β-LG se amplifico un fragmento de 247 a 262 pb con las condiciones descritas por Medrano y Aguilar-Cordova, (1990) y adaptado por Díaz *et al*, (2006). Se utilizaron 50 ng/µl de ADN y se mezclaron con 3 µl de Tris-HCL (20mM) y se desnaturalizaron en un termociclador a 95°C bajando luego la temperatura a

85 °C, momento en el cual se incluyo la mezcla de buffer de PCR (Cuadro 5) con 0.75µl (10 pmoles/µl) de cada cebador (BLGP3 sentido, 5´ -GTC CTT GTG CTG GAC ACC GAC TAC A-3´; y BLGP4 antisentido, 5´-CAG GAC ACC GGC TCC CGG TAT ATG A-3´). Las muestras se desnaturalizaron por 3 minutos a 97°C, 60°C por un minuto y 72°C por un minuto y luego 35 ciclos, constando cada ciclo de 94 °C por un minuto, 60°C por un minuto y 72°C por un minuto.

Para α-LA se amplificó un fragmento de 166 pb (Mao, 1993) localizado en el cromosoma 5 siguiendo las condiciones descritas por Medrano y Aguilar-Cordova, (1990) y adaptada por Díaz *et al.,* (2006).

Se tomaron 50 ng/µl de ADN y mezclaron en una solución buffer de PCR (Cuadro 5) con 0.25µl (10 pmoles/µl) de cada cebador (sentido, 5´ -CTC TTC CTG GAT GTA AGG CTT-3´; y antisentido, 5´-AGC CTG GGT GGC ATG GAA TA-3´). Posteriormente las muestras se sometieron a un ciclo de desnaturalización de 2 minutos a 95°C, 55°C por un minuto y 72°C por un minuto y luego a 35 ciclos, constando cada ciclo de 95°C por un minuto, 55°C por un minuto y 72°C por un minuto.

Cuadro 5. Composición de la solución de PCR para κ-CN, β-LA y α-LA

	k-CN [1]		**B-LG**[2]		**α-LA**[3]	
Reactivos	[Inicial]	Volumen µl	[Inicial]	Volumen µl	[Inicial]	Volumen µl
Buffer Taq	10 X	2.5	10X	2,5	10X	2,5
DNTPs	1,25 mM	4.0	1,25 mM	2	1,25 mM	2
Primer F	20 pmol/µl	0.5	10 pmol/µl	0,75	10 pmol/µl	0,25
Primer R	20 pmol/µl	0.5	10 pmol/µl	0,75	10 pmol/µl	0,25
MgCl2	25 mM	2.5	25 mM	1,5	25 mM	1,5
Enzima Taq	2 U	0,2	2 U	0,2	2 U	0,2
DNA	20-50 ng/µl	2	20-50ng/µl	2	20-50ng/µl	2
Agua	*	18.	*	15,3	*	16,3
Total		25 µl		25 µl		25 µl

1. Adaptado de Barroso et al., (1998); Díaz *et al,* (2006).
2. Adaptado de Medrano y Aguilar-Cordova, (1990); Díaz *et al.,* (2006).
3. Adaptado de Medrano y Aguilar-Cordova, (1990); Díaz *et al.,* (2006).

2.1.6 Genotipificación

Los alelos se identificaron mediante PCR-SSCP para las tres proteínas. Se mezclaron 2µl de los productos de PCR con 8 µl de buffer desnaturalizante (0.05% de Xilene-Cianol, 0.05% de azul bromofenol, 5.5mM de EDTA pH 8.0). Se desnaturalizaron a 95°C por 5 minutos y luego se enfriaron en hielo por dos minutos para evitar que el ADN se renaturalice. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida (100:1 Acrilamida:N,N´-metilene-bis-acrilamida) al 12%, 14 % y 16 % para k-CN, β-LG y α–LA respectivamente de 12x8 cm. (*Cámara Biometra*®), glicerol al 3.7 % para β-LG y α–LA y 5% para k-CN, con TBE 0.5 X (0.045 M tris-borato, 0.001 M EDTA, pH 8.0). Para la corrida se uso buffer TBE 0,5 X, excepto para β-LG que se uso TBE 1X condición que difiere a lo reportado por Díaz *et al.*, (2006) quienes usaron TBE 0.5X, posteriormente fueron corridos a 180 Voltios (V) por 12 horas (h), 160 V /10 h y 180 V / 4 h (k-CN, β-LG y α–LA respectivamente) a una temperatura constante de 12° C, las condiciones para β -LG difieren de las descritas por Díaz *et al.*, 2006 (corrida a 200 V/7h). Después de la electroforesis las bandas se tiñeron con nitrato de plata.

2.1.7 Análisis De Datos

Se estimaron las frecuencias alélicas y la Heterocigocidad (Nei., 1978). Para estimar las desviaciones a las proporciones de Hardy y Weinberg se uso el método de la cadena Marcoviana descrito por Guo y Tompson, (1992) y el estimador F_{IS} (Weir y Cockerham, 1984) para todos los análisis se uso el software estadístico Arlequín 3.1 versión 3.1 (Excoffier *et al.,* 2006).

El grado de estructura genética se estimo a partir del AMOVA (Análisis de Varianza Molecular) basado en las frecuencias génicas de las poblaciones (Weir y Cockerham., 1984) en dos niveles jerárquicos.

Los valores de distancia genética entre razas se estimaron mediante el índice de coancestría (Reynolds *et al*., 1983) mediante el software estadístico Arlequín ver 3.1.

3. RESULTADOS

3.1 BANCO DE ADN DEL GANADO CRIOLLO COLOMBIANO.

Se obtuvieron 354 muestras de las razas de ganado criollo colombiano: Blanco Orejinegro (BON), Caqueteño (CQT), Casanareño (CAS), Costeño con cuernos (CCC), Chino Santandereano (ChS), Hartón del Valle (HV), Lucerna (LUC), Romosinuano (ROMO), Sanmartinero (SM), Velásquez (VEL) (Cuadro 6), de las cuales 232 eran hembras y 53 machos y dos razas comerciales Brahman (BRAH) y Holstein (HOLS). La georeferenciación se hizo usando un mapa del sitio donde se realizó el muestreo de las diferentes razas de ganado criollo colombiano en el territorio nacional, mediante el programa “DIVA- GIS. ver 7.1.1” (Ver figura 2).

3.2 IDENTIFICACIÓN DE ALELOS

Mediante la técnica PCR-SSCP en el ganado criollo colombiano (GCC), se detectaron siete patrones de banda diferentes en k-CN correspondientes a los alelos A, B, A^1, G, I, E y un patrón que no pudo ser identificado que se le denomino N. Igualmente se hallaron dos patrones de banda para β-LG y dos para α–LA. Los patrones de corrida se observan en las figuras 3 y 4.

3.3 FRECUENCIA ALÉLICA DE *K*-CN.

En el cuadro 7 se observa las frecuencias de los tres loci evaluados en el GCC y de acuerdo con la raza. En el GCC las mayores frecuencias fueron encontradas para los alelos k-CN A (0.390±0.02) y k-CN B (0.418±0.20), mientras que las frecuencias de los demás alelos fueron bajas: k-CN G (0.095±0.01), k-CN I (0.038±0.08), k-CN A^1 (0.025±0.06), k-CN E (0.006±0.00) y k-CN N (0.01±0.04). En HOLS se halló una mayor proporción de k-CN A (0.76±0,05) respecto a k-CN B

(0.20±0.05) (Cuadro 7). Sin embargo en BRAH la mayor frecuencia fue obtenida para el alelo k-CN G (0.52±0.07), seguido de A (0.24±0.06) y el alelo B (0.065±0.03) tuvo baja frecuencia.

Cuadro 6. Distribución de las muestras de acuerdo con la raza y localización por sitio de muestreo del ganado criollo colombiano. N= numero de muestras.

Raza	Distribución por sexos			Localización			
	N	Hembras	Machos	Finca	Municipio- Departamento	Georefencia	
Blanco orejinegro	30	22	8	El Medio	Popayán –Cauca	2° 26' N	76°36' O
Caqueteño	30	19	2	San Isidro	Florencia- Caquetá	1° 37' N	75° 37' O
		7	2	Villa Meri	Morelia- Caquetá	1° 29'N	75°37'O
Casanareño	30	26	6	Chaparral	Arauca-Arauca	7° 04' N	70° 45' O
Costeño con cuernos	30	27	3	Villa Soco	Campeche –Atlántico	10° 43'N	74° 54' O
Chino Santandereano	30	25	5	Ojo de agua y Los pozos	San Gil-Santander	6° 33' N	73° 07' O
				El Trofeo	San Alberto-Cesar	7° 45'N	73°23'O
Hartón del Valle	30	_	_	(banco ADN	Valle del Cauca	3° 24' N	76° 21' O
Lucerna	30	30	0	Lucerna	Valle de Cauca	4° 12' N	76° 09' O
Romosinuano	30	22	8	La Bonanza	Sincerin -Bolívar	8° 43' N	74° 36' O
Sanmartinero	30	27	3	Corinto –IRACA	Sanmartín-Meta	3° 41' N	73° 41' O
Velásquez	30	19	11	África	La Dorada- Caldas	5° 27' N	74° 40' O
Total GCC	**300**	**232**	**53**				
Brahman	24	_	_	Banco ADN	Valle del Cauca	3° 30' N	76° 18' O
Holstein	30	_	_	Banco ADN	Valle del Cauca	3° 30' N	76° 18' O
Total muestras	**354**						

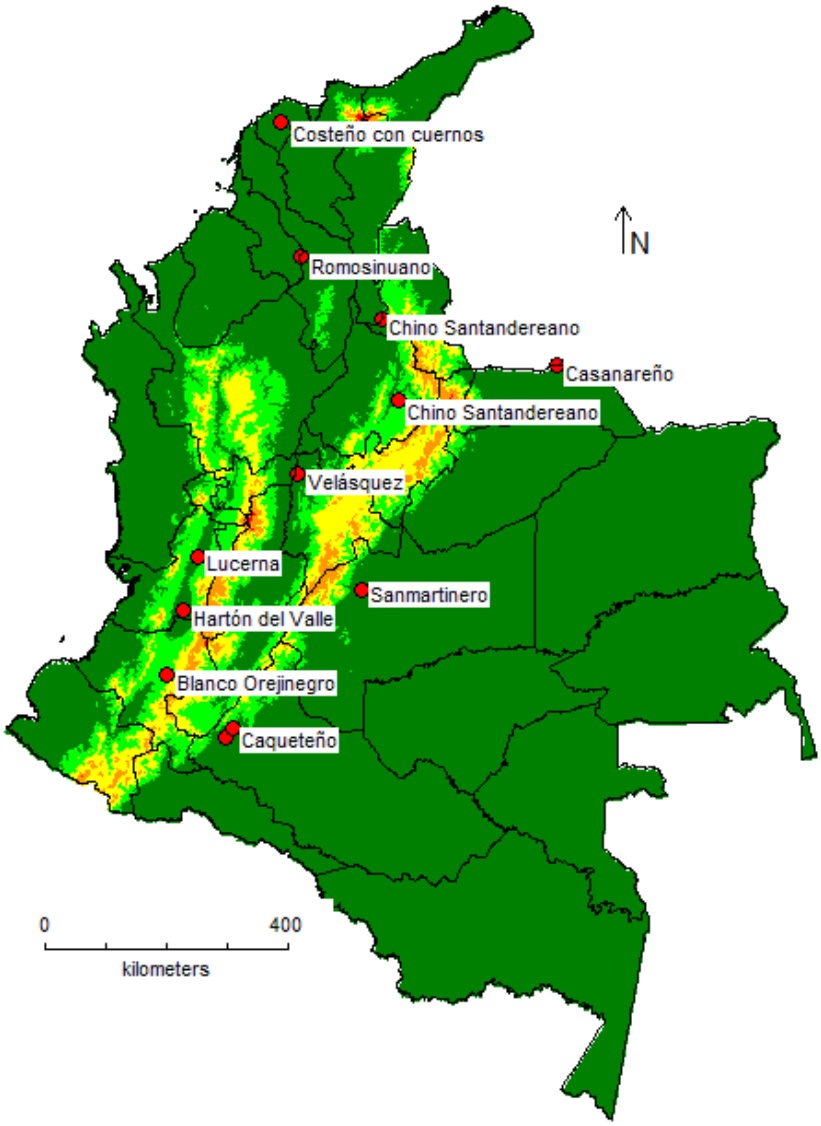

Figura 2. Sitios de muestreo de las razas criollas colombianas

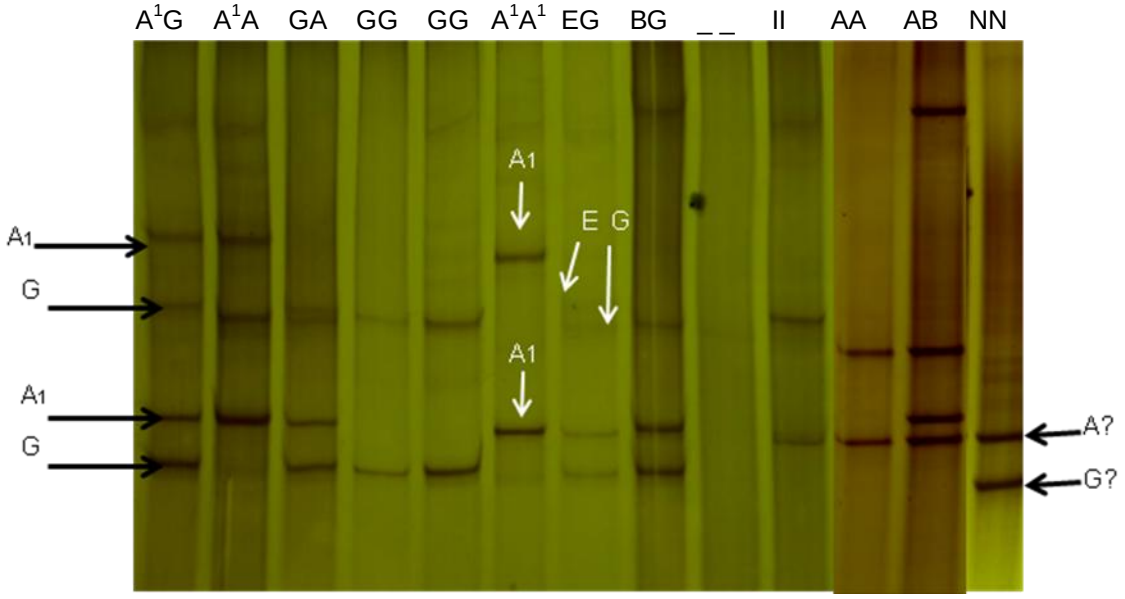

Figura 3. Patrones de corrida para siete variantes alélicas de k-CN en el GCC mediante SSCP.

Figura 4. Patrones de corrida para dos variantes alélicas de β-LG (izquierda) y α–LA (derecha) en el GCC mediante SSCP.

En la figura 5 se observa las frecuencias para k-CN del GCC y las razas comerciales usadas en este estudio. El alelo de interés k-CN B presento muy alta frecuencia en las razas criollas CCC (0.81±0.050), ROMO (0.66±0.061), alta frecuencia en CQT (0.55±0.065), ChS (0.48±0.065) y VEL (0.43±0.064) y en menor proporción en BON (0.316±0.060), SM (0.316±0.060), HV (0.30±0.059) y CAS (0.26±0.057). En contraste las frecuencias más bajas fueron halladas en la raza colombiana LUC (0.03 ± 0.02), BRAH (0.068±0.03) y HOLS (0.20±0.052).

La variante k-CN A se halló en alta frecuencia en la raza colombiana LUC (0.916±0.035), en la control HOLS (0.76±0.055) y en las criollas BON (0.616±0.063) y SM (0.46±0.064).

El alelo k-CN I estuvo presente en seis de las doce razas evaluadas, pero se destacó en SM (0.13±0.044) y en muy baja frecuencia en las razas CQT, CAS, ChS, HV y LUC (Cuadro 7).

El alelo k-CN G fue encontrado en todas las razas con excepción de LUC, ROMO, y en mayor frecuencia en BRAH (0.52±0.074) y CAS (0.36±0.062), HV (0.233±0.05) y VEL (0.11±0.041) (Cuadro 7).

En siete de las doce razas se detectó la variante k-CN A^1 y con mayor frecuencia en CAS (0.15±0.046) y BRAH (0.136±0.050). La variante k-CN E fue hallada en baja frecuencia y con un valor similar (0.016±0.016) en CQT, CAS, SM y VEL. En lo concerniente a la variante que no pudo ser identificada (k-CN N) únicamente se halló en baja frecuencia en las razas ChS (0.066±0.032) y VEL (0.033±0.023).

Cuadro 7. Frecuencias génicas y desviaciones estándar de las variantes alélicas de κ-CN, β-LG y α-LA en diez razas criollas colombianas y dos razas comerciales (Arlequin ver 3.1)

Locus	Alelo	Razas criollas y colombianas (GCC)										Promedio	Razas Comerciales	
		BON	CQT	CAS	ChS	CCC	HV	LUC	ROMO	SM	VEL	GCC	BRAH	HOLS
k-CN	A	0,616± 0,063	0,250 ± 0,056	0,100 ± 0,039	0,283 ± 0,058	0,150±0,046	0,383 ± 0,063	0,916 ± 0,035	0,330 ± 0,61	0,460 ± 0,064	0,380 ± 0,063	0,390 ± 0,019	0,240 ± 0,063	0,760±0,055
	B	0,316±0,060	0,550± 0,065	0,266 ± 0,057	0,480 ± 0,065	0,816 ± 0,050	0,300 ± 0,059	0,033 ± 0,023	0,660± 0,061	0,316± 0,060	0,430 ± 0,064	0,418 ± 0,20	0,065 ± 0,036	0,200±0,052
	I	0,000	0,050 ± 0,028	0,033±0,023	0,066 ± 0,032	0,000	0,050±0,028	0,050 ± 0,028	0,000	0,130 ± 0,044	0,000	0,038 ± 0,078	0,000	0,000
	G	0,050± 0.028	0,066 ± 0,032	0,366 ± 0,062	0,066 ± 0,032	0,033 ± 0,023	0,233 ± 0,055	0,000	0,000	0,016±0,016	0,116±0,041	0,095 ± 0,011	0,521 ± 0,074	0,033±0,023
	A[1]	0,0166± 0,016	0,016 ± 0,016	0,150 ± 0,046	0,033±0,023	0,000	0,000	0,000	0,000	0,016 ± 0,016	0,016±0,016	0,025 ± 0,063	0,136 0,050	0,000
	E	0,000	0,016±0,016	0,016 ± 0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,016 ± 0,016	0,016±0,016	0,006± 0,003	0,000	0,000
	N	0,000	0,000	0,000	0,066±0,032	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00	0,033±0,023	0,01 ± 0,040	0,000	0,000
β-LG	A	0,516± 0,065	0,283 ± 0,058	0,650 ± 0,062	0,366 ± 0,062	0,466 ± 0,064	0,316 ± 0,060	0,350 ± 0,062	0,433 ± 0,064	0,633 ±0,062	0,633 ± 0,062	0,463 ± 0,020	0,282 ± 0,069	0,600±0,063
	B	0,483 ± 0,065	0,716 ± 0,058	0,310 ± 0,060	0,633 ± 0,062	0,533 ± 0,064	0,650 ± 0,062	0,650 ± 0,062	0,566 ± 0,064	0,366 ± 0,062	0,366 ± 0,062	0,530 ± 0,020	0,673 ± 0,069	0,400±0,063
α –LA	A	0,550 ± 0,065	0,500 ± 0,065	0,330±0,061	0,316 ± 0,060	0,300 ± 0,059	0,083 ± 0,035	0,216 ± 0,053	0,300 ± 0,059	0,433 ± 0,064	0,433 ± 0,064	0,346 ± 0,019	0 ± 0,0	0,530 ± 0,064
	B	0,450 ± 0,064	0,500 ± 0,065	0,666±0,061	0,683 ± 0,062	0,700 ± 0,059	0,850 ± 0,046	0,783 ± 0,053	0,700 ± 0,059	0,566 ± 0,064	0,566 ± 0,064	0,643 ± 0,019	1± 0.0	0,466 ± 0,064

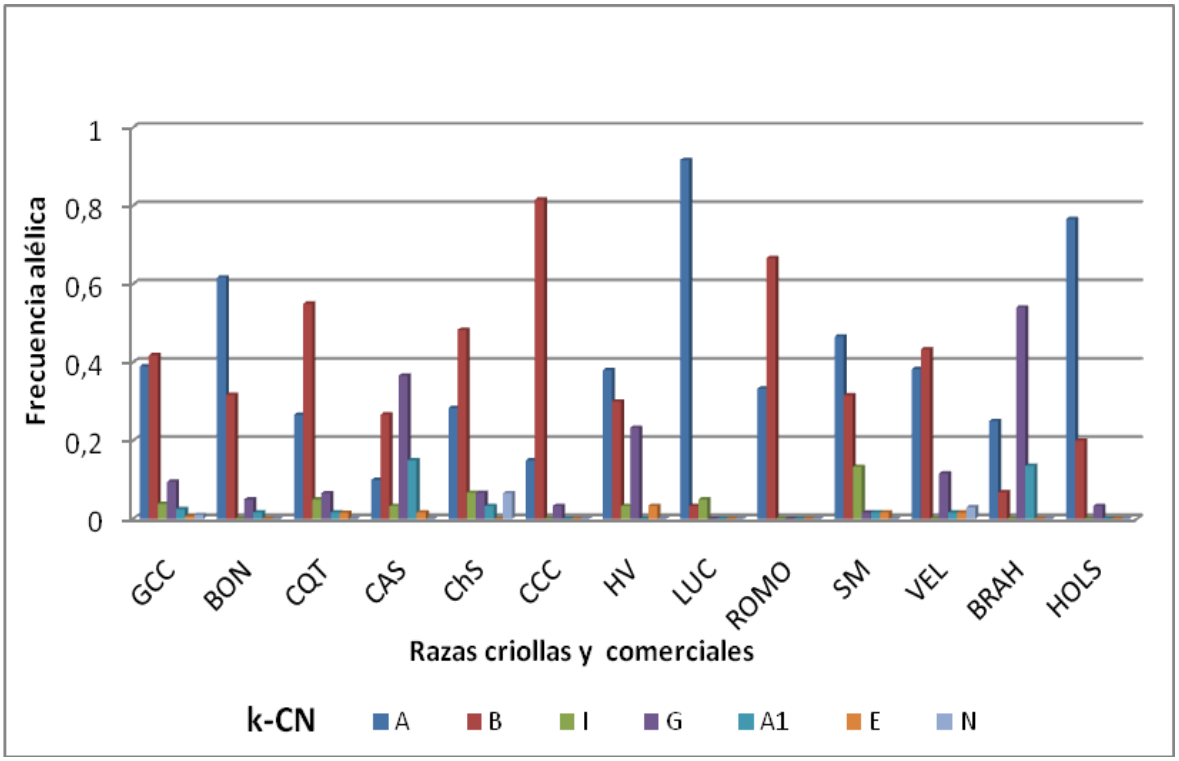

Figura 5. Distribución de frecuencias alélicas de k-CN en el ganado criollo colombiano y dos razas control comerciales.

3.4. FRECUENCIAS ALÉLICAS DE β-LG

En el cuadro 7 se observa la frecuencia para las variantes A y B de β-LG. En el GCC se obtuvo una mayor frecuencia para la variante β-LG B (0.53±0.020), que para β-LG A (0.463±0.020). La frecuencia en la raza control HOLS fue mayor para β-LG A (0.60±0.063) que en β-LG B (0.40±0.063), mientras en BRAH, β-LG A (0.282±0.06) fue menor que para β-LG B (0.673±0.06).

La figura 6 se compara la distribución de las frecuencias β-LG en el GCC y las razas comerciales. La variante de interés β-LG B fue encontrada en alta frecuencia en las razas; CQT (0.717±0.058), LUC (0.65±0.062), HV (0.65±0.06), ChS

(0.633±0.06), ROMO (0.567), CCC (0.533±0.06), BRAH (0.673±0.069) y en menor proporción en las razas criollas BON, CAS, SM, VEL, y la raza control HOLS.

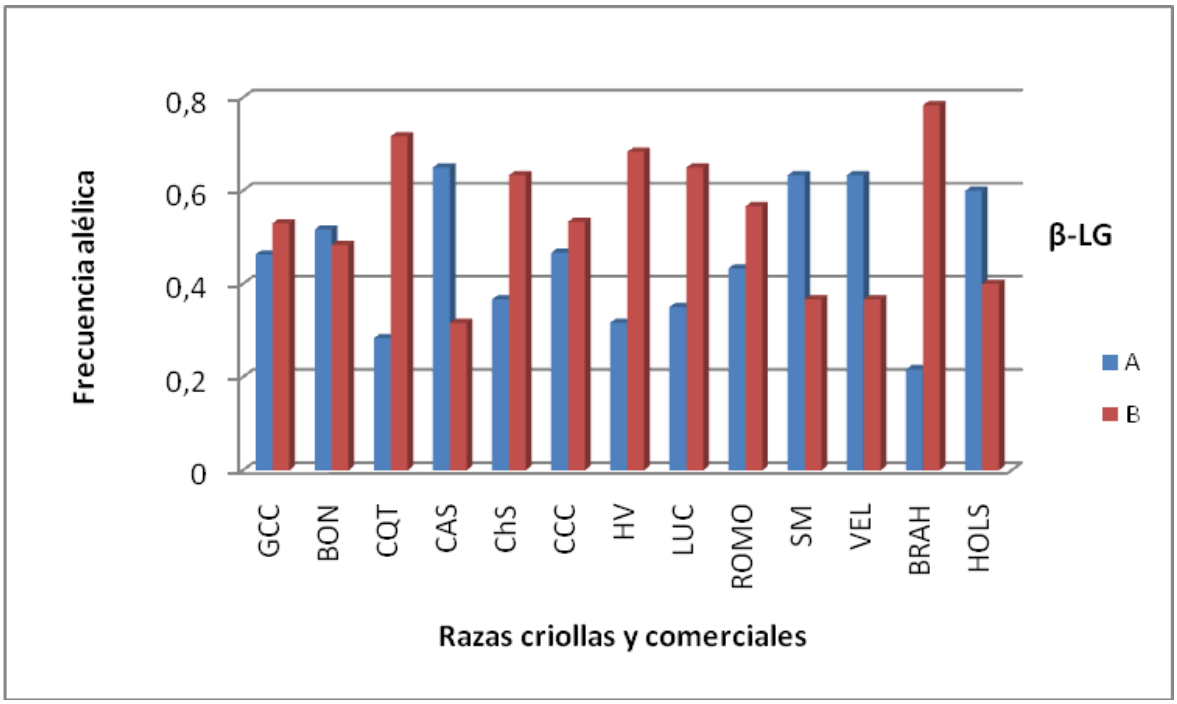

Figura 6. Distribución de frecuencias alélicas de β-LG en el ganado criollo colombiano y dos razas comerciales.

3.5. FRECUENCIAS ALÉLICAS DE α–LA

En todas las razas criollas, colombianas y controles se detectaron las variantes A y B α–LA, excepto en BRAH donde solo se halló la variante α–LA B (Cuadro 7). En el GCC se halló una mayor frecuencia de la variante α–LA B (0.64±0.019) que para α–LA A (0.35±0.019), mientras que en HOLS fue mayor α–LA A (0.530 ±0,064) que α–LA B (0.466±0,064); BRAH no presentó el alelo α–LA A.

En la figura 7 se compara las frecuencias de α–LA entre las diferentes razas. Las criollas presentaron valores altos de frecuencia para el alelo α–LA B; HV

(0.85±0.046), LUC (0.78±0.05), ROMO (0.7±0.059), CCC (0.7±0.059), ChS (0.68±0.06), SM (0.56±0.064), CAS (0.66±0.061), VEL (0.56±0.064) y CQT (0.50±0.065), levemente inferior en BON, HOLS y completamente fijado en BRAH.

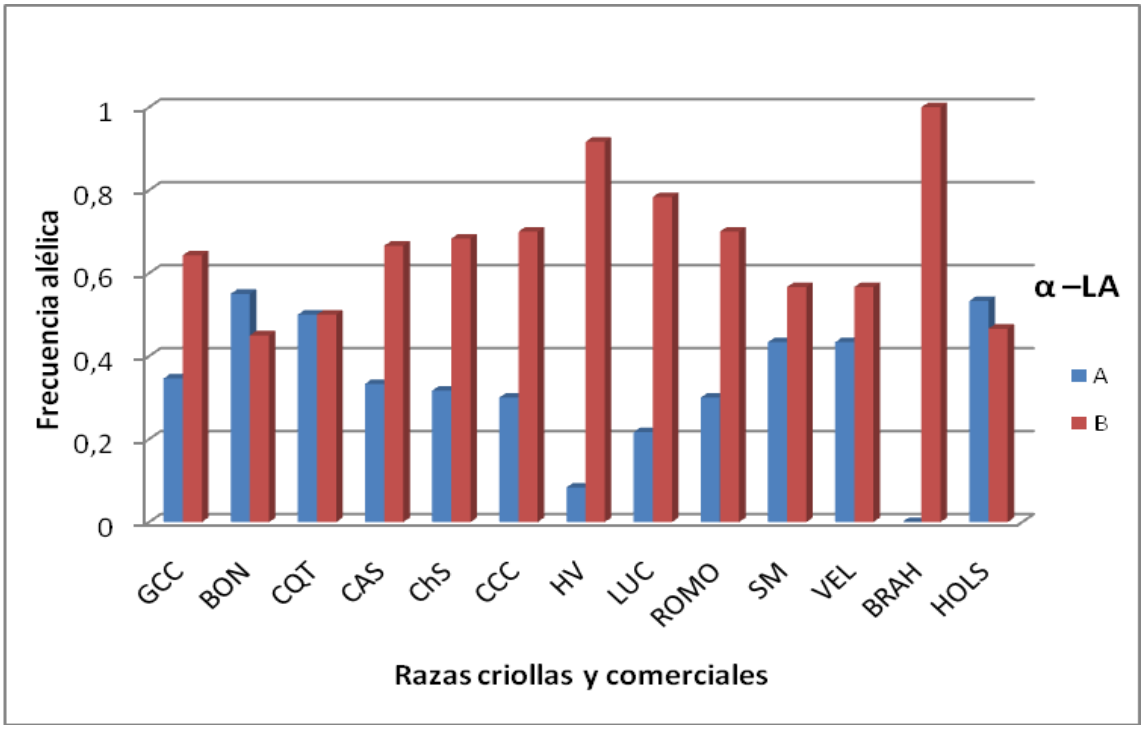

Figura 7. Distribución de frecuencias alélicas de α–LA en el ganado criollo colombiano y dos razas comerciales.

3.6. DIVERSIDAD GENETICA y NÚMERO PROMEDIO DE ALELOS (NPA).

El número promedio de alelos en las diez razas de ganado criollo y las dos razas control se observa en el cuadro 8. El número promedio de alelos (NPA) en el GCC para los tres loci evaluados fue 3.667±2.357, en BRAH de 2.33±1.210 y HOLS de 2.33±0.470.

Para k-CN el número de alelos promedio en las razas criollas fue 4.60±1.57, mientras en las razas comerciales (HOLS y BRAH) de 3.5±0.71. El locus k-CN fue el más polimórfico con un valor de 6 alelos en las criollas CQT, CAS, ChS, SM y

VEL, en contraste, solo dos alelos fueron observados en ROMO. Para β-LG se halló un NPA igual en las criollas que en las razas control (2.0). El NPA para α–LA en las criollas fue de 2.0±0.00, mientras que en las razas control fue menor (1.5±0.71). Se aclara que en la raza control BRAH solo se detectaron homocigotos para el alelo B de α–LA.

Cuadro 8. Estadística descriptiva de κ-CN, β-LG y α-LA para las diez razas de ganado criollo y colombiano y dos razas comerciales: Número de muestras (N), Número promedio de alélos (NA) y promedio (NPA).

		NA			
Raza	**N**	**k-CN**	**β-LG**	**α–LA**	**NP A**
BON	30	4	2	2	2.667 ± 0.943
CQT	29	6	2	2	3.333 ± 1.886
CAS	29	6	2	2	3.333 ± 1.886
CCC	30	3	2	2	2.330 ± 0.471
ChS	30	6	2	2	3.333 ± 1.886
HV	29	4	2	2	2.660 ± 0.943
LUC	30	3	2	2	2.330 ± 0.471
ROMO	30	2	2	2	2.000 ± 0.000
SM	29	6	2	2	3.333 ± 1.886
VEL	30	6	2	2	3.333 ± 1.886
Promedio GCC	30	4.60±1.57	2±0.0	2±0.0	2.865 ± 1.226
Total GCC	**296**	**7**	**2**	**2**	**3.667 ± 2.357**
BRAH	23	4	2	1	2.330 ± 1.247
HOLS	30	3	2	2	2.333 ± 0.471
Total comerciales	**53**	**3.5±0.71**	**2±0.0**	**1.5±0.70**	**2.330 ± 0.860**

3.7. HETEROCIGOSIDAD OBSERVADA (H_O) y ESPERADA (H_e) y EQUILIBRIO HARDY WEINBERG (EHW).

Las estimaciones de heterocigocidad (observada y esperada) y la prueba de equilibrio Hardy Weinberg (EHW) se muestran en el cuadro 9. En el GCC el valor de diversidad genética promedio (H_e) para los tres loci fue de 0.482±0.09. Las razas CAS, ChS VEL y SM presentaron los valores más altos de H_e.

Los valores H_e en la población de GCC oscilaron entre 0.31-0.73 para k-CN, con excepción de la raza LUC donde se encontró un valor menor. La diversidad genética promedio (H_e) para el gen de κ-CN en el ganado GCC fue de 0.65, similar a la encontrada en BRAH, pero superior a HOLS (0.37). No se encontró Equilibro Hardy Weinberg (EHW) en las razas BON, ChS, HV, LUC y VEL (Cuadro 9).

La H_e en β-LG oscilo entre 0.41 a 0.50, el valor promedio de H_e en el GCC fue 0.49. Las razas BON y CCC mostraron los valores más altos de diversidad genética (Cuadro 9). Las razas CQT, HV, ChS, LUC y BRAH no se encontraron en EHW.

El valor de H_e para α-LA varió entre 0.16 a 0.5, el promedio para el GCC fue de 0.45, en tanto que la raza HOLS fue mayor (0.5) y en BRAH solo se encontró un alelo (H_e = 0.0). Los valores más altos de H_e fueron estimados en las razas BON, CQT y HOLS. Se determinó que las razas BON, CQT, ROMO y HOLS no están en EHW (Cuadro 9)

Los valores de F_{IS} resultaron variables entre las razas criollas y las control (Cuadro 9). El valor global para el GCC resulto altamente significativo (F_{IS} =0.099, P<0.01). La endogamia intrapoblacional estimada mediante el F_{IS} solo resultó significativamente diferente de cero, para la raza CAS, LUC y BRAH.

Cuadro 9. Valores estimados de Heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) para κ-CN, β-LG, α-LA, en diez razas de ganado criollo colombiano y dos razas comerciales e índice de fijación (F_{IS}).

	He			Promedio			F_{IS}
Raza	k-CN	β-LG	α-LA	Ho	He		
BON	0.520*	0.507	0.50**	0.711 ± 0.134	0.512 ± 0.010		-0.241
CQT	0.602	0.413*	0.50**	0.630 ± 0.314	0.508 ± 0.077		-0.174
CAS	0.738	0.448	0.452	0.476 ± 0.170	0.546 ± 0.136		0.138*
CCC	0.314	0.506	0.427	0.367 ± 0.047	0.416 ± 0.079		0.107
ChS	0.683*	0.472*	0.448	0.418 ± 0.161	0.535 ± 0.105		0.038
HV	0.697*	0.448*	0.165	0.401 ± 0.276	0.437 ± 0.217		-0.015
LUC	0.159*	0.462*	0.345	0.188 ± 0.063	0.322 ± 0.125		0.407**
ROMO	0.451	0.499	0.427**	0.311 ± 0.137	0.460 ± 0.030		0.094
SM	0.650	0.472	0.499	0.474 ± 0.155	0.541 ± 0.079		0.102
VEL	0.661*	0.472	0.499	0.433 ± 0.047	0.547 ± 0.081		0.138
Total GCC	**0.651****	**0.498****	**0.455**	**0.441 ± 0.150**	**0.482 ± 0.094**		0.099**
BRAH	0.633	0.426*	0.000	0.257 ± 0.274	0.352 ± 0.262		0.218*
HOLS	0.377	0.481	0.506**	0.567 ± 0.268	0.457 ± 0.057		-0.159
Total comerciales	**0.505**	**0.454**	**0.253**	**0.412 0.271**	**0.405 0.159**		

EHW según la prueba exacta descrita por Guo and Thompson (1992) utilizada por el paquete estadístico Arlequín ver. 3.1 (Schneider *et al.,* 2000) usando la cadena Markoviana con longitud pronosticada =100000; No. de Demorizaciones = 1000.
*Probabilidad estadísticamente significativa (*P*<0,05) de que no hay EHW en cada raza.
**Probabilidad altamente significativa (*P*<0,01) de que no hay EHW en cada raza.

3.8. DIFERENCIACIÓN Y ESTRUCTURA GENÉTICA

3.8.1 Análisis de Varianza Molecular

Los resultados del Análisis de varianza molecular (AMOVA) se observan en el cuadro 10. En los tres loci evaluados de la población de GCC se encontró una alta diferenciación genética (*P*< 0.01) respecto a BRAH pero no con HOLS (*P*= 0.11828).

El análisis de varianza molecular (AMOVA) reveló que el 89% de la varianza genética para los tres genes de las proteínas de la leche (κ-CN, β-LG y α-LA), fue ocasionada por variaciones entre los individuos, mientras que el 7.7% corresponde a variaciones entre razas y el 3.21 % correspondió a variaciones entre individuos dentro de cada raza.

Cuadro 10. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) entre y dentro de diez razas de ganado criollo Colombiano y dos comerciales para tres loci.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre razas	11	27.339	0.03495 Va	7.76
Entre individuos dentro de razas	341	146.551	0.01446 Vb	3.21
Entre individuos	353	141.500	0.40085 Vc	89.03
Total	705	232.29	0.45026	

F_{ST} = 0.077 (*P*< 0.01)
AMOVA basado en Excoffier *et al.,* (1992).

El valor del coeficiente de diferenciación genética F_{ST} global fue 0.077 (*P*<0.01), lo que indica que existe baja pero altamente significativa diferenciación genética entre las razas bovinas criollas.

Para identificar posibles correlaciones de diferenciación genética con la distancia geográfica y el sistema de producción (carne o leche), se hicieron las siguientes agrupaciones: Criollos (ocho razas de GCC) vs razas colombianas ó sintéticas (LUC y VEL), Producción de leche (BON, HV, CCC, LUC, ChS) vs Producción de carne (ROMO, VEL, CQT, CAS, SM), Andinos (BON, HV, LUC, VEL, CQT, ChS) vs costa norte (CCC y ROMO), Andinos vs Llanos (CAS y SM), Costa norte vs Llanos, Criollos vs Brahman y Criollos vs Holstein. En el cuadro 11 se observa los

resultados del análisis de varianza molecular y el coeficiente de diferenciación F_{ST} de acuerdo con los grupos conformados. Se encontró diferencias significativas en los valores de diferenciación genética F_{ST} únicamente en los grupos Llanos vs Costa norte y en Criollos vs Brahman.

Cuadro 11. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) entre y dentro de grupos; Criollos vs razas colombianas (sintéticas), Producción de leche vs Producción de carne, Andinos vs costa norte, Andinos vs Llanos, Costa norte vs Llanos, Criollos vs Brahman, Criollos vs Holstein.

Grupos	Fuente de variación	GL	Variación (%)	F_{ST}
Criollos vs Mejorados	Entre grupos	1	2.14	**0.02143ns**
	Entre poblaciones dentro de grupos	298	9.54	
	Entre individuos	300	88.32	
	Total	599		
Leche vs Carne	Entre grupos	1	-0.23	**-0.00225ns**
	Entre poblaciones dentro de grupos	298	10.58	
	Entre individuos	300	89.65	
	Total	599		
Zona Andina vs Costa	Entre grupos	1	1.04	**0.01039ns**
	Entre poblaciones dentro de grupos	238	8.36	
	Entre individuos	240	90.6	
	Total	479		
Andinos vs Llanos	Entre grupos	1	-0.46	**-0.00456ns**
	Entre poblaciones dentro de grupos	329	9.46	
	Entre individuos	240	90.99	
	Total	479		
Llanos vs Costa	Entre grupos	1	2.98	**0.02975****
	Entre poblaciones dentro de grupos	118	13.51	
	Entre individuos	120	83.52	
	Total	239		
Criollos vs Brahman	Entre grupos	1	8.31	**0.08306****
	Entre poblaciones dentro de grupos	261	6.74	
	Entre individuos	263	84.96	
	Total	525		
Criollos vs Holstein	Entre grupos	1	2.23	**0.02226ns**
	Entre poblaciones dentro de grupos	268	4	
	Entre individuos	270	93.77	
	Total	539		

*Probabilidad estadísticamente significativa (*P*<0,05)
**Probabilidad altamente significativa (*P*<0,01)
ns Diferencias no significativas (*P*>0.05)

3.8.2 Distancia genética

En el cuadro 12 se observa los valores de distancia genética para el GCC y dos razas comerciales. Los valores de distancia genética fueron estimados con base en el coeficiente de coancestría (Reynols *et al*., 1983).

La raza criolla LUC fue la más distante con valores de distancia desde 0.13 a 0.28 con las demás razas, excepto con HV (0.07). Las razas más cercanas fueron SM y ChS con VEL (0.01), ROMO con ChS (0.0), BON con SM (0.009) y CQT con ChS (0.005). Por su parte la raza BRAH resultó muy distante (0.11-0.22) de las razas criollas excepto CAS y HV (0.072 y 0.080 respectivamente). La raza Holstein resultó con una menor distancia de BON y SM.

Cuadro 12. Valores de distancia genética para el GCC y dos razas comerciales; Brahman y Holstein.

	LUC	BON	CQT	SM	ROMO	CCC	ChS	VEL	CAS	HV	BRAH	HOLS
LUC	0.000											
BON	0.164	0.000										
CAQ	0.216	0.065	0.000									
SM	**0.138**	**0.009**	0.039	0.000								
ROMO	0.168	0.061	0.024	0.029	0.000							
CCC	**0.279**	0.116	0.025	0.068	0.019	0.000						
ChS	0.155	0.052	**0.005**	0.013	**0.000**	0.016	0.000					
VEL	0.142	0.041	0.036	**0.000**	0.026	0.045	**0.011**	0.000				
CAS	0.205	0.102	0.077	0.048	0.069	0.092	0.047	0.024	0.000			
HV	0.077	0.104	0.069	0.062	0.032	0.085	0.027	0.043	0.057	0.000		
BRAH	0.224	0.192	0.149	0.148	0.165	0.209	0.120	0.111	0.072	0.080	0.000	
HOLS	0.130	0.000	0.086	0.007	0.085	0.141	0.067	0.032	0.103	0.107	0.183	0.000

3.9 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

En la Cuadro 13 se observan los resultados de la prueba de desequilibrio de ligamiento. Se encontró que en el GCC existe un desequilibrio de ligamiento únicamente entre β-LG/α-LA. Sin embargo cuando se analizó por cada razas se encontró desequilibrio de ligamiento entre k-CN/ α-LA en CQT y β-LG/α-LA en VEL y entre los tres loci evaluado en BON. En tanto que en la raza BRAH no se halló desequilibrio de ligamiento, pero si en HOLS entre k-CN/ α-LA y β-LG/α-LA (Cuadro 13)

Cuadro 13. Desequilibrio de ligamiento entre genes pareados en GCC y en las razas comerciales Brahman (BRAH) y Holstein (HOLS).

			Comerciales			
Raza	**GCC**		**BRAH**		**HOLS**	
Gen	**β-LG**	**α-LA**	**β-LG**	**α-LA**	**β-LG**	**α-LA**
κ-CN	0.088ns	0.00**	0.87ns	-	0.27ns	0.012*
β-LG		0.00**		-		0.00**

Probabilidades del equilibrio de ligamiento entre pares de genes obtenidos mediante la prueba exacta usando la cadena Markoviana (Slatkin *et a.l,* 1996) en 1023 pasos.

* indica que existe desequilibrio de ligamiento estadísticamente significativo (P<0,05)
** indican que existe desequilibrio de ligamiento altamente significativo (P<0,01)
ns indica que no existe desequilibrio de ligamiento estadísticamente significativo (P>0,05)

4. DISCUSION

4.1 FRECUENCIA ALÉLICA DE LOS GENES κ-CN, β-LG, α-LA.

En el ganado criollo colombiano (GCC) los seis alelos encontrados de k-CN (A, B, A^1, G, I, E), mostraron un patrón de corrida similar a los de una población de la raza criolla Hartón de Valle; sin embargo en tres individuos se encontró un patrón de migración diferente a los descritos en HV (Díaz *et al*., 2006). Se evidenció la efectividad de la técnica molecular PCR-SSCP en la identificación de mutaciones puntuales y el alcance en identificación variantes comunes y de nuevas variantes.

Los patrones de movilidad de las bandas para los tres genes de las proteínas de la leche, fueron similares a los reportado por Barroso *et al.,*(1998), pero diferentes a los reportados por Naranjo *et al.*,(2007), quienes sólo identificaron dos variantes alélicas para k-CN en una muestra de HV. En otro estudio se reportan cinco variantes para k-CN en *Bos indicus* (A, A^1, B y H) y tres en *Bos taurus* (A, B y E) (Ceriotti *et al.*, 2004). A pesar que la técnica molecular PCR-SSCP se desarrollo hace 20 años (Orita *et al.*, 1989), muchos de los investigadores prefieren usar PCR-RFLP para la identificación de alelos de k-CN, lo que conlleva a una mala identificación, puesto que se puede confundir la variante C como B y también confundir a la E, F, G, H, A^1 con la variante A lo cual puede dar lugar a sobreestimación en la frecuencia de A (Prinzenberg *et al*., 1999).

El alelo k-CN B es de alto interés por estar asociado con el contenido alto de proteína en la leche y la calidad de la leche (Boettcher *et al*. 2004; Caroli *et al*. 2004); el genotipo BB incrementa el contenido de proteína y grasa (Kucerova *et al.* 2006).

La frecuencia estimada para el alelo k-CN B en el GCC, resultó significativa ($P<0.05$) y superior a lo reportado para la mayoría de razas comerciales normalmente usadas en la producción de leche en Colombia (Figura 8) tales como la raza

Holstein en Antioquia (López *et al.,* 1999), Nariño (Solarte-Portilla *et al.,* 2009) y Valle del Cauca (Vivas y Vinasco, 2006) y la raza de carne Brahman (Díaz *et al*., 2006).

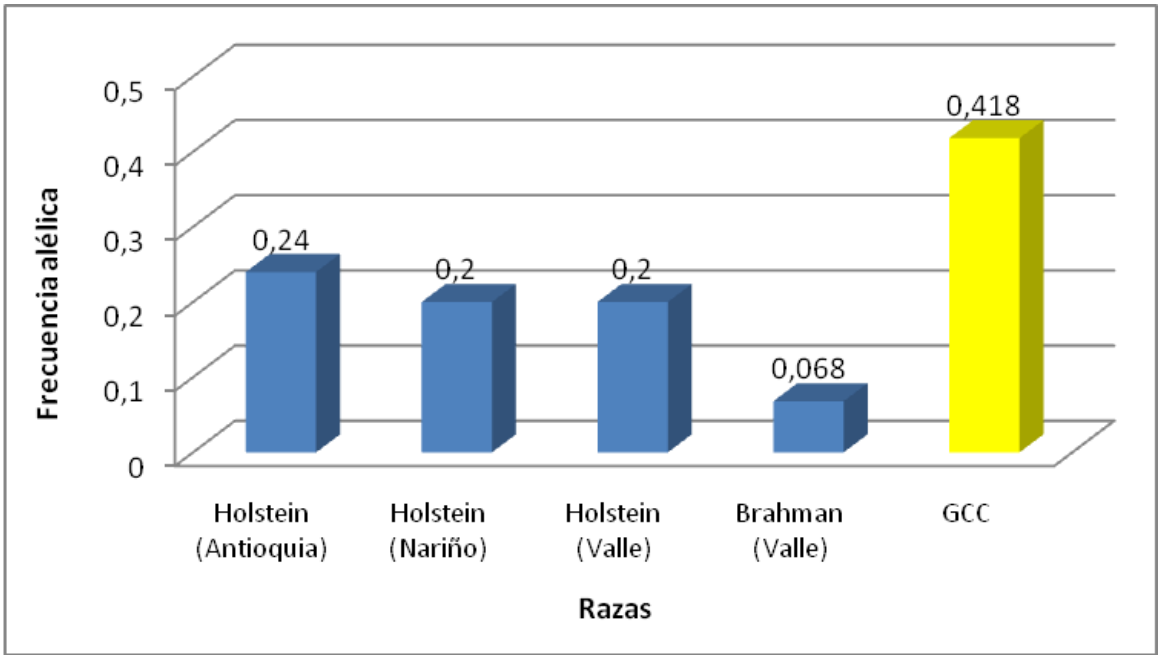

Figura 8. Comparación de la frecuencia de alelo de interés k-CN B en diferentes razas comerciales en Colombia y el GCC.

En la figura 9 se compara la distribución de las frecuencias del alelo k-CN B en razas comerciales y el GCC. En el GCC el alelo interés k-CN B superó (excepto en Jersey) a los valores reportados para las razas comerciales Holstein en Estados Unidos de Norte América (Eenennaam y Medrano (1991), Portugal (Beja-Pereira *et al.,*2002), India (Patel *et al.,* 2006), México (Barreras *et al.,* 2001) y Grecia (Tsiaras *et al.,* 2005) y para las razas Guernsey, Shorthorn lechero (Eenennaam y Medrano, 1991), Italian Fresian (Caroli *et al.,* 2004) y Swedish Red (Hallén *et al.,* 2009);sin embargo, no resultaron significativos en la prueba de t (P>0.05). Los hallazgos en el GCC fueron similares a las razas Italian Brown (Caroli *et al.,* 2004), Yaroslavl (Sulimova *et al.,* 2007) y Rubia gallega (Viana *et al.,* 2001). Es indiscutible la menor proporción del alelo k-CN B en las razas

comerciales comparado con observado en el GCC, cuyo originen se sustenta por la presión de selección unidireccional que conlleva a un aumento de la frecuencia de genes aditivos favorables.

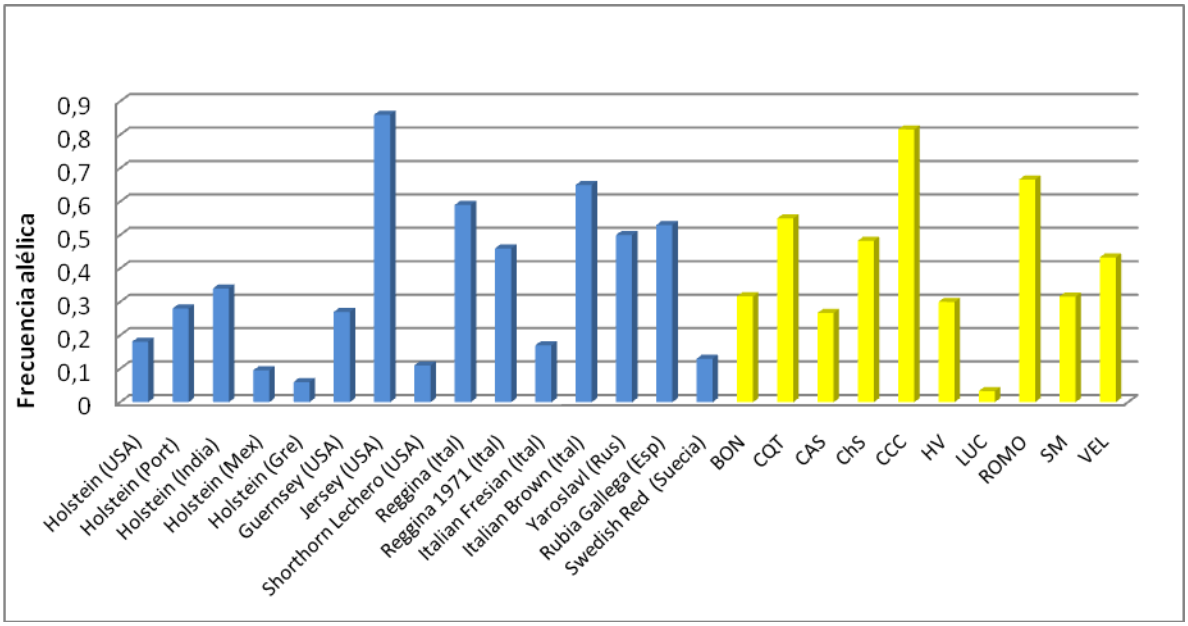

Figura 9. Comparación de la frecuencia de alelo de interés k-CN B en diferentes razas comerciales en el mundo y el GCC.

Los valores calculados de frecuencia de k-CN B en el GCC también estuvieron acorde a lo determinado en diferentes razas de Sur América y el Caribe (Figura 10). El valor promedio del alelo k-CN B en el GCC no vario significativamente (P>0.05) con las razas criollas de América, sin embargo los valores de frecuencia encontrados en CCC, ROMO, CQT, ChS y VEL fueron ampliamente superiores a lo reportado en razas criollas Cubanas (Uffo *et al*., 2006), Brasileras (Lara *et al*., 2002; Kemenes *et al.*, 1999), Peruanas (Veli *et al*., 2005), Argentinas (Poli *et al*., 2002; Lirón *et al.,* 2002; Martínez *et al*., 2003; Ripoli *et al.*,1999) y para las Bolivianas Cusqueño y Saavedreño (Lirón *et al.,* 2002). Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a lo reportado para la raza criolla Uruguaya (Postiglioni *et al*., 2002) y para las Bolivianas Chaqueño y Yacumeño (Lirón *et al*.,

2002). Es evidente una mayor asociación entre los datos obtenidos para las diferentes razas criollas de América y los obtenidos para el GCC, que para las razas comerciales, lo que es consistente debido a su origen y evolución desde la época de la conquista. Este estudio es uno de los primeros que considera pertinente la identificación real de los alelos del gen k-CN por métodos más certeros (PCR-SSCP), no solo por la evaluación u obtención precisa del alelo de interés sino por elucidar el aumento o pérdida de diversidad, cuestión que es esencial el planes de evaluación y conservación de recursos genéticos locales.

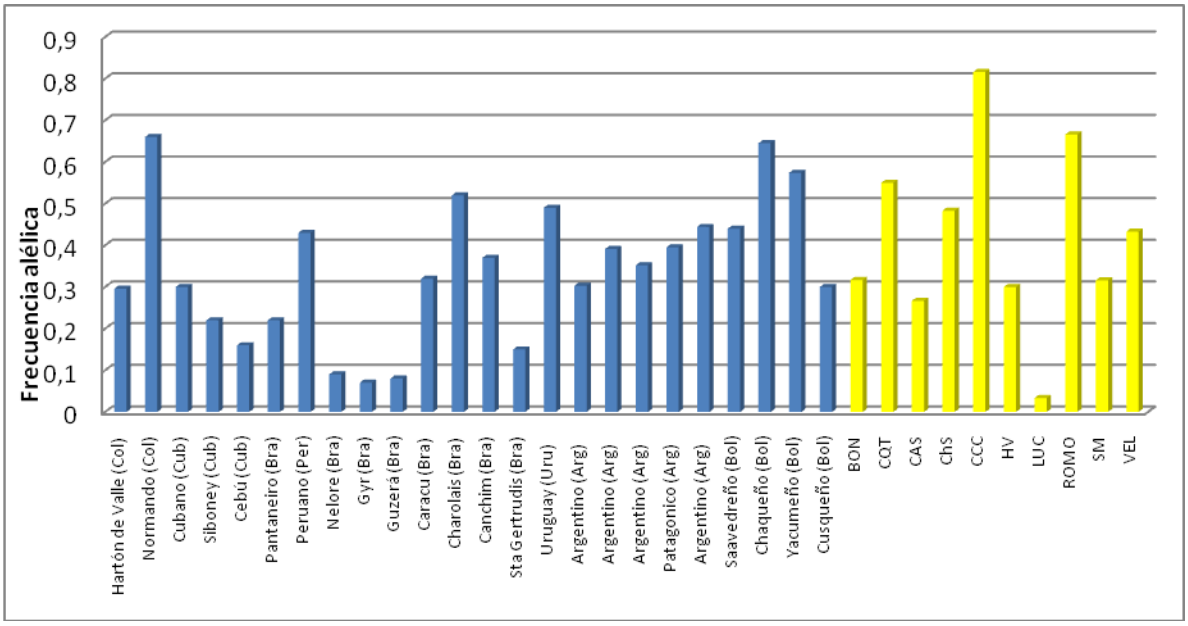

Figura 10. Comparación de la frecuencia de alelo de interés k-CN B en diferentes razas de Sur América y el Caribe y el GCC.

Llama la atención que las mayores frecuencias para el alelo de interés k-CN B se encontraron en algunas razas cuyo fin principal es carne tales como ROMO, CQT, ChS y VEL y no con las utilizadas para la producción de leche o doble propósito (BON, HV y LUC), lo que sugiere una posible correlación entre vacas con mejor habilidad materna expresada como menor tiempo en levante de terneros con leche con mejores cualidades proteicas relacionados con el alelo k-CN B.

Los valores estimados del alelo k-CN B en el GCC resultaron consistentes con las frecuencias reportadas en razas africanas, con valores entre 0.35 a 0.79 en taurinos y cebuinos (Ceriotti *et al.* 2004). Altas frecuencias del alelo k-CN B son deseables en sistemas de producción lechero y principalmente a nivel industrial puesto que existe una relación fuerte del alelo k-CN B con los factores de rendimiento (menor tiempo de cuajo, proporción más alta de proteína, mayor estabilidad a la congelación) en la elaboración de queso (Lunden *et al*., 1997; Wedholm *et al*., 2006).

En lo referente a la variante k-CN A en el GCC (0.390±0.019) se halló una menor proporción respecto a lo encontrado para una población de HV (0.455±0.021) por Díaz *et al.*, 2006, así mismo fue relativamente inferior a lo reportado para otras razas criollas de Argentina (0.585–0.69) (Poli *et al.,* 2002; Lirón et al.,2002; Martínez *et al*., 2003; Ripoli *et al.,* 1999), Perú (0.84) (Veli *et al*., 2005), Cuba (0.7-0.84) (Uffo *et al.,* 2006), Brasil (0.78). También resulto ser inferior a lo reportado para las razas africanas e italianas tanto *Bos indicus* como *Bos taurus* (Ceriotti *et al*, 2004). Sin embargo, estuvo dentro del rango de las razas criollas de Bolivia (0.355-0.70) (Lirón *et al*., 2002). Se aclara que con excepción de Ceriotti *et al*., (2004), los demás autores solo reporta las frecuencias para los alelos comunes A y B. La variante k-CN A no es deseable debido a estar asociada a una menor proporción de caseínas en la leche (Lunden *et al*., 1997; Heck *et al*., 2009).

Las variantes menos comunes k-CN G, k-CN I, k-CN A^1, k-CN E y k-CN N, representaron una fracción importante (18%) de la frecuencia total en el GCC para el gen k-CN. Este resultado permite sugerir que la técnica PCR-SSCP es un método eficiente en la detección real de las variantes y una herramienta importante en la selección efectiva de individuos con el alelo de interés. La sobre y subestimación de los alelos A ó B ocasionada por la mala identificación, podría conllevar al descarte de animales de forma improcedente, o desviar las trayectorias de los esquemas de mejoramiento genético, con graves implicaciones

sobre los hatos cuyo fin principal es producción de leche. La presencia de polimorfismos para un gen de interés económico da indicio de que cada raza tiene una historia evolutiva única, la presencia de alelos diferentes podría ser de gran valor en programas de mejora genética debido a la heterosis (Mariante *et al*., 2008).

La baja frecuencia del alelo B de k-CN encontrado en la raza LUC tiene respuesta en su origen genético; 40% de Holstein, 30% de Shorthorn lechero y 30% Hartón del Valle (CORPOICA, 2006) y en la selección de animales dirigido a alcanzar altos volúmenes de producción, cuya relación es directa el alelo k-CN A.

La variante k-CN I fue encontrada con mayor frecuencia en SM (0.13±0.044) similar a lo encontrado en HV (0.115) por Díaz *et al*., (2006) pero fue rara en las demás razas. El alelo k-CN G, catalogado como raro (Caroli *et al*., 2009) fue alto en BRAH (0.521±0,074) y en las criollas CAS (0.36±0.062), HV (0.23±0.05), VEL (0,116±0.041), resultados superiores lo encontrado en HV por Díaz *et al.,* (2006). A pesar que no se tiene evidencia clara sobre los efectos en la leche de vacas con este alelo, Prinzenberg *et al.,* (1999) menciona que tiene efectos negativos sobre la propiedades de coagulación al igual que la variante k-CN A.

La frecuencia de k-CN A^1 en CAS y BRAH mayor que lo hallado en HV (Díaz *et al.,* 2006) e inferiores a lo reportado para *Bos indicus* por Ceriotti *et al.,* (2004) contrasta con Prinzenberg y Erhardt, (1999) quienes afirman que la variante k-CN A^1 es específica para razas cebuinas. De igual forma los valores hallados en VEL resultan muy bajos, considerando que la raza VEL contiene en su conformación genética Cebú rojo (25%), lo que sugiere que este alelo no es exclusivo para razas cebuinas,en consecuencia la detección del alelo A^1 en las razas criollas no indica necesariamente introgresion con razas cebuinas.

La baja frecuencia del alelo k-CN E en las razas CQT, CAS, SM y VEL, resultó superior a lo encontrado por Díaz *et al*., (2006) en HV, pero inferior a lo reportado para la raza Italiana Modicana por Ceriotti et al., (2004). Aunque se ha relacionado la variante k-CN E con pobres cualidades de coagulación (Ikonen *et al*., 1999; Hallén *et al*., 2007), los estudios realizados por Heck *et al.,* (2009) demostraron que se producía una relativa mayor proporción de caseínas con el alelo k-CN E que con k-CN A y que los aparentes efectos negativos de la variante k-CN E se deben al ligamiento de k-CN E con β-CN A, quien es responsable de dichos efectos desfavorables.

Por su parte la variante k-CN N únicamente fue hallada en las razas ChS y VEL, lo que da lugar a suponer que este patrón de banda corresponda a una mutación no identificable por el método SSCP, ó que resulte un alelo aun no reportado. Según Cavalli-Sforza y Bodner (1981), bajo el criterio de los alelos pueden considerarse raros o poco comunes cuando sus frecuencias son menores a 0.005.

En la figura 11 se contrasta la distribución de las frecuencias de β-LG B entre razas comerciales a nivel mundial y las razas de este estudio. La frecuencia de β-LG B estimada en el GCC fue superior, aunque no difirió significativamente (P>0.05), con Holstein de Estados unidos de Norte América (Van-Eenennaam y Medrano., 1991), Australia (González de Llano., 1990), Portugal (Beja-Pereira *et al.,*2002), México (Barreras *et al.,* 2001), Holanda (Heck *et al.,* 2009), Grecia (Tsiaras *et al.,* 2005), razas Italianas (Caroli *et al.*, 2004; Martini *et al*., 2007), razas de Hungría (Baranyi *et al.,* 1993) y la raza Swedish Red de Suecia (Hallén *et al.,* 2009). Se halló una frecuencia similar a las razas comerciales Guernsey, Jersey y Shorthorn Lechero (Van-Eenennaam y Medrano., 1991).

Es deseable una mayor frecuencia del alelo β-LG B puesto dicho alelo esta correlacionado con una mejor calidad de proteína en la leche y mejora la formación de agregados en procesos del cuajo a nivel industrial (Meza-Nieto *et al.,*

2007). Es probable que la alta frecuencia encontrada esté asociada a una selección indirecta por rendimiento de peso en terneros puesto que han sido amamantados con leche con mayor contenido proteico.

El promedio estimado del alelo β-LG B en el GCC supero al calculado para las razas comerciales, aunque la desviación entre estos no resulto significativa, lo que da lugar a suponer que este gen no ha sido afectado directamente por los procesos selectivos en hatos de ganados comerciales, ni en el GCC.

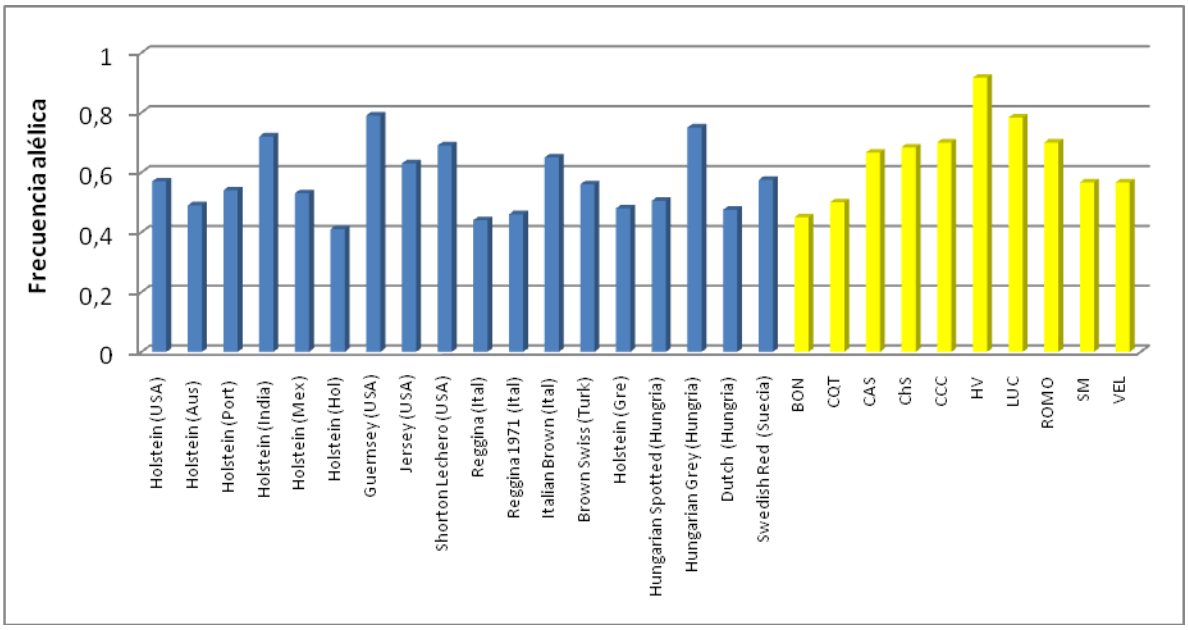

Figura 11. Comparación de la frecuencia de alelo de interés β-LG B en diferentes razas a nivel mundial y el GCC.

En la figura 12 se aprecia la distribución de la frecuencia del alelo de interés β-LG B en diferentes razas en sur América y el Caribe. La alta frecuencia β-LG B encontrada en la mayoría de razas criollas colombianas resultó similar a lo estimado para las razas criollas suramericanas (*P*>0.05) de Uruguay (Postiglioni *et al*., 2002), criollo Argentina (Martínez *et al*., 2003; Lirón *et al*., 2002; Poli *et al*., 2002), y las razas criollas Bolivianas (Lirón *et al*., 2002), sin embargo fueron

inferiores (excepto HV) a los datos reportados para las razas criollas cubanas 0.7-0.8 (Uffo *et al*., 2006). La imperante proporción del alelo β-LG B en las criollas colombianas como en las de América es consistente con la expectativas para este alelo, debido una mínima selección de individuos, menor polimorfismo para este gen, o por el menor alcance identificación de otros alelos por los métodos usados (PCR-RFLP y PCR-SSCP).

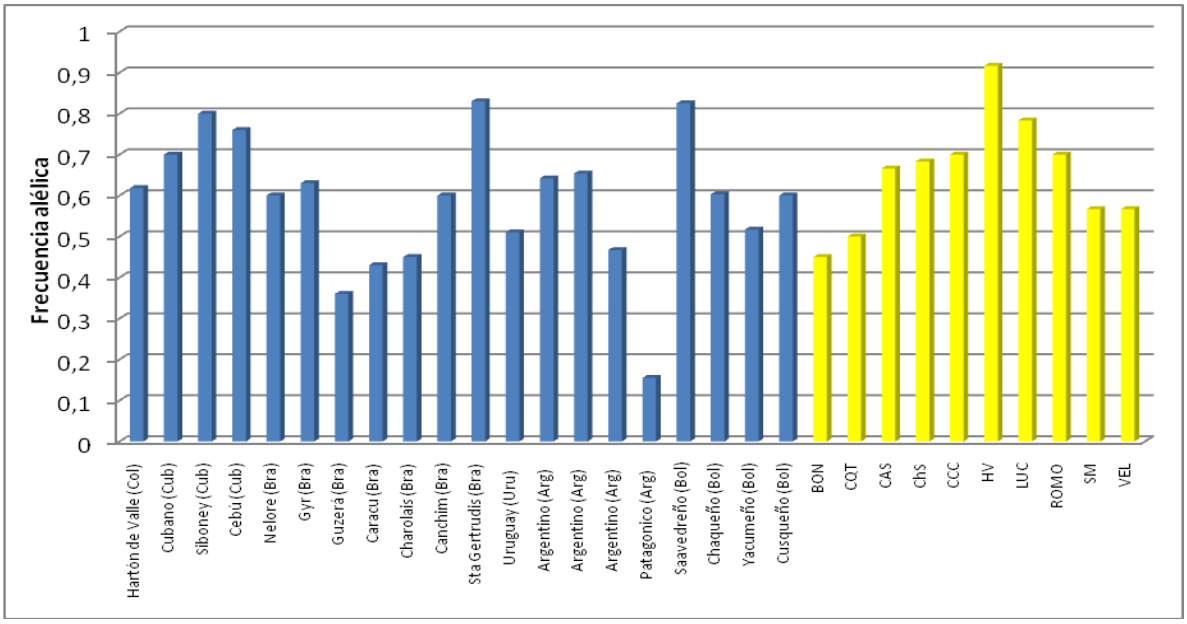

Figura 12. Comparación de la frecuencia de alelo de interés β-LG B en diferentes razas de Sur América y el Caribe y el GCC.

Las mayores frecuencias del alelo β-LG A encontrado en la raza CAS, VEL, SM, BON y en la raza control HOLS son similares hallado en la raza brasilera Caracú (Kemenes *et al*., 1999). Sin embargo nuestras estimaciones fueron inferiores a lo encontrado por Martínez *et al*., (2003) en el ganado criollo Patagónico (0.84). La alta frecuencia de β-LG no es deseable debido que genera disminución en la proporción de β-LG total (Wedholm *et al.,* 2006).

Por otra parte, la frecuencia de α–LA B en el GCC fue similar a lo determinado para la mayoría de las razas comerciales y criollas de América (P>0.05) (Figura 13), superior al Holstein, Jersey y Guernsey en EEUU (Voelker *et al.,(*1997) aunque inferior al Holstein de Holanda (Heck *et al.,* 2009). En tanto que cuando se comparo con los reportes en ganado criollo de América (Postiglioni *et al*., 2002; Díaz *et al.,* 2006; Uffo *et al*., 2006) se encontró mayor similitud a lo hallado en GCC. La similar proporción en el alelo α–LA B en las criollas de América y el GCC, obedece al compartido origen de las razas para toda América, la distribución de los alelos en las poblaciones de ganado criollo, ésta influenciado por proceso de selección natural y en menor proporción por selección individual. La selección individual y la asistencia por biotecnologías reproductivas han permitido excepcionales promedios en el desempeño animal en ganaderías especializadas, no obstante su retribución género un negativo proceso de erosión genética y reducido pool alélico. Los bovinos criollos Colombianos y en general de América pese a sus reducidos tamaños poblacionales aun conservan una gran riqueza genética, como recursos genéticos locales, regionales, nacionales y mundiales, bien adaptados y portadores de genes y alelos ineludibles en el presente y futuro no solo de las poblaciones de ganado, sino también como alternativa en la seguridad alimentaria mundial.

La variante α–LA A únicamente fue encontrada en alta frecuencia en la raza criolla BON (0.45±0.064), siendo similar a lo obtenido en la raza criolla cubana (0.39) y Siboney (0.44) (Uffo *et al*., 2006). En razas especializadas para producción de leche, Poli *et al*., (2002) encontraron altas frecuencias para α-LA A (0.67 a 1.0). Esto permite argumentar que la baja frecuencia encontrada para este alelo en el GCC, responde a una menor producción de leche, pero mayor concentración de proteínas entre otros componentes en la leche como lo sustenta Bleck y Bremel, (1994). No se detecto el alelo α-LA B en la raza BRAH sin embargo Farell *et al*., (2004), reporta el alelo A y B α-LA, en ganado *Bos indicus*.

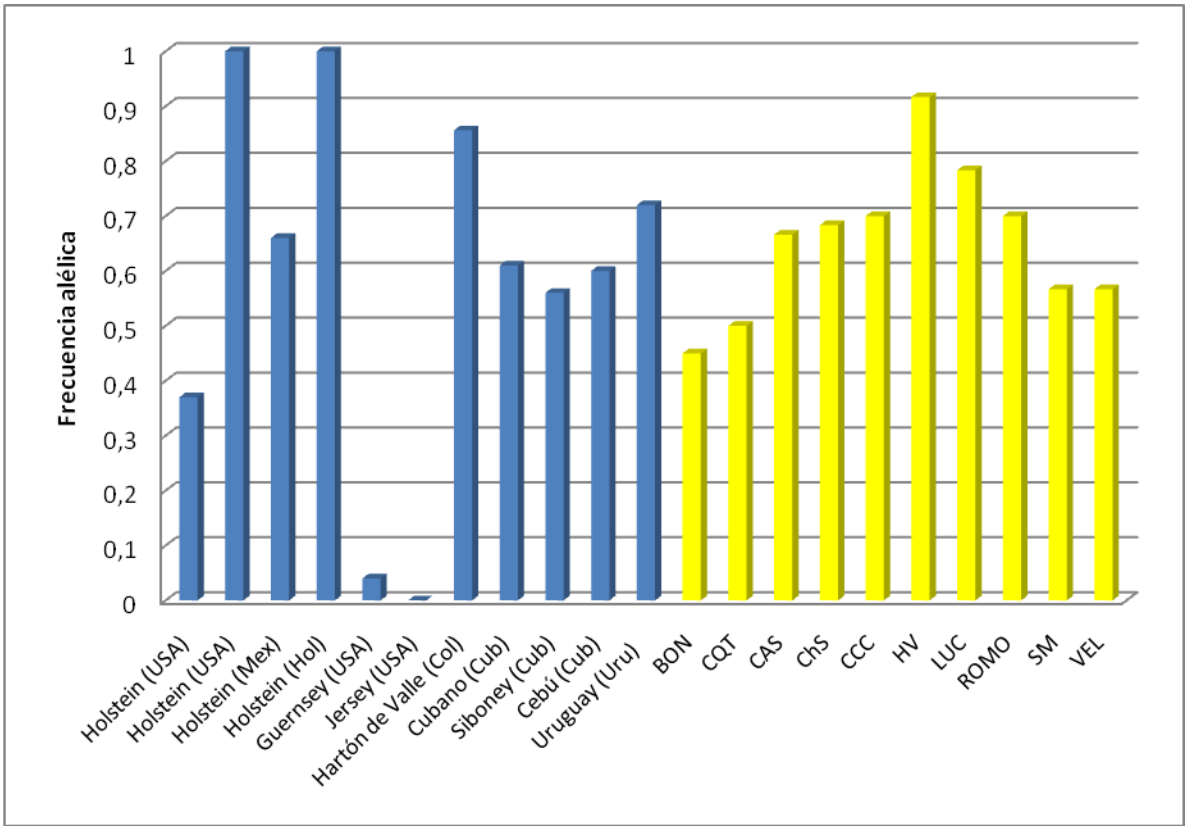

Figura 13. Comparación de la frecuencia de alelo de interés α–LA B en diferentes razas de Sur América y el Caribe y el GCC.

4.2 DIVERSIDAD GENÉTICA

El número promedio de alelos (NPA) hallado en el GCC para los tres loci evaluados (3.66±2.35), superó a la mayoría de las estimaciones realizadas para las razas criollas de Bolivia (2.0) (Lirón *et al*., 2002) Cuba (1.8) (Uffo et al., 2006), y HV (Díaz *et al.*, 2006). Así mismo el numero de alelos en el GCC resulto superior a lo reportado para las razas de Italia (2.5-2.75) (Caroli *et al.,* 2004).

En lo relacionado al locus k-CN la estimación de NPA en el GCC (4.60±1.57), estuvo de acuerdo lo reportado en HV (Díaz *et al*., 2006), pero ampliamente

superior a lo reportado para la mayoría de razas criollas de América (Lirón *et al*., 2002; Postiglioni *et al.,* 2002; Martínez *et al*., 2003; Uffo *et al*., 2006, Lara *et al*., 2002; Veli *et al*., 2005; Kemenes *et al*., 1999). Se aclara que estos reportes únicamente incluyen dos alelos de k-CN identificados mediante RFLP, contrario a los reportes cuando se usa PCR-SSCP, donde se reporta un NPA mayor (4.0) en *Bos indicus* y (3.0) en *Bos taurus* (Ceriotti et al., 2004).

Por su parte el NPA para β-LG en el GCC (2.00±0.00) fue similar a lo reportado para la mayoría de las razas de América (Lirón *et al*., 2002; Postiglioni *et al.,* 2002; Martínez *et al*., 2003; Uffo *et al*., 2006, Lara *et al*., 2002; Veli *et al*., 2005; Kemenes *et al*., 1999). De la misma manera para α–LA el NPA en el GCC (2.00±0.00) resulto similar a lo encontrado en HV (Díaz *et al*., 2006) y en otras razas criollas de América (Uffo *et al*., 2006; Postiglioni *et al.,* 2002), sin embargo el NPA encontrado para β-LG y α–LA resulto ser superior a lo reportado para las razas comerciales Holstein y Jersey (Ng-Kwai-Hang *et al*., 1984; Voelker *et al*., 1997), debido la fijación para un alelo, ocasionado por alta presión de selección para producción de leche, procedimiento que es común ganadería especializada.

La diversidad genética promedio para los tres locus (H_e) en el GCC (0.482±0.094), coincidió con las estimaciones hechas para HV 0.47±0.01 (Díaz *et al*., 2006), también fue similar a la diversidad hallada en razas taurinas y cebuínas de África (Ceriotti *et al*, 2004) pero notoriamente superior a la encontrada en criollo cubano (0.33-0.34) (Uffo *et al*, 2006). Este estudio demuestra la alta diversidad genética presente en todas las razas de ganado criollo colombiano, pese a las reducidas poblaciones y en algunos casos los inadecuados sistemas de manejo, en praderas extensivas y el limitado número de machos reproductores que conllevaría a incrementar los niveles de endogamia.

En lo concerniente a la heterocigosidad total esperada (H_e) para el gen de κ-CN en el ganado GCC (0.65±0.15), superó lo reportado por Díaz *et al*., (2006) para HV

(0.60), a las razas criollas de América (0.33 a 0.50) (Giovambattista, *et al*., 2001; Lirón *et al*., 2002; Martínez *et al*., 2003), en las razas de Portugal (0.10-0.50) (Beja-Pereira *et al*., 2002) y Holstein en Colombia (0.322) (Solarte-Portilla *et al.,* 2009). En el locus de k-CN no se encontró Equilibro Hardy Weinberg (EHW) en las razas ChS, HV, LUC y VEL y tampoco en el valor promedio del GCC, coincidiendo con lo reportado en Holstein en Colombia (Solarte-Portilla *et al.,* 2009) y HV (Díaz *et al.,* 2006), pero contrastante con lo reportado en razas Cubanas (Uffo *et al.,* 2009), criollo Peruano (Veli *et al.,* 2004), Criollo argentino (Martínez *et al*., 2003).

Las determinaciones de H_e en el GCC para β-LG (0.498±0.02), resultaron en el rango descrito para las razas criollas de sur América (0.267 a 0.508; Lirón *et al*., 2002), a las razas Portuguesas (0.27-0.5)(Beja-Pereira *et al*., 2002), y la colombiana Hartón del Valle (Díaz *et al.,* 2006), sin embargo superior a lo reportado en *Bos indicus* (0.13) y *Bos taurus* (0.38) (Ceriotti *et al* 2004). A pesar que en la mayoría de las razas criollas se encontraron en equilibrio EHW, en el promedio para el locus de β-LG no se encontró en EHW, lo que es consistente a lo reportado por Díaz *et al*., 2006 en HV, criollo Cubano y Siboney (Uffo *et al.,* 2006). Pero resultó contrastante con lo reportado para la razas criollas Argentinas (Martínez *et al*., 2003) .El no equilibrio EHW en las criollas CQT y ChS puede estar asociado al disminuido tamaño poblacional existente y por consiguientes altos niveles de consanguinidad y a la preferencia por ciertos machos reproductores que permanecen más de 8 años en el hato.

El valor H_e obtenido para el gen de α-LA presentó la menor diversidad entre los tres genes evaluados (0.45±0.12), sin embargo fue superior a lo reportado para HV en α-LA (0.26±0.02), por Díaz *et al*., (2006). En tres razas criollas (BON, CQT, ROMO) y en la comercial (HOLS) no se encontró en EHW para el gen α-LA, lo que es similar a lo hallado en el criollo y cebú cubano (Uffo *et al*., 2006), mientras que contrasto con lo reportado para HV (Díaz *et al*., 2006) y Siboney (Uffo *et al.,* 2006). El no EHW en la raza criolla CQT podría estar relacionado al bajo número de

efectivos en esta raza, mientras que en la raza HOLS podría estar debida a la presión de selección y la fijación de uno de los alelos en la población de esta raza.

La prueba de EHW, se demostró que muchas de las poblaciones de ganado criollo colombiano se comportan de manera independiente en cada locus, únicamente la raza ChS resultó no EHW en los loci k-CN y β-LG, mientras CQT presentó no EHW en los loci β-LG y α-LA. Estos resultados estarían sustentados por que estas razas presentan reducidos tamaños poblacionales con un bajo número de machos.

4.3 DIFERENCIACIÓN Y ESTRUCTURA GENÉTICA

El valor de F_{ST} global fue 0.077 ($P<0.01$) encontrado para el GCC fue superior a lo encontrado entre fincas con la raza HV F_{ST} = 0.0404 (Díaz *et al*., 2006), siendo consistente puesto que existe mayor diferenciación entre razas del ganado criollo y las razas comerciales, que entre las fincas en una misma raza de ganado. Las diferencias en las razas son útiles para la conservación y manejo de los recursos zoogenéticos, puesto que generan un indicio del origen o la magnitud de diferenciación genética entre razas (Mariante *et al.,* 2008).

Las estimaciones de distancia genética encontradas, muestran a la raza LUC muy distante de las demás razas criollas, sin embargo muestra cercanía genética con la raza HV, lo que es consistente por contener en su conformación genética al menos un 30% de HV. No obstante, solo una pareja de razas tiene relación por cercanía geográfica como ROMO y ChS, pero no entre BON y SM ó CQT y ChS.

La diferenciación genética F_{ST} después del análisis por grupos, únicamente resulto significativa cuando se comparo el grupo de Llanos vs Costa norte y Criollas vs Brahman. La diferencias significativas encontradas cuando se comparo el grupo Llanos vs Costa norte, se podría estar explicada cuando se considera que las

razas CAS y SM (Grupo Llanos) presentan un numero alto de alelos para k-CN, y en general los valores de diversidad son mayores para éstas, que para las razas CCC y ROMO (Grupo Costa Norte), con un menor número de alelos en consecuencia un menor valor de diversidad genética, mientras que la diferenciación genética encontrada entre Criollos vs Brahman, obedece en parte al bajo polimorfismo encontrado en los tres loci evaluados en la raza Brahman, comparado con los valores hallados en las razas criollas.

El desequilibrio de ligamiento entre los tres loci evaluados hallado en BON, resulto similar a lo reportado para lo reportado para HV (Díaz *et al.,* 2006), mas no para el total del GCC encontrado desequilibrio de ligamiento solo entre β-LG/α-LA. Lo reportado por Díaz *et al.,* (2006) también resultaron contrarios a lo encontrado en la raza HOLS, donde se encontró desequilibrio de ligamiento entre k-CN/ α-LA y β-LG/α-LA, pero coincidió con lo hallado en BRAH.

El desequilibrio de ligamiento entre pares de genes observado en el GCC estaría relacionado a diversos factores como; disminución en el tamaño efectivo de las poblaciones (sobre todo CQT), indicios de procesos de selección individual (como BON) y fuerte procesos de selección (Holstein). Cabe anotar que para la mayoría de las razas criollas no se halló desequilibrio de ligamiento, lo que da lugar a suponer que son poblaciones un sistema de cría abierto

5. CONCLUSIONES

Se conformo un banco de ADN con una muestra representativa del ganado criollo colombiano, de las razas; Blanco orejinegro, Caqueteño, Casanareño, Costeño con Cuernos, Chino Santandereano, Lucerna, Romosinuano, Sanmartinero y Velásquez (30 muestra por raza), mas 270 muestras de Hartón del Valle, debidamente identificadas y conservadas a -80°C en el laboratorio de Biología molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

La técnica molecular PCR-SSCP permitió detectar además de las variantes comunes reportadas en la mayoría de investigaciones, otras variantes de menor ocurrencia. Se logro detectar siete variantes alélicas del gen de κ-Caseína, dos de β-LG y dos a α-LA en la mayoría de las razas criollas.

La alta frecuencia del alelo de interés B de k-CN, β-LG y α-LA encontrado en las razas criollas ***Costeño con cuernos, Romosinuano, Caqueteño y Chino Santandereano***, responden a una sabia actitud de nuestros criadores de ganado criollo, quienes seleccionaron animales con alto rendimiento en crecimiento en terneros y buena habilidad materna en hembras adultas, aumentando la frecuencia de los alelos relacionados con mayor proporción de proteína y sólidos totales, dando así respuesta a una mayor eficiencia alimenticia y productiva reportada en el GCC por otros autores.

Los alelos menos comunes de k-CN; A^1, I, G, E y N alcanzaron una no despreciable proporción del 18% de la frecuencia total encontrada el GCC, reafirmando, la necesidad del uso adecuado de las técnicas moleculares y el grado de polimorfismo desarrollado por los ganados criollos colombiano a lo largo de su adaptación en América.

Las estimaciones de las frecuencias altas halladas de los alelos de interés económico y/o relacionado con la tolerancia a condiciones medioambientales agrestes, confirman la necesidad de conservar el ganado criollo colombiano como única medida para sobrellevar la creciente necesidad de mayor calidad de nutricional en alimentos de origen animal.

La alta frecuencia del alelo A de k-CN encontrada en las razas ***Lucerna y Holstein*** es consistente con los niveles de producción de leche ofrecidos por estas razas, sin embargo se advierte la pérdida de diversidad observada en la raza Lucerna por fijación del alelo A de k-CN, asociado a la presión de selección dirigida cada vez más a obtener mayores volúmenes de producción.

A pesar de que el fin principal de la raza colombiana **Velásquez** es la producción de carne, una alta frecuencia del alelo B de k-CN fue encontrada, posibilitando su potencialidad en cruzamientos para fines producción de leche. Así mismo explicaría una mayor eficiencia hallada en el crecimiento de terneros en esta raza relacionado con mejores cualidades en la proteína de su leche y en general al aumento en la cantidad de sólidos totales.

Los altos valores de diversidad génica y número de alelos observados indican que el ganado criollo colombiano constituye un recurso que alberga una amplia diversidad genética en cuanto a proteínas de la leche. Lo que constituye una base genética apta para el uso en programas de mejora genética en bovinos proyectando mejorar la calidad de la proteína de leche especialmente con fines industriales para la producción de queso o para fines de doble propósito (carne y leche).

Pese a las reducidas poblaciones, una admisible diversidad y una consistente diferenciación genética fueron encontradas en la mayoría de las razas criollas colombinas, no obstante el riesgo de erosión genética asociado a altos niveles de

endogamia y a reducidos tamaños poblacionales anticipan una extinción de algunas razas, es una obligación el desarrollo de planes estratégicos de conservación, que confronten el conocimiento tradicional de los ganaderos, Universidades e instituciones relacionadas.

Los ganados criollos albergan un alto polimorfismo para genes de interés económico relacionado con la calidad y cantidad de proteína en la leche, ésta investigación sustenta la evaluación genética, exploración de alelos de interés y de nuevos alelos, como base para futuras investigaciones fundamentadas en la conservación y uso adecuado de los recursos genéticos animales, para garantizar la disponibilidad de genes y/o alelos necesarios para atender las demandas de alimento para una creciente población mundial.

BIBLIOGRAFIA

ALEANDRI, R.; BUTTAZZONI, L. G.; SCHNEIDER, J.C. (1990). The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. En: J Dairy Sci. Vol. 73; p.241-255.

ÁLVAREZ L. A (1999). Potencial genético y productivo del ganado criollo Hartón del Valle. En: Censo y Caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo y colombiano. FEDEGAN, ICA, PRONATTA y ASOBON. pp: 94-98.

ALVAREZ L A. (2008). Diversidad genética del ganado Hartón del Valle y sus relaciones con Holstein y Brahman, mediante el uso de marcadores moleculares. Tesis Ph.D. Universidad del Valle. Cali-Colombia. 177 p.

ALVAREZ L A., VERA V., CÁRDENAS H., BARRETO G., MUÑOZ J E (2008). Estudios de variabilidad en ganado criollo Hartón del Valle, mediante el uso de marcadores moleculares. En: DURAN G y CAMPOS R (Eds). Perspectivas de conservación. Mejoramiento y utilización de recursos genéticos criollos y colombianos en los nuevos escenarios del mejoramiento animal. UNAL-Palmira, Colciencias y Fedegan. P. 115-127.

ARCHILA M y BERNAL S. (1983). Contribución al estudio del ganado criollo Hartón del Valle. Trabajo de Grado. Zoot. UNAL-Bogotá.

ASOCRIOLLO. (2007). Asociación de razas criollas y colombianas – AsoCriollo. Union Nacional De Asociaciones Ganaderas Colombianas http://www.unaga.org.co/index.htm. acceso: 10-10-2007.

BARANYI M. y BOSZE Z S (1993) Genetic Polymorphism of Milk Proteins in Hungarian Spotted and Hungarian Grey Cattle: A Possible New Genetic Variant of β –Lactoglobulin. En: J Dairy Sci 76:630-636

BARRERA G.P.; MARTÍNEZ R.; PÉREZ J.E.; POLANCO N. y ARIZA F. (2006). Evaluación de la variabilidad genética en ganado Criollo Colombiano mediante 12 marcadores microsatélites. En: AGRI, 38: 35-45.

BARRERAS A.; ROBINSON O.; MONGE F.J.; VIZCARRA O.; NAVARRO L.H. (2001). Effects of genotypes of casein and serum proteins on milk production in holsteins. En: Proceeding, Western Section, American Society of Animal Science Vol. 52.

BARROSO, A.; DUNNER, S.; CAÑON J. (1998). Technical note: detection of bovine kappa-casein variants A, B, C and E by means of polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). En: J. Anim. Sci. Vol. 76; p.1535-1538.

BAWDEN, W. S. y NICHOLAS, K. R. (1999). Molecular Genetics of Milk Production. En: Fries R y Ruvinsky A. (Eds) The genetics of Cattle. CAB international. Reimpresion 2006. 539-564 p.

BEDOYA, G.; L.G. CARVAJAL.; N.R. BERMÚDEZ, F.L. MORENO, et al. (2002). Estructura molecular y poblacional del ganado criollo colombiano (GCC). Rev. Col.Cienc. Pec. 14: 107-118.

BEJA-PEREIRA A.; ERHARDT G.; MATOS C.; GAMA L. Y FERRAND N. 2002. Evidence for a geografical cline of casein haplotypes in portiuguese cattle breeds. En: Animal Genetics Vol. 33; p.295-300.

BENAVIDES C.T A. (2003). Efecto de las variantes geneticas A y B de k-caseína y β-Lactoglobulina sobre las propiedades de coagulación de la leche. Tesis Pregrado Ing Alimentos. Valdivia Chile.

BELITZ H-D Y GROSCH W. (1997). Química de los alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 1087 p.

BIKKER J F.; ANEMA S G.; LI Y. y HILL JP .(2000). Rheological properties of acid gels prepared from heated milk fortified with whey protein mixtures containing the A, B and C variants of β –lactoglobulin. En: International Dairy Journal 10 723-732

BLAKE R W. (2008). Perspectivas de la investigación pecuaria en el mundo tropical: Utilización de recursos genéticos de ganado bovino. En: DURAN G y CAMPOS R (Eds). Perspectivas de conservación. Mejoramiento y utilización de recursos genéticos criollos y colombianos en los nuevos escenarios del mejoramiento animal. UNAL-Palmira, Colciencias y Fedegan. 1-16 p.

BLECK, G. y BREMEL, R. (1994). Variation in expression of a bovine α-lactalbumin transgene in milk of transgenic mice. En: J. Dairy Sci. Vol. 77; p.897-1904.

BLECK G T y BREMEL R D. (1993). Correlation of the α-lactalbumin (+15) Polymorphism to Milk Production and Milk Composition of Holsteins. En: J Dairy Sci 76:2292-2298

BOBE, G.,BEITZ D. C. FREEMAN A. E. y LINDBERG G. L. (1999). Effect of Milk Protein Genotypes on Milk Protein Composition and Its Genetic Parameter Estimates. En J Dairy Sci. Vol. 82, No. 12: 2797-2804.

BOETTCHER P. J.; CAROLI A.; STELLA A.; CHESSA S.; BUDELLI E. CANAVESI F.; GHIROLDI S.; PAGNACCO G. (2004): Effects of casein haplotypes on milk production traits in Italian Holstein and Brown Swiss cattle. J. Dairy Sci., 87: 4311–4317.

BRAUNSCHWEIG, M; HAGGER, C; STRANZINGER, G. y PUHAN Z. (2000). Associations between Casein haplotypes and Milk production traits of Swiss Brown cattle. En: J. Dairy Sci. Vol. 76; p.1387-1395.

BOVENHUIS H y VAN ARENDONK J A. M. (1991) Estimation of Milk Protein Gene Frequencies in Crossbred Cattle by Maximum Likelihood. En: J Dairy Sci 14:2128-2736

BUITRAGO y GUTIÉRREZ (1999). Potencial genético y productivo del ganado Blanco orejinegro [BON]. En: Censo y Caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo y colombiano. FEDEGAN, ICA, PRONATTA y ASOBON. pp: 65-73.

CAMPO J E.; ALVAREZ L A.; POSSO A. y MUÑOZ J E. (2007). Detección de las variantes alélicas de la Kappa caseína en el ganado Normando utilizando la técnica PCR-SSCP. En Resúmenes Memorias IX ENICIP. Rev Col Cienc Pec Vol 20 N° 4. pp 553-554.

CAROLI A.; CHESSA S.; BOLLA P.; BUDELLI E.; GANDINI G. (2004) Genetic structure of milk protein polymorphism and effects on milk production traits in local dairy cattle. En: J. Anim. Breed. Genet. 121:141 - 142.

CAROLI A. M., CHESSA S., & ERHARDT G. J. (2009). Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. En: J Dairy Sci Vol. 92 No. 11: 5335–5352.

CASAS, I. y VALDERRAMA, M. (1998). El ganado criollo Hartón del Valle. Boletín divulgatorio. ASOHARTON.. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 54. Pag.

CELIK S. (2003). β -Lactoglobulin genetic variants in Brown Swiss breed and its association with compositional properties andrennet clotting time of Milk. En: Int. Dairy J: 13:727–731

CERIOTTI G. MARLETTA , D. CAROLI A.y ERHARDT G. (2004). Milk protein loci polymorphism in taurine (Bos taurus) and zebu (Bos indicus) populations bred in hot climate. J. Anim. Breed. Genet. 121: 404–415

CORPOICA. 2006. Razas criollas Colombianas. Corporación Colombiana de Investigacion Agropecuaria y ASOCRIOLLO. 33 P.

CORPOICA-TURIPANA. 2007. Razas criollas. Centro de investigación Turipana. http://www.turipana.org.co/razas_criollas.html: acceso: 15-sep-07

DAD-IS. 2007. Chino Santandereano/Colombia. http://dad.fao.org/cgi-bin/ acceso; 24 nov-07.

DENTINE M R. (1999). Marker-assisted selection. En: Fries R y Ruvinsky A. (Eds) The genetics of Cattle. CAB international. Reimpresion. 2006 P. 497-510.

De WIT J N (1981). Structure and functional behaviour of Whey proteins. En: Neth. Milk Dairy J. 35: 47-64.

DÍAZ H A.; ALVAREZ L A.; MUÑOZ J. E.; POSSO A.; SANABRIA H. L. (2006) Genetic variability of milk proteins (k-Casein, B-Lactoglobulin and a-Lactoalbumin) in “Hartón Del Valle” Creole cattle. En Proceedings of the 30th International Conference on Animal Genetics. Porto Seguro, Brazil. Belo

Horizonte, Brazil: CBRA, 2006. ISBN 85-85584-03-3 (CD); 85-85584-02-5 (site www.cbra.org.br).

DONATO L.; GUYOMARC'H F.; AMIOT S.; DALGLEISH D G. (2007). Formation of whey protein/k-casein complexes in heated milk: Preferential reaction of whey protein with k-casein in the casein micelles. Int. Dairy J. 17: 1161–1167.

DURAN C. C. V. y MANRIQUE P. L P. (1999). Potencial genético y productivo de la raza Bovina de doble propósito Lucerna. En: Censo y Caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo y colombiano. FEDEGAN, ICA, PRONATTA y ASOBON. pp 104-115.

EGITO, A.A., M.S.M. ALBUQUERQUE, S.T.R. CASTRO, S.R. PAIVA, J.R.F. MARQUES, C. MCMANUS, A.S. MARIANTE, U.P.G. ABREU, S.A. SANTOS, J.R. SERENO, M.C.S. FIORAVANTI, C.M. VAZ, F.V. NOBRE, J.V. OLIVEIRA, J.H. DE CARVALHO, M.R. COSTA, M.N. RIBEIRO, M.A. LARA (2005). Situação atual do banco de DNA de recursos genéticos animais no Brasil. En: Arch. Zootec. 54: 283-288.

EGITO, A.A, M.S.M. ALBUQUERQUE, C.R. GASPAROTTO, S.T.R. CASTRO, C. MCMANUS AND A.S. MARIANTE (2000). DNA Banking - another option on conservation strategy. In: Fifth Global Conference in Conservation of Domestic Animal Genetic Resources, 2000, Brasília. Fifth Global Conference in Conservation of Domestic Animal Genetic Resources. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. CDROM, CD97.

FAO. (1998). Secondary guidelines for development of National Farm Animal Genetic Resources Manegements Plans: management of small populations at risk. FAO, Rome, Italy. 215 p

FAO. 2003. Ordenación de los recursos zoogenéticos mundiales. http://www.fao.org/spanish/newsroom/field/2003/0303_saudihorses.htm. acceso;15- feb- 08

FAO. 2007. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture, edited by Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. Rome. 493 p.

EXCOFFIER, L; SMOUSE P. E. and QUATTRO J. M. (1992) Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. Genetics. Vol. 131; p.479-491

EXCOFFIER L.; LAVAL G. y SCHNEIDER S. (2006). Arlequin ver 3.1: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Manual Arlequin. 145 p

FARRELL, H. M.; JIMENEZ-FLORES. R.; BLECK, G. T.; BROWN E. M; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F. y SWAISGOOD, H. E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision En: J Dairy Sci. Vol. 87; p.1641-1674.

FITZGERALD R J y HILL J P. 1997. The relationship between milk protein polymorphism and the manufacture and functionality of products. En: Milk protein polymorphism. International Dairy Federation. Proceeding of the IDF Seminar held in Palmerston North, New Zeland: 355-361.

FOX, P.F. y MCSWEENWEY, P.L.H. (1998). Dairy chemistry and biochemistry. London: Blackie Academic & Professional. 478p.

FOX P F. y BRODKORB A. (2008). The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. Review. En: Int. Dairy. J. Vol. 18. 677-684.

FREYER, G.; ERHERDT, G. y PANICKE, L. (1999). Casein polymorphism and relation between milk production traits. En: J. Anim. Breed. Genet. Vol 116; p.87-97.

GINGER, M y GRIGOR M. (1999) Comparative aspects of milk caseins. *Comp. Bioch. Phys*. Part B 1999; 124:133-145.

GOFF, H. D. y HILL A. R. (1993). Chemistry and Physics. Dairy Science and Technology Handbook. Y. H. Hui, VCH Publishers, Inc.: 1-62.

GONZÁLEZ M y ARANGO H (1974). Estudio del ganado Harton del Valle del Cauca. Acta Agronomica, Vol 24, N° 1-4

GONZÁLEZ DE LLANO D. (1990). Polimorfismo Genetico de las proteínas de la leche de vaca. Alimentacion, Equipos y Tecnología. Julio-Agosto: 77-81.

GRASSELLI M.; DEL CAÑIZO A.; FERNÁNDEZ H.; MIRANDA M.; CAMPERI S. Y CASCONE O. (1997). ¿Qué hacer con el suero del queso?. En: Ciencia Hoy. Vol. 8, no. 43.

GUO S.; THOMPSON E. (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 48:361-372.

HALLÉN, E., T. ALLMERE, J. NÄSLUND, A. ANDRÉN, & A. LUNDÉN. (2007). Effect of genetic polymorphism of milk proteins on rheology of chymosin-induced milk gels. Int. Dairy J. 17:791–799.

HALLÉN E.; ALLMERE T.; LUNDEN A.; ANDREN A (2009). Effect of genetic polymorphism of milk proteins on rheology of acid-induced milk gels. En: Int. Dairy J. 19: 399–404.

HAYES H C.; POPESCU P y DUTRILLAUX, B. (1993). Comparative gene mapping of lactoperoxidase retinoblastoma, and α –lactoalbumin genes in cattle, sheep and goats. En: Mammalian genome. 4, 593-597.

HECK J. M. L.; SCHENNINK A.; VAN VALENBERG H. J. F.; BOVENHUIS H.; VISKER M. H. P. W.; VAN ARENDONK J. A. M. & VAN HOOIJDONK A. C. M. (2009). Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. J. Dairy Sci. 92:1192-1202.

HENK BOVENHUIS AND JOHAN A. M. VAN ARENDONK (1991) Estimation of Milk Protein Gene Frequencies in Crossbred Cattle by Maximum Likelihood. En: J Dairy Sci 14:2128-2736.

HILL, J. P.; BOLAND, M. J.; CREAMER, L. K.; ANEMA, S. G.; OTTER, D. E.PATERSON, G. R.; LOWE, R.; MOTION, R. L. & THRESHER, W. C. (1996). The e!ect of bovine b-lactoglobulin phenotype on the properties of β-lactoglobulin, milk composition and dairy products. In Macromolecular interactions in food technology (pp. 281-294). WashingtonDC: American Chemical Society.

IKONEN T.; OJALA M.; SYVAOJA E.L. (1997). Effects of composite casein and beta-lactoglobulin genotypes on renneting properties and composition of bovine milk by assuming an animal model. Agricultural and Food Science in Finland, 6, 283–294.

IMAFIDON G.I.; NG-KWAI-HANG K.F.; HARWALKAR V.R. y MA C.Y. (1991). Differential scanning calorimetric study of different genetic variants of β-lactoglobulin. J. Dairy Sci. **74**, pp. 2416–2422.

JAKOB E y PUHAN Z. (1995). Implications of genetics polimorphism of milk protein on production and processing of milk. Bulletinof the international Dairy Federation. IDF 204: 2-25.

KAZMER G. W.; ZHOU P.; TROYER J. L. y STRAUSBAUGH L. D. (2001). Haplotype Analysis Involving a Novel Polymorphism in Bovine Alpha-Lactalbumin 5′ Flanking Region. En: J. Dairy Sci. 84:1542–1544

KEMENES, P.A.; DE ALMEIDA REGITANO, L.C.; DE MAGALHAES ROSA, A.J.; PACKER, I.U.; RAZOOK, A.G.; DE FIGUEREIDO, L.A; SILVA, N.A.; ETCHEGARAY, M.A.L.; COUTINHO, L.L. (1999). κ-casein; β-lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distance in Nelore, Gyr, Guzera, Caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis Cattle. En: Genetics and Molecular Biology, 22, 4, 539-541.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L (2004). Invited review: betalactoglobulin: binding properties, structure and function. En: J. Dairy Science, Vol. 87, p.785-796, 2004.

KROEKER, E. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F. y MOXLEY, J. E. (1985). Effects of β-lactoglobulin variant and environmental factors on variation in the detailed composition of bovine milk serum proteins. En: J. Dairy Sci. Vol.68.

KUČEROVÁ J, MATĚJÍČEK A., JANDUROVÁ O.M., SØRENSEN P., NĚMCOVÁ E., ŠTÍPKOVÁ M, KOTT T, BOUŠKA J, FRELICH J. (2006) Milk

protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. Czech J. Anim. Sci., 51, (6): 241–247

LARA, M.A.C.; GAMA, L.T.; BUFARAH, G.; SERENO, J.R.B.; CELEGATO, E.M.L.; DE ABREU, U.P. (2002). Genetic Polymorphism at the K-Casein Locus in Pantaneiro Cattle. Arch. Zootec. 51:99-105.

LIRÓN, J. P.; RIPOLI, M. V.; DE LUCA, J. C .; PERAL-GARCIA, P. Y GIOVAMBATTISTA, G. (2002). Analysis of genetic diversity and population structure in Argentine and Bolivian Creole cattle using five loci related to milk production. En: Genetics and Molecular Biology. Sao Paulo. Vol. 24, no. 4; p.413-419.

LIU H. C.; CHEN W. L.; MAO S. J. T. (2007). Antioxidant Nature of Bovine Milk β-Lactoglobulin. En: J. Dairy Sci. 90:547–555.

LÓPEZ, M; HERNANDEZ, V; ESTRADA, L; Correlación entre haplotipos para la K-caseína y características de producción láctea en Bovinos Holstein. (1999);. En: Rev.. Col. Biotec.. Vol. II, no. 2; p.16-20

LÓPEZ A.; SALDARRIAGA O A.; ARANGO A E.; RUGELES M T.; ZULUAGA F N; OLIVERA M.; BERMÚDEZ N; BEDOYA G Y OSSA J E. (2001). Ganado Blanco Orejinegro (BON): Una alternativa para la producción en Colombia. En: Rev Col Cienc Pec Vol. 14: 2, 121.

LÓPEZ D. (2009).El tercer banco de ADN de especies animales y vegetales más grande de Latinoamérica está en Colombia. En: Periodico el Tiempo Colombia. http://www.eltiempo.com/verde/cienciaytecnologia/ARTICULO-WEB-PLANTILLA_NOTA_INTERIOR-5909967.html acceso 18-01-10.

LUNDÉN A.; NILSSON M.; JANSON L. (1997). Marked effect of β-lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. En: J. Dairy Sci. 80: 2996–3005.

LYN C.Y. y MCALLISTER A. J. (1986). Effects of milk protein loci on first lactation production in dairy cattle. En: J. Dairy Sci. Vol.69; p.704-712.

MAHÉ, M. F.; G. MIRANDA, R.; QUERAL, A; BADO, P. SOUVENIR-ZAFIDRAJAONA. Y F. GROSCLAUDE. (1999). Genetic polymorphism of milk proteins in African Bos taurus and Bos indicus populations characterization of variants αS1-Cn H and κ-Cn J. En: Genet. Sel. Evol. 31:239–253.

MAO F.C. (1994). Rapid communication: a bovine α-lactalbumin gene MnlI restriction fragment length polymorphism. En: J Anim. Sci. Vol. 72; p.529.

MARIANTE da S A., PAIVA S R., EGITO A A., ALBUQUERQUE M do S M. (2008). Utilización, conservación y caracterización de recursos zoogeneticos en Brasil. En: DURAN G y CAMPOS R (Eds). Perspectivas de conservación. Mejoramiento y utilización de recursos genéticos criollos y colombianos en los nuevos escenarios del mejoramiento animal. UNAL-Palmira, Colciencias y Fedeganp: 59-67

MARTINI M.; CECCHI F.; SCOLOZZI C.; SALARI F.; CHIATTI F.; CHESSA S.; A. CAROLI. (2007). The influence of b-lactoglobulin genetic polymorphism on morphometric characteristics of milk fat globules and milk fatty acids composition in Italian Friesian cow. En: Ital J Anim Sci. Vol. 6 (suppl. 1).

MARTÍNEZ C, G. (1992). El ganado criollo colombiano blanco orejinegro (BON) Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Villavicencio, Meta, COLOMBIA. En animal genetic resources información. Organizacion de las Naciones Unidas

para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y Programa de la Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP).

MARTÍNEZ C, G. (1998). El ganado criollo Romosinuano (Romo). Instituto Colombiano agropecuario ICA. En AGRI 1998 24:1-11

MARTÍNEZ C, G. (1999). Seminario: Censo y Caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo y colombiano. FEDEGAN, ICA, PRONATTA y ASOBON. 158 pág.

MARTÍNEZ C, G. GONZÁLEZ H F. (2000). El ganado criollo Sanmartinero (SM) y su potencial productivo. En Animal Genetic Resources Information, No. 28, 2000.

MARTÍNEZ C. G. (2004). Razas Bovinas Criollas y Colombianas. Boletín Divulgativo No. 13. Meta, Colombia, pp. 20.

MARTINEZ R.D.; GIOVAMBATTISTA G.; RIPOLI M.V.; DE LUCA J.C.; DULOUT F.N. (2003). Patagonian Argentine Creole cattle polymorphism: comparison with North-West populations of this breed. En: Research in Veterinary Science 74 (2003) 287–290

MCLEAND, D. M. (1987). Influence of milk proteins, yield and cheesemaking properties. En: Anim. Genet. Vol. 18 suppl 1.

MEDRANO J y SHARROW L. (1989). Milk protein typing of bovine mammary gland tissue used to generate a complementary deoxyribonucleic acid library. En: Journal Dairy Science. 72 (12): 3190-3196.

MEDRANO, J. F. y AGUILAR-CORDOVA, E., (1990): Polymerase chain reaction amplification of bovine b-lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. Animal Biotechnol. 1: 73–77.

MEZA-NIETO M. A.; VALLEJO-CORDOBA B.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA A. F.; FÉLIX L. y GOYCOOLEA F. M. (2006). Effect of β-Lactoglobulin A and B Whey Protein Variants on the Rennet-Induced Gelation of Skim Milk Gels in a Model Reconstituted Skim Milk System. En: J. Dairy Sci. 90:582–593

MANDERSON G A.; CREAMER L K.; HARDMAN M J. (1999). Effect of Heat Treatment on the Circular Dichroism Spectra of Bovine â-Lactoglobulin A, B, and C. En: J. Agric. Food Chem. 47, 4557-4567.

MILLER S A.; DYKES D D.; POLESKY H F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. En: Nucleic Acids Res.11;16(3):1215

MADR (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural). (2003). Situación de los recursos Zoogenéticos en Colombia. ICA, CORPOICA, UN, ACP, FENAVI, FAO, ASOCRIOLLO, UNAGA, FEDEGAN, INPA. 119 pag.

MADR- ASOCRIOLLO. (2003). Población por grupos raciales. En: Razas criollas y colombianas puras. MADR y ASOCRIOLLO (Asociación de criadores de ganado criollo y colombiano). Memoria convenio 135-01.

MOLINA, L. H.; CASANOVA, M.; GONZALEZ, L. A.; PINTO, M.; CARRASCO, E. y BRITO, C. (2003). Identification of the genetic variants of κ-casein in milk by isoelectric focusing electrophoresis. En: International Journal of Dairy Technology. Vol. 56(4). p.211-214.

MOLINA L.H.; KRAMM J.; BRITO C.; CARRILLO *B*.; PINTO M. y FERRANDO A. (2006). Protein composition of milk from Holstein-Friesian dairy cows and its lationship with the genetic variants *A* and *B* of κ-casein and β-lactoglobulin (Part I.).En: Int. J. Dairy Technol., 59, 183– 187.

MUNÉVAR MG. (1989). Creer en lo criollo. En: Carta Ganadera 26(8): 26

MUNIZAGA F G, BARRALES V L y VALENZUELA A L (2004). Desarrollo de un modelo para evaluar la factibilidad productiva y económica de la progenie resultante del cruzamiento de vacas Holstein Friesian con toros de las razas francesas Montbeliarde y Normando. Departamento de Ciencias Animales, pontificia Universidad Católica de Chile.

NARANJO M. J D. (2005) Detección de variantes alélicas de la kappa-caseína en la raza de ganado criollo Hartón del Valle. Tesis Biólogo. Universidad del Valle. 44 pag.

NARANJO,J.; POSSO,A.; CARDENAS, H, y MUÑOZ, J. (2007). Detección de variantes alelicas de la kappa-caseína en bovinos Hartón del Valle. En: Acta Agronomica Vol 56 (1): 43-47.

NEI M .(1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York. p 512.

NG-KWAI-HANG K.F.; MOXLEY J.F. Y MONARDES H.G. (1984). Association of genetic variants of Casein and milk serum proteins with milk, and protein production by dairy cattle. En: J. Dairy Sci. Vol. 67 p.835-840.

NOTTER D.R. (1999). The Importance of Genetic Diversity in Livestock Populations of the Future En: J. Anim. Sci. Vol.77; p.61-69.

OEA/GTZ Publicaciones. 2003. Optimización del rendimiento y Aseguramiento de Inocuidad en la Industria de Quesería. En: Oficina de ciencia y tecnología. Washington D C. USA. http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/ LIBROS/ QUESO/queso.htm.

OLIVERA Á, M. (2003). Conferencia. Producción de Embriones F1 BON, para la caracterización del doble propósito y como apoyo a las cadenas láctea y cárnica. Rev Col Cienc Pec Col. Vol 16:1

ORDAS J. G. 1992. Selección de caseínas k bovinas mediante polimorfismos de ADN y PCR. En: A. Y. M. A. Vol. 32, no.1; p.21-23.

ORITA, M.; SUZUKI Y.; SEKIYA T. Y HAYASHI K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics vol 5: p 874-879.

ORTÍ G.; HARE M. P.; AVISE J.C. (1997). Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. En: Molecular Ecology. 6. 575-580.

ORTIZ J W. (1993). Estudio de paramentros productivos y reproductivos del ganado criollo Hartón del Valle del Cauca. Trabajo de grado. Fac Cs Agropec., UNAL-Palmira

OSSA. S. (1999). Comportamiento productivo del Ganado costeño con cuernos y sus cruces. En: Censo y Caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo y colombiano. FEDEGAN, ICA, PRONATTA y ASOBON. Pp 90-93.

PATEL R K.; CHAUHAN J B.; SINGH K M.;. SONI K JV (2006) Allelic Frequency of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin in Indian Crossbred (Bos taurus × Bos indicus) Dairy Bulls. En: Turk. J. Vet. Anim. Sci. 399-402.

PATERSON, G. R.; OTTER D. E.; Y HILL J. P. (1995). Application of capillary electrophoresis in the identification of phenotypes containing the β-lactoglobulin C variant. J. Dairy Sci. 78:2637–2644.

PATEL R K., CHAUHAN J B., SINGH K M., SONI K J (2007). Allelic Frequency of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin in Indian Crossbred (Bos taurus × Bos indicus) Dairy Bulls. En: Turk. J. Vet. Anim. Sci. 31(6): 399-402

PEREZ, M. D. y CALVO, M. (1995). Interaction of beta-lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. EN: J. Dairy Sci. Vol. 78; p.978–988.

PIMENTEL DE MELLO. L; TAMBASCO-TALHARI, D; POZZI, A; LEHMANN, L. Y CORREIA DE ALMEIDA, L. (2003). Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. En: Genetic. Mol. Biol. Sao Paulo. Vol. 26, no. 2 .

PINZON, M.E. 1984. Historia de la ganadería bovina en Colombia. En: Suplemento ganadero. Banco ganadero Vol. 4, no.1; p.208

PLOWMAN, J. E. y CREAMER, L. K. (1995). Restrained molecular dynamics study of the interaction between bovine ·-casein peptide 98-111 and bovine chymosin and porcine pepsin. En: J. Dairy Res. Vol. 62 . 451–467.

POLI M. A.; HOLGADO F. y RABASA A. E. (2002). Frecuencias genotípicas y alélicas de los genes de caseína k y la lactoglobulina B en un rodeo de bovinos

criollos en Argentina. En: III Simposio Iberoamericano sobre la conservación de los recursos zoogeneticos locales y el desarrollo rural. (25-27 nov. 2002 :Montevideo, Uruguay) Programa y resúmenes. Area de mejoramiento genético animal, Facultad de veterinaria- UDELAR. p.12.

POSTIGLIONI, A., G. RINCÓN, L. KELLY, S. LLAMBÍ, G. FERNÁNDEZ, M. ANGELO, G. GAGLIARDI, J. TRUJILLO, M. DE BETHENCOURT, K. GUEVARA, A. CASTELLANO y ARRUGA M. V. (2002). Biodiversidad genética en bovinos criollos del Uruguay. análisis con marcadores moleculares. En: Arch. Zootec. Vol. 51; p.195-202.

PRINZENBERG E.M. y ERHARDT G. (1999a). A new CSN3 allele in Bos indicus cattle is characterised by MspI PCR-RFLP. En: Animal Genetics. Vol. 30; p.164.

PRINZENBERG, E. M.; KRAUSE I. y ERHARDT G. (1999b). SCCP análisis of the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphism (H, I, A^1). En: Anim. Biotechnol. 10:49–62.

PUHAN, Z y JAKOB E. (1993). Genetics variants of milk proteins and Cheese yield. En: Cheese yiel and factor affecting its control. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF seminar Held I Cork. Irelan. 111-112.

REYNOLDS J.; WEIR B. S.; COCKERHAM C. C. (1983) Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. En: Genetics 105:767-779.

ROBITAILLE G.; BRITTEN M.; MORISSET J. y PETITCLERC D. (2005) Polymorphism in the bovine k-casein (CSN3) gene and the 5´-flanking region:

sequence analysis of CSN3 A and B alleles. En: International Society for Animal Genetics, Animal Genetics, 36, 160–190

RON, M.; YOFFE O.; EZRA E.; MEDRANO J.F, Y WELLER J.I. (1994). Determination of milk protein genotype effects on production traits of Israeli Holsteins. En: J. Dairy Sci. Vol.77; p.1106-1113.

SEGURA-CORREA, J. C; MONTES-PEREZ, R. C. (2001). Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales (RGA). En: Rev. Biomed . 12: 196-206. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. Disponible en http// www.uady.mx/~biomedic/rb011237.pdf.

SALAMANCA C. A, (1999). El ganado criollo Casanare y su entorno productivo. En: Censo y Caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo y colombiano. FEDEGAN, ICA, PRONATTA y ASOBON. pp 75-83.

SAS Institute Inc. (2004). What's New in SAS® 9.0, 9.1, 9.1.2, and 9.1.3. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SCHAAR J. (1984). Effects of k-casein genetics variants and lactation number on the renneting properties of individual milks. En: journal of Dairy Research 51: 398-406.

SCHNEIDER S.; ROESSLI D.; EXCOFIER L. (2000) Arlequin ver. 2.000. A software for populations genetic data anaysis. University of Genova. Switzerland. p.111.

SLATKIN M.; EXCOFFIER L. (1996) Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the expectation-maximization algorithm. Heredity 76:377–383.

SOLARTE-PORTILLA C E, C Y ROSERO, J M ERASO, G L ZAMBRANO, H CÁRDENAS Y W O BURGOS (2009) Frecuencias alélicas del gen Kappa caseína en la raza Holstein del trópico alto de Nariño – Colombia. en: Livestock Research for Rural Development 21 (1)

SOTOLONGO P J, 1999. Ganado Criollo Colombiano Importancia estratégica de su recuperación genética. Diciembre de 1999. En BIODIVERSIDAD 22 (11).

SULIMOVA G. E., AHANI-AZARI M., ROSTAMZADEH J.,MOHAMMAD-ABADI M. R. y LAZEBNY O. E. (2007). K-Casein Gene (CSN3) Allelic Polymorphism in Russian Cattle Breeds and Its Information Valueas a Genetic Marker. En: Russian Journal of Genetics. Vol. 43, No. 1, pp. 73–79.

SUNNUCKS P, WILSON ACC, BEHEREGARAY LB, ZENGER K, FRENCH J, TAYLOR AC. (2000). SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. Molecular Ecology, 9, 1699–1710.

SWAISGOOD, H. E. (1993). Review and update of casein chemistry. En: J. Dairy Sci. Vol. 76. p.3054–3061.

SZULC T.; PAWELSKA-GÓRAL M. (2008). Effect of methionine and fishmeal added to the diet of cows with different beta-lactoglobulin genotypes on the composition and physical properties of milk. En: Livestock Science 117. 1–6

TOBAR C Y VARELA G. (1989). Estudio de las curvas de crecimiento y lactancia, fertilidad y rentabilidad en la raza Hartón del Valle. Trabajo de Grado Zootecnia. UNAL-Palmira.

TSIARAS A. M., BARGOULI G. G., BANOS G., y BOSCOS C. M. (2005). Effect of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin Loci on Milk ProductionTraits and Reproductive Performance of Holstein Cows. En: J. Dairy Sci. 88:327–334

TRIVIÑO M. H (1999). Aporte genético del ganado Romosinuano a la producción de carne. En: En: Censo y Caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo y colombiano. FEDEGAN, ICA, PRONATTA y ASOBON. pp: 118-127.

UFFO O.; MARTÍN-BURRIEL I.; MARTÍNEZ S.; RONDA R.; OSTA R.; RODELLAR C. y ZARAGOZA P. (2006). Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. En: AGRI, 39: 15-24.

VAIMAN D. (1999) The genetics of cattle. R. Ries and A. Ruvinsky (Eds) CAB International.

VAN- EENENNAAN A. & MEDRANO J. F. (1991a). Differences in alelic protein expression in the milk of heterozygous k-casein cows. En: J. Dairy Sci. Vol. 74 ; p.1491-1496.

VAN-EENENNAAN A. y MEDRANO J. F. (1991b). Milk Protein Polymorphisms in California Dairy Cattle. En: J Dairy Sci. Vol. 74; p.1730-1742.

VARGAS F. C. (1999). Chino santandereano. En: Censo y Caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo y colombiano. FEDEGAN, ICA, PRONATTA y ASOBON. pp 84-89.

VÁSQUEZ A. H J. (2005). Conservación y utilización de las razas bovinas criollas y colombianas para el desarrollo rural sostenible. En: Arch Zootec 54: (206) 141-144.

VELASQUEZ J. A (1999). Potencial genético y productivo del ganado Velásquez. En: En: Censo y Caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo y colombiano. FEDEGAN, ICA, PRONATTA y ASOBON. pp: 139-144.

VELI E.; RIVAS E.; RIVAS V.; VERASTEGUI M.; PASTOR S. (2004). Evaluación de la variabilidad de genes de kappa caseina en Poblaciones de bovinos criollos de ticllos y huaschao, región Ancash. En: INIA.

VIANA, J. L.; FERNÁNDEZ, A.; IGLESIAS, A.; SÁNCHEZ, L.; BECERRA, J. (2001). Análisis de los genotipos más frecuentes de la kappa caseína en la raza vacuna Rubia Gallega mediante PCR/RFLPs. Archivos de Zootecnia 50:91-96.

VILOTTE J L.; SOULIER S y MERCIER J C. (1993). Complete sequence of a bovine La α–Lactoalbumin pseudogene: then region homologous to the gene is flanked by two directly repeated LINE sequences. En: Genomics 16, 529-532.

VIVAS N, J y VINASCO A. (2007). Detección de variantes alélicas de kappa-caseína utilizando la técnica PCR-SSCP en ganado Holstein en el Valle del Cauca. Tesis Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.

VOELKER, G. R.; BLECK, G. T. y WHEELER, M. B. (1997) Single-base Polymorphisms within the flanking region of the bovine α-lactalbumin gene. En: J Dairy Sci. Vol. 80 ; p.194-197.

WALSH, C. D.; GUINEE, P. T.; HARRINGTON, D.; MEHRA, R.; MURPHY, J. y FITZGERALD, R. J. (1998). Cheesemaking, compositional and functional characteristics of low-moisture part-skim Mozarrellla cheese from bovine milks containing K-casein AA, AB or BB genetics variants. En: J. Dairy Research. Vol. 65; p.307-315.g

WALSTRA, P.; GEURTS, T.; NOOMEN, A.; JELLENA, A. Y BOEKEEL, M. (1999). Principales of milk properties and proceses. Marcel Dekker, New York. 727 P.

WEDHOLM A.; LARSEN L. B.; LINDMARK-MA°NSSON H.; KARLSSON A. H. Y ANDRÉN A. (2006). Effect of Protein Composition on the Cheese-Making Properties of Milk from Individual Dairy Cows. J. Dairy Sci. 89:3296–3305

WEIR, B. S. y COCKERHAM, C. C. (1984). Estimating F-statistics for theanalysis of populations structure. En. Evolution Vol.38; p.1358-1370.

WHEELER, M. B. (2003). Production of transgenic livestock: promise fulfilled. En: J. Anim. Sci. Vol. 81, no.3; p.32-37.

WILKINS J V.; MARTINEZ F. y ROJAS F. (1993). El ganado vacuno criollo. En dialogo XXXVI-conservación y mejoramiento del ganado bovino criollo. IICA y PROCISUR. P 69-82.