

Estudio de la Variabilidad Genética en una Población de Ganado Bovino Criollo Argentino Aislada Geográficamente en una Pradera de Altura.

GIOVAMBATTISTA, G.^{1,2}, C.D. GOLIJOW^{1,2}, M.V. RIPOLF², I.L. ROCCIA², F.N. DULOUT² y M.M. LOJO².

¹ Becario de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

² Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA) - Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLP

RESUMEN

Se estudió de la variabilidad genética de tres loci (κ -Caseína, β -lactoglobulina y BoLA-DRB3), en una población de ganado Criollo Argentino aislada en una pradera de altura, ubicada en la localidad de Chasquivil (Tucumán). A pesar del aislamiento geográfico sufrido por un largo período de tiempo y el reducido tamaño de dicha población, el análisis de los resultados indicó una alta heterocigocidad sin que se observe la fijación de alguna de las variantes alélicas. Las frecuencias genotípicas estimadas para los loci κ -Caseína y BoLA-DRB3 indicaron que la población se encontraría en equilibrio para estos loci. Por otra parte, el locus correspondiente a β -Lactoglobulina presentó una fuerte desviación hacia la forma heterocigota.

En teoría, una población con las características de la de Chasquivil debería mostrar un incremento en las formas homocigotas. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que, por lo menos en el caso de los tres loci estudiados, esta población habría desarrollado los mecanismos para el mantenimiento de la diversidad genética.

Palabras claves: *Bovinos, κ -Caseína, β -lactoglobulina y BoLA-DRB3, Diversidad Genética.*

SUMMARY

A Study of the Genetic Variability in Argentine Creole Cattle Population in Geographical Isolation in a High Grassland.

The genetic variability of three loci (κ -Casein, β -lactoglobulin y BoLA-DRB3) were studied in a population of Argentine Creole cattle

isolated in a high grassland located in Chasquivil, (Tucumán). Despite the geographical isolation for such a long period and the small population size, the analysis of data showed a high degree of heterozygosity. No allele was found to be fixed. The estimated genotype frequencies for κ -Casein and BoLA-DRB3 showed that these loci were in Hardy-Weinberg equilibrium, whereas β -Lactoglobulin exhibited a strong deviation with many heterozygotes.

In theory, a population like Chasquivil should show a trend to increase the number of homozygotes. However, the result obtained in this study suggest that (at least for the three loci studies) this population might have developed same mechanisms to maintain genetic diversity.

Key words: *Bovine, κ -Casein, β -lactoglobulin y BoLA-DRB3, Genetic Diversity.*

INTRODUCCION

El bovino Criollo Argentino

Las evidencias antropológicas y paleontológicas indican que la familia bovidae fue introducida por primera vez al continente americano por los conquistadores españoles. En 1493 Cristobal Colón introdujo los primeros bovinos en el nuevo mundo cuando en su segundo viaje desembarcó en la isla La Española (actualmente Haití y República Dominicana).

A pesar que el grupo fundador fue de aproximadamente 300 animales, en sólo pocos años, estas vacas emigraron al Centro y Sud América, Sudoeste y Sudeste de Estados Unidos, dispersándose en casi todo el continente. Los animales introducidos pertenecían a razas Ibéricas: Retinta,

Berrenda, Negra Andaluza y Casere. (Primo, 1994).

El ganado bovino Criollo Argentino se originó a través de tres rutas diferentes. En 1549, Juan Nuñez de Prado introdujo los primeros bovinos desde Potosí (Bolivia), Francisco de Aguirre trasladó sus rodeos desde Chile a través de los Andes y Juan de Salazar, habiendo desembarcado en Brasil, introdujo más animales en las Pampas (Argentina), a través del norte (Paraguay).

Después de muchos años de selección natural, el ganado bovino Criollo Argentino se adaptó a una amplia variedad de condiciones ambientales, desarrollando una gran variabilidad fenotípica. Por esta razón una característica de la raza es la diversidad de colores de capa (todos los colores descriptos en bovinos están representados en el ganado bovino Criollo Argentino). Se han señalado, para estos animales, altos niveles de longevidad y fertilidad, demostrándose además una alta resistencia a enfermedades subtropicales (Guglielmone et al., 1991; Rabasa, 1993; Hansen, 1994). Estas características hacen que la raza sea considerada como reservorio genético de una especie sobre la que se ha ejercido una fuerte presión de selección.

La población actual de ganado bovino Criollo Argentino esta subdividida en pequeñas subpoblaciones distribuidas en diferentes lugares de nuestro país. La localidad de Chasquivil (Tucumán) se localiza en una pradera de altura a más de 2000 m. sobre el nivel del mar, donde el acceso sólo es posible por senderos a través del monte. En este sitio existe, actualmente, una población de ganado bovino Criollo Argentino. Por referencias de los lugareños se sabe que dicha población, cuyo tamaño estimado es de alrededor de 250 individuos, habría permanecido aislada por más de 25 generaciones.

La evolución independiente de esta subpoblación en un medio ambiente de pradera de altura y la escasa intervención de la mano del hombre en su cría, le otorgan características aproximadas a lo que podría considerarse una población natural. Por lo dicho esta población resultó un modelo interesante para interpretar el efecto del aislamiento sobre la diversidad genética.

Con este objetivo se estudiaron las frecuencias génicas y genotípicas de tres loci- κ -Caseína (κ -Cn) y β -lactoglobulina (β -Lg) y BoLA-DRB3. Los dos primeros están estrechamente relacionados con caracteres de producción lechera (Lin et al., 1986; Threadgill y Womack, 1990; van der Berg et

al., 1992; Boland et al., 1992) mientras que el locus BoLA-DRB3, ha sido correlacionado con caracteres de resistencia a infecciones virales, endo y ectoparasitarias, así como también con patologías autoinmunes (Schook et al., 1991; van Eijk et al., 1992; Xu et al., 1993; Malo y Skamene, 1994).

La κ -Cn es una de las cuatro caseínas presentes en la leche (Jenness et al., 1956; Whitney et al., 1976 and Eigel et al., 1984). A partir de estudios realizados en leches se han descripto dos variantes para esta proteína denominadas A y B. A través de la técnica de amplificación de secuencias de ADN (PCR), es posible realizar la caracterización de estas variantes a partir de muestras de sangre (Damiani et al., 1990; Pinder et al., 1990; Agrawala et al., 1992).

En el caso de β -Lg, las variantes más frecuentes A y B, también pueden ser identificadas por el método PCR (Medrano et al. 1990; Agrawala et al., 1992).

La caracterización de los alelos del locus BoLA-DRB3 por el método PCR-RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), permite la identificación de más de 30 alelos diferentes (van Eijk et al., 1992), lo que hace a este sistema altamente informativo para el estudio de la diversidad genética.

MATERIALES Y METODOS

Toma de muestra

Se obtuvieron muestras de sangre periférica a partir de 35 animales, elegidos al azar, pertenecientes a la población de bovino Criollo Argentino de la localidad de Chasquivil, Provincia de Tucumán. La falta de datos genealógicos así como las características de apareamiento, dificultan la estimación del tamaño efectivo de la población en estudio. Cálculos aproximados indicarían que el N_e sería del orden de los 50 individuos.

El ADN genómico fue aislado a partir de dichas muestras utilizando el método de Sambrook et al., (1989). Las muestras de ADN fueron caracterizadas para los loci de κ -Cn, β -Lg y BoLA-DRB3, utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa y polimorfismo de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP).

Condiciones de la reacción

La amplificación por PCR se llevó a cabo en 50 µl (Perkin-Elmer thermal cycler), en la siguiente solución de reacción: 10mM Tris-ClH (pH=8), 50mM ClK, 1,5 mM Cl₂ Mg y 0,1 % Triton X 100, 100 µM de cada dNTP, 1,25 U de Taq polimerasa, 100 ng de ADN genómico.

κ-caseína

Para amplificar el cuarto exón del gen de κ-caseína que incluye los sitios de restricción que permiten definir los alelos A y B, se utilizaron los cebadores: KCN583 (5'-GTGACAAAATAGC-CAAATAT-3' y 5'-ACAGATTTAATTTATC-CATCT-3') descritos por Agrawala et al., (1992). El programa de amplificación consistió en: 4 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguido por 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min 30 s de hibridación a 55°C y 2 min de extensión a 72°C. Finalmente 10 min de polimerización a 72°C.

Del producto de amplificación 8,5 µl fueron digeridos con la enzima de restricción Hinf I (5 U), durante 2 h, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Los fragmentos de restricción fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 3%/ 0,5X TBE (100 V, 30 min) y detectados con bromuro de etidio.

β-lactoglobulina

Para amplificar el cuarto exón del gen de β-lactoglobulina, que incluye el sitio de restricción que define los alelos A y B, se utilizaron para la primera ronda de amplificación los cebadores: JBLG2 y JBLG3 (5'-TGTGCTGGACACCGACTA-CAAAAAG-3' y 5'-GCTCCCGGTATAATGAC-CACCCTCT-3') descritos por Medrano y Aguilar Cordova (1990).

La primera ronda de amplificación consistió en: 4 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguido por 10 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 40 s de hibridación a 58°C y 1 min 30 s de extensión a 72°C. Finalmente 4 min de polimerización a 72°C.

Para aumentar la sensibilidad y la especificidad se realizó una segunda ronda de amplificación utilizando los cebadores JBLG3 y el cebador interno LP1 (5'-CCTGCTCTTCTGCATGGAGA-3'). La secuencia de temperatura consistió en: 25 ciclos

de 94°C por 1 min, 58°C durante 40 s y 72°C seguido por 4 min de extensión final.

Alícuotas de los productos de amplificación (8,5 µl) fueron digeridas con la enzima de restricción HaeIII (5 U), por 2 h de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Los fragmentos de restricción fueron resueltos en geles de agarosa 3 % / 0,5 X TBE y detectados en UV con bromuro de etidio.

BoLA-DRB3

Para amplificar el segundo exón del gen DRB3 se emplearon para la primera ronda de amplificación los cebadores: LA31 (5' GATGGATC-CTCTCTCTGCAGCACATTTCCT -3' y LA32 (5' -CTTGGATTCTGCGCTCCACCTCGCCGCTG -3') descritos por Sigurdardóttir et al. (1993). Las condiciones de temperatura utilizadas consistieron en 4 min a 94°C, 2 min a 60°C y 1 min a 72°C, seguidos por 4 min de polimerización final.

En la segunda etapa se usaron los cebadores LA31 y HL032 (5'-TCGCCGCTG-CACAGTTGAAACTCTC-3') de acuerdo a la metodología propuesta por Lewin et al. (1992). Las condiciones de temperatura utilizadas consistieron en 19 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a 65°C seguidos por 4 min de polimerización final.

Alícuotas de los productos de amplificación (12µl) fueron digeridos, por separado, con las enzimas de restricción RsaI, BstI y HaeIII (5 U) por 3 h de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Los fragmentos de digestión fueron resueltos en geles de acrilamida-bisacrilamida 6%/1X TBE y detectados por bromuro de etidio.

Los patrones observados con cada enzima fueron identificados siguiendo la nomenclatura establecida por van Eijk et al. (1992). En base a la combinación de los patrones de restricción correspondiente a cada una de las enzimas se definieron los alelos de este locus en acuerdo con lo propuesto por dicho autor. Así por ejemplo: el alelo designado como DRB3,2*5 corresponde al alelo 5 (locus DRB3, exón 2). De acuerdo a la nomenclatura adoptada el alelo 5 corresponde a la combinación de los patrones "c" (RsaI), "b" (BstI) y "b" (HaeIII).

Análisis de la estructura genética de la población.

El índice de fijación F_{is} de Wright fue cal

Tabla 1. Frecuencias génicas y genotípicas del locus de κ -caseína en la población de bovino Criollo Argentino de Chasquivil y los valores para la raza. Valores observados de F_{is} con la significancia obtenida.

Fuente	AA	AB	BB	A	B	F_{is}	χ^2
Población Total	0,432	0,486	0,081	0,675	0,324	-0,202	1,81
Chasquivil	0,291	0,548	0,161	0,565	0,435	-0,110	0,41

$\chi^2_{0,05,1}=3,84$

Tabla 2. Estimación de la diversidad genética en términos de las frecuencias génicas (parámetro h) para los loci de κ -caseína, β -lactoglobulina y BoLA-DRB3

Locus	h(Chasquivil)	h(Población Total)
κ -caseína	0,492	0,375
β -lactoglobulina	0,494	0,499
BoLA-DRB3	0,854	0,851

culado según la ecuación propuesta por Nei (1987), donde $F_{is} = (X_k - x_k^2) / [x_k (1 - x_k)]$, siendo x_k la frecuencia génica estimada en la población y X_k la frecuencia genotípica observada del homocigota. El grado de significación de las desviaciones de F_{is} con respecto a cero fueron estimadas a través de $\chi^2 = N \cdot F_{is}^2$ con un grado de libertad (Nei y Chesser, 1983).

La diversidad genética fue estimada a través del índice h de heterocigocidad. Este parámetro fue calculada con la fórmula $h = 1 - \sum x^2$ propuesta por Nei (1987), siendo x la frecuencia génica estimada de cada uno de los alelos presentes.

RESULTADOS

Las frecuencias génicas y genotípicas estimadas para el locus β -Lg en la raza de ganado bovino Criollo Argentino fueron tomadas de Poli y Antonini (1991). Con respecto a los loci κ -Cn y BoLA-DRB3, las frecuencias fueron estimadas a partir de muestras representativas (n=210) tomadas de siete rodeos provenientes de localidades distribuídas en todo el país, tales como la Región del Noroeste, Mesopotámica, Chaqueña y Pampeana (Giovambattista, Golijow Tesis doctorales en ejecución).

k-caseína: Las frecuencias génicas y genotípicas observadas para la población de Chasquivil al igual

que las correspondientes a las estimadas para la raza en estudio no se desviaron con respecto al equilibrio (Tabla 1). Sin embargo cuando se compararon los valores correspondientes a las frecuencias génicas entre las dos poblaciones, mediante una tabla de contingencia, los resultados evidenciaron diferencias significativas ($\chi^2 = 7,537, 0,01 > p > 0,005$).

Como estimación de la diversidad genética se utilizó el valor h (ver materiales y métodos). Este dato permite la estimación de la diversidad en términos de las frecuencias génicas. Como se observa en la Tabla 2 los valores correspondientes a la población de Chasquivil no pusieron en evidencia una reducción de la diversidad como la que podría esperarse si se tienen en cuenta las características de esta población.

β -lactoglobulina: Las frecuencias génicas y genotípicas estimadas mostraron diferencias significativas con respecto al equilibrio tanto para la población de Chasquivil como para la población total (Tabla 3). Como se observa en la Tabla 3 los valores de F_{is} para la población de Chasquivil indican un marcado incremento en el número de heterocigotas. Mientras que en la población total las desviaciones se manifiestan a través de un número elevado de homocigotas.

Al comparar mediante una tabla de contingencia, los valores de las frecuencias génicas correspondientes a la población en estudio y a la total, no se observaron diferencias significativas ($\chi^2=0,327, 0,75 > p > 0,50$). Dado que la estimación de h se basa, como se dijo anteriormente, a los valores correspondientes a las frecuencias génicas, los valores calculados para ambas poblaciones resultaron similares (Tabla 2).

BoLA-DRB3: De los 21 alelos caracterizados en la raza de bovino Criollo Argentino (Giovambattista, Golijow tesis doctorales en preparación), solo 12 de ellos fueron detectados en la población de Chasquivil (Tabla 4).

Tabla 3. Frecuencias génicas y genotípicas del locus de β -lactoglobulina en la población de bovino Criollo Argentino de Chasquivil y los valores estimados para la raza. Valores observados de F_{is} con la significancia obtenida.

Fuente	AA	AB	BB	A	B	F_{is}	χ^2
Poli & Antonini	0,297	0,392	0,310	0,494	0,506	0,212	7,23*
Chasquivil	0	0,885	0,115	0,442	0,558	-0,793	16,35**

$\chi^2_{0,05,1}=3,84.$ $0,01>p>0,005$ $p>0,001$

Dos de los alelos más frecuentes en la raza bovino Criollo Argentino (DRB3,2*15 y DRB3,2*18) fueron detectados en dicho rodeo. Sin embargo el alelo DRB3,2*24, cuya frecuencia en la población total es de 0,112, no fue detectado en los animales analizados. El resto de las variantes alélicas ausentes en la población de Chasquivil, presentaron una frecuencia muy baja en la población total (con rango entre 0,033 a 0,007). Como hecho interesante de remarcar, el alelo 22, que en la población de Chasquivil aparece con una frecuencia estimada de 0,10, en la población total presenta una frecuencia muy baja (0,026).

Al comparar las frecuencias génicas, se encontraron diferencias altamente significativas entre la población estudiada y la población total ($\chi^2 = 55,987$, $p<0,001$). El F_{is} unificado, calculado para esta población, fue de -0,129, no evidenciando diferencias significativas con respecto al equilibrio ($\chi^2 = 0,410$, $0,75< p< 0,50$). Los F_{is} correspondientes a cada alelo se dispersaron alrededor del unificado con un rango de 0,111 a 0,250.

La heterocigocidad (h) para este locus, en la población de Chasquivil, resultó ser comparable con el valor calculado para la población total (Tabla 2).

Tabla 4. Frecuencias génicas de los alelos del BoLA-DRB3 detectados en la población de Chasquivil.

Alelo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia
DRB3.2*5	0,04	DRB3.2*18	0,26
DRB3.2*6	0,02	DRB3.2*20	0,06
DRB3.2*11	0,06	DRB3.2*22	0,10
DRB3.2*13	0,10	DRB3.2*23	0,04
DRB3.2*15	0,20	DRB3.2*26	0,02
DRB3.2*16	0,08	DRB3.2*27	0,02

DISCUSION

El comportamiento de los alelos en una población pequeña, aislada durante un cierto período de tiempo (cuello de botella) es muy difícil de analizar matemáticamente debido a la fuerte influencia de los procesos estocásticos. A partir de simulaciones realizadas se ha tratado de predecir la pérdida y/o conservación de la diversidad genética. Así, Klein et al.,(1993), trabajando con el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) concluyeron que el 60% de los casos mantenían la totalidad de los alelos estudiados, siempre y cuando el número inicial se mantuviera sobre los 500 individuos y el período de tiempo no supera las diez generaciones. Si el número inicial disminuía y/o se extendía el período de tiempo, se registraba una importante pérdida del polimorfismo. Por lo que se concluye que el grupo fundador de una especie no podría ser menor de 500 individuos para mantener el polimorfismo en un sistema altamente variable como el MHC (Klein, 1986; Klein y Figueroa, 1986; Klein et al.,1993).

A pesar que la población de Chasquivil no cumple con los requisitos propuestos por Klein (1993), tanto en tamaño como en número de generaciones, los resultados sugieren que se ha mantenido un grado muy alto de diversidad en el locus BoLA-DRB3 (Tablas 2 y 4). Por otra parte, los valores de F_{is} indicarían una ausencia de fijación de alguna de las variantes alélicas, así como niveles no significativos de desviación con respecto al equilibrio. Estas observaciones sugieren que el alto grado de heterocigosis observado en este locus podría estar de algún modo favorecido por la selección, en acuerdo a las teorías propuestas (Snell, 1968; Bodmer, 1972; Doherty y Zinkernagel, 1975; Klein, 1986; Hughes y Nei, 1988). Nuestras observaciones estarían en concordancia con lo predicho con respecto a la selección hacia la diversidad en el sistema MHC.

Una de las problemáticas en la conservación de razas domésticas nativas o autóctonas estaría dada por el bajo número poblacional, lo cual llevaría a un aumento de homocigosis, con disminución de la supervivencia. En todo el mundo se están realizando programas para lograr mantener la variabilidad genética de este tipo de poblaciones a través de la creación de reservas o bancos de esperma como reservorio genético (Fresno et al., 1992).

En el caso del ganado bovino Criollo Argentino y en particular en la población de Chasquivil, el alto grado de diversidad genética observados pondrían en evidencia la importancia de la conservación de estas poblaciones para el mantenimiento del patrimonio genético. Por otra parte podrían brindar una fuente de variación para una futura selección de marcadores de resistencia y fertilidad.

En el caso de los loci bialélicos (κ -Caseína y β -Lactoglobulina), los valores de h calculados para esta subpoblación resultaron mucho mayores de los que podrían esperarse teniendo en cuenta el aislamiento (corte de flujo génico) y el bajo número de individuos, factores que de alguna manera contribuyen al aumento de homocigosis. En el caso particular del locus β -Lactoglobulina, las frecuencias genotípicas muestran una fuerte desviación con respecto a los valores esperados si el sistema estuviera en equilibrio. Como característica interesante, en la población de Chasquivil se observó un elevado número de heterocigotas mientras que el desequilibrio en la población total se debería a un exceso de homocigotas (ver valores de F , tabla 3). Sin embargo la diversidad genética (estimada a partir del parámetro h) sería comparable en ambas poblaciones (Tabla 2). En la población de Chasquivil gran parte de esta diversidad estaría aportada por los heterocigotas, mientras que en la población total el aporte hacia la variabilidad se debería al alto número de homocigotas de ambos tipos (AA y BB).

En síntesis los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que, por lo menos en el caso de los tres loci estudiados, la población de Chasquivil, a pesar de sus características, habría desarrollado los mecanismos necesarios para el mantenimiento de la diversidad genética.

Agradecimiento. Se agradece al Dr. M.A. Poli por haber provisto las muestras de sangre. Este trabajo ha sido financiado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas y la Agencia de Cooperación Internacional del Japón.

BIBLIOGRAFIA

- 1-AGRAWALA P.L.; WAGNER V.A.; GELDERMANN H. 1992. Sex determination and milk protein genotyping of preimplantation stage bovine embryos using multiplex PCR. *Theriogenology* 38:969-978.
- 2-BOLAND M.J.; HILL J.P.; CREAMER L.K. 1992. Genetic manipulation of milk proteins and its consequences for the dairy industry. *Review Paper* 2(6):355-360.
- 3-BODMER W. 1972. Evolutionary significance of the HLA, system. *Nature* 237:139-145.
- 4-DAMIANI G.; FERRETTI L.; ROGNONI G. y SGAMARELLI V. 1990. Restriction fragment polymorphism analysis of the K-casein locus in cattle. *Animal Genetics* 21(2):107-114.
- 5-DOHERTY P. C.; ZINKERNAGEL R. M. 1975. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at H-2 gene complex. *Nature* 256:50-52.
- 6-EIGEL W. N.; BUTLER J. E.; ERNSTROM C. A.; FARRELL JR. H. M.; HARWALKAR V. R.; JENNESS R.; MCL. WHITNEY R. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revisión. *J. Dairy Sci.* 67:1599-1631.
- 7-FRESNO M.; CAPOTE J. F.; CAMACHO M. E.; DARMANIN N.; DELGADO J.V. 1992. The Canary Islands breeds: past, present and future. *Arch. Zootec.* 41(extra):513-518.
- 8-GUGLIELMONE A. A.; MANGOLD A.J.; AGUIRRE D. H.; BERMUDEZ A. C.; GAIDO A.B.(1991). Comparación de la raza criolla con otros biotipos bovinos respecto al parasitismo por *Boophilus microplus* e infecciones naturales de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*. En *ganado Bovino Criollo*. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, Argentina. 2:1-6.
- 9-HANSEN E. W. (1994) *Ganadería bovina de raza criolla en el noroeste argentino*. Universidad Nacional de Jujuy, San Salvador de Jujuy, Argentina, 150.

- 10-HUGHES A. L.; NEI M. 1988. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* 355:167-170.
- 11-JENNESS R.; LARSON B.L.; MCMEEKIN T.L.; SWANSON A. M.; WHITNAH C. H.; WHITNEY R. MCL. 1956. Nomenclature of the proteins of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 39:536.
- 12-KLEIN J.; FIGUEROA F. 1986. Evolution of the major histocompatibility complex. In *Critical Reviews in Immunology*. 6(4):295-386.
- 13-KLEIN J. 1986. Natural history of the major histocompatibility complex. *J. Wiley & Sons*, New York, 1-35.
- 14-KLEIN J.; TAKAHATA N.; AYALA F.J. 1993. MHC polymorphism and human origins. *Scientific American*, 46-51.
- 15-LEWIN H. A.; SCHMITT K.; HUBERT R. VAN EIJK M. J. T.; ARNHEIM N. 1992. Close linkage between bovine prolactin and BoLA-DRB3 genes: Genetics mapping in cattle by single sperm typing. *Genomics* 13: 44-48.
- 16-LIN C. Y.; MC. ALLISTER A. J.; NG-KWAI-HANG K. F.; HAYES J. F. 1986. Effects of milk protein loci on first lactation production in dairy cattle. *Journal of Dairy Sciences* 69:704-712.
- 17-MALO D.; SKAMENE E. 1994. Genetic control of host resistance to infection. *TIG*. 10(10):365-371.
- 18-MEDRANO; AGUILAR CORDOVA 1990. Genotyping of bovine Kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Biotechnology* 8:144-146.
- 19-NEI M. 1987 *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. Ed. New York. 512 , 159-166.
- 20-NEI M.; CHESSE R. K. 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Ann. Hum. Genet.* 47:253-259.
- 21-PINDER S. J. ; PERRY B. N.; SKIDMORE C. J. y SAVVA D. 1991. Analysis of polymorphism in the bovine casein gene by use of the polymerase chain reaction. *Animal Genetics* 22(1):11-20.
- 22-POLI M. A.; ANTONINI A. G. 1991. Genetics structure of milk proteins in Argentinian Holstein and Argentinian Creole Cattle. *Hereditas* 115:177-182.
- 23-PRIMO A. T. 1992. El ganado bovino ibérico en las américas: 500 años después. *Arch. Zootec. (extra)*:421-432.
- 24-RABASA C. E. 1993. Comportamiento comparativo del ganado Criollo. En *Ganado Bovino Criollo*. Orientación Grafica Editora, Buenos Aires, Argentina. Tomo 3:14-17.
- 25-SAMBROOK J.; FRITSCH E. F.; MANIATIS T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1626.
- 26-SCHOOK L. B.; LEWIN H. A.; MCLAREN D. G. 1991. Gene mapping techniques and applications. *M. Dekker, inc.* N.Y., 283-303.
- 27-SIGUROARDOTTIR S.; MARIANI P.; GROENDEN A. M.; VAN DER POEL J. J.; ANDERSSON L. 1991. Organization and polymorphism of bovine MHC class II genes by genomic hybridizations using bovine probes. *Animal Genetics* 22:465-475.
- 28-SNELL G. D. 1968. The H-2 locus of the mouse. Observations and speculations concerning its comparative genetics and its polymorphism. *Folia Biol.* 14:335-358.
- 29-VAN DER BERG G.; ESCHER J. T.; DE KONING P. J.; BOVENHUIS H. 1992. Genetic polymorphisms of κ -casein and β -lactoglobulin in relation to milk composition and processing properties. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 46:145-168.
- 30-VAN EIJK M. J. T.; STEWART-HAYNES J. A.; LEWIN H. A. 1992. Extensive polymorphism of BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics* 23:483-496.
- 31-WHITNEY R. MCL.; BRUNNER J. R.; EBNER K. E.; FARREL JR. H. M.; JOSEPHSON R. V.; MORR C. V.; SWAISGOOD H. E. 1976. Nomenclature of the proteins of cow's milk: Fourth revision. *J. Dairy Sci.* 59:795.
- 32-XU A.; VAN EIJK M. J. T.; PARK C.; LEWIN H. A. 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *The J. Immunology* 151(12):6977-6985.