



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

FRECUENCIAS DE LAS VARIANTES ALELICAS DEL GEN DE LA CASEINA ALFA S1 DE CABRAS EN MÉXICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:
JOSE ANTONIO TORRES VAZQUEZ

ASESORES: DR. RAUL ULLOA ARVIZU
DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES



MEXICO, D. F.

2005

m. 345759



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

II. DEDICATORIAS.

A mis padres Ofelia Vázquez Altamirano y José Antonio Torres Rivera, por el gran apoyo tanto económico como moral que siempre he tenido de ellos.

A mi hermana Claudia, a mi cuñado Oscar y al pequeño Diego.

A la Lic. Nancy, que desea lo mejor para mi.

Autorizo a la Asociación General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: José Antonio Torres Vázquez
FECHA: 15 de Junio de 2005
FIRMA: 

III. AGRADECIMIENTOS.

A mi tercer tutor Dr. Hugo H. Montaldo Valdenegro, por su amistad y quien desinteresadamente colaboró en gran parte en la realización de este trabajo y en mi formación profesional.

Al los profesores Dr. Raúl Ulloa Arvizu y Dr. Rogelio Alonso Morales, por sus estímulos intelectuales y mi formación profesional.

A mi cuarta tutora la MVZ. Felicitas Vázquez Flores, a quien pido disculpas por hacerla desesperar más de una vez.

Al Profesor Emérito Dr. José Manuel Berruecos Villalobos, por sus valiosos comentarios a este trabajo y la motivación que me transmitió hacia esta materia.

A los miembros del jurado: Dr. Pedro Ochoa Galván, Dr. Andres Ducoing Watty, MVZ. Julio Cervantes Morali, Dr. Hugo H. Montaldo Valdenegro y al Dr. Raúl Ulloa Arvizu.

Al MC. Francisco Castrejón Pineda, quien me orientó durante el PAEA.

Al Dr. Miguel Enrique Arechavaleta y MPA. María del Carmen Camacho Rea.

A la Jefa del Departamento de Genética y Bioestadística de la FMVZ. MPA. Frida Salmerón Sosa y a la Lic. Ma. De Lourdes Rocio De la Torre Aceves, por confiar en mi.

A Amanda Gayosso V., y Alejandro Valdés R., del Lab. de Genética Molecular de la FMVZ de la UNAM.

A todo el personal Docente y Administrativo (en especial a Emilia y Carmen) del Departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.

A Ilda Graciela Fernández García, por proporcionar la sangre de los caprinos de la Laguna.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIAS.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
CONTENIDO.....	IV
ÍNDICE DE CUADROS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Producción de leche caprina en México.....	5
1.2 Leche caprina.....	6
1.3 Composición proteica de la leche de cabra.....	7
1.4 Caseínas.....	7
1.5 Polimorfismos de la caseína α 1.....	8
1.6 Tipificación de los alelos del locus de la caseína α 1.....	9
1.6.1 Sitios Polimórficos de Amplificados Digeridos (CAPS).....	9
1.7 Mejoramiento genético.....	10
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	12
2.1 Hipótesis.....	12
2.2 Objetivo general.....	12
2.3 Objetivos específicos.....	12
III. MATERIAL Y METODOS.....	13
3.1 Material biológico.....	13
3.2 Purificación del ADN.....	13

3.3	Identificación de genotipos del alelo E	14
3.4	Identificación de genotipos por medio de CAPS para los alelos B y F.	15
3.5	Análisis estadístico	16
IV.	RESULTADOS.	17
4.1	Tipificación de los alelos E, B y F	17
4.2	Frecuencias alélicas, genotípicas y número de alelos efectivos. . .	17
4.3	Prueba de equilibrio genético de Hardy-Weinberg	18
4.4	Estadísticas de F (F_{IS} , F_{ST} , F_{IT}) y diferenciación génica	19
V.	DISCUSIÓN.	20
5.1	Frecuencias genotípicas y alélicas	20
5.2	Equilibrio de Hardy-Weinberg.	21
VI.	CONCLUSIONES	26
VII.	LITERATURA CITADA	27
ANEXOS	45
I.	Número de animales muestreados por rebaño y por grupo genético.	45
II.	Purificación de ADN.	46
III.	Reacción en cadena a la polimerasa.	47
IV.	Base de datos.	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tipificación de alelos del locus de la caseína α 1 por CAPS del exón 9 y PCR del exón 19.	34
Cuadro 2. Número de individuos observados en el locus de la caseína α 1 para cada genotipo por población.	35
Cuadro 3. Frecuencias genotípicas observadas en el locus de la caseína α 1 por grupo genético.	36
Cuadro 4. Frecuencias alélicas del locus de la caseína α 1, heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada y número de alelos efectivos por grupo genético.	37
Cuadro 5. Resultados obtenidos de los programas para las pruebas de exceso y deficiencia de heterocigosis, índice de fijación y prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg.	38
Cuadro 6. Diferenciación génica para cada par de poblaciones.	39
Cuadro 7. Frecuencias alélicas para el locus de la caseína α 1 en diferentes países.	40

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1. Gen de la caseína α 1 en cabras	41
Figura 2. Patrones de los fragmentos amplificados del exón 19 del gen de la caseína α 1.....	42
Figura 3. Productos de digestión obtenidos con la enzima <i>Pdmnl</i> del segmento amplificado del exón 9 del gen de la caseína α 1.....	43
Figura 4. Dendrograma.....	44

RESUMEN

TORRES VÁZQUEZ JOSÉ ANTONIO. Frecuencias de las variantes alélicas del gen de la caseína alfa s1 de cabras en México (Bajo la dirección del Dr. Raúl Ulloa Arvizu y el Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales).

En México, es importante conocer las frecuencias alélicas para el locus de la caseína $\alpha s1$, debido a que su polimorfismo está asociado con el rendimiento en queso de la leche de cabra. Con el objeto de obtener dichas frecuencias y determinar si las poblaciones a estudiar se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, se identificaron los genotipos de 326 caprinos de los grupos: Saanen (97), Alpina (81) y Toggenburg (92), provenientes de Guanajuato. Además, se analizaron caprinos con apariencia externa similar a la raza Murciana-Granadina (26), y animales heterogéneos denominados Mezcla Lagunera (30), provenientes de la región de La Laguna. Se implementó un método de tipificación de las variantes E, B y F de la caseína $\alpha s1$, basado en las técnicas de Sitios Polimórficos de Amplificados Digeridos (con la enzima *Pdml*) y la Reacción en Cadena a la Polimerasa. Para los grupos genéticos Saanen, Alpina y Toggenburg, la mayor frecuencia fue para los alelos E y F (del 46.8 al 78.9%), mientras que para los grupos Murciana-Granadina y Mezcla Lagunera la suma de las frecuencias para los alelos A y B fue de 38.5 y 53.3% respectivamente. Únicamente la población de Alpina se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P > 0.05$), y sólo el grupo genético con apariencia de Murciana-Granadina mostró un exceso de

heterocigotos ($P < 0.05$). Alrededor del 5.16% de la variabilidad genética total (F_{ST}) se debe a diferencias entre los grupos genéticos. Por otro lado, hubo diferenciación génica ($P < 0.01$) entre la mayoría de los grupos estudiados, con excepción de Alpina y Toggenburg, y entre Toggenburg y Mezcla Lagunera ($P > 0.05$).

I. INTRODUCCIÓN.

Muchas de las características económicamente importantes en los animales domésticos, incluyendo la producción de leche y su calidad en los caprinos, son de naturaleza poligénica, lo cual significa que varios loci están involucrados en la expresión del fenotipo. En los últimos años, las investigaciones evidenciaron que algunos de esos loci podrían tener un mayor efecto que otros, y que ellos podrían ser identificados a nivel de ADN¹. En los caprinos, los genes que codifican para las proteínas de la leche, están directamente involucrados en el rendimiento de proteína y la composición de la leche^{1 y 2}. El polimorfismo de la caseína $\alpha 1$ en los caprinos está relacionado con la composición y algunas propiedades tecnológicas de la leche como la velocidad de coagulación, el tamaño micelar medio, lipólisis, composición de ácidos grasos, sólidos totales, rendimiento en la producción de queso así como sabor del queso^{3 y 4}.

En el caso de México, la valorización de la leche de cabra se da a través de subproductos. Debido a esto, el valor de la leche depende en gran medida de sus componentes, en particular el contenido y producción total de proteína y grasa⁵. Por esta razón resulta muy conveniente la identificación de individuos portadores de alelos favorables para incrementar el contenido de estos componentes.

Los alelos asociados con un alto contenido de caseína $\alpha 1$ en la leche de cabra son llamados alelos fuertes; los animales portadores de ellos pueden ser empleados como reproductores para producir queso, porque la cantidad total de caseínas en la leche de cabra está correlacionada positivamente con la cantidad de caseína $\alpha 1$ ⁶.

Los alelos asociados con una muy baja o nula síntesis de caseína $\alpha 1$ son llamados alelos nulos, éstos también son importantes, debido a que producen menores reacciones alérgicas en personas con intolerancia a la caseína⁶. Por otra parte, los caprinocultores necesitan mejorar la industria de quesos caprinos para poder incrementar sus ingresos y una forma sería utilizar esta información para seleccionar reproductores con los genotipos más deseables.

En Francia, el programa de selección utiliza como un criterio de selección la información sobre las variantes de la caseína $\alpha 1$, en adición a los valores genéticos obtenidos con modelos estadísticos de los registros de producción para leche y componentes de la leche. Esta selección se realiza particularmente en los machos jóvenes antes de entrar a la prueba de progenie⁵. De esta manera, los machos que se utilizarán para la inseminación artificial, son genotipificados para los alelos de la caseína $\alpha 1$ y son descartados en mayor proporción cuando portan alelos desfavorables^{1, 7 y 8}.

Sánchez *et al.*⁹ observaron mediante el uso de un modelo estocástico, y cuando el objetivo de selección es el contenido de proteína, que la inclusión de la información de la caseína $\alpha 1$ como criterio adicional de selección a los índices basados en control de producción de leche, grasa y proteína, puede incrementar el progreso genético hasta un 18% en la selección a corto plazo y hasta 8% en la selección a largo plazo, a diferencia de cuando no se usa esta información en la selección con el mejor predictor lineal insesgado (BLUP).

Las investigaciones realizadas en la leche de cabra desde 1980, evidenciaron que el polimorfismo de la caseína $\alpha 1$, se asocia con 4 niveles de síntesis de caseína $\alpha 1$ (alta, media, baja y nula). Sin embargo, únicamente en Francia, Italia, España

y Hungría se han estimado las frecuencias genotípicas y alélicas para este locus. Hasta ahora, los alelos E y F son los más frecuentes (cerca de 40% cada uno), mientras que el alelo A muestra una baja frecuencia (cercana al 10%) en las razas Alpina y Saanen¹⁰. Por otro lado, los alelos E y B predominan en la raza Murciana-Granadina (59 y 23 % respectivamente)¹¹.

En México, no existen estudios del polimorfismo genético de la caseína α s1 en caprinos. El conocimiento de las frecuencias génicas permitirá establecer las estrategias de los programas de mejoramiento genético asistido por este locus cuando tengan como objetivo aumentar el porcentaje de proteína y mejorar la producción de quesos o crear líneas de cabras productoras de leche hipoalérgica. Asimismo, la distribución de los alelos y genotipos para este locus, permite la caracterización de las poblaciones de cabras usadas en México y conocer más sobre su estructura genética y posibles relaciones.

1.1 Producción de leche caprina en México.

La producción y el consumo de leche de cabra y sus derivados se han incrementado en el país en los últimos 20 años³. Las principales regiones productoras de leche de caprinos son los estados del norte como; Coahuila y Durango (La Laguna), y el centro (El Bajío), principalmente Guanajuato^{12 y 13}.

En México y en otros países, como los de la cuenca mediterránea, la valorización de la leche de cabra se da a través de subproductos como quesos y dulces (cajeta y glorias)⁵. Esto enfatiza la importancia de las características de composición de la leche, que están ligadas al rendimiento de estos productos⁵.

Según la SAGARPA, la producción de leche de caprinos se realiza principalmente en sistemas de baja inversión y se destina en su totalidad a la fabricación de quesos, dulces y cajeta. La producción de leche de caprino aumentó de 1991 al 2001 a una tasa media anual de 1%, de 130 millones de litros a 140 millones. En el año 2001, no se registraron en México importaciones o exportaciones de leche de cabra¹³.

1.2 Leche caprina.

La leche de cabra tiene una composición similar a la leche de vaca, aunque esto varía de acuerdo a la raza³, las características genéticas de los individuos y las condiciones de producción. Existen diferencias en los tipos de proteínas de la leche entre las especies de rumiantes; por ejemplo, la leche de cabra contiene más caseína- β y menos caseínas α -1 y α -2 que la leche de vaca. Por otro lado, la composición total en aminoácidos de la fracción proteica es similar entre la leche de cabra y la leche de oveja. La proporción de ácidos grasos de cadena corta y media es mayor en la leche de cabra que en la de vaca y también es mayor la proporción de glóbulos grasos pequeños. La leche de cabra es sustancialmente más pobre tanto en grasa total como en proteína total que la leche de oveja. La composición del queso de cabra es también comparable al queso de vaca, aunque su textura física es diferente. La leche de cabra forma una cuajada más blanda y desmenuzable al ser acidificada y como resultado, los quesos de cabra tienden a ser más blandos que los elaborados con leche de vaca¹⁴.

1.3 Composición proteica de la leche de cabra.

La leche de cabra se compone principalmente de seis proteínas, de las cuales las caseínas equivalen aproximadamente al 80%. Estas son las únicas coagulables y determinan el rendimiento y la calidad del queso¹. Existen 4 tipos de caseínas: α 1, α 2, caseína- β y caseína- κ . Las caseínas: α 1, α 2 y caseína- β , son sensibles a la precipitación en calcio, mostrando peso (24 kDa) y estructura génica similares. Según Rijkels¹⁵, éstos y otros datos sostienen la hipótesis de un origen de evolución común para el locus de la caseína α 1^{7 y 16}. El restante 20 % se debe a las proteínas del suero, las cuales son α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina¹.

1.4 Caseínas.

Los genes de las caseínas de caprinos han sido localizados en el cromosoma 6. Los cuatro genes constituyen una región de 250 kb. La caseína α 1 muestra una unidad transcripcional relativamente larga, de aproximadamente 16.7 a 17.5 kb^{15 y 17}. La principal característica del gen de la caseína α 1 es su arquitectura dividida en 19 exones y 18 intrones (Figura 1). La proteína de la caseína α 1 consta de 199 aminoácidos^{7, 17 y 18}.

Caseína α 1. Actualmente se han identificado 14 alelos. Los alelos A, B₁, B₂, B₃, B₄, C, H y L; están asociados con un alto nivel de síntesis de caseína α 1 de 3.5 a 3.6 g/l por alelo, estos son llamados alelos fuertes. Los alelos E e I; están asociados con un nivel medio de síntesis de caseína α 1 entre 1.1 y 1.7 g/l, y se denominan alelos intermedios. Los alelos F y G; están asociados con un bajo nivel de síntesis de caseína α 1 entre 0.45 y 0.6 g/l; y son llamados alelos débiles. Los alelos O₁ y O₂; se denominan alelos nulos, los animales homocigóticos para estos

no producen caseína $\alpha 1$ ³. Algunos autores han considerado como la forma alélica ancestral al alelo B₁¹⁹. Grosclaude *et al.*²⁰, comparando la secuencia del gen de la caseína $\alpha 1$ entre las diferentes especies de rumiantes, concluyen que los alelos fuertes representan la secuencia ancestral de este gen en las cabras.

Caseína $\alpha 2$. No hay estudios acerca de la influencia del polimorfismo del locus de la caseína $\alpha 2$ en las propiedades de la leche y sólo se han realizado algunos estudios para evaluar el efecto de esta proteína en la posible alergenicidad a la leche de cabra³.

La caseína β tiene un rol en la estimulación de la respuesta inmune, mientras que la caseína κ puede tener un rol de protección contra alergias debido a que suprime la liberación de histamina de los mastocitos⁶.

1.5 Polimorfismos de la caseína $\alpha 1$.

El origen de los polimorfismos se debe tanto a mutaciones puntuales, como a inserciones, deleciones e inversiones de fragmentos del ADN^{1 y 21}.

Di Gregorio *et al.*²², Leroux *et al.*²³, Ramunno *et al.*²⁴ y Jansa *et al.*²⁵ identificaron en el caso del alelo E, una inserción de un elemento tipo LINE de 457 pb dentro del exón 19.

Ramunno *et al.*²⁶ observaron en el exón 9, que los alelos A, B, E y O₁, presentan una citosina en la vigésimo tercera posición del noveno exón; pero los alelos B y E, presentan una inserción de 11 pb (CGTAATGTTTC), localizadas a 73 nucleótidos secuencia abajo de la región 5' del noveno intrón. El alelo F, no presenta la deleción de una citosina en la vigésimo tercera posición del noveno exón. Sin embargo, éste alelo presenta la inserción de 11 pb localizadas en el

noveno intrón. En los demás alelos no se han reportado las diferencias polimórficas a nivel del noveno exón (ver cuadro 1).

1.6 Tipificación de los alelos del locus de la caseína α 1.

Los alelos del locus de la caseína α 1, se han identificado con técnicas electroforéticas como: con Sulfato Duodecil de Sodio-Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS), Electroforesis bidimensional/ espectrofotometría de masas (MALDI-ToF), Reacción en Cadena a la Polimerasa (PCR), Sitios Polimórficos de Amplificados Digeridos (CAPS) y secuenciación^{11 y 26}.

El alelo E se puede identificar mediante la Reacción en Cadena a la Polimerasa, para identificar el elemento tipo LINE presente en el exón 19.

Ramunno *et al.*²⁶, observaron que una delección de un nucleótido (C), en la vigésimo tercera posición y una inserción de 11 pb (CGTAATGTTTC), localizada a 73 nucleótidos secuencia abajo de la región 5' del noveno intrón, se asociaban a los alelos E, B, F, A y O₁. Esta técnica permite identificar los alelos B y F, pero tiene la desventaja de no distinguir al alelo A del O₁, ni distinguir otros alelos²⁶ (ver cuadro 1).

1.6.1 Sitios Polimórficos de Amplificados Digeridos (CAPS).

Ramunno *et al.*²⁶, desarrollaron un método para una genotipificación simultánea de los alelos B y F, mediante la técnica de Sitios Polimórficos de Amplificados Digeridos (CAPS, del inglés *Cleaved Amplified Polimorphic Sites*); también llamada PCR-RFLP²⁶ (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción previamente amplificados por la Reacción en Cadena a la Polimerasa). Esta

técnica consiste en la amplificación de un segmento corto de ADN, seguido de la digestión con una enzima de restricción.

Ramunno *et al.*²⁶, desarrollaron un par de iniciadores que amplifican el exón 9 y parte de los intrones 8 y 9. De esta manera, se incluye el sitio donde se presenta la inserción de 11 pb; por lo que, el fragmento amplificado es de 212 a 223 pb. Los alelos A, B, E y O₁, presentan un sitio de reconocimiento donde corta la enzima *XmnI* (GAANN/NNTTC) en la vigésimo tercera posición en el exón 9. En el alelo F, el sitio de restricción desaparece por la deleción de una citosina en la vigésimo tercera posición del exón 9. El haplotipo formado por la presencia/ausencia de la deleción y la presencia/ausencia de la inserción de 11 pb, definen los alelos (cuadro 1). Este método no permite diferenciar al alelo A del O₁. Por otro lado, no se han descrito los haplotipos para los demás alelos.

1.7 Mejoramiento genético.

La técnica de CAPS se puede aplicar exitosamente para detectar individuos portadores de algunos alelos favorables (como el A y B) del gen de la caseína α_1 , e incluir esta información en los criterios de selección^{1 y 5}.

La principal ventaja de usar métodos basados en el análisis del ADN, es que se puede determinar el genotipo de los caprinos al nacimiento en ambos sexos, mientras que esta información sólo estaba disponible al estudiar la leche de las hembras, después del primer parto, ya que anteriormente, la identificación de genotipos de hembras se basaba únicamente en el análisis de electroforesis de las proteínas lácteas^{9 y 10}.

La relación existente entre el contenido de caseína $\alpha 1$, debido al polimorfismo del locus del gen de la caseína $\alpha 1$ y las proteínas totales de la leche, ha estimulado el interés de seleccionar animales portadores de alelos fuertes (A, B₁, B₂, B₃, B₄, C, H y L) asociados con un alto contenido de caseína $\alpha 1$ ^{6 y 10}. En cabras, vacas y borregos, los genes de las caseínas forman un grupo sinténico y como consecuencia, los alelos son heredados juntos en forma de haplotipos. La información de estos haplotipos en cabras puede ser una herramienta útil para la selección^{27 y 28}.

Debido a la importancia de los productos fabricados a base de leche de cabra en México, es importante evaluar las frecuencias alélicas para el locus de la caseína $\alpha 1$ en varias poblaciones y determinar el efecto aditivo de este locus para ser usado como criterio selección en programas de mejora genética.

Además, las diferencias de las de las frecuencias genotípicas y alélicas en las poblaciones estudiadas en México para este locus, pueden proporcionar información sobre su origen y relaciones genéticas¹².

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

2.1 Hipótesis.

Debido a que las poblaciones caprinas a estudiar probablemente tienen diferente origen y han estado sujetas a distintas historias de selección, se espera que las frecuencias alélicas del gen de la caseína α_1 sean diferentes entre las poblaciones de estudio.

2.2 Objetivo general.

Estimar las frecuencias alélicas y genotípicas de los alelos A, B, E y F del gen de la caseína α_1 en algunas poblaciones de caprinos en México.

2.3 Objetivos específicos.

2.3.1 Obtener las frecuencias alélicas y genotípicas del gen de la caseína α_1 en cabras.

2.3.2 Evaluar si las poblaciones de estudio se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

2.3.3 Comparar las frecuencias alélicas entre las poblaciones de estudio.

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 Material biológico.

Se utilizaron 270 muestras sanguíneas de caprinos de razas Saanen, Alpina y Toggenburg provenientes de rebaños inscritos en la Asociación de Caprinocultores Unidos de Guanajuato y la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Caprino de Registro, A.C. Además, se incluyeron 26 muestras de un rebaño conformado por animales de color negro sólido y con apariencia externa de Murciana-Granadina. Por último, se incluyeron 30 muestras obtenidas de explotaciones tradicionales de la región conocida como “La Laguna”, región que abarca la parte sur del estado de Coahuila y la parte noroeste de Durango. Estos animales son probablemente el producto de el apareamiento de animales criollos con animales de raza Anglo Nubia, Alpina, Toggenburg y Saanen, por lo que se les denomina Mezcla Lagunera¹³. En el anexo I, se presenta el número de animales por rebaño y raza.

Todas las muestras fueron obtenidas con tubos al vacío con EDTA. Pasada una semana, fueron transportadas en una hielera a 4° C. al laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Las muestras sanguíneas se mantuvieron en congelación a -20°C., hasta su procesamiento.

3.2 Purificación del ADN.

A partir de cada muestra sanguínea se obtuvo ADN de leucocitos por el método de Miller²⁹ (Anexo II). Posteriormente, el ADN fue cuantificado en un fluorómetro

(Marca registrada: Hoefer Scientific Instruments DQ200-115V) empleando el reactivo Hoechst 33258 como marcador fluorescente. Se ajustó la concentración del ADN a 50ng/μl.

3.3 Identificación de genotipos del alelo E.

Se utilizó la reacción en cadena a la polimerasa (PCR) para amplificar una región ubicada en el exón 19 del gen de la caseína α s1. En la variante E se amplifica un segmento de 457 pb, debido a la presencia de un elemento transponible. En los alelos que no son E, se amplifica una región de 205 pb.

Los iniciadores empleados fueron diseñados por Vázquez³⁰ con las siguientes secuencias:

Iniciador Delantero 5' ATG GGA TTG AAA ATT CCA TGC 3'.

Iniciador de Reversa 5' ATA CTA CTG GAA TTT AGG TA 3'.

La reacción de PCR tuvo una concentración final de 1.5 mM MgCl₂ y una temperatura de alineación de 59°C. Las condiciones de la PCR se presentan en el anexo III.

Los productos amplificados fueron evaluados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% -TBE 1X, se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 μg/ml), utilizando como marcador de peso molecular pBR322/*Msp*I.

3.4 Identificación de genotipos por medio de CAPS para los alelos B y F.

En la identificación de los alelos A, B, D y F, se siguió la metodología propuesta por Ramunno *et al.*²⁶.

Como primer paso se utilizó la reacción en cadena a la polimerasa (PCR) para amplificar un segmento de 223 ó 212 pb ubicado en el exón 9.

Los iniciadores empleados tienen las siguientes secuencias:

Iniciador Delantero 5' TGT ATG TTC CGA TAG TTG GG 3'.

Iniciador de Reversa 5' TTC TAA AAG TCT CAG AGG CAG 3'.

En este caso la PCR tuvo una concentración final de 2 mM MgCl₂ y una temperatura de alineación de 66°C. (Anexo III). Los productos amplificados se evaluaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 3.5% -TBE 1X, teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), utilizando como marcador de peso molecular pBR322/*MspI*.

En el segundo paso se digirieron alícuotas de los productos amplificados de la PCR para el exón 9 empleando la enzima de restricción *Pdml* (Fermentas) que es un isoesquizomero de la enzima *Xmnl*, donde de acuerdo al tamaño de los fragmentos se puede diferenciar los alelos (ver cuadro 1). En el caso de los grupos de alelos [O₂, D, G] y [A, O₁] se consideró un sólo alelo D ó A respectivamente, debido a que la técnica no permite discriminar entre todos los alelos de cada grupo (ver cuadro 1).

Los productos digeridos fueron evaluados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% (-TBE 1X, poliacrilamida 8%, Temed 0.25 % y Persulfato de

amonio 0.075%³¹), teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), utilizando como marcador de peso molecular pBR322/*MspI*.

3.5 Análisis estadístico.

En cada grupo genético se estimaron las frecuencias genotípicas y las frecuencias alélicas, así como los índices de fijación según Weir y Cockerham³², para lo cual se utilizó el programa GENEPOP web version 3.4³³ Para evaluar si las poblaciones se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, se empleó una metodología Bayesiana propuesta por Rogatko *et al.*³⁴ la cual esta implementada en el programa HWDIAG version 1.beta³⁵. En aquellos grupos que no estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg se usó la prueba U propuesta por Rousset y Raymond³⁶ para determinar si existe exceso o deficiencia de heterocigotos empleando el método de la Cadena de Markov³⁷ implementado en el programa GENEPOP web version 3.4³³, con los parámetros ajustados a 1000 pasos de desmemorización, 100 repeticiones y 1000 iteraciones por repetición. Las estadísticas de F (F_{IS} , F_{ST} y F_{IT}), se obtuvieron mediante el programa GENEPOP web version 3.4³³. La diferenciación génica entre grupos caprinos se evaluó mediante el valor de P utilizando la prueba de Raymond y Rousset³⁸ implementada en el programa GENEPOP web version 3.4³³, con los parámetros ajustados a 1000 pasos de desmemorización, 100 repeticiones y 1000 iteraciones por repetición. Se calculó el número de los alelos efectivos según Kimura y Crow³⁹.

IV. RESULTADOS.

4.1 Tipificación de los alelos E, B y F.

Mediante la amplificación de una región en el exón 19 se identificó la presencia del alelo E. En la figura 2 se observa un gel que muestra individuos homocigóticos para E (fragmento de 662 pb), individuos heterocigóticos (fragmentos de 662 y 205 pb) e individuos homocigóticos para no E (fragmento de 205 pb). La identificación de los alelos B y F se obtuvo mediante la amplificación de un segmento del exón 9 y su digestión posterior con la enzima *Pdmnl*. En la figura 3 se observa un gel de poliacrilamida que muestra los productos de digestión del fragmento amplificado.

4.2 Frecuencias alélicas, genotípicas y número de alelos efectivos.

En el cuadro 2 se muestran en cada población los individuos observados para cada genotipo en el locus de la caseína *cs1*. En los cuadros 3 y 4 se presentan las frecuencias genotípicas observadas, y las frecuencias calculadas de los alelos B, E y F por grupo genético.

En la población Saanen los alelos E (0.42) y F (0.37) fueron los más frecuentes, al igual que los alelos E (0.24) y F (0.28) en Alpina. No se observaron animales Saanen con genotipos homocigotos para A y heterocigotos para AB; esta población fue la que obtuvo el menor número de alelos efectivos (3.03). La población Alpina fue la que presentó el mayor número de alelos efectivos (4.69). En el grupo genético Toggenburg los alelos más frecuentes fueron F con 0.32 y B con 0.21; en el tipo Murciana-Granadina los alelos más frecuentes fueron E con 0.44 y A con 0.25. En esta población no se observaron animales homocigotos para

A, B, D y F, ni heterocigotos para BD, BF y DF; y en la Mezcla Lagunera, los alelos más frecuentes fueron el B con 0.35 y el F con 0.23, no se observaron animales homocigotos para A, B y E, ni heterocigotos para AE.

Se observó una gran diversidad genética (heterocigosidad esperada mayor a 0.7) en la mayoría de los grupos, con excepción de Saanen, el cual obtuvo el menor valor de heterocigosidad esperada (0.67). El valor de heterocigosidad máxima posible para 5 alelos es de 0.8. En el grupo Saanen, sólo 3 alelos contribuyen realmente a la heterocigosidad, ya que los alelos A y D tienen frecuencias estimadas menores de 0.08. Por otro lado, las razas Alpina y Toggenburg presentan casi el valor máximo (Cuadro 4).

4.3 Prueba de equilibrio genético de Hardy-Weinberg.

Por medio de la prueba de equilibrio genético de Hardy-Weinberg, sólo el grupo Alpina se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P > 0.05$); el resto de los grupos genéticos mostraron un desequilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.05$), (ver cuadro 5).

Los grupos genéticos Toggenburg y Saanen, presentaron un valor positivo de Fis (índice de fijación), por lo que se realizó la prueba para deficiencia de heterocigotos y se encontró que no es significativa ($P > 0.05$) (cuadro 5); mientras que en los grupos Murciana-Granadina y la Mezcla Lagunera, como su valor de Fis fue negativo, se realizó la prueba para exceso de heterocigotos, la que únicamente resultó significativa para el grupo Murciana-Granadina ($P = 0.02$) (ver cuadro 5).

4.4 Estadísticas de F (F_{IS} , F_{ST} y F_{IT}) y diferenciación génica.

En el estudio de los índices de fijación, se construye una “metapoblación” que es un agregado de todos los grupos de cabras (Saanen, Alpina, Toggenburg, Murciana-Granadina y Mezcla Lagunera), que representan las subpoblaciones. F_{IT} se refiere a la consanguinidad de la metapoblación (MP) que en este estudio fue de 4.84%. La F_{IS} es la consanguinidad promedio de las 5 subpoblaciones cuyo valor fue de -0.34%. El índice de F_{ST} mide la diferenciación genética de las poblaciones, el valor de 0.0516 en estudio, significa que alrededor del 5.16% de la variabilidad genética total se debe a diferencias entre las subpoblaciones de cabras (grupos genéticos).

Debido a la diferenciación existente entre las subpoblaciones, se procedió a realizar una prueba de probabilidad de acuerdo a Raymond y Rousset³⁸ para evaluar si existe una diferenciación génica entre cada una de las 5 subpoblaciones o grupos caprinos; por lo que se realizaron 10 pruebas. Se observó que en 8 pruebas hubo diferencias significativas ($P < 0.01$) (cuadro 6), mientras que en los grupos Toggenburg con Alpina ($P = 0.09$) y Toggenburg con Mezcla Lagunera ($P = 0.07$) no se encontraron diferentes.

V. DISCUSIÓN.

5.1 Frecuencias genotípicas y alélicas.

Este es el primer estudio que proporciona resultados sobre las frecuencias de los alelos B, E y F del locus de la caseína $\alpha s1$, para caprinos de México. Algunos autores han demostrado que la frecuencia de los alelos para este locus varía de acuerdo a la raza^{11 y 24}. En este trabajo se observó una mayor proporción de los alelos E (0.42) y F (0.37) en el grupo genético Saanen, coincidiendo con las frecuencias encontradas en Francia⁴⁰ E (0.41) y F (0.43) e Italia¹⁹ E (0.49) y F (0.46), únicos países donde se han hecho estudios en estas razas (ver cuadro 7). Para el grupo genético Alpino, el alelo F mostró la mayor proporción (0.28); seguido por el alelo E (0.24). El alelo F fue también el más frecuente en estudios de Francia⁴⁰ (0.41) e Italia²⁴ (0.59), sin embargo, los valores son superiores a los obtenidos en este estudio. En el grupo Alpino se obtuvo la mayor diversidad genética reportado como heterocigosidad esperada (0.787) y por consecuencia, el mayor número de alelos efectivos (4.69), valor que se acerca mucho al máximo posible, que es de 5. Para el grupo genético Toggenburg, los alelos más frecuentes fueron el F (0.32) y el B (0.21). Estos datos no se han podido comparar, debido a que hasta ahora no se han encontrado otros estudios para este locus en esta raza, por lo que probablemente, éste sea el primer trabajo realizado para este grupo genético.

Las mayores frecuencias para el grupo genético con apariencia de Murciana-Granadina en este estudio fueron para los alelos E (0.44), A (0.25) y B (0.14). En España¹¹, para este mismo grupo genético se encontró que los alelos más

frecuentes fueron el E (0.59) y el B (0.23); pero los alelos A y F mostraron un menor valor que los encontrados en este estudio. Estas diferencias pudieran deberse a un efecto fundador, deriva génica o mezcla con otros genotipos. Es importante mencionar que en este trabajo se incluyeron animales que tuvieron el color y la apariencia externa de la raza, pero la población estudiada no es una raza propiamente dicha.

En el caso de la Mezcla Lagunera, los alelos de mayor frecuencia fueron el B (0.35) y F (0.23); recordando que este grupo es el resultado del apareamiento de cabras criollas con machos de razas especializadas en la producción de leche como Alpina, Saanen, Toggenburg y Nubia, provenientes en parte de un Centro de Cría del Gobierno Federal, ubicado en el municipio de Tlahualilo, Durango en el Norte de México¹³. Es notable que este grupo genético presenta más de la mitad de alelos fuertes (0.53), lo cual podría ser una consecuencia de la influencia de Nubia o criolla. La raza Nubia presenta niveles de producción de leche inferiores a los de Alpina o Saanen, pero superiores en contenido de proteína y grasa en leche⁴¹.

5.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Al someter las poblaciones a la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg sólo el grupo genético Alpino mostró estar en equilibrio de Hardy-Weinberg con una $P > 0.05$; sin embargo, es importante mencionar que pudiera no ser un equilibrio verdadero, debido a que los alelos A y D en este estudio, engloban más alelos que la técnica usada no permite distinguir. El valor negativo de $F_{is} = -0.23$ del grupo

genético Tipo Murciana-Granadina, refleja un exceso de heterocigotos, que puede deberse a que este grupo genético es producto de cruzamientos.

Es difícil suponer las razones por las que los grupos estudiados no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg, ya que la prueba solo indica si existe o no equilibrio sin indicar cuáles de las condiciones de equilibrio no se cumplen. Por otro lado, existe la posibilidad de que las muestras de caprinos puedan pertenecer a diferentes generaciones o que los machos pertenezcan a otras poblaciones con diferentes frecuencias alélicas.

Cavalli-Sforza y Bodmer⁴² mencionan que con tantas condiciones que se requieren para establecer el equilibrio de Hardy-Weinberg, es difícil de creer que alguna población pueda mostrarse en equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo, Kimura y Crow³⁹ mencionan que teóricamente la mayoría de los genes de las especies con reproducción sexual están aproximadamente en equilibrio.

Actualmente se han reportado 14 alelos de la caseína $\alpha 1^3$, que se detectan por medio de técnicas electroforéticas en la leche. Con la metodología utilizada sólo se detectaron 3 grupos de alelos. Con la identificación de más alelos, es factible que estos resultados puedan modificarse en cierto grado. Sin embargo en todas las poblaciones estudiadas, la frecuencia de los alelos nulos (O_1 y O_2), ha sido muy baja. Es necesario realizar más estudios que contemplen a los alelos A y los nulos.

Los índices de fijación F_{IT} , F_{IS} y F_{ST} , fueron propuestos por S. Wright^{39 y 43} para estudiar la estructura de la población y tienen la siguiente relación:

$$(1-F_{IT}) = (1-F_{IS})(1-F_{ST})$$

Donde F_{IS} es el coeficiente de consanguinidad de un individuo relativo a su propia población. F_{ST} es la consanguinidad promedio de la subpoblación relativa a la población total. Finalmente F_{IT} es el coeficiente de consanguinidad del individuo relativo a la población total.

Por lo que, al sustituir el valor de F_{IS} por 0, entonces $F_{IT} \approx F_{ST}$. Esto quiere decir que la consanguinidad de la metapoblación esta dada por un exceso de homocigotos debido a que la metapoblación tiene una estructura reproductiva donde hay grupos (subpoblaciones) aislados; de este modo, el coeficiente de diferenciación génica ($F_{ST} = 0.05$), mide el proceso de dispersión entre estos grupos que ha habido desde que se formaron a partir de su ancestro común. Sin embargo en este estudio, este estimador es poco preciso, debido a que se usó un solo locus⁴³. La utilización de varios marcadores genéticos neutros como los microsatélites, sería de mayor utilidad. Este estudio se podría realizar a un nivel jerárquico inferior, es decir, reconociendo los ranchos dentro de los grupos genéticos. Los grupos genéticos de Saanen, Alpina y Toggenburg, tienen mas de una explotación muestreada (anexo I). Sin embargo, en varias de ellas, se tienen menos de 10 caprinos, razón por la cual esta evaluación no se realizó en el presente trabajo.

Cuando se efectuaron las pruebas para saber si existen diferencias génicas entre las razas, se vió que el grupo Toggenburg no es distinto de Alpina ($P = 0.09$), ni de la Mezcla Lagunera ($p = 0.07$). También, se observó que son estos tres grupos los que presentan mayor diversidad genética. De hecho, el grupo Alpino tiene 4.7 alelos efectivos que se acerca mucho al máximo de 5 alelos efectivos, cuyo valor se logra cuando todos los alelos presentan la misma frecuencia.

Entre los grupos de Alpina y Toggenburg, el alelo E mostró la mayor diferencia [0.094], pero entre los grupos Toggenburg y Mezcla Lagunera lo fue el alelo B [0.138]. Sin embargo, debido a la menor muestra de caprinos en el grupo Mezcla Lagunera, la probabilidad de cometer el error tipo II es mas grande al comparar los grupos Toggenburg con Mezcla Lagunera, que al comparar Alpina con Toggenburg; a pesar de esto, la prueba de Raymond y Rousset³⁸ muestra que no existe diferencia ($P = 0.07$).

La frecuencia de los alelos fuertes (A y B) es de 53.3% en el caso de la Mezcla Lagunera, mientras que los alelos E y F son los mas frecuentes en Saanen (78.9%) y Alpina (51.9%).

El valor de negativo del índice de fijación ($F_{IS} = -0.18$) en el grupo Mezcla Lagunera (cuadro 5), indica que hay un exceso de heterocigotos, aunque no fue significativo ($P=0.08$). El exceso de heterocigotos se podría explicar debido a que el grupo esta conformado por varios rebaños y pudiera ser que en ellos existe migración o introducción de animales de otros grupos genéticos.

Si utilizáramos el valor de F_{ST} con sólo dos grupos, encontraríamos un estimador de distancia genética, que al usarlo en la formación de un dendrograma, nos daría una síntesis de las diferencias genéticas entre todos los grupos. Al realizarlo (figura IV), se observa que los grupos Alpina, Toggenburg y Mezcla Lagunera, se agrupan en una sola rama, lo cual indica que son muy parecidos entre ellos. Esto confirma la suposición de que estas razas están involucradas en los animales de la Mezcla Lagunera.

Actualmente el mejoramiento genético de los caprinos se beneficia de la contribución de la genética molecular. Sin embargo, Manfredi *et al.*⁴⁴ mostraron

como la selección después de una prueba de progenie de machos de las razas Alpina y Saanen, a pesar de ignorar la información de la caseína α_1 , incrementó la frecuencia del alelo favorable A de 0.41 y 0.09 en 1987 a 0.80 y 0.17 en 1994.

Para evitar conservar machos jóvenes portando alelos desfavorables (nacidos de padres heterocigotos AE y AF) hasta que se evalúa su progenie, se han implementado programas basados en una selección temprana con información del locus de la caseína α_1 mediante evaluaciones de ADN.

La información molecular es de utilidad tanto para mejorar características de la leche como para mejorar características de baja heredabilidad^{44 y 45}. La genotipificación a nivel de ADN en la producción animal proporciona además una alternativa para verificar los errores del pedigrí y ofrece la oportunidad de estudiar la relación entre el tipo de proteínas de la leche y muchos aspectos de la producción y la salud animal.

VI. CONCLUSIONES.

Para el grupo genético Saanen, las frecuencias de los alelos E y F del locus de la caseína α 1 son similares a las encontradas en Francia e Italia. Para el grupo Alpino las frecuencias de los alelos E y F del locus de la caseína α 1 son similares a las encontradas en otros países. En el grupo de cabras con apariencia de Murciana-Granadina, las frecuencias de los alelos A y B concuerdan aproximadamente con lo reportado en España para esta raza¹¹.

Se sugiere identificar todos los alelos del gen de la caseína α 1, con el objetivo de detectar sementales con genotipos menos deseables para excluirlos de los programas de selección, en caprinos lecheros. De esta manera el locus de la caseína α 1, se puede utilizar como criterio de selección en caprinos para incrementar el rendimiento de queso por lactación.

Por otro lado, aunque para los estudios de diversidad genética se aconseja el uso de varios microsatélites, los estudios realizados con un solo locus muy polimórfico y probablemente sujeto a selección, mostraron una idea de la diversidad génica presente entre y dentro de las poblaciones.

Existen amplias posibilidades de incrementar las frecuencias de los alelos fuertes usando la selección asistida por genotipos obtenidos con métodos moleculares, particularmente en los grupos Alpina y Saanen. Debido a las bajas frecuencias de los alelos fuertes en estos grupos.

VII. LITERATURA CITADA.

1. Moioli, B., Pilla, F. and Tripaldi, C.: Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats. *Small Ruminant Research.*, 27: 185-195 (1998).
2. Angiolillo, A., Yahyaoui, M.H., Sánchez, A., Pilla, F. and Folch, J.M.: Characterization of a new genetic variant in the caprine κ -casein gene. *J. Dairy Sci.* 85: 2679-2680 (2002).
3. Gómez, J.A., Miralles, B., Agüera, P. and Amigo, L.: Quantitative determination of α_{s2} - and α_{s1} -casein in goat's milk with different genotypes by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A.*, 1054:279-284 (2004).
4. Clark, S. and Sherbon, J.W.: Alpha s1-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Ruminant Research.* 2: 123-134 (2000).
5. Montaldo, H., Valencia, M., Arellano, S. y Oliveros, J.: Programa de Mejoramiento Genético de Caprinos Productores de Leche en Guanajuato. *Acontecer Ovino-Caprino. Proyecto Apoyado en el Periodo 2000-2001 por la Fundación Guanajuato Produce A.C.*, 4:54-60 (2001).
6. Roncada, P., Giviraghi, A., Liberatori, S., Canas, B. and Greppi, G. F.: Identification of caseins in goat milk. *Proteomics.*, 2: 723-726 (2002).
7. Martín, P., Szymanowska, M., Zwierzchowski, L. and Leroux, C.: The impact of genetics polymorphism on the protein composition of ruminant milks. *Reprod. Nutr. Dev.*, 42: 433-459 (2002).

8. Strzalkowska, N., Krzyzewski, J., Zwierzchowski, L. and Ryniewicz, Z.: Effects of κ -caseina and β -lactoglobulin loci polymorphism, cows' age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield and milk composition in Polish Black-and-White cattle. *Animal Science Papers and Reports*. 20: 21-35 (2002).
9. Sánchez, A., Ilahi, H., Manfredi, E. and Serradilla, J.M.: Potential benefit from using the α s1-casein genotype information in a selection scheme for dairy goats. *J. Anim. Breed. Genet.* 122: 21-29 (2005).
10. Leroux, C., Martín, P., Mahé, M. F., Levéziel, H., and Mercier, J.C.: Restriction fragment length polymorphism identification of goat α s1-casein alleles: a potential tool in selection of individuals carrying alleles associated with a high level protein synthesis. *Animal Genetics.*, 21: 341-351 (1990).
11. Jordana, J., Amills, M., Diaz, E., Angulo, C., Serradilla, J.M. and Sánchez, A.: Gene frequencies of caprine s1-casein polymorphism in Spanish goat milk. *Small Ruminant Research.*, 20: 215-221 (1996).
12. Montaldo, H. y Meza, C.: Goat Genetic Resources Situation in Mexico., 7th International Conference on Goats. France. Tomo II 944-945 (2000).
13. Claridades Agropecuarias. Informe sobre la Situación de los Recursos Genéticos Pecuarios en México. Apoyos y Servicios a Comercialización Agropecuaria (ASERCA). Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca (SAGARPA). Núm. 111: 1-52 (2002).
14. Wilkinson, J.M. y Stark, B.A.: Producción comercial de cabras., ACRIBIA, S.A., Zaragoza, España. 1987.

15. Rijnkels, M.: Multispecies comparison of the casein gene *loci* and evolution of the casein gene family. *J. Mammary Gland Biol.*, 7: 327-345 (2002).
16. Koczan, D., Hobom, G. and Seyfert, H.: Genomic organization of the bovine α s1-casein gene. *Nucleic Acids Res.* 19: 5591-5596 (1991).
17. Rammuno, L., Gianfranco, C., Rando, A., Illario, R., Gallo, D., Di Bernardino, D. and Masina, P.: The goat α s1-casein gene: gene structure and promoter analysis., *Gene.* 334: 105-111 (2004).
18. Leroux, C., Mazure, N. and Martín, P.: Mutations away from splice site recognition sequences might cis-modulate alternative splicing of goat α s1-casein transcripts. *Journal of Bioquimical Chemistry.*, 267: 6147-6157 (1992).
19. Martin, P. and Leroux, C.: Le gène caprin spécifiant la caséine α s₁: un suspect tout désigné aux effets aussi multiples qu'inattendus. *INRA Prod. Anim.*, 2000, numéro hors série <<Génétique moléculaire: principes et application aux population animales>>, 125-132 (2000).
20. Grosclaude, F., Ricordeau, G., Martin, P., Remeuf, F., Vassal, L. and Bouillon, J.: From Gene to cheese: the caprine alpha s1-casein polymorphism, its effects and its evolution. *Journal Productions Animales.* INRA Prod. Anim., 7: 1-19 (1994).
21. Cosenza, G., Illario, R., Rando, A., Di Gregorio, P., Masina, P. and Ramunno, L.: Molecular characterization of the goat CSN1S1 α 1 allele. *Journal of Dairy Research.* 70: 237-240 (2003).
22. Di Gregorio, P., Rando, A., Ramunno, L., Masina, P. and Pieragosini, E.: Polimorfismi nelle regioni del Dna che contengono i geni delle caseine di pecora e capra. *Tai XXIV Simposio Internazionale Zootecnia.*, 275-282 (1989).

23. Leroux, C., Martin, P., Mahé, M.F., Lévéziel, H. and Mercier, J.C.: RFLP identification of goat α -s1 alleles. *Anim. Genet.*, 21: 341-351 (1990).
24. Ramunno, L., Rando, A., Di Gregorio, P., Massari, M., Blassi, M. and Masina, P.: Structura genetica di alcune popolazioni caprine allevate in Italian a locus della caseina α s1. *Proceedings IX Congress Associazione Scientifica Produzione Animale. Milan*, 579-589 (1991).
25. Jansa, P., Leroux, C., Bonastre, B. and Martín, P.: Occurrence of a LINE séquence in the 5' UTR of the goat α s1 casein E allele associated with a reduced protein sintesis. *Gene.*, 147:179-187 (1994).
26. Ramunno, L., Cosenza, G., Pappalardo, M., Pastore, N., Gallo, D., Gregorio, P. and Masina, P.: Identification of the Goat *CSN1S1^F* Allele by Means of PCR-RFLP Method., *Animal Genetics.*, 31:33-336 (2000).
27. Marletta, D., Bordonaro, S., Guastella, A.M. and D'Urso, G.: Genetic polymorphism at CSN1S2 locus in two endangered Sicilian goat breeds. *J. Anim. Breed. Genet.*, 120: 52-56 (2004).
28. Brignon, C., Mahe, M.F., Ribadeau, B., Mercier, J.C. and Grosclaude, F.: Two of the three genetic variants of goat α s1-casein which are synthesized at a reduced level have an internal deletion possibly due to altered RNA splicing. *Eur. J. Biochem.* 193: 237-241(1990).
29. Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells., *Nucleic Acids Research.* 16:1215 (1988).

30. Vázquez, F.: Variantes alélicas de la Caseína $\alpha 1$ y sus efectos en la producción y composición de la leche en cabras Alpina, Saanen, Toggenburg y Criollas del centro de México. (En proceso de publicación).
31. Fritsch, E.F., Maniatis. and Sambrook, J.; Molecular cloning., Cold Spring Harbor, Laboratory Press., Second Edition., Unites States of America., 1989., p 13.48.
32. Weir, B. and Cockerham, C.: Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370 (1984).
33. Raymond, M. and Rousset, F.: Genepop on the web version 3.4 disponible en la página <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/Option1.html>
34. Rogatko, A., Slifker, M.J. and Babb, J.S.: Hardy-Weinberg Equilibrium Diagnostics., *Theoretical Population Biology*. 62: 251-257 (2002).
35. Rogatko, A and Slifker, M.: HWDIAG version 1.beta. Disponible en la página <http://www.fccc.edu/users/rogatko/hwdiag/>
36. Rousset, F. and Raymond, M.: Testing heterozygote excess and deficiency., *Genetics*, 140: 1412-1419 (1995).
37. Guo, S.W. and Thompson, E.A.: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for the multiple alleles. *Biometrics*., 48: 361-372 (1992).
38. Raymond, M and Rousset, F.: An exact test for population differentiation. *Evolution*., 49: 1280-1283 (1995).
39. Crow, J. and Kimura, M.: An introduction of Population genetics theory. Harper and Row. New Cork. 1970.

40. Grosclaude, F., Mahé, M.F., Brignon, C., Di Stasio, L. and Jeunet, R.: A mendelian polymorphism underlying variations of goat α s1-casein. *Genet. Sel. Evol.* 19: 399-412 (1987).
41. Wiggans, G.R. and Van Dijk, J.W.J and Misztal, I.: Genetic evaluation of dairy goats for milk and fat yield with an animal model., *J. Dairy Sci.* 71:1330-1337 (1987).
42. Cavalli-Sforza, L.L. and Bodmer, W.F.: *The genetics of human population*, W.H. Freeman and Company, San Francisco. 1971.
43. Nei, M.: *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, USA. 1987.
44. Manfredi, E., Ricordeau, G., Mahé, M.F., Leroux, C., Elsen, J.M., Marin, P. and Grosclaude, F.: Importance de la α -s1 casein polymorphism in dairy goats genetics. *EAAP 46th Annual Meeting, Prague.* p 48 (1995).
45. Manfredi, E., Serradilla, J.M., Leroux, C., Martín, P. and Sánchez, A.: Genetics for milk production. 7th International Conference on Goats, France., Tome 1. 15-21 May. 191-196 (2000).
46. Veress, G., Kusza, S., Bösze, Z., Kukovics, S. and Jávör, A.: Polymorphism of the α s1-casein, κ -casein and β -lactoglobulin genes in the Hungarian Milk Goat. *South African Journal of Animal Science*, 34: 20-23 (2004).
47. Zullo, A., Barone, C., Chianese, L., Colatruglio, P., Occidente, M. and Matassino, D.: *Small Ruminant Research* (www.sciencedirect.com), 2004.
48. Marletta, D., Bordonaro, S., Guastella, A. M., Criscione, A. and Urso, G.D.: Genetic polymorphism of the calcium sensitive caseins in sicilian Girgentana

and Argentata dell'Etna goat breeds. *Small Ruminant Research*. 57: 133-139
(2004).

CUADROS.

Cuadro 1. Tipificación de alelos del locus de la caseína *cs1* por CAPS²⁶ del exón 9 y PCR del exón 19.

Alelo	Exón 9		Digestión	Tamaño del fragmento (pb)	Exón 19 (pb)
	Eventos polimórficos del locus de la caseína <i>cs1</i>				
F	Deleción ⁺	Inserción de 11pb.	-	223	205
0 ₂ , D, G ó nuevo	Deleción ⁺	No inserción de 11pb.	-	212	205
B	Deleción ⁻	Inserción de 11pb.	+	161 y 63	205
E	Deleción ⁻	Inserción de 11pb.	+	161 y 63	662
A y 0 ₁	Deleción ⁻	No inserción de 11pb.	+	150 y 63	205

Deleción⁺, indica la ausencia de una citosina;
Deleción⁻, indica la presencia de una citosina.

Cuadro 2. Número de individuos observados en el locus de la caseína cs1 para cada genotipo por población.

Genotipo*	Saanen	Alpina	Toggenburg	Tipo Murciana- Granadina	Mezcla Lagunera
AA	0	2	1	0	0
AB	0	5	7	4	8
AD	1	5	9	1	2
AE	2	6	4	7	0
AF	3	10	4	1	1
BB	1	2	1	0	0
BD	2	3	6	0	5
BE	2	6	2	3	1
BF	15	5	22	0	7
DD	3	5	3	0	1
DE	3	6	7	2	1
DF	2	1	5	0	1
EE	21	4	4	3	0
EF	32	13	6	5	1
FF	10	8	11	0	2
TOTAL	97	81	92	26	30

* Se consideró como alelos A y D a los alelos (A + O₁) y (D + G + O₂) respectivamente.

Cuadro 3. Frecuencias genotípicas observadas en el locus de la caseína α_1 por grupo genético.

Genotipo*	Saanen	Alpina	Toggenburg	Tipo Murciana- Granadina	Mezcla Lagunera
AA	0.000	0.025	0.011	0.000	0.000
AB	0.000	0.062	0.076	0.154	0.267
AD	0.010	0.062	0.098	0.038	0.067
AE	0.021	0.074	0.043	0.269	0.000
AF	0.031	0.123	0.043	0.038	0.033
BB	0.010	0.025	0.011	0.000	0.000
BD	0.021	0.037	0.065	0.000	0.167
BE	0.021	0.074	0.022	0.115	0.033
BF	0.155	0.062	0.239	0.000	0.233
DD	0.031	0.062	0.033	0.000	0.033
DE	0.031	0.074	0.076	0.077	0.033
DF	0.021	0.012	0.054	0.000	0.033
EE	0.216	0.049	0.043	0.115	0.000
EF	0.330	0.160	0.065	0.192	0.033
FF	0.103	0.099	0.120	0.000	0.067
TOTAL	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

* Se consideró como alelos A y D a los alelos (A + O₁) y (D + G + O₂) respectivamente.

Cuadro 4. Frecuencias alélicas del locus de la caseína *cs1*, heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada y número de alelos efectivos por grupo genético.

Grupo genético	Alelos					Ho	Hs	n _e
	A'	B	D''	E	F			
Saanen	0.031	0.108	0.072	0.418	0.371	0.639	0.670	3.031
Alpina	0.185	0.142	0.154	0.241	0.278	0.741	0.787	4.686
Toggenburg	0.141	0.212	0.179	0.147	0.321	0.783	0.779	4.516
Tipo								
Murciana-Granadina	0.250	0.135	0.058	0.442	0.115	0.885	0.707	3.414
Mezcla Lagunera	0.183	0.350	0.183	0.050	0.233	0.900	0.753	4.055

A' = (A + O₁);
D'' = (D + G + O₂)

1. **Hs** es el número de heterocigosidad esperada ($H_s = 1 - \sum x_i^2$)
2. **Ho** es el número de heterocigosidad observada.
3. **n_e** se refiere al número de alelos efectivos ($n_e = 1 / \sum x_i^2$)

Cuadro 5. Resultados obtenidos de los programas para las pruebas de exceso y deficiencia de heterocigosis, índice de fijación y prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg.

Grupo genético	Valor de P*	Índice de Fijación Fis**	Deficiencia de heterocigotos Valor de P	Exceso de heterocigotos Valor de P
Saanen	0.0000 ^a	0.0512	0.0549	0.9460
Alpina	0.3365 ^b	0.0645	0.0903	0.8970
Francesa	0.0000 ^a	0.0003	0.4853	0.5076
Toggenburg Tipo	0.0234 ^a	-0.2326	0.9957	0.0191
Murciana-granadinas	0.0140 ^a	-0.1783	0.9347	0.0800
Mezcla Lagunera				

* Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg HWDIAG version 1.beta.

** Índice de fijación según Weir y Cockerham (1984)³².

^a Poblaciones que se encuentran en desequilibrio de Hardy-Weinberg.

^b Población que se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Cuadro 6. Diferenciación génica para cada par de poblaciones.

Grupo genético	Probabilidad	Error estándar
Saanen y Alpina	0.00000	0.00000
Saanen y Toggenburg	0.00000	0.00000
Saanen y Tipo Murciana-Granadina	0.00000	0.00000
Saanen y Mezcla Lagunera	0.00000	0.00000
Alpina y Toggenburg	0.08830	0.00591
Alpina y Tipo Murciana-Granadina	0.00828	0.00123
Alpina y Mezcla Lagunera	0.00089	0.00032
Toggenburg y Tipo Murciana-Granadina	0.00000	0.00000
Toggenburg y Mezcla Lagunera	0.06780	0.00437
Tipo Murciana-Granadinas y Mezcla Lagunera	0.00000	0.00000

Cuadro 7. Frecuencias alélicas para el locus de la caseína cs1 en diferentes países.

Raza	Núm.	A + O ₁ *	B	D + O ₂ + G*	E	F	País	Referencia
Saanen	159	0.10	0.06	•	0.41	0.43	Francia	Grosclaude <i>et al.</i> (1987) ⁴⁰
Saanen	70	0.03	•	•	0.49	0.46	Italia	Martin and Leroux (2000) ¹⁹
Saanen	97	0.03	0.11	0.07	0.42	0.37	México	Presente trabajo
Alpina	213	0.19	0.05	•	0.34	0.41	Francia	Grosclaude <i>et al.</i> (1987) ⁴⁰
Alpina	80	•	•	•	0.35	0.59	Italia	Ramunno <i>et al.</i> (1991) ²⁴
Alpina	81	0.19	0.14	0.15	0.24	0.28	México	Presente trabajo
Murciana-Granadina	109	0.08	0.23	•	0.59	0.08	España	Jordana <i>et al.</i> (1996) ¹¹
Tipo Murciana-Granadina	26	0.25	0.14	0.06	0.44	0.12	México	Presente trabajo
Toggenburg	92	0.14	0.21	0.18	0.15	0.32	México	Presente trabajo
Mezcla Lagunera	30	0.18	0.35	0.18	0.05	0.23	México	Presente trabajo
Hungarian milk	109	•	•	•	0.08	0.31	Hungría	Veress <i>et al.</i> (2004) ⁴⁶
Poitevine	209	0.05	0.35	•	0.45	0.14	Francia	Martin and Leroux (2000) ¹⁹
Corse	106	0.14	0.13	•	0.14	0.59	Francia	Martin and Leroux (2000) ¹⁹
Rove	147	0.23	0.05	•	0.62	0.10	Francia	Martin and Leroux (2000) ¹⁹
Garganica	54	0.61	•	•	•	0.02	Italia	Martin and Leroux (2000) ¹⁹
Maltese	81	0.34	•	•	0.11	0.27	Italia	Martin and Leroux (2000) ¹⁹
Malagueña	373	0.09	0.09	•	0.65	0.04	España	Jordana <i>et al.</i> (1996) ¹¹
Payoya	111	0.05	0.19	•	0.76	•	España	Jordana <i>et al.</i> (1996) ¹¹
Canaria	74	0.28	0.32	•	0.20	•	España	Jordana <i>et al.</i> (1996) ¹¹
Cilentana Goat Milk	86	0.16	0.30	-	0.21	0.33	Italia	Zullo <i>et al.</i> (2004) ⁴⁷
Girgentana	341	•	•	•	0	0.17	Italia	Martletta <i>et al.</i> (2004) ⁴⁸
Argentata dell'Etna	183	•	•	•	0	0.18	Italia	Martletta <i>et al.</i> (2004) ⁴⁸

• No distinguibles.

FIGURAS.

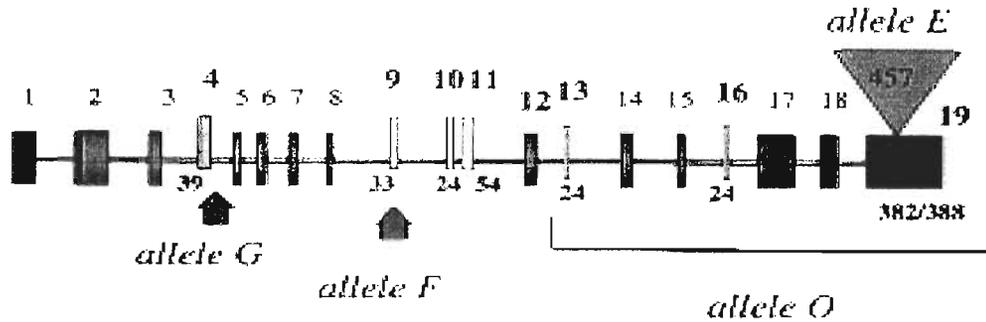


Figura 1. Gen de la caseína α_1 en cabras. Representación esquemática de los intrones y exones del locus de la caseína α_1 de la cabra, las flechas representan los alelos G, F, O y E responsables del “polimorfismo cuantitativo”. En el alelo E se representa la inserción del elemento line (457 pb) en el último exón⁷.

GENOTIPOS



Figura 2. Patrones de los fragmentos amplificados del exón 19 del gen de la caseína $\alpha s1$, muestra separada por un gel de agarosa al 2%, donde M corresponde al marcador de peso molecular pBR322/*MspI*; se observa 2 individuos homocigóticos para E (662 pb); un individuo heterocigótico para E con (662 y 205 pb) y un individuo homocigótico para alelos no E (205 pb).

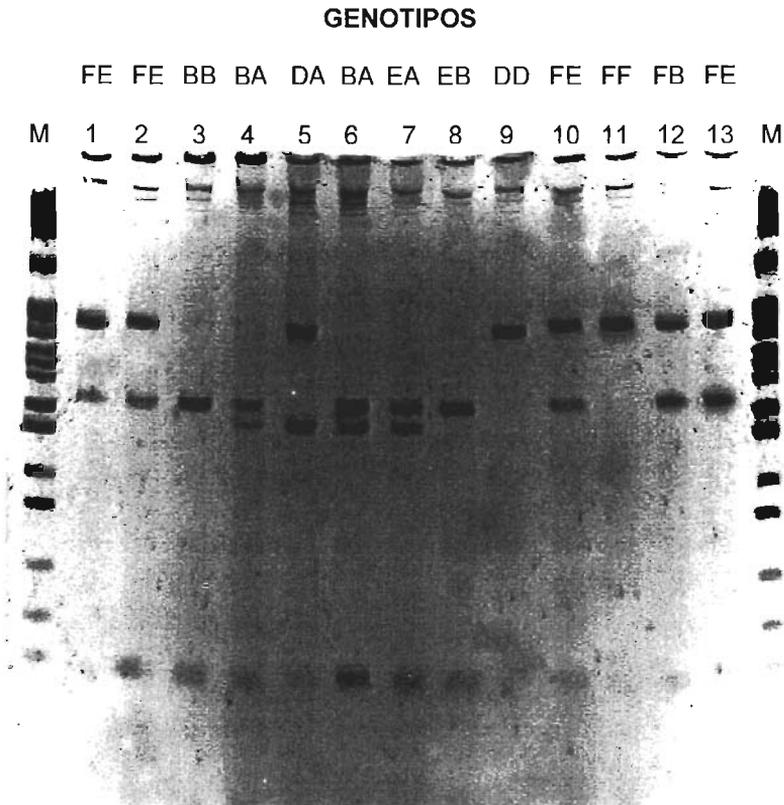


Figura 3. Productos de digestión obtenidos con la enzima *Pdmnl* del segmento amplificado del exón 9 del gen de la caseína *cs1*. Las muestras fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 8%. M corresponde al marcador de peso molecular pBR322/*MspI*. Las muestras de los carriles 1, 2, 10 y 13 corresponde al genotipo FE (fragmentos de 223, 161 y 63 pb); la muestra del carril 3 corresponde al genotipo BB (fragmentos de 161 y 63 pb); las muestras de los carriles 4 y 6 corresponden al genotipo BA (fragmentos de 161, 150 y 63 pb); la muestra del carril 5 corresponde al genotipo DA (fragmentos de 212, 150 y 63 pb); la muestra del carril 7 corresponde al genotipo EA (fragmentos de 161, 150 y 63 pb); la muestra del carril 8 corresponde al genotipo EB (fragmentos de 161 y 63 pb); la muestra del carril 9 corresponde al genotipo DD (fragmento de 212 pb); la muestra 11 corresponde al genotipo FF (fragmento de 223 pb) y la muestra del carril 12 corresponde al genotipo FB (fragmentos de 223, 161 y 63 pb).

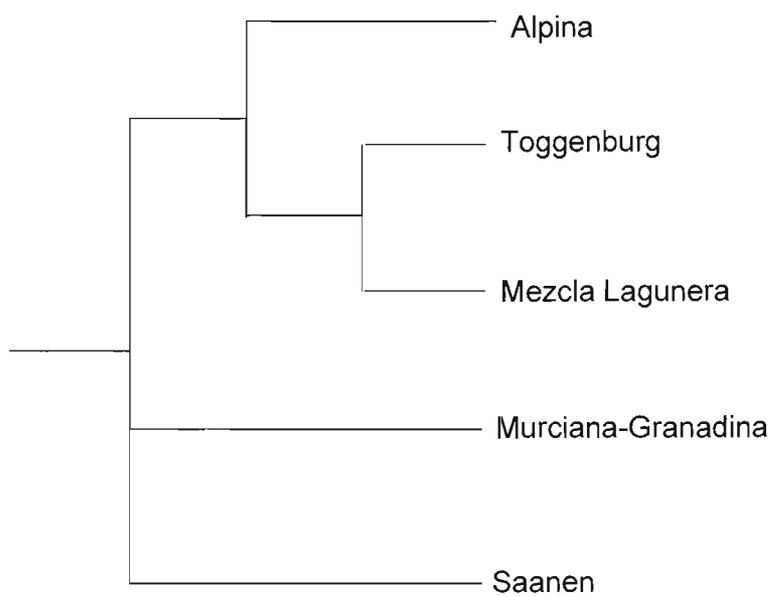


Figura 4. Dendrograma que resume las diferencias génicas entre los grupos caprinos.

ANEXOS.

I. Número de animales muestreados por rebaño y por grupo genético.

Rancho	Saanen	Alpina	Toggenburg	Mezcla Lagunera	Tipo Murciana- Granadina
Concepción	21	-	-	-	-
San Miguel	11	-	-	-	-
Los Piolines	7	-	-	-	-
San Pablo	14	-	-	-	-
La Chompitas	12	7	3	-	-
Matega	14	57	49	-	-
Puente Colorado	10	3	38	-	-
Santa Elena	8	14	2	-	-
Torreón	-	-	-	30	-
El Peñón	-	-	-	-	26
Total	97	81	92	30	26

II. Purificación de ADN por el método de Miller²⁹ (modificado por el Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM).

Tomar 1 ml de sangre en un tubo eppendorf de 2 ml. Lavarla dos veces con un volumen de agua dd estéril fría (utilizando el vortex cada vez) y centrifugado a 12,000 rpm/12 minutos/4°C. Decantar y resuspender la pastilla en 0.5 ml de solución de lisis, complementada con RNAsa (15 ug/ml final). Incubar 37°C durante 1 hora. Adicionar 50 µg/ml de proteinasa K, incubar 2 hrs. a 55°C y 1 hr. a 60°C. (O bien a 50°C. toda la noche). Agregar NaCl a una concentración final 2 M, mezclar durante 15 segundos. Centrifugar a 12,000 rpm/10 minutos.

Recuperar el sobrenadante y precipitar con un volumen de isopropanol, incubar 1 hora a -20°C. Centrifugar 12,000 rpm/10 minutos/4°C. y decantar. Lavar la pastilla con etanol al 70% (500µl), centrifugando a 5 minutos durante 10,000 rpm.

Decantar y eliminar los residuos de etanol por centrifugación al vacío. Resuspender la pastilla de DNA en H₂O di destilada estéril (aproximadamente 200 µl), cuantificar. Se verificó su calidad por electroforesis en gel de agarosa al 1% preparados con buffer TBE 1x (90 mM Tris-Ac. Bórico/2 mM EDTA pH 8.0), sometidos a una corriente eléctrica de 86 volts durante 60 minutos, mediante una cámara de electroforesis horizontal (utilizando como buffer de corrida TBE 1X); empleando 200 ng de ADN de Lambda digerido con la enzima *BstEII* como marcador de peso molecular. Al terminar la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (5 µg/ml). La valoración de la integridad del ADN se realizó, observando la fluorescencia de las bandas en un transiluminador con luz ultravioleta.

III. Reacción en cadena de la polimerasa.

Se emplearon 100 ng de ADN de cada muestra. Cada reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 μ l (exón 19) y 30 μ l (exón 9), constituidos por: Amortiguador para PCR (1.5 mM $MgCl_2$ para el exón 19 y en el caso del exón 9 se utilizó a 2 mM $MgCl_2$; 10 mM Tris-HCl pH 8.4; 50 mM KCl; 10 μ l/ml gelatina).

Deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 0.2 mM.

Iniciadores delanteros y de reversa 0.5 μ M (0.8 μ M exón 9).

BSA 0.15 μ g/ml.

Tritón 0.1% (y Tritón 0.2 % para el exón 9).

Taq ADN Polimerasa 1 u (Amplificasa[®] BIOGÉNICA).

Las condiciones de amplificación en el termociclador para realizar este método fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial de un ciclo a 94°C, durante 3 minutos; desnaturalización a 94°C, 30 segundos, alineación a 59°C (alineación a 66°C en caso del exón 9), 30 segundos y extensión a 72°C, 30 segundos, repetidas en 30 ciclos. Y con una extensión final de 72°C, durante 3 minutos en un ciclo.

Las reacciones se realizaron en termocicladores Techne mod. FTGENE2D y HYBAID Omn-E mod. HBTRE02HL110.

ID Lab	ID	RAZA	Bandas	EX-19	Referencia	Bandas	EXON 9	Referencias
CA-001	JE1 ♂	Saenen	662- 205 -520	E?	2306ALEB	161-223	EF	DIG1-24A
CA-002	JE3 ♂	Saenen	662- 205 -520	E?	0207MA	161-223	EF	DIG1-24A
CA-003	EM1084 ♂	Saenen	662-520	EE	2306ALEB	161-223	EE	DIG1-24A
CA-004	L109 ♂	Saenen	662	EE	2306ALEB	161-223	EE	DIG1-24A
CA-005	S/N ♂	Saenen	662	EE	2306ALEB	212-150	EE	DIG1-24A
CA-006	ELIXIR ♂	Saenen	205	??	170504A	223-161	FB	DIG1-24A
CA-007	10	Saenen	205	??	170504A	212	DD	DIG1-24A
CA-008	13	Saenen	205	??	170504A	212-161	DB	DIG1-24A
CA-009	57	Saenen	205	??	170504A	223-161	FB	DIG1-24A
CA-010	61	Saenen	662-205	E?	2306ALEB	223-161	FE	DIG1-24A
CA-011	66	Saenen	662-205-520	E?	2306ALEB	223-161	FE	DIG1-24A
CA-012	77	Saenen	205	??	170504A	223-161	FB	DIG1-24A
CA-013	79	Saenen	205	??	2306ALEB	212	DD	DIG1-24A
CA-014	80	Saenen	205	??	170504A	223-161-63	FB	DIG1-24B
CA-015	81	Saenen	205	??	170504A	223-161-63	FB	DIG1-24B
CA-016	85	Saenen	205	??	170504A	223-161-63	FB	DIG1-24B
CA-017	86	Saenen	205	??	170504B	212-150-63	DA	DIG1-24B
CA-018	86	Saenen	205	??	170504B	223-161-63	FB	DIG1-24B
CA-019	87	Saenen	205	??	170504B	223-161	FB	16D19-31
CA-020	88	Saenen	205	??	170504B	223-161	FB	16D19-31
CA-021	90	Saenen	205	??	170504B	223-161	FB	16D19-31
CA-022	93	Saenen	205	??	170504B	223-161	FB	16D19-31
CA-023	94	Saenen	205	??	180504A	223	FF	16D19-31
CA-024	96	Saenen	205	??	180504A	223-150-290	FA	16D19-31
CA-025	107	Saenen	662-620	EE	180504A	223-161	EE	16D19-31
CA-026	108	Saenen	662-205-620	E?	180504A	223-161	FE	16D19-31
CA-027	919	Saenen	662-205-620	E?	180504A	223-161	FE	16D19-31
CA-028	209	Saenen	662-205-620	EE	180504A	223-161	EE	16D19-31
CA-029	307	Saenen	662-205-620	EE	180504A	223-161	EE	16D19-31
CA-030	308	Saenen	205	??	180504A	212-161	DB	16D19-31
CA-031	309	Saenen	662-205-620	E?	180504A	212-161	DE	16D19-31

ID Lab	ID	RAZA	Bandas	EX-19	Referencia	Bandas	EXON 9	Referencias
CA-032	311	Saanen	662	EE	180504A	223-161-63	EE	16D32-38
CA-033	314	Saanen	662-205	E?	180504A	223-161-63	FE	16D32-38
CA-034	319	Saanen	662-205	E?	180504A	223-161-63	FE	16D32-38
CA-035	322	Saanen	205	??	180504A	223	FF	16D32-38
CA-036	323	Saanen	662-205	E?	180504A	212-161-63	ED	16D32-38
CA-037	325	Saanen	662-205	E?	180504A	212-161-63	ED	16D32-38
CA-038	62	Saanen	662-205	E?	180504A	223-161-63	EF	16D32-38
CA-039	69	Saanen	662	EE	2106ALEA	223-161-63	EE	7DIG
CA-040	84	Saanen	662-205	E?	180504A	223-161	EF	18D74-81
CA-049	1014	Saanen	662-205	E?	2306ALEB	223-161	FE	18D49-62
CA-051	2000	Saanen	662	EE	180504B	161	EE	18D49-62
CA-052	2011	Saanen	662-205	EE	180504B	223-161	EE	18D49-62
CA-053	2021	Saanen	662	EE	180504B	223-161	EE	18D49-62
CA-054	210	Saanen	662-205	EE	180504B	223-161	EE	18D49-62
CA-056	362	Saanen	205	??	180504B	223	FF	18D49-62
CA-057	369	Saanen	205-500-525	??	2306ALEB	161	BB	18D49-62
CA-058	378	Saanen	205	??	180504B	223-150-290	FA	18D49-62
CA-059	395	Saanen	662-205	E?	180504B	161	EB	18D49-62
CA-060	400	Saanen	662-205	E?	180504B	223-161-63	EF	18D49-62
CA-061	409	Saanen	662	EE	2106ALEA	223-161	EE	7DIGC
CA-062	444	Saanen	662-205	E?	180504B	161-63	EB	18D49-62
CA-064	18	Saanen	662	EE	PERDIDO	223-161	EE	18D63-73
CA-065	30	Saanen	662-205	E?	PERDIDO	223-161-63	EF	18D63-73
CA-066	43	Saanen	205	??	PERDIDO	223	FF	18D63-73
CA-067	59	Saanen	205	??	PERDIDO	223-161	FB	18D63-73
CA-068	85	Saanen	662-205	E?	PERDIDO	223-161	EF	18D63-73
CA-069	86	Saanen	662-205	E?	PERDIDO	223-161	EF	18D63-73
CA-070	125	Saanen	205	??	PERDIDO	223-161	FB	18D63-73
CA-071	133	Saanen	662-205	E?	PERDIDO	223-161	EF	18D63-73
CA-072	158	Saanen	662-205	E?	PERDIDO	161-150-63	EA	18D63-73
CA-073	162	Saanen	662-205	E?	PERDIDO	223-161	EF	18D63-73

ID Lab	ID	RAZA	Bandas	EX-19	Referencia	Bandas	EXON 9	Referencias
CA-074	161	Saanen	662-205	E?	PERDIDO	223-161-125	EF	18D74-81
CA-075	397	Saanen	662	EE	PERDIDO	161	EE	18D74-81
CA-076	509	Saanen	662-205	E?	PERDIDO	223-161-63	EF	18D74-81
CA-077	526	Saanen	662	EE	PERDIDO	223	EE	18D74-81
CA-078	609	Saanen	205	??	PERDIDO	223	FF	18D74-81
CA-079	617	Saanen	662	EE	PERDIDO	223	EE	18D74-81
CA-080	913	Saanen	662-205	E?	PERDIDO	223	EF	18D74-81
CA-081	915	Saanen	662-205	E?	PERDIDO	223-161	EF	18D74-81
CA-082	917	Saanen	662-205-500	E?	0207MA	223-161	EF	23D82-94
CA-083	918	Saanen	662	EE	190504B	161	EE	23D82-94
CA-084	925	Saanen	205	??	190504B	223-212-290	FD	23D82-94
CA-085	928	Saanen	662-205	E?	190504B	223-161	EF	23D82-94
CA-086	1003	Saanen	205	??	190504B	223	FF	23D82-94
CA-087	1332	Saanen	662	EE	190504B	161	EE	23D82-94
CA-088	2233	Saanen	662-205	E?	190504B	223-161	EF	23D82-94
CA-089	39874	Saanen	205	??	190504B	223	FF	23D82-94
CA-090	002	Saanen	662-205	E?	190504B	223-161	EF	23D82-94
CA-091	0108	Saanen	662-205	E?	190504B	223-161	EF	23D82-94
CA-093	0192 P	Saanen	662	EE	190504B	161	EE	23D82-94
CA-094	0195 P	Saanen	662-205	E?	190504B	223-161	EF	23D82-94
CA-095	0424	Saanen	662	EE	190504B	161-150	EA	23D95-99
CA-096	P2 P	Saanen	205	??	190504B	223	FF	23D95-99
CA-097	944	Saanen	662-205	E?	190504B	223-161	EF	23D95-99
CA-098	1302	Saanen	205	??	190504B	223	FF	23D95-99
CA-099	1313	Saanen	205	??	190504B	223	FF	23D95-99
CA-100	1330	Saanen	662-205	E?	190504B	223-161	EF	23D95-99
CA-101	1334	Saanen	205	??	190504B	212	DD	115-126
CA-102	1335	Saanen	205	??	190504B	223-150	FA	D102-114
CA-103	2018	Saanen	205	??	190504AC	223-161	FB	D102-114
CA-104	2020	Saanen	205	??	190504AC	223-212	FD	D102-114
CA-105	2021	Saanen	205	??	190504AC	223-161	FB	D102-114

ID Lab	ID	RAZA	Bandas	EX-19	Referencia	Bandas	EXON 9	Referencias
CA-106	2022	Saanen	662	EE	190504AC	223-161	EE	D102-114
CA-107	2071	Saanen	662-205	E?	190504AC	223-161	EF	D102-114
CA-108	0309	Saanen	662-205	E?	190504AC	223-161	EF	D102-114
CA-109	0310	Saanen	662-205	E?	190504AC	223-161	EF	D102-114
CA-111	FERRARRI	Alpina	662-205	E?	190504AC	223-161	EF	D102-114
CA-112	3	Alpina	205	??	190504AC	212-150	DA	D102-114
CA-114	17	Alpina	662-205	E?	0207MA	212-161	ED	D102-114
CA-115	23	Alpina	205	??	190504AC	223-161	BF	115-126
CA-116	66	Alpina	205	??	190504AC	212-150	DA	115-126
CA-117	300	Alpina	662-205	E?	190504AC	212-161	ED	115-126
CA-118	301	Alpina	205	??	190504AC	212	DD	115-126
CA-119	303	Alpina	205	??	190504AC	212-161	DB	115-126
CA-120	260	Alpina	662-205-650	E?	190504AC	212-161	ED	115-126
CA-121	261	Alpina	205	??	190504AC	212-161	DB	115-126
CA-122	354	Alpina	662-205	E?	190504AC	212-161	DE	115-126
CA-123	36	Alpina	662-205	E?	190504AC	212-161	DE	115-126
CA-124	2028	Alpina	662-205	E?	190504AC	212-161	DE	115-126
CA-125	2090	Alpina	205	??	190504AC	223	FF	115-126
CA-126	2254	Alpina	662-205	E?	190504D	223-161	FE	115-126
CA-127	10746	Alpina	662-205	E?	190504D	223-161	FE	127-135
CA-128	0137	Alpina	662-205	E?	190504D	223-161	FE	127-135
CA-129	0145	Alpina	662-205	E?	190504D	223-161	FE	127-135
CA-130	0147	Alpina	662-205	E?	190504D	223-161	FE	127-135
CA-131	0173	Alpina	205	??	190504D	223-150-290	FA	127-135
CA-132	0178	Alpina	205	??	190504D	223-150	FA	127-135
CA-133	0188	Alpina	205	??	190504D	223-150-290	FA	127-135
CA-134	0244	Alpina	205	??	190504D	223	FF	127-135
CA-135	07	Alpina	205	??	190504D	223	FF	127-135
CA-136	K-50	Alpina	662-205	E?	190504D	223-161	EF	136-149
CA-138	95	Alpina	205	??	190504D	150	AA	136-149

ID Lab	ID	RAZA	Bandas	EX-19	Referencia	Bandas	EXON 9	Referencias
CA-139	96	Alpina	205	??	190504D	161-150	BA	136-149
CA-140	600	Alpina	205	??	190504D	223-212-290	FD	136-149
CA-141	663	Alpina	205	??	190504D	223	FF	136-149
CA-142	665	Alpina	205	??	190504D	223	FF	136-149
CA-143	707	Alpina	205	??	190504D	223-150-290	FA	136-149
CA-144	708	Alpina	205	??	190504D	223-150-290	FA	136-149
CA-145	710	Alpina	205	??	190504D	161-150	BA	136-149
CA-146	773	Alpina	205	??	270504A	223-150-290	FA	136-149
CA-147	814	Alpina	662-205	E?	270504A	223-161	EB	136-149
CA-148	816	Alpina	662-205	E?	270504A	223-161	EB	136-149
CA-149	830	Alpina	205	??	270504A	223	FF	136-149
CA-150	888	Alpina	662-205	E?	270504A	223-161-63	EF	150-162
CA-151	889	Alpina	662-205	E?	270504A	223-161-63	EF	150-162
CA-152	909	Alpina	205	??	270504A	161	BB	150-162
CA-153	915	Alpina	205	??	270504A	161-150	BA	150-162
CA-154	983	Alpina	205	??	270504A	212-150-290	DA	150-162
CA-155	983	Alpina	205	??	270504A	161-150	BA	150-162
CA-156	985	Alpina	662-205	E?	270504A	161-150	EA	150-162
CA-157	1032	Alpina	662-205	E?	270504A	212-161	EB	150-162
CA-158	1136	Alpina	205	??	270504A	212	DD	150-162
CA-159	1152	Alpina	662-205	E?	270504A	223-161	FE	150-162
CA-160	1153	Alpina	205	??	270504A	223	FF	150-162
CA-161	1154	Alpiña	205	??	270504A	223-161	FB	150-162
CA-162	1155	Alpina	662-205	E?	270504A	223-161	EF	150-162
CA-163	1157	Alpina	205	??	270504A	223	FF	163-175
CA-164	1158	Alpina	205	??	270504A	212	DD	163-175
CA-165	1159	Alpina	205	??	270504B	223-161	FB	165-178
CA-166	1160	Alpina	205	??	21061ALEA	212	DD	165-178
CA-167	1161	Alpina	205	??	270504B	212	DD	165-178
CA-168	1261	Alpina	205	??	270504B	223-161	FB	165-178
CA-169	1300	Alpina	205	??	270504B	161	BB	165-178

ID Lab	ID	RAZA	Bandas	EX-19	Referencia	Bandas	EXON 9	Referencias
CA-170	1309	Alpina	662-205	E?	270504B	223-161	FE	165-178
CA-171	1310	Alpina	662-205	E?	270504B	161	EB	165-178
CA-172	1312	Alpina	662	EE	270504B	161-150	EA	165-178
CA-174	1315	Alpina	662-205	E?	270504B	161	EB	165-178
CA-175	1318	Alpina	662	EE	270504B	161	EE	165-178
CA-176	1324	Alpina	662	EE	270504B		EE	PERDIDO
CA-177	2002	Alpina	662-205	E?	270504B	161-150	EA	165-178
CA-178	2004	Alpina	205	??	270504B	223-150	FA	165-178
CA-179	2006	Alpina	662	EE	270504B	161-63	EE	179-189
CA-180	2011	Alpina	205	??	270504B	150-63	AA	179-189
CA-181	2012	Alpina	205	??	270504B	212-161-290	BD	179-189
CA-182	2014	Alpina	205	??	270504B	223-150-290	FA	179-189
CA-183	2016	Alpina	205	??	270504B	223-150-290	FA	179-189
CA-184	2059	Alpina	205	??	270504B	223-161	BF	179-189
CA-185	2081	Alpina	662-205	E?	270504B	161-150	EA	179-189
CA-186	2082	Alpina	662-205	E?	270504B	161-150	EA	179-189
CA-187	2083	Alpina	205	??	270504A	161-150	BA	179-189
CA-188	2084	Alpina	662-205	E?	270504A	161	EB	179-189
CA-189	2085	Alpina	662-205	E?	270504A	223-161	EF	179-189
CA-190	2086	Alpina	662-205	E?	270504A	161-150	EA	190-201
CA-191	2110	Alpina	205	??	270504A	223-150	FA	190-201
CA-192	2128	Alpina	662	EE	270504A	161	EE	190-201
CA-193	9820	Alpina	205	??	270504A	212-150	DA	190-201
CA-195	0325	Alpina	205	??	270504A	212-150	DA	190-201
CA-196	JAY	Toggenburg	205	??	270504A	212-150	DA	190-201
CA-197	ROSSEMARY	Toggenburg	205	??	270504A	212	DD	190-201
CA-198	214	Toggenburg	205	??	270504A	212-150	DA	190-201
CA-199	305	Toggenburg	662-205	E?	270504A	212-161	ED	190-201
CA-201	355	Toggenburg	662-205	E?	270504A	212-161	DE	190-201
CA-202	490	Toggenburg	205	??	270504A	223-161	FB	202-214

ID Lab	ID	RAZA	Bandas	EX-19	Referencia	Bandas	EXON 9	Referencias
CA-203	617	Toggenburg	205	??	270504A	223	FF	202-214
CA-204	618	Toggenburg	205	??	270504A	150	AA	202-214
CA-205	619	Toggenburg	205	??	270504A	223-150	FA	202-214
CA-206	628	Toggenburg	205	??	270504A	223-161	FB	202-214
CA-207	634	Toggenburg	205	??	270504B	223-212	FD	202-214
CA-208	679	Toggenburg	662-205	E?	270504B	161-150	EA	202-214
CA-209	682	Toggenburg	205	??	270504B	161-150	BA	202-214
CA-210	689	Toggenburg	205	??	270504B	223-150	FA	202-214
CA-211	729	Toggenburg	205	??	270504B	223-212	FD	202-214
CA-212	906	Toggenburg	662-205	E?	270504B	161	EB	202-214
CA-213	936	Toggenburg	205	??	270504B	161-150	BA	202-214
CA-214	970	Toggenburg	662-205	E?	270504B	161-150	EA	202-214
CA-215	971	Toggenburg	662-205	E?	270504B	223-161	EF	215-226
CA-216	972	Toggenburg	662	EE	270504B	161-150	EA	215-226
CA-217	973	Toggenburg	662-205	E?	270504B	212-161	ED	215-226
CA-218	975	Toggenburg	662-205	E?	270504B	212-161	ED	215-226
CA-219	979	Toggenburg	662-205	E?	270504B	161	EB	215-226
CA-220	982	Toggenburg	662-205	E?	270504B	161-150-290	EA	215-226
CA-221	983	Toggenburg	205	??	PERDIDO	161-150	BA	215-226
CA-222	1124	Toggenburg	205	??	PERDIDO	212	DD	215-226
CA-223	1126	Toggenburg	205	??	PERDIDO	212-161	DB	215-226
CA-224	1127	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223-212	DF	215-226
CA-225	1129	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223-150	FA	215-226
CA-226	1132	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223-161	FB	215-226
CA-227	1133	Toggenburg	205	??	2106ALEA	223-161	FB	227-239
CA-228	1134	Toggenburg	205	??	0707ALEP	223-161	FB	227-239
CA-229	1135	Toggenburg	205	??	PERDIDO	212-150	DA	227-239
CA-230	2024	Toggenburg	205	??	0707ALEP	223-161	BF	227-239
CA-231	2029	Toggenburg	662-205	E?	21061ALEA	223-161	EF	227-239
CA-232	2037	Toggenburg	205	??	PERDIDO	212-161	DB	227-239
CA-233	2038	Toggenburg	205	??	PERDIDO	212-161	DB	227-239

ID Lab	ID	RAZA	Bandas	EX-19	Referencia	Bandas	EXON 9	Referencias
CA-234	2039	Toggenburg	662	EE	PERDIDO	161-150	EE	227-239
CA-235	2050	Toggenburg	662-205	E?	PERDIDO	223-161	EF	227-239
CA-236	2052	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223	FF	227-239
CA-237	2054	Toggenburg	205	??	PERDIDO	161-150	BA	227-239
CA-238	2055	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223-161	FB	227-239
CA-239	2056	Toggenburg	662	EE	21061ALEA	223-161	EE	227-239
CA-240	2058	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223-161	FB	240-251
CA-241	2059	Toggenburg	205	??	PERDIDO	212-150	DA	240-251
CA-242	2061	Toggenburg	205	??	PERDIDO	212-150	DA	240-251
CA-244	2063	Toggenburg	205	??	PERDIDO	212-150	DA	240-251
CA-245	0301	Toggenburg	662-205	E?	2106ALEA	223-161	EF	240-251
CA-246	0303	Toggenburg	205	??	2106ALEA	212-150	DA	240-251
CA-247	0304	Toggenburg	205	??	PERDIDO	212-150	DA	240-251
CA-248	0305	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223	FF	240-251
CA-249	0306	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223-161	FB	240-251
CA-250	685	Toggenburg	205	??	2106ALEA	212-150	DA	240-251
CA-251	97	Toggenburg	205	??	2106ALEA	223	FF	240-251
CA-252	98	Toggenburg	662	EE	PERDIDO		EE	PERDIDO
CA-253	99	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223-150	FA	252-263
CA-254	120	Toggenburg	205-240	??	2206ALED	212	DD	252-263
CA-255	121	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223-161	FB	252-263
CA-256	122	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223-212	FD	252-263
CA-257	123	Toggenburg	205	??	2106ALEB	223-161	FB	252-263
CA-258	124	Toggenburg	205-240	??	2206ALED	223-161	FB	252-263
CA-259	125	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223-161	FB	252-263
CA-261	201	Toggenburg	205	??	PERDIDO	161	BB	252-263
CA-262	202	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223-161	FB	252-263
CA-263	203	Toggenburg	205-240	??	2306ALEA	223	FF	252-263
CA-264	204	Toggenburg	662-205-240	E?	2306ALEA	212-161	ED	264-273
CA-265	206	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223-161	FB	264-273
CA-266	244	Toggenburg	205	??	2106ALEB	223	FF	264-273

ID Lab	ID	RAZA	Bandas	EX-19	Referencia	Bandas	EXON 9	Referencias
CA-267	267	Toggenburg	205	??	2106ALEC	223-161	FB	264-273
CA-268	270	Toggenburg	205	??	2106ALEB	223	FF	264-273
CA-269	271	Toggenburg	662-240	E?	2106ALEB	223-161	EF	264-273
CA-270	343	Toggenburg	662-240	E?	2106ALEB	212-161	ED	264-273
CA-271	344	Toggenburg	205-240-500	??	PERDIDO	223-161	FB	264-273
CA-272	351	Toggenburg	205	??	2106ALEC	212-161	DB	264-273
CA-273	353	Toggenburg	205	??	2106ALEB	161-150	BA	264-273
CA-274	355	Toggenburg	205	??	2106ALEB	223-161	BF	274-286
CA-275	403	Toggenburg	205	??	2106ALEB	161-150	BA	274-286
CA-276	420	Toggenburg	205	??	2106ALEB	161-150	BA	274-286
CA-277	423	Toggenburg	205	??	2106ALEB	212-161	BD	274-286
CA-278	424	Toggenburg	205	??	2106ALEB	212-161	DB	274-286
CA-279	437	Toggenburg	205	??	PERDIDO	223	FF	274-286
CA-280	438	Toggenburg	662	EE	2106ALEB	161	EE	274-286
CA-281	811	Toggenburg	205	??	2106ALEC	223-161	FB	274-286
CA-282	489 P	Toggenburg	205	??	2106ALEB	223-212	FD	274-286
CA-283	502 P	Toggenburg	205	??	2106ALEB	223	FF	274-286
CA-284	525 P	Toggenburg	205	??	2106ALEB	223	FF	274-286
CA-285	K48	Toggenburg	205	??	2106ALEB	223-161	FB	274-286
CA-286	K63	Toggenburg	205	??	2106ALEB	223-161	FB	274-286
CA-287	M33	Toggenburg	205	??	2106ALEB	223	FF	287-300
CA-288	M54	Toggenburg	205-240-500	??	2206ALED	223-161	FB	287-300
CA-290	10753	Toggenburg	662-205-500	E?	2206ALED	223-161	EF	287-300
CA-291	10732	Toggenburg	662-205-500	E?	2206ALED	212-161	ED	287-300
CA-292	S/ID	T. Murcia-Granad	662	EE	2206ALED	212-161	EE	287-300
CA-293	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205	E?	2206ALED	223-161	EF	287-300
CA-294	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205-500	E?	2206ALED	161-150	EA	287-300
CA-295	S/ID	T. Murcia-Granad	205-240	??	2206ALED	161-150	BA	287-300
CA-296	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205-500	E?	2206ALED	223-161	EF	287-300
CA-297	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205-500	E?	2206ALED	161-150	EA	287-300

ID Lab	ID	RAZA	Bandas	EX-19	Referencia	Bandas	EXON 9	Referencias
CA-298	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205-500	E?	2206ALED	223-161	EB	287-300
CA-299	S/ID	T. Murcia-Granad	662-500	EE	2206ALED	161	EE	287-300
CA-300	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205-500	E?	2206ALED	223-161	EF	287-300
CA-301	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205-500	E?	2206ALED	223-161-150	EA	301-311
CA-302	S/ID	T. Murcia-Granad	205-240	??	2206ALED	223-161-150	BA	301-311
CA-303	S/ID	T. Murcia-Granad	205-240	??	2206ALED	223-161-150	BA	301-311
CA-304	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205	E?	2206ALEB	212-161	ED	301-311
CA-305	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205	E?	2206ALEB	161	EB	301-311
CA-306	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205	E?	2206ALEB	223-161-150	EA	301-311
CA-307	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205	E?	2206ALEB	223-161	EF	301-311
CA-308	S/ID	T. Murcia-Granad	205	??	2206ALEB	212-150	DA	301-311
CA-309	S/ID	T. Murcia-Granad	205	??	2206ALEB	223-150	FA	301-311
CA-310	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205	E?	2206ALEB	223-161-150	EA	301-311
CA-311	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205	E?	2206ALEB	223-161-150	EA	301-311
CA-312	S/ID	T. Murcia-Granad	205	??	2206ALEB	223-161-150	BA	312-321
CA-313	S/ID	T. Murcia-Granad	662	EE	2206ALEB	223-161	EE	312-321
CA-314	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205	E?	2206ALEB	223-161-150	EA	312-321
CA-315	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205	E?	2206ALEB	223-161	EB	312-321
CA-316	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205	E?	2206ALEB	212-161	ED	312-321
CA-317	S/ID	T. Murcia-Granad	662-205-500	E?	2206ALEB	223-161	EF	312-321
CA-318	132	Mezcla Lagunera	205	??	2206ALEB	161-150	BA	312-321
CA-319	165	Mezcla Lagunera	205	??	2206ALEB	161-150	BA	312-321
CA-320	300	Mezcla Lagunera	205	??	2206ALEB	223-161	FB	312-321
CA-321	304	Mezcla Lagunera	205	??	2206ALEB	223-150	FA	312-321
CA-322	320	Mezcla Lagunera	205	??	2206ALEB	223-161-150	BA	322-333
CA-323	1	Mezcla Lagunera	205	??	2206ALEB	223-161-150	BA	322-333
CA-324	2	Mezcla Lagunera	205-500-240	??	2306ALEA	223-161-150	BA	322-333
CA-325	3	Mezcla Lagunera	205 - 500	??	2306ALEA	223-161-150	BA	322-333
CA-326	4	Mezcla Lagunera	205-500-240	??	2306ALEA	290-212-161	BD	322-333
CA-327	6	Mezcla Lagunera	205-500-240	??	2306ALEA	223-161	FB	322-333

ID Lab	ID	RAZA	Bandas	EX-19	Referencia	Bandas	EXON 9	Referencias
CA-328	225	Mezcla Lagunera	205	??	PERDIDO	223-161	FB	322-333
CA-329	227	Mezcla Lagunera	662-205-500	E?	2306ALEA	223-161	EB	322-333
CA-330	228	Mezcla Lagunera	205 -240	??	2306ALEA	290-223-212	FD	322-333
CA-331	229	Mezcla Lagunera	662-205-500	E?	2306ALEA	223-161	EF	322-333
CA-332	231	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEA	212-150	DA	322-333
CA-333	232	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEA	212-161	DB	322-333
CA-334	233	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEA	290-212-161	BD	334-336
CA-335	234	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEA	223-161-150	BA	334-336
CA-336	235	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEA	223-161	FB	334-336
CA-337	236	Mezcla Lagunera	662-205-500	E?	2306ALEA	223-212-161	ED	334-336
CA-338	237	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEA	223	FF	334-336
CA-339	239	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEA	212	DD	334-336
CA-340	241	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEB	223-161	FB	334-336
CA-341	243	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEB	212-161	DB	334-336
CA-342	244	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEB	161-150	BA	334-336
CA-343	245	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEB	223-161	BF	334-336
CA-344	246	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEB	212-150	DA	334-336
CA-345	247	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEB	223-161	FB	334-336
CA-346	248	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEB	223	FF	334-336
CA-347	S/A corral 2	Mezcla Lagunera	205-240-500	??	2306ALEB	212-161	BD	347