

ANÁLISIS DE LINAJES MATERNOS Y PATERNOS DE BOVINOS CRIOLLO DEL CENTRO DE ECOLOGÍA APLICADA SIMÓN I. PATIÑO - BOLIVIA

Pereira J.A.C.^{1*}, Giovambattista G.², Peña S.³, Lirón J.P.²,
Loza A.J.¹, Posik D.², Baudoin M.³, Bomblat C.³

¹Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Facultad de Ciencias Veterinarias, Bolivia.

*antonios8@hotmail.com.

²IGEVET (CONICET La Plata), Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias, Argentina

³Centro de Ecología Aplicada Simón I. Patiño, Bolivia

RESUMEN

Se determinaron los linajes maternos y paternos de 33 bovinos Criollo (27 hembras y 6 machos) del Centro de Ecología Aplicada Simón I. Patiño (Ceasip) mediante marcadores genéticos del ADN genómico, mitocondrial y del cromosoma Y. El ADN genómico se extrajo utilizando el kit Wizard[®] Genomic Purification. Los linajes maternos se determinaron mediante secuenciación del ADN mitocondrial (región control D-loop) y los linajes paternos se determinaron analizando siete marcadores genéticos del cromosoma Y, dos SNP (Polimorfismo de Nucleótido Simple) y cinco microsatélites (Secuencias Repetidas en Tándem). La diversidad genética se estimó tipificando 18 microsatélites. Se analizaron los datos con MStools, GenePop y Arlequin. La secuenciación de D-loop mitocondrial permitió detectar seis linajes maternos, que incluían cuatro haplotipos mitocondriales de origen europeo y dos africanos. A través del análisis de los marcadores del cromosoma Y se determinaron tres linajes paternos, dos taurinos y uno cebuino. En el hato del Ceasip, la diversidad alélica (n_a) fue de 6.11, mientras que la heterocigosidad esperada (H_e) fue de 0.70 y la observada (H_o) fue de 0.68. Los valores de diversidad genética observada en los bovinos del Ceasip son similares a los estimados para la mayoría de los biotipos del Criollo boliviano (n_a Yacumeño= 6.82; n_a Saavedreño= 5.95), siendo los valores promedios para el ganado Criollo boliviano analizados anteriormente de n_a = 6.39, H_e = 0.72 y H_o = 0.65. Los análisis de Componentes Principales y de distancia genética mostraron que sería factible intercambiar material genético entre las poblaciones Criollo bolivianas sin pérdida significativa de su diversidad genética.

Palabras clave: Genética de conservación; Bovino nativos; Diversidad genética; D-loop; Marcadores moleculares.

MATERNAL AND PATERNAL LINEAGE ANALYSIS IN CREOLE CATTLE FROM THE CENTER FOR APPLIED ECOLOGY SIMÓN I. PATIÑO - BOLIVIA

ABSTRACT

Paternal and maternal lineages of 33 Creole bovines (27 cows and 6 bulls) from the Center of Applied Ecology Simón I. Patiño (Ceasip) were determined by nuclear, mitochondrial, and Y chromosome DNA markers. DNA was extracted with the Wizard[®] Genomic Purification Kit. Maternal lineages were identified by mitochondrial DNA sequencing (D-loop region). Seven Y chromosome markers - two Simple Nucleotide Polymorphisms (SNPs) and five microsatellites (tandem repeat sequences) - were used to determine paternal lineages. Genetic diversity was estimated with 18 microsatellites markers. Data were analyzed with MStools, GenePop, and Arlequin software. Two European and two African mitochondrial haplotypes were identified in the maternal lineages. Two taurine and one cebuine paternal lineages were detected. Allelic diversity (n_a) was 6.11, expected heterozygosity (H_e) was 0.70, and observed heterozygosity (H_o) was 0.68. These values were similar to average values of Yacumeño and Saavedreño Creole ($n_a=6.39$, $H_e=0.72$, and $H_o=0.65$). Allelic diversity in Ceasip bovines ($n_a=6.11$) was also similar to Yacumeño Creole (6.82) and Saavedreño Creole (5.95) biotypes. Cluster and Principal Component analyses indicate that genetic material could be exchanged between populations without significant diversity loss.

Keywords: Conservation genetics; Native cattle; Gene diversity; D-loop; Molecular markers.

INTRODUCCIÓN

En 1493, Cristóbal Colón introdujo bovinos a las Américas. Según Wilkins, Martínez y Rojas (1983), los animales que llegaron a las Américas eran pocos, relativamente heterocigotos y probablemente ya contenían genes de origen africano y del cercano Oriente (Salazar y Cardozo, 1981). Luego, las extremas condiciones ambientales en las Américas resultaron en una selección natural de los bovinos (Alba y Cabrera, 1958). Hoy existen características, posiblemente únicas, de adaptación y resistencia a las condiciones tropicales (Mariane y Pavia, 2015) y el bovino Criollo es considerado un recurso zoogenético de alto valor.

La importancia del ganado Criollo en Bolivia ha sido documentada por varios autores (Wilkins, Rojas y Martínez 1989; Bauer *et al.*, 1992; Verde *et al.*, 1993; Rojas *et al.*, 1995). Conservar este recurso es importante porque, al usar la genética del Criollo en cruzamientos, posiblemente se puede responder a nuevas

exigencias de producción y productividad (Salazar y Cardozo, 1981) en un contexto de acelerados cambios climáticos (Nuñez-Domínguez *et al.*, 2015).

En 2007, el Centro de Ecología Aplicada Simón I. Patiño (Ceasip) fundó (16 hembras y 2 machos) un hato del ganado Criollo de conservación de doble propósito (leche y carne). La base genética fueron animales de la Estación Experimental El Salvador del Departamento de Chuquisaca (1 animal). Además, del Departamento de Santa Cruz, se seleccionaron animales de Las Colinas (3), Tatayti-Provincia Cordillera (1), la cabaña Alta Vista (1) y 12 animales descendientes del Centro de Investigación Agrícola Tropical (CIAT). Hasta mayo del 2015, de los 126 descendientes, 67 animales fueron registrados por AsoCriollo. En mayo 2015, el hato consistió de 89 animales, 25 terneros, 16 vaquillas, 33 vacas y 15 toretes/toros. El 36% de los animales tenía una edad <12 meses, 20% tenían 13-24 meses, 13% tenían 25-36 meses y 31% tenían >37 meses. Al nacer, los machos pesan en promedio 32.9 kg y las hembras 30.6 kg. Hasta los 24 meses, la ganancia promedio de peso es de 546 g•d⁻¹ en hembras y 670 g•d⁻¹ en machos. Las vaquillas paren en promedio a los 29 meses. El intervalo entre partos es de 369 d. En 2012 y 2013 se evaluaron 19 lactancias de diez vacas con una edad promedio de siete años. Las vacas fueron ordeñadas dos veces por día en ausencia de sus terneros. En promedio, las vacas produjeron 1 496 kg de leche durante 273 d (prom. 5.1 kg•d⁻¹; max= 17.8 kg•d⁻¹).

El objetivo del Ceasip es mantener una alta variabilidad genética. Por tanto, a partir del 2008, se eligieron pajuelas de seis toros del CIAT. Al contar con un número efectivo poblacional muy reducido (FAO, 1998), es necesario definir criterios de selección, basados en la estructura genética del hato para maximizar la variabilidad genética. Por tanto, se caracterizó genéticamente el hato para determinar la estructuración poblacional. Además, se estimó la diversidad genética para comparar el ganado del Ceasip con otros biotipos de ganado Criollo de los llanos orientales bolivianos. Finalmente, se determinaron los linajes maternos y paternos del hato.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal y extracción de ADN

Se tomaron 5 ml de sangre con anticoagulante de 33 bovinos Criollo (27 hembras y 6 machos) del Ceasip. Las muestras se conservaron a -20°C. Se escogieron animales lo menos emparentados posible. El ADN genómico se extrajo con el kit comercial Wizard[®] Genomic Purification (Promega, WI, USA).

Genotipificación de linajes maternos

Para determinar los linajes maternos, se analizó un fragmento de 240 bp de la región hipervariable I de la región control (D-loop) del ADN mitocondrial

(Posiciones 16.023-16.262) (Anderson, 1982). Se amplificó el fragmento mediante Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), utilizando los primers L15960 y H16334 (Troy *et al.*, 2001). Se secuenciaron los productos de la amplificación en un secuenciador MegaBACE 1000, con el kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare, USA).

Genotipificación de linajes paternos

Los linajes paternos de seis toros se determinaron mediante el análisis de siete marcadores genéticos del cromosoma Y, cinco microsatélites (Secuencias Repetidas en Tándem) y dos SNP (Polimorfismos de Nucleótido Simple). Se amplificaron cinco microsatélites (INRA189, BYM1, UMN307, UMN103 y BM861) mediante PCR-multiplex, utilizando los métodos de análisis de fragmento y pirosecuenciación de Ginja *et al.*, (2009, 2011). Los productos de la amplificación de los microsatélites se corrieron en un secuenciador MegaBACE. Los dos SNPs del cromosoma Y (UTY19 y ZFY10) se genotipificaron mediante pirosecuenciación.

Diversidad genética

La diversidad genética nuclear se estimó a través de la diversidad alélica (n_a), la heterocigosidad esperada (H_e o diversidad génica) y la heterocigosidad observada (H_o) (Nei, 1978). Se amplificaron 18 microsatélites autosómicos (BM1818, BM1824, BM2113, BRR, CSRM60, CSSM66, ETH3, ETH10, ETH225, HAUT27, HEL1, INRA023, RM067, SPS115, TGLA53, TGLA122, TGLA126 y TGLA227) de 29 hembras mediante PCR-multiplex, utilizando los primers previamente reportados (FAO, 2011). Los marcadores utilizados son parte de las lista de STRs recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG, www.isag.org.uk/) y la FAO (<http://www.fao.org/>).

Estructuración Poblacional

Para determinar las relaciones entre la población de Ceasip y otros biotipos de bovinos Criollo bolivianos, se construyó un dendrograma, basado en el algoritmo UPGMA, las distancias genéticas de D_s y D_a de Nei (Nei, 1987) y el análisis de componentes principales (PCA). En el análisis, se incluyeron otras razas taurinas europeas (Angus y Hereford) y cebuinas (Nelore, Brahman y Gir). Se aplicaron los programas Population (Langella, 2000) y Past (Hammer *et al.*, 2001).

Análisis estadísticos

Las secuencias del D-loop mitocondrial se alinearon con el algoritmo CLUSTAL-W *multiple alignment* (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). Las variaciones del D-loop se definieron por comparación directa con la secuencia mitocondrial de referencia europea T3 (accesión No V00654; Anderson *et al.*, 1982). La diversidad genética mitocondrial se calculó mediante los índices de diversidad nucleotídica y el número de diferencia tomada de a pares, utilizando el software Arlequin

(Schneider *et al.*, 1997). La variabilidad genética se determinó mediante la n_a (número total de alelos), H_o y H_e , utilizando el software GENEPOP (Rousset, 2008). Se determinó la relación entre los haplotipos mitocondriales mediante el software Network (Bandelt *et al.*, 1995). Mediante el algoritmo blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se compararon las secuencias del D-loop con las bases de datos públicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante el análisis de los linajes maternos, a través de la secuenciación del D-loop, se detectaron seis haplotipos mitocondriales (Figura 1; Tabla I), cuatro europeos (aquí denominados Pat1, Pat3, Pat4 y Pat5) y dos africanos (Pat2 y Pat6). En la población de Ceasip se detectaron las secuencias nodales europeas o T3 (Pat1) y africanas o T1 (Pat2, animales 0509, 1012 y 1613; Figura 1). A partir de estos haplotipos nodales (Pat1 y Pat2) divergen los haplotipos Pat3, 4, 5 y 6 (Figura 1). Los haplotipos nodales tienen una amplia distribución geográfica. Sin embargo, la comparación de los restantes haplotipos detectados en Ceasip con las secuencias previamente reportadas en las base de datos públicas indica que los cuatro haplotipos divergentes (Pat3, 4, 5 y 6) están presentes también en otros biotipos de bovinos Criollo bolivianos (Yacumeño, Chaqueño y Saavedreño). Además, Pat3, 4, 5 y 6 se detectaron en poblaciones de ganado Criollo de Argentina, Colombia y México y en razas nativas de la península Ibérica (Lidia, Garvonesa y Barrosa). Por el origen histórico de los bovinos Criollo, la composición genética de los linajes maternos del Ceasip es típica de los bovinos Criollo latinoamericanos. Se recomienda conservar especialmente los cuatro haplotipos divergentes (Pat3 - animal 1411; Pat4 - animal 330; Pat5 - animales 304 y 0610 y Pat6 - animal 296; Figura 1) porque esta diversidad genética es propia de las razas iberoamericanas.

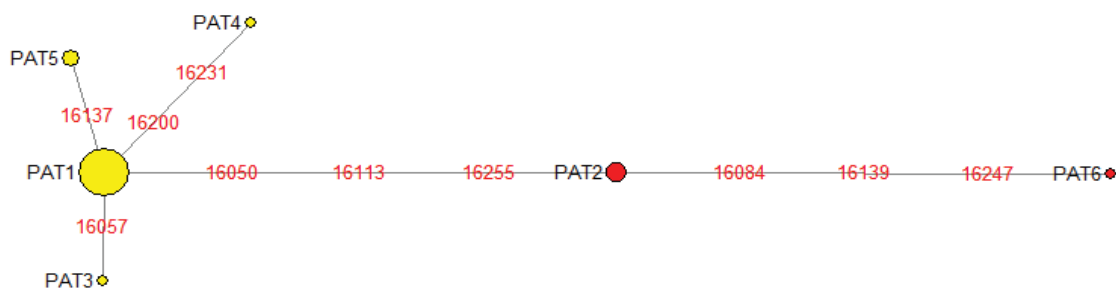


Figura 1. Network de los haplotipos mitocondriales (linajes maternos) identificados en la población de bovinos Criollo del Ceasip. Pat1, Pat3, Pat4 y Pat5 son haplotipos europeos y Pat2 y Pat6 son haplotipos africanos [Mitochondrial haplotypes network (Maternal lineages) identified in the Ceasip Creole cattle population. Pat1, Pat3, Pat4, and Pat5 are European haplotypes and Pat2 y Pat6 are African haplotypes]

Tabla I. Haplotipos y haplogrupos (europeos= T3; africanos= T1) mitocondriales detectados en el hato del Ceasip [*Mitochondrial haplotypes and haplogroups (European = T3; African = T1) detected in the Ceasip Creole population*]

Haplotipo	N	Sitios Polimórficos										Haplogrupo
		16050	16057	16084	16113	16137	16139	16200	16231	16247	16255	
Sec. Ref.*		C	G	C	T	T	C	G	C	C	T	
Pat1	19											T3
Pat2	3	T			C						C	T1
Pat3	1		T									T3
Pat4	1							A	T			T3
Pat5	2					C						T3
Pat6	1	T		T	C		T			T	C	T1

*Anderson *et al.*, 1982

Tabla II. Sitos polimórficos de los cinco microsatélites y dos SNPs que definen los linajes paternos identificados en el ganado Criollo del Ceasip (*Polymorphic sites of five microsatellites and two SNPs that define the maternal lineages identified in the Ceasip Creole cattle population*)

Muestra	Padre	Microsatélites					SNPs		Linaje	Origen
		INRA189	BYM1	UMN307	UMN103	BM861	UTY19	ZFY10		
1213	1457-CIAT	88	254	151	114/116	156	C	GT	Y3	Cebuino
1013										
0113	1597-CIAT	98	260	155	128	158	C	GT	Y2	Taurino
1312										
0513	1597-CIAT	102	260	149	134	158	A	GT	Y2	Taurino
0813										

Mediante el análisis de siete marcadores del cromosoma Y, se detectaron tres linajes paternos (Tabla II). Dos linajes paternos son taurinos (Y2; Tabla II), que han sido detectados previamente en otras poblaciones de ganado Criollo boliviano, por ejemplo en el Criollo Yacumeño (Giovambattista G., comunicación personal). El tercer linaje paterno es un haplotipo cebuino (Y3; Tabla II).

Tabla III. Estimación de la diversidad genética (n_a), heterocigosidad promedio esperada (H_e) y observada (H_o) en base a marcadores de tipo microsatélites en Angus, Hereford, Criollo Yacumeño, Criollo Saavedreño, Criollo de los Valles, Criollo del Ceasip, Gir, Nelore y Brahman [*Genetic diversity (n_a), expected (H_e), and observed (H_o) average heterozygosity estimated for genotyped microsatellites in Angus, Hereford, Creole Yacumeño, Creole Saavedreño, Creole from the Valles, Ceasip Creole, Gir, Nellore and Brahman*]

Población	Muestras	Marcadores	H_o	H_e	n_a
Angus ¹	48	22	0.636	0.693	6.59
Hereford ²	20	22	0.642	0.697	5.59
Promedio taurinos	34	22	0.639	0.695	6.09
Yacumeño ³	35	22	0.654	0.712	6.82
Saavedreño ⁴	17	22	0.645	0.737	5.95
Promedio Criollo	26	22	0.650	0.725	6.39
Ceasip	27	18	0.684	0.699	6.11
Gir ⁵	20	22	0.503	0.608	4.91
Brahman ⁶	37	22	0.603	0.665	6.14
Nelore ⁷	51	22	0.569	0.623	5.68
Promedio cebuinos	36	22	0.558	0.632	5.58

^{1, 2, 4, 5, 6, 7}Estimado en base a datos del IGEVET (CONICET La Plata Fac Cs Veterinarias, UNLP)

²Estimado en base a datos del IGEVET (CONICET La Plata Fac Cs Veterinarias, UNLP)

Se evaluó la diversidad genética nuclear al genotipificar 18 microsatélites (Tabla III). En la población de Ceasip, la n_a fue de 6.11, la H_e fue de 0.70 y la H_o fue de 0.68 (Tabla III). Estos valores fueron similares al promedio reportado para otros bovinos Criollo bolivianos analizados previamente ($n_a= 6.39$; $H_e= 0.72$ y $H_o= 0.65$).

Se determinaron las relaciones entre la población de Ceasip y otros biotipos de ganado Criollo boliviano mediante dendrogramas (Figura 2) y el análisis de Componentes Principales (Figura 3), basados en el algoritmo UPGMA y las distancias genéticas de D_s y D_a de Nei (Nei, 1987). En un solo cluster, se agruparon la población de Ceasip y los biotipos Saavedreño y Yacumeño. El cluster del Criollo se diferencia claramente de los clusters de las razas cebuinas

(Gir, Brahman y Nelore) y taurinas europeas (Angus y Hereford). Por tanto, es factible intercambiar material genético entre las poblaciones Criollo bolivianas sin pérdida significativa de su diversidad genética e identidad.

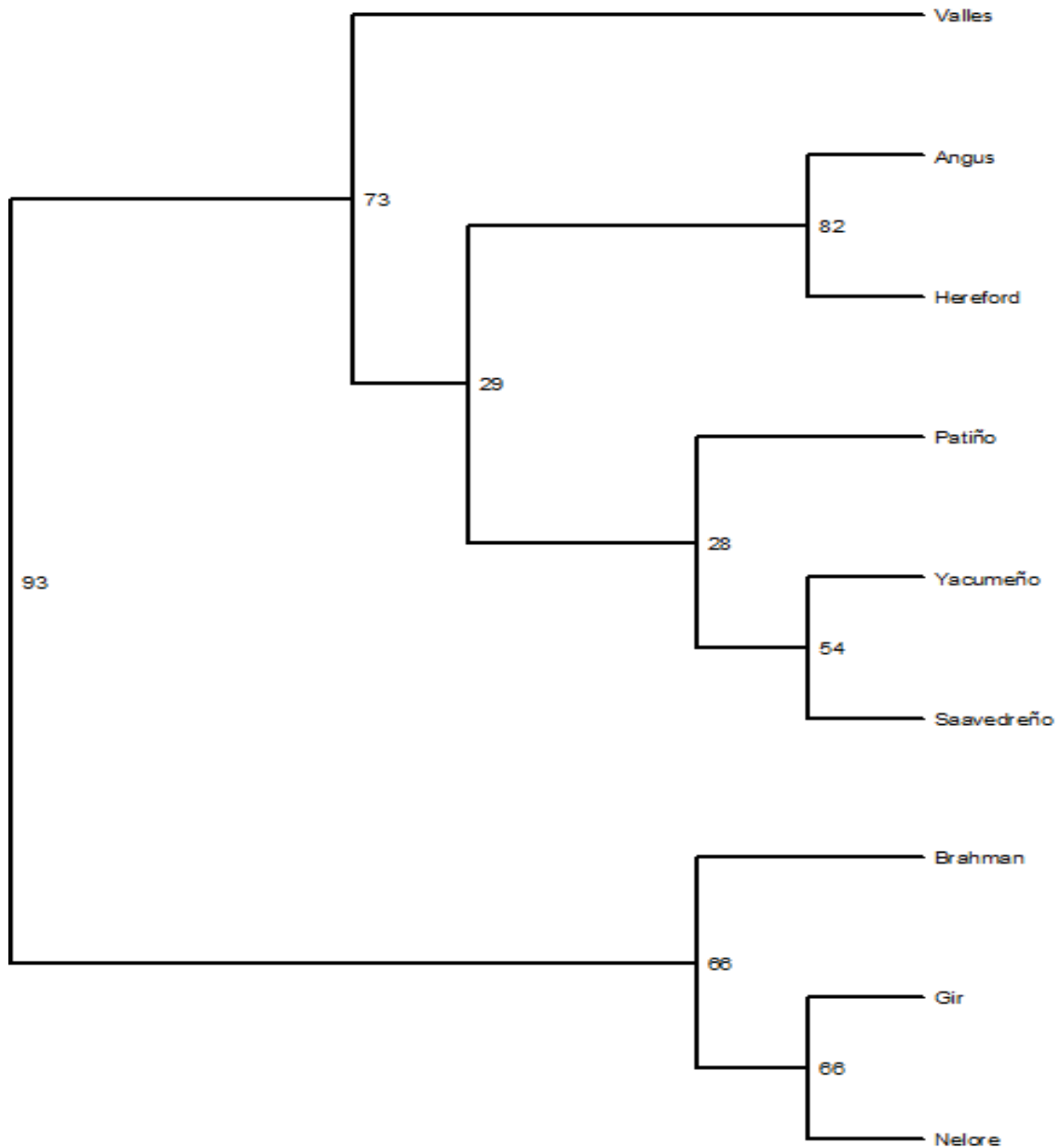


Figura 2. Dendrograma construido con el algoritmo UPGMA y basado en la distancia genética D_a de Nei, calculada a partir de las frecuencias génicas de 22 marcadores autosómicos del tipo microsatélites de las razas Angus, Hereford, Criollo Yacumeño, Criollo Saavedreño, Criollo del Ceasip, Brahman, Gir y Nelore [UPGMA Dendrogram based on Nei D_a genetic distance, calculated by 22 microsatellites gene frequencies of Angus, Hereford, Creole Yacumeño, Creole Saavedreño, Ceasip Creole, Brahman, Gir, and Nellore].

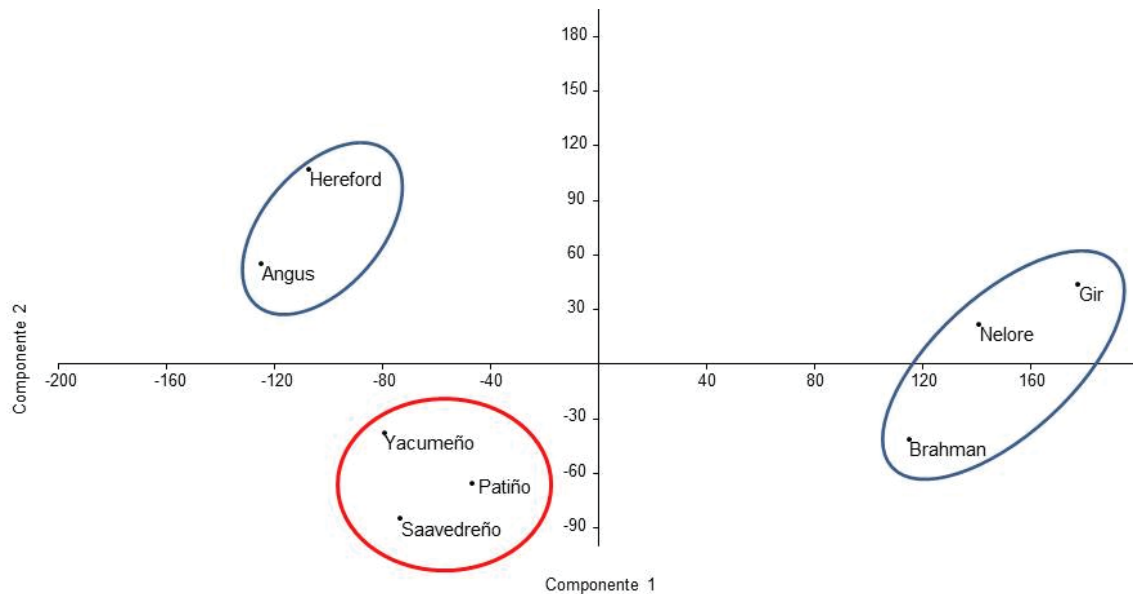


Figura 3. Análisis de Componentes Principales (PCA) basado en las frecuencias génicas de marcadores autosómicos del tipo microsatélites estimadas para las razas Angus, Hereford, Criollo Yacumeño, Criollo Saavedreño, Criollo Ceasip, Brahman, Gir y Nelore [*Principal Component Analysis (PCA) based on microsatellites gene frequencies estimated in Angus, Hereford, Creole Yacumeño, Creole Saavedreño, Ceasip Creole, Brahman, Gir, and Nellore*].

CONCLUSIONES

En conclusión, la composición genética de los linajes maternos del ganado del Ceasip es típica del ganado Criollo latinoamericano. Se recomienda conservar los cuatro haplotipos divergentes (Pat3, 4, 5 y 6) porque esta diversidad genética es propia de las razas iberoamericanas. Se identificaron tres linajes paternos. Se recomienda conservar la genética, especialmente de los toros 1597-CIAT y 0409-Ceasip. La diversidad alélica del ganado Criollo del Ceasip fue relativamente alta y el perfil genético del Criollo del Ceasip fue similar al de la mayoría de los bovinos Criollo de los llanos orientales bolivianos (Saavedreño y Yacumeño). Por tanto, es factible intercambiar material genético entre las poblaciones sin pérdida significativa de sus características genéticas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Fondo Argentino de Cooperación Sur-Sur y Triangular (FO.AR.) por la financiación del proyecto FO.AR. 6286. También se agradece a la Fundación Universitaria Simón I. Patiño, propietario del hato estudiado, y al Proyecto de Conservación de Ganado Criollo Yacumeño de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma Gabriel René Moreno.

BIBLIOGRAFÍA

- Allais S., Journaux L., Levéziel H., Payet-Duprat N., Raynaud P., Hocquette J.F., Lepetit J., Rousset S., Denoyelle C., Bernard-Capel C. & Renand G. 2011. Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *Journal of Animal Science* 89, 1-11.
- Bonilla C.A., Rubio M.S., Sifuentes A.M., Parra-Bracamonte G.M., Arellano V.W., Méndez M.R.D., Berruecos J.M. & Ortiz R. 2010. Association of CAPN1 316, CAPN1 4751 and TG% markers with bovine meat quality traits in Mexico. *Genetics and Molecular Research* 9 (4), 2395-2405.
- Carduza F., Grigioni G. & Irurueta M. 2002. Evaluación organoléptica de calidad en carne. Buenos Aires IDIA. INTA.
- Cuetia J.A., Posso A.M., Hernandez D.Y., Ariza M.F., Muñoz J.E. & Alvarez L.A. 2011. Polimorfismos de los genes calpaina y calpastatina en diez razas bovinas criollas mediante siete marcadores de polimorfismos de nucleótidos simple (SNPS). Actas Iberoamericanas de Conservación Animal, AICA Vol. 1, 191-194.
- Cuetia J., Posso A.M., Muñoz J.E., Ariza M.F. & Alvarez L.A. 2012. Tipificación de las frecuencias de los genes calpaina, calpastatina y leptina en bovinos criollos colombianos. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal, Aica Vol. 2, 231-234.
- Corva P., Soria L., Schor A., Villarreal E., Pérez Cenci M., Motter M., Mezzadra C., Melucci L., Miquel C., Paván E., Depetris G., Santini F. & Naón J.G. 2007. Association of CAPN1 and CAST gene polymorphisms with meat tenderness in Bos taurus beef cattle from Argentina. *Genetics and Molecular Biology* 30, 1064-1069.
- De Alba J. 2011. El libro de los bovinos criollos de América. Ediciones Papiro Omega, S.A de C.V.
- Geesink G.H. & Koohmarie M. 1999. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem conditions. *Journal of animal Science* 77:2685.
- Juszczuk-Kubiak E., Wyszynska-Koko J., Wicinska K. & Rosochacki S. 2008. A novel Polymorphisms in intron 12 of the bovine calpastatin gene. *Molecular Biology Reports*. Vol 35: 29-35.
- Koohmaraie M., Kent M.P., Shackelford S.D., Veiseth E. & Wheeler T.L. 2002. Meat tenderness and muscle growth: Is there any relationship? *Meat Science* Vol 62: 345-352.
- Koohmaraie M., Shackelford S.D. & Wheeler T.L. 2005. Biological bases that determine beef tenderness. University of Bristol, British Society of Animal Science, Eight Annual langford Food Industry Conference: The Science of beef Quality; 2005. p. 21-25
- Miller M.F., Huffman K.L., Gilbert S., Hammom L. & Ramsey B. 1995. Retail consumer acceptance of beef tenderized with calcium chloride. *Journal of animal science*. Vol. 73
- Morales A.G., Pereira J.A.C., Rojas P. & Loza A.J. 2013. Determinación de la frecuencia alelica de dos polimorfismos del gen de la calpaina (CAPN-1) asociado a terneza de la carne en bovinos de la raza Brahman del departamento de Santa Cruz. Tesis de Grado. FCV-UAGRM.
- Morris C.A., Cullen N.G., Hickey S.M., Dobbie P.M., Veenvliet B.A., Manley T.R., Pitchford W.S., Kruk Z.A., Botema C.D.K. & Wilson T. 2006. Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of cooked M. longissimus dorsi steaks from Jersey x Limousin, Angus and hereford-cross cattle. International Society for Animal Genetics. *Animal Genetics* Vol 37. pp 411-414.

- Page B.T., Casas E., Quass R.L., Thallman R.M., Wheeler T.L., Schackelford S.D., Koohmaraie M., White S.N., Bennett G.L. & Keele J.W. 2004. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal of Animal Science* 82, 3464 - 3481.
- Pereira J.A.C. & Calderón D.O. 2002. Pruebas de ganancia de peso en base a pasturas en ganado Nelore en el tropico boliviano. Memorias XIV Reunión nacional de ABOPA. "Forraje y Producción Animal". Tomo 2: Producción Animal 305-314.
- Pereira J.A.C., Landivar J., Asfura J, Brown A.H., Johnson Z. & Kellog D.W. 2006. Parámetros y medidas bovino métricas relacionadas con características de crecimiento en ganado Nelore preparado para feria. Memoria XVI Reunión nacional de ABOPA. "Producción pecuaria sostenible". 1-7.
- Raymond M. & Rosusset F. 1997. GENEPOP versión 3.2 b: an updated version of GENEPOP (versión 1,2); (originally published as) population genetic software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity* 86:248-9.
- Riley D.G., Chase, Jr T.D., Pringle R.L. , West D.D., Johnson T.A., Hammond A.C. & Coleman S.W. 2003. Effect of sire μ - calpain activity and rate of tenderization as indicated by myofibril gfragmentation indices of steaks from Brahman cattle. *Journal of Animal Science* 81:2440.
- Rincon G. & Medrano J.F. 2006. Assays for genotyping single nucleotide polymorphisms in the bovine CAPN1 gene. *Animal Genetics* 37:(3):294-5.
- Rivera I.R. 2006. Determinación de curvas de lactancia del hato bovino Criollo Saavedreño en Santa Cruz, Bolivia Tesis de Grado. FCV-UAGRM
- Robinson D.L., Café L.M., McIntyre B.L., Geesink G.H., Barendse W., Pethick D.W., Thompson J.M., Polkinghorne R. & Greenwood P.L. 2012. Production and processing studies on calpain-system gene markers for beef tenderness: Consumers assessments of eating quality. *Journal of Animal Science* 90: 2850-2860.
- Suzano R.C., Pereira J.A.C., Rojas P. & Loza A.J. 2013. Determinación de la frecuencia alélica de dos polimorfismos del gen de la calpaina (CAPN-1) asociado a terneza de la carne en bovinos de la raza Nelore del departamento de Santa Cruz. Tesis de Grado. FCV-UAGRM.
- Vargas M. 2013. El Bovino Criollo Yacumeño. IICA.
- Vasquez R.E., Ballesteros H.H. & Muñoz C.A. 2007. Factores asociados con la calidad de la carne. Revista Corpoica - Ciencia y tecnología Agropecuaria Vol. 8.
- Wilkins J.V. 1992. Mejoramiento de ganado vacuno en america latina: una revisión de los recursos, prácticas y perspectivas. Informe Técnico No. 3. Centro de Investigación Agrícola Tropical (CIAT-Bolivia).