

7 VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA RAZA BON EVALUADA CON MARCADORES MOLECULARES TIPO MICROSATÉLITES



Andrés Pedraza Linás, Juan Felipe M-Rocha, Rodrigo Martínez S.

INTRODUCCIÓN

La variabilidad genética, desde el punto de vista matemático, es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes (Crow y Kimura, 1970). Para caracterizar dicha variabilidad se utilizan dos tipos de componentes: la variabilidad fenotípica, que se observa fácilmente y se puede medir directamente sobre los individuos evaluados; y la variabilidad genética, que se puede medir directamente en la secuencia de ADN o detectando diversos marcadores genéticos. En ambos casos hay herramientas matemáticas que permiten caracterizar adecuadamente la variabilidad existente dentro y entre poblaciones y de esta forma pueden cuantificarse las diferencias entre y dentro de las poblaciones animales.

Los primeros estudios de variabilidad genética se concentraron en detectar variaciones cuantificables como el color, variaciones morfológicas, aberraciones cromosómicas y tipos de grupos sanguíneos (Hedrick, 2005). Actualmente se están desarrollando investigaciones usando herramientas basadas en el estudio del ADN para la conserva-



ción, caracterización genética y utilización de las razas de animales; muchos de estos estudios de caracterización se basan en los análisis genéticos a través del uso marcadores moleculares, entre ellos los microsatélites o '*short tandem repeat*' (str), los cuales son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb) que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos. Una de las ventajas de estos marcadores en comparación con otros (minisatélites, RFLP, RAPD, etc.) radica en que están considerados por la mayoría de autores como la más poderosa herramienta para los estudios de genética de poblaciones (Cheng H. and Crittenden, L. B. 1994; FAO, 2008), ya que son muy polimórficos, presentan herencia mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, y son confiables, repetitivos y automatizables (Hedrick P., 2005).

La FAO ha propuesto una estrategia para la caracterización de los recursos genéticos de animales domésticos usando dicha metodología, recomendando el análisis de 50 individuos no emparentados por raza (25 machos y 25 hembras) (Barker *et al.*, 1993). En los estudios de genética poblacional, estos marcadores permiten la identificación de cada alelo por marcador y obtener datos poblacionales, calcular las frecuencias alélicas, y a partir de estas estimar las distancias genéticas entre las poblaciones o individuos (Bowcock A. M. y col., 1994).

En las razas criollas son varias las publicaciones realizadas en esta área pero generalmente evalúan animales de una misma población; es por eso que en este capítulo se presenta el estudio de la variabilidad genética de 10 poblaciones comerciales de la raza bovina criolla BON de diferente origen genético, mediante el análisis de doce microsatélites en una muestra de 138 animales.

METODOLOGÍA

Los animales fueron obtenidos de poblaciones comerciales provenientes del departamento de Antioquia de los siguientes lugares: la ganadería hacienda Campoalegre (CA), la hacienda Vegas de la Clara (Universidad de Antioquia - Udea), la hacienda Paysandú (Universidad Nacional de Medellín - Unal Med) y el Banco de Germoplasma de la raza, conservado por Corpoica (BG) en el municipio de San Roque. En el departamento de Cundinamarca se tomaron muestras de la hacienda El palmar (EP), mientras en el departamento de Córdoba se hizo de la hacienda La Esmeralda (LE); en Risaralda de las haciendas

Azufra (AZ), Bohemia (BH) y Hato viejo (HV); y del departamento del Tolima la hacienda Pacora (JP); y 18 animales de la raza Cebú que se utilizaron como control externo para evaluación de introgresión genética (Tabla 7.1).

Un análisis adicional, incluyó 5 individuos de la raza española Morucha, suministrados por la asociación de esta raza en España, los resultados se presentan al final del capítulo.

Tabla 7.1. Ubicación de las subpoblaciones de animales de la raza BON incluidos en el análisis de variabilidad genética.

Población	Ubicación	Departamento	No Animales
AZ	La Virginia	Risaralda	9
BH	La Virginia	Risaralda	10
CA	Fredonia	Antioquia	16
EP	Pacho	Cundinamarca	10
HV	La Virginia	Risaralda	10
JP	Chaparral	Tolima	7
LE	Ayapel	Córdoba	16
UDEA	Gómez Plata	Antioquia	9
Unal Med	Barbosa	Antioquia	8
BG	San Roque	Antioquia	26

Caracterización genética

Los análisis de los marcadores microsatélites de todas las poblaciones incluidas en este estudio se realizaron en el Laboratorio de Genética Molecular Animal de la Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria, Corpoca. Inicialmente se recolectaron muestras de sangre periférica, se realizó la separación de glóbulos blancos y posteriormente a partir de ellos se llevó a cabo la extracción de ADN utilizando la resina Chelex al 20%.

Se estudiaron 12 marcadores tipo microsatélites, seleccionados a partir de las recomendaciones hechas por la FAO/ISAG (Food and Agriculture Organization/ International Society of Animal Genetics) para realizar estudios de biodiversidad bovina (FAO 2001): BM 2113, BM 1818, BM 1824, ETH 10, 1TH



225, ETH 3, INRA 23, SPS 115, TGLA 122, TGLA 126, TGLA 227 y TGLA 53. Estos microsatélites se han analizado utilizando una amplificación mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de acuerdo con el protocolo descrito en el laboratorio de genética molecular animal de Corpoica. Con el fin de determinar el tamaño de los fragmentos, los productos de PCR se evaluaron en un analizador genético (ABI 310, Applied Biosystems), identificando los polimorfismos presentes en estas subpoblaciones de animales de la raza BON.

Para el análisis de genética de poblaciones se utilizó el programa Genepop® (Raymond y Rousset, 1995) versión 3.3 (Laboratoire du Genetique et Environment, Montpellier, France). La heterocigosidad observada y esperada, los estadísticos F, el análisis factorial de correspondencia y el valor de F_{IS} (índice de fijación) por población se han realizado con el programa Genetix® V. 4.05 (Belkhir y col., 2003). Los valores de PIC se han calculado mediante la fórmula de Botstein y col. (1980), con el complemento de Excel “Microsatellite Toolkit V 3.1” (Park, 2001), utilizando el programa MS Excel 2007®. Las distancias genéticas se calcularon utilizando la metodología de Nei (1978) mediante el módulo Gendist incluido en el programa Phylip® (Felsenstein, 1993) con un proceso previo de bootstrapping de 10.000 remuestreos, utilizando el módulo seqboot, del mismo programa. La reconstrucción de los árboles filogenéticos se realizó por medio de la metodología neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) incluida en el mismo programa.

RESULTADOS

Al utilizar información molecular para determinar la variabilidad genética existente entre poblaciones normalmente se utilizan algunos parámetros poblacionales, entre ellos el número promedio de alelos, frecuencias alélicas, valores de heterocigosidad y PIC, y con ellos se determinan los índices de fijación (Wright, 1969).

Frecuencias alélicas

En los doce microsatélites evaluados en las poblaciones estudiadas se detectaron en total 171 variantes alélicas, con una media de 14,2 alelos por marcador genético. El número de alelos por locus (N_a) ha variado significativamente, siendo el microsatélite TGLA 227 el que presentó mayor número de alelos

(22), con valores intermedios, donde se encontraron los marcadores ETH3 y TGLA 126, que presentaron cada uno 17 y 16 alelos respectivamente. Ninguno de los microsatélites ha mostrado variantes con frecuencias superiores a 0,95, por lo que se deduce que los doce marcadores han sido polimórficos.

En este caso, el mayor valor de Na se ha encontrado en la población de LE, con un promedio de 6,58 alelos por loci, seguido por la población de BG (6,42) y CA (6,25); el menor valor se encontró en la población de EP (3,82). En la población de la LE se encontró que doce marcadores han mostrado valores de PIC superiores a 0,50 y estos han resultado medianamente informativos (entre 0,25 y 0,50) (Tabla 7.2).

El contenido de información polimórfica PIC depende tanto del número de alelos como de la distribución de sus frecuencias en la población. En este estudio se encontró un valor promedio de PIC de 0,63 y se observó una importante variación en cuanto al PIC de los marcadores (en la Tabla 7.2 se muestran los valores de PIC para cada población). Los mayores valores de PIC fueron encontrados para la población de la Udea (0,866) y, por el contrario, el menor valor se encontró para la subpoblación de JP (0,239). En resumen, todas las subpoblaciones han resultado altamente informativas, con valores mayores de 0,60 de PIC.

Tabla 7.2. Número promedio de alelos (NPA) y contenido de información polimórfica (PIC) para todas las subpoblaciones.

Subpoblación	NAP	PIC
Azufra	5,25	0,822
BG	6,42	0,863
BH	4,83	0,717
CA	6,25	0,779
C	5,58	0,788
EP	3,82	0,721
HV	4,33	0,744
JP	4,25	0,777
LE	6,58	0,819
UDEA	5,58	0,866
UN	4,58	0,766



Valores de heterocigosidad por población

Otro parámetro importante en genética de poblaciones es la heterocigosidad esperada y observada, que se puede obtener a partir de la proporción de individuos que tienen en cada uno de los marcadores genotipos heterocigotos, e indica desvío del equilibrio de Hardy & Weinberg, situación que lleva a identificar una disminución en la variabilidad genética cuando se encuentran poblaciones con déficit de heterocigotos por efecto de apareamientos entre animales cercanamente emparentados, o por el contrario cuando existe exceso de heterocigotos, lo que indicaría procesos recientes de cruzamiento entre razas.

Para las once poblaciones analizadas se estimaron los valores de heterocigosidad esperada (H_e), encontrándose en general un valor promedio de 0,73 con los valores más altos encontrados para la población de BG, que presentó un valor de 0,78. De manera similar, las subpoblaciones de Udea, HV y UN tuvieron valores superiores a 0,70; por el contrario, el menor valor fue encontrado en la subpoblación de JP (0,67), similar a los encontrados en otras poblaciones bovinas criollas como la raza Criollo Uruguayo ($H_e=0,67$) (Armstrong y col., 2004), Florida Craker, Pineywoods y Texas Longhorn de Estados Unidos ($H_e=0,7$) (Mac Neil y col., 2006) o la raza Criollo Casanare de Colombia ($H_e=0,82$) (Barrera y col., 2006).

El valor de diversidad genética o heterocigosidad esperada (H_e) en las subpoblaciones de animales de la raza BON es mayor al encontrado en otras razas bovinas, como por ejemplo Simmental ($H_e=0,58$) (Edwards y col., 2000), Nelore ($H_e=0,515$) (Lara y col., 2005), Highland ($H_e=0,57$), Hereford ($H_e=0,60$) y Shorthorn ($H_e=0,58$) (McNeil y col., 2006), que indica que a causa de la intensiva selección estas poblaciones se han vuelto más homocigotas.

La heterocigosidad observada promedio fue de 0,65, y la heterocigosidad observada por subpoblación mostró valores mayores para cuatro de las subpoblaciones BH, AZ, LE, y JP, siendo la subpoblación de BH la más alta (0,72) y de 0,70 para las otras subpoblaciones (las subpoblaciones de HV (0,59) y CA (0,52) presentaron el valor mínimo de heterocigosidad). Con respecto a los valores de F_{IS} , el valor promedio fue de 0,09, presentándose un valor mayor en la subpoblación de CA con 0,325; por el contrario, las subpoblación de EP presentó el menor valor (-0,004), y las subpoblaciones de JP y BH presentaron valores similares de -0,038 (Tabla 7.3).

En los animales de la raza BON no se observan diferencias estadísticas significativas, mostrando una variabilidad genética similar para todas las subpoblaciones, lo que indica que se tiene una amplia variación para realizar procesos de selección.

Esta variabilidad genética de la raza también lo confirma la heterocigosidad observada ($H_o = 0,65$) en las subpoblaciones de la raza analizadas, valor muy similar al encontrado para la heterocigosidad esperada ($H_e = 0,73$), lo cual indica que en términos generales estas poblaciones se encuentran muy cerca al equilibrio.

Tabla 7.3. Heterocigosis esperada (H_e) y heterocigosis Observada (H_o) e índice de fijación (F_{is}) para cada subpoblación.

Subpoblación	H_e	H_o	F_{is}
Azufra	0,7365	0,7049	0,043
BG	0,7829	0,6027	0,2302
BH	0,7030	0,7297	-0,038
CA	0,7855	0,5296	0,3257
C	0,6888	0,6325	0,0816
EP	0,6846	0,6870	-0,004
HV	0,7470	0,5960	0,2021
JP	0,6784	0,7044	-0,038
LE	0,7649	0,7088	0,0734
UDEA	0,7598	0,6591	0,1326
UN	0,7049	0,6944	0,0149
Promedio	0,7306	0,6590	0,0930

Medidas de variabilidad genética

El F_{is} mide la reducción en la heterocigosidad debida a los apareamientos no aleatorios en la población, e indica el nivel de endogamia de los individuos de dicha población. Este valor es una correlación estadística que toma valores desde -1 a + 1. El signo negativo indica exceso de heterocigotos, mientras que el signo positivo indica exceso de homocigotos. La magnitud del F_{is} viene dada por el valor absoluto del índice, siendo bajo si el valor está entre 0 y



0,05, medio si se encuentra entre 0,06 y 0,15, alto si se encuentra entre 0,16 y 0,25, y muy alto si es mayor a 0,25 (Hartl, 1988). En la Tabla 7.3 se observa el valor de F_{IS} para cada subpoblación: el mayor valor se encuentra en la subpoblación de CA con un valor de (0,325), debido a un alto número de heterocigotos y muy bajo de homocigotos, aunque es importante destacar que la mayoría de las subpoblaciones presentan signo positivo. Por su parte, las subpoblaciones de BG y HV presentaron valores medios de 0,230 y 0,202 respectivamente; por el contrario, subpoblaciones JP, EP y BH presentaron valores negativos de -0,03, -0,004 y -0,03 respectivamente para cada subpoblación, demostrando así un exceso de individuos heterocigotos para estos marcadores y evidenciando cruzamiento entre diferentes líneas de la misma raza, por lo que es muy bajo el nivel de endogamia.

Cuando un proceso de aislamiento genético persiste por varias generaciones, la consecuencia principal –desde el punto de vista de la genética de poblaciones– es la consanguinidad y la deriva génica (Falconer y Mackay, 1996).

Para los 12 microsatélites utilizados en este estudio, el valor de F_{IS} presentó una magnitud intermedia (0,09), lo que muestra que animales de la raza BON presentan moderada endogamia, que indica una significativa proporción de sus alelos en heterocigosis; esto es similar a lo encontrado por Bedoya y col. (2001), quienes estudiando cinco microsatélites encontraron valores de $F_{IS}=0,1148$ en una población de animales de la raza BON de la Universidad de Antioquia, donde evaluaron también un número menor de animales. Los valores encontrados en el presente trabajo se diferencian básicamente en la cantidad de muestras analizadas y de marcadores evaluados, que fueron mayores a los estudiados por Bedoya y col. (2001).

Desde un punto de vista práctico, favorecer la variabilidad dentro de razas es útil en los procesos de selección y adaptación, mientras que dar más importancia a la variabilidad entre razas sería más razonable cuando lo que se pretende es explotar el resultado de cruzamientos (García y Cañón, 2007).

Análisis de componentes principales

En el Gráfico 7.1 se observa la representación espacial de cada uno de los animales BON en las 10 subpoblaciones en estudio, empleando como variable clasificatoria los genotipos individuales para los 12 microsatélites. Se puede observar en la primera dimensión que los individuos se agrupan alrededor

del centroide, con una clara división de las poblaciones BON respecto a los animales Cebú; este primer eje factorial es el que controla la mayor parte de la variación, pues explica el 35,41% de la variación total. La mayor variabilidad se ha presentado en la subpoblación del BG y la menor se nota en las demás poblaciones BON, las cuales se agruparon muy cercanas a la derecha del centroide. El segundo eje factorial que explica el 16,82% de la variación, muestra que los animales Cebú se agrupan de manera más homogénea que los animales de las poblaciones de BON que muestran mayor dispersión (8,89%), indicando mayor variabilidad.

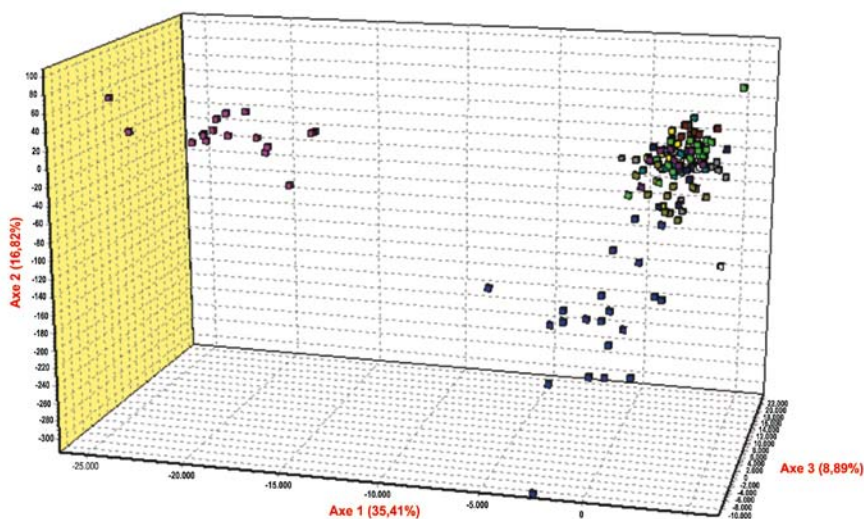


Gráfico 7.1. Análisis factorial de correspondencias múltiples en subpoblaciones de animales de las razas BON y Cebú.

Distancias genéticas entre poblaciones de la raza BON

En este trabajo se ha calculado la distancia genética de Nei DS (Nei, 1983) entre las 10 poblaciones comerciales (una representación de las distancias genéticas se presenta en el Gráfico 7.2.) La medida de distancia de Nei ha coincidido en que las poblaciones más distantes en este estudio son las subpoblaciones de la EP y BH, donde se encontraron los valores de distancia genética más altos ($D_A=0,91$). En las subpoblaciones del JP y BG (0,84) también se presenta un alto valor de distancia genética, lo que indica que dichas subpoblaciones comparten pocos alelos y la frecuencia de los alelos compartidos entre ellas son muy diferentes, por lo que están genéticamente distanciadas. Por el contrario, se observan los menores valores de distancia



genética entre las subpoblaciones de HV y AZ (0,15) y, como era de esperarse, las subpoblaciones de BH y AZ también presentaron muy baja distancia genética (0,193), pues son subpoblaciones que se encuentran muy cercanas geográficamente y han compartido recientemente reproductores. Por su parte, la subpoblación de BH presentó valores de distancia muy bajos con la población de la UN (0,17); un valor similar de distancia fue encontrado entre las poblaciones de AZ y LE (0,199) (ver Gráfico 7.2.)

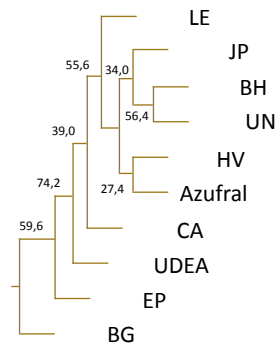


Gráfico 7.2. Dendrograma utilizando la metodología de Nei entre las subpoblaciones de la raza BON, usando el algoritmo neighbor-joining del programa Phylip® con bootstrapping de 1000 réplicas.

Relación genética con la raza Morucha

Se realizó un estudio de variabilidad genética adicional que incluyó 5 individuos de la raza Morucha, con el fin de evaluar el grado de distanciamiento genético de esta respecto al ganado BON.

El número promedio de alelos y el contenido de información polimórfica de los individuos moruchos (3,58 y 0,50, respectivamente) se encontraron por debajo de los valores promedio estimados para las poblaciones BON incluidas en el estudio, sin embargo, la heterocigocidad observada (0,66), se asemeja bastante al promedio del total de individuos BON analizados.

En el gráfico 7.3 se muestra por cada cluster ó grupo las inercias principales o la dirección que lleva la nube de puntos, se indica claramente que la raza BON se estructura en tres grupos (rojo, verde, morado). Los animales de la raza morucho se encuentran en el grupo cuatro (morado), que es donde se presenta la mayor parte de los animales BON analizados, en alta cercanía al grupo dos.

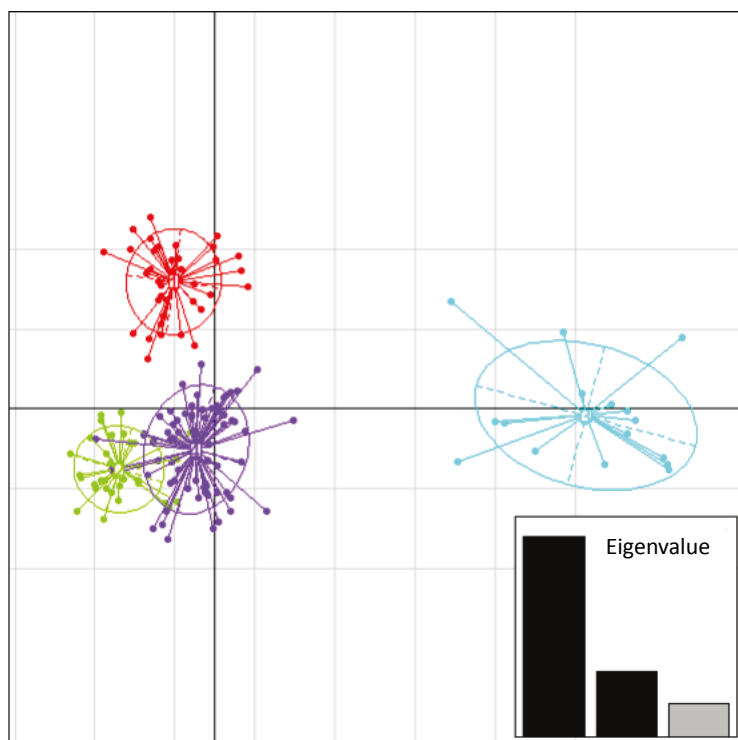


Gráfico 7.3. Inercias de componentes principales en poblaciones de animales BON, moruchos y cebuinos.

En el análisis factorial de correspondencias múltiples, los individuos moruchos se agruparon en cercanía de las poblaciones de BON y con una clara diferenciación respecto a los individuos Cebú también analizados. Asimismo, en la asignación individual a clusters, estos bovinos se concentraron en un grupo similar al de la población del Banco de Germoplasma (BG) de BON. Los porcentajes de membresía, que indican el grado de asignación a un determinado grupo genético (con valores entre 95 y 98% de asignación), junto con los valores obtenidos para los índices de fijación calculados, indicarían una cercanía genética significativa de los bovinos moruchos analizados con los animales BON del BG.

No obstante, sería importante realizar futuros análisis incluyendo un mayor número de individuos y de marcadores genéticos, así como también contar con las demás razas criollas y con otras poblaciones de ganado que ancestralmente pudieran haber dado origen a las mismas.



CONCLUSIÓN

Los resultados del presente trabajo han mostrado un alto polimorfismo presente en todos los marcadores genéticos evaluados en las subpoblaciones de BON, lo cual indica la alta variabilidad presente en esta raza y da la posibilidad del desarrollo de programas de mejoramiento genético con el fin de mejorar el comportamiento productivo de esta raza.

Las frecuencias alélicas en las subpoblaciones estudiadas fueron heterogéneas. Estos resultados, junto con la alta variación presentada en los pares de marcadores, indican que los marcadores utilizados son adecuados para estudios de control de filiación y caracterización genética de esta raza.

A su vez, los valores de F_{IS} encontrados muestran la necesidad de desarrollar estrategias de gestión genética para el control de la endogamia y evitar así los efectos deletéreos sobre las características productivas.

Las medidas de distancia genética indican que existen grupos claramente diferenciados que se agrupan posiblemente por su origen genético; esta información permite tener una herramienta para la selección de animales por su similaridad genética y para el planeamiento de los apareamientos, buscando mínima consanguinidad. En general, los resultados muestran que la raza BON presenta variabilidad genética suficiente, una estructura poblacional definida y dado su censo poblacional, puede ser objeto de procesos de mejoramiento genético.

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento para los diferentes productores de ganado BON que facilitaron la obtención de las muestras necesarias para realizar este estudio. También, a la colaboración, aportes de información y material genético proporcionado por don Alonso Restrepo de León, quien sugirió incluir animales de la raza Morucha dentro de los análisis.

Referencias

- Armstrong, E.; Postiglioni, A.; Martínez, A.; Rincón, G. y Kelly, L. (2004). Reseña genética de bovinos criollos del Parque Nacional de San Miguel. I Análisis Genético de Toros con Microsatélites. *Veterinaria (Montevideo)* 39 (155-156): 33-38.
- Barker, J. S. F.; Bradley, D. G.; Fries, R.; Hill, W. G.; Nei, M. and Wayne, R. K. (1993). An integrated global programme to establish the genetic relationships among the breeds of each domestic animal species. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Animal Production and Health Division, Rome.
- Barrera, G. P.; Martínez, R.; Perez, J.; Polanco, N.; Ariza, F. (2006). Evaluación de la variabilidad genética en ganado criollo colombiano mediante marcadores microsatélites. *Anim. Gen. Res. Inf* 38:35-45.
- Bedoya, G.; Ossa, J. E.; López, A.; Saldarriaga, O.; Arango, A. E.; Rugeles, M.; Zuluaga, F.; Olivera, M.; Bermúdez, N. (2001). Ganado BON (BON): Una alternativa para la producción en Colombia. *Rev Col Cienc Pec Vol.* 14: 2.
- Belkhir, K.; Borsa, P.; Chikhi, L.; Raufaste, N.; Bonhomme, F. (2003). GENETIX version 4.04, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Genome, Populations, Interactions: CNRS UMR. 5000. Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, H. y Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics.* 32 314-331.
- Bowcock, A. M.; Ruiz-Linares, A.; Tomfohrde, J.; Minch, E.; Kidd, J. R. and Cavalli-Sforza, L. L. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368, 455-457.
- Cheng, H. H. and Crittenden, L. B. (1994). Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Sci.* 73:539-546.
- Crow, J. F. and Kimura, M. (1970). An Introduction to population genetics theory. Harper and Row Publishers Inc New York.
- Edwards, C. J.; Dolf, G.; Looft, C.; Loftus, R. T. y Bradley, D. G. (2000). Relationships between the endangered Pustertaler-Sprinzen and three related European Cattle breeds as analysed with 20 microsatellite loci. *Animal Genetics*, 31: 329-332.
- Falconer, D. S.; Mackay, T. F. C. (1996). An Introduction to Quantitative Genetics. 4th ed. Longman Pub. London, UK. 464 p.
- FAO. (2001). World Watch List for Domestic Animal Diversity. FAO Programa ONU para el Medio Ambiente (PNUMA) Roma.
- Felsenstein, J. (2004). Inferring phylogenies. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. 664 p.
- García, D. y Cañón, J. (2007). Diversidad de las especies de animales domésticos: Importancia y conservación de la variabilidad genética. *Feagas* 31: 61-66.
- Hartl, D. L. (1988). A primer of population genetics. Segunda Edición. Editado por Sinauer Associated Inc. Sunderland Mass.
- Hedrick, P. W. (2005). Genetic of populations. Third edition. 27-29.
- MacNeil, M. D.; Cronin, M. A.; Blackburn, H. D. y Alexander, L. J. (2006). Genetics relationships among breeds of beef cattle in the United States that originated from the British Islands, Iberian Peninsula or West-Central Europe. 8th Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Belo. Horizonte Brasil.
- Nei, M.; Tajima, F. y Taten, Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19: 153-170.
- Park, S. D. E. (2001). Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection [PhD. thesis]. University of Dublin. Available at <http://acer.gen.tcd.ie/~sdepark/ms-toolkit/index.php>.
- Raymond, M. y Rousset, F. (1995). Genepop (version 3.1c): A population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution.* 4: 406-425.
- Wright, S. (1969). Evolution and the genetics of populations. The theory of gene frequencies N° 2. University of Chicago Press, Chicago.