

ANÁLISIS DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE BOVINOS CRIOLLOS DE DOS REGIONES DEL ESTADO DE OAXACA, MÉXICO

ANALYSIS OF GENETIC DIFFERENTIATION OF CREOLE CATTLE FROM TWO REGIONS IN OAXACA STATE, MEXICO

Domínguez M.A.^{1*}, Pérez J.D.², Landi V.³, Martínez A.³, Fuentes-Mascorro G.⁴

¹Laboratorio de Genética Molecular y Zoonosis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. México. *madm02@hotmail.com.

²Departamento de Secuenciación Genómica. Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. Morelos. México.

³Laboratorio de Marcadores Moleculares. Departamento de Genética. Universidad de Córdoba. España.

⁴Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. México.

Keywords: Diversity; Microsatellite; Genetic distance; Population structure; Conservation.

Palabras clave: Diversidad; Microsatélites; Distancia genética; Estructura poblacional; Conservación.

ABSTRACT

Oaxaca is the most biodiverse state in México, represented by its wild species and domestic creole livestock. Two creole cattle populations from two regions of Oaxaca were analyzed (Zimatlan: n=26, Ecatepec: n=34) in order to assess their genetic diversity level and to clarify if they are two genetically differentiated populations or just one creole population geographically separated. Twenty-four microsatellite markers and three reference populations (Retinto, Jersey, Brahman) were used to perform the study. Results revealed a moderate level of genetic diversity both Zimatlan and Ecatepec cattle (Zimatlan: MNA= 5.58 ± 1.38 , Ne= 3.25 ± 1.03 , He= 0.670 ± 0.026 , Ho= 0.659 ± 0.019 / Ecatepec: MNA= 7.04 ± 1.97 , Ne= 3.80 ± 1.42 , He= 0.712 ± 0.024 , Ho= 0.638 ± 0.017). Hardy-Weinberg equilibrium test showed only two unbalanced *loci* ($p < 0.05$) in Zimatlan cattle (HEL9, INRA35) and four in Ecatepec cattle (BM8125, HEL9, HAUT24, TGLA53). The results shown by the Nei's genetic distance analysis, F_{ST} calculation (0.023), and population structure analysis using the Structure software, and the subsequent calculation of suitable K value using the Evanno method, revealed that Zimatlan and Ecatepec cattle share a large part of their genome, gathering in a well-structured cluster with only little genetic differentiation (K4: 95.6 % Zimatlan, 91.7 % Ecatepec). Data showed that Ecatepec and Zimatlan cattle are only one creole population.

RESUMEN

Oaxaca es el estado con mayor biodiversidad animal en México, representada tanto por sus especies silvestres como domésticas de tipo criollo. En el presente estudio se analizaron dos poblaciones de bovinos criollos, localizadas en dos regiones del estado de Oaxaca (Zimatlán: n=26, Ecatepec: n=34). El objetivo fue evaluar el grado de diversidad y las relaciones genéticas existentes entre ambas poblaciones para determinar si se trata de dos poblaciones genéticamente

diferenciadas o una sola población criolla separada geográficamente. Para desarrollar el estudio se emplearon 24 marcadores microsatélites y tres poblaciones de referencia (Retinto, Jersey, Brahman). Los resultados obtenidos revelaron una diversidad genética moderada tanto en los bovinos de Zimatlán como de Ecatepec (Zimatlán: NMA= $5,58 \pm 1,38$, Ne= $3,25 \pm 1,03$, He= $0,670 \pm 0,026$, Ho= $0,659 \pm 0,019$ / Ecatepec: NMA= $7,04 \pm 1,97$, Ne= $3,80 \pm 1,42$, He= $0,712 \pm 0,024$, Ho= $0,638 \pm 0,017$). La prueba de equilibrio Hardy-Weinberg reveló únicamente dos *loci* desequilibrados ($p < 0,05$) en los bovinos de Zimatlán (HEL9, INRA35) y cuatro en los bovinos de Ecatepec (BM8125, HEL9, HAUT24, TGLA53). Los resultados obtenidos en los cálculos de distancia genética de Nei (1972), F_{ST} (0.023), así como el análisis de la estructura poblacional mediante el programa Structure y el posterior cálculo del K óptimo con el método Evanno, evidenciaron que tanto los bovinos de Zimatlán como de Ecatepec comparten gran parte del genoma, agrupándose en un solo *cluster* bien estructurado (K4: 95,6 % Zimatlán, 91,7 % Ecatepec), con escasa diferenciación genética entre ellos, demostrando que se trata de una sola población criolla.

INTRODUCCIÓN

El estado de Oaxaca cuenta con la mayor biodiversidad animal en México, tanto en fauna silvestre como doméstica representada por el ganado de tipo criollo, descendiente de los primeros ejemplares traídos por los españoles durante la época de la Colonia en el siglo XVI. En el caso del ganado bovino, la mayor parte de la composición genética en el estado se basa en animales criollos, no obstante, la introducción de razas especializadas provenientes de Europa y Estados Unidos desde la segunda mitad del siglo XX a la fecha, ha representado un factor de riesgo para este reservorio genético bovino, debido a los cruzamientos no controlados y en algunos casos, a la implementación de programas que establecen la sustitución total de los animales criollos por animales de razas especializadas. En el estado de Oaxaca, los bovinos criollos se ubican principalmente en las regiones de Valles Centrales, Costa, Sierra e Istmo de Tehuantepec, representando un recurso biológico de gran valor, debido a su importancia económica, social y cultural, principalmente para los pobladores de los municipios más pobres del estado. Fenotípicamente, los bovinos criollos de Oaxaca se caracterizan por un pelaje rojizo en diferentes tonalidades (figura 1), habiendo ejemplares con pelaje negro, bayo o blanco.



Figura 1. Localización geográfica de las poblaciones de bovinos criollos Zimatlán y Ecatepec (*Geographic location of Zimatlan and Ecatepec creole cattle populations*).

Por lo general son criados en libertad en el ecosistema, lo que ha permitido su adaptación a condiciones geográficas particulares con pendientes y barrancos (Pérez, 2011; Fuentes-Mascorro *et al.*, 2012). No obstante, a pesar de su gran valor, muy pocos esfuerzos se han dirigido a su conservación y en particular a su correcta identificación. Es por esto que en el presente trabajo se

llevó a cabo el análisis de diferenciación genética de dos poblaciones de bovinos criollos del estado de Oaxaca, para evaluar el grado de diversidad y las relaciones genéticas existentes entre las poblaciones bovinas de Zimatlán y Ecatepec (figura 1) y determinar si se trata de dos poblaciones genéticamente diferenciadas o una sola población criolla separada geográficamente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se colectaron 60 muestras de pelo pertenecientes a bovinos criollos de dos municipios del estado de Oaxaca: Zimatlán de Álvarez (n=26), ubicado en la Región de los Valles Centrales (coordenadas 16°52' N, 96°47' O) y Santa María Ecatepec (n=34), localizado en la Región de la Sierra Sur (16°17' N, 95°53' O) (figura 1). La selección de ejemplares se realizó tomando en cuenta las características fenotípicas descritas previamente por Fuentes-Mascorro y colaboradores (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2012), excluyéndose todos aquellos animales con parentesco. La extracción de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante la técnica modificada de Dissing (Dissing *et al.*, 1996) y la amplificación de fragmentos microsatélites se realizó siguiendo la técnica descrita por Martínez y colaboradores (Martínez *et al.*, 2004). En total se emplearon 24 marcadores microsatélites seleccionados del panel recomendado por la FAO/ISAG (FAO, 2007b). Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI377XL, utilizando el marcador Genescan 500-Liz size standard (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) como patrón de tamaño. La tipificación alélica de cada *locus* microsatélite se realizó con ayuda del software Genemapper (Applied Biosystems, Foster City CA, USA).

Los datos obtenidos en el genotipado se analizaron estadísticamente con los programas Arlequin v 3.1 (Excoffier *et al.*, 2007), Popgene v 1.32 (Yeh *et al.*, 1999), Genepop (Raymond & Rousset, 1995) y el complemento MSTools para Excel (Park, 2001). Se analizó la diversidad intra-raza calculando el número medio de alelos por *locus* (NMA), número efectivo de alelos (Ne), frecuencias alélicas, heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho). Se desarrolló el test de equilibrio Hardy-Weinberg y se estimó el estadístico F_{ST} de Wright (Weir & Cockerham, 1984) con un test de significancia ($p < 0.05$) empleando el programa FSTAT (Goudet, 1995).

La estructura poblacional y relaciones genéticas de los bovinos de Zimatlán y Ecatepec fueron analizadas empleando tres poblaciones bovinas de referencia (Retinto, Jersey, Brahman), cuyos genotipos fueron amablemente cedidos por el consorcio BioBovis (<https://biobovis.jimdo.com/>). Las poblaciones Brahman y Jersey fueron elegidas por ser razas especializadas comúnmente utilizadas en la región, mientras que la población Retinta fue empleada debido a su origen Ibérico. Se calculó la distancia genética de Nei (D_{ST}) (Nei, 1972) entre poblaciones usando el software POPTREE2 (Takezaki *et al.*, 2010). Las distancias obtenidas fueron usadas para construir un árbol filogenético mediante el método neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987), empleando un Bootstrap (n=1000) para testar la robustez del dendrograma. La estructura genética de las poblaciones bovinas fue evaluada con el software Structure versión 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), realizando el análisis bajo los siguientes parámetros: 200000 burn-in; 1000000 iteraciones. Finalmente, la estimación del K óptimo se realizó mediante el método Evanno (Evanno *et al.*, 2005) usando el software Struture Harvester Web v0.6.94 (Earl & vonHoldt, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La correcta identificación de las poblaciones de ganado criollo es uno de los puntos prioritarios en el desarrollo y conservación de los recursos zoogenéticos a nivel mundial (FAO, 2007a). En este sentido, el presente estudio se orientó hacia el análisis de la variabilidad y diferenciación

genética de dos poblaciones de bovinos criollos del estado de Oaxaca para esclarecer mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites que se trata de una sola población criolla separada geográficamente, a pesar de que la orografía característica del estado de Oaxaca, conformada por ejes neovolcánicos, sierras y cordilleras, ha dificultado la comunicación entre comunidades y como consecuencia el flujo de este tipo de ganado a lo largo del tiempo.

El estudio comprendió la toma de muestras de bovinos localizados en dos municipios geográficamente distantes, por lo que el análisis de la información se clasificó en dos grupos denominados Zimatlán y Ecatepec. Los 24 marcadores analizados resultaron polimórficos, detectándose un total de 134 alelos en los bovinos de Zimatlán, con una media de 5.58 ± 1.38 alelos por *locus* y de 169 en los bovinos de Ecatepec, con una media de 7.04 ± 1.97 alelos por *locus*. Cabe resaltar que los 24 microsatélites presentaron al menos cuatro variantes alélicas, lo que de acuerdo con los criterios propuestos por Barker (Barker, 1994), confirma que los 24 *loci* pueden ser utilizados para el análisis de la diversidad genética en cualquier población de bovinos presentes en el estado de Oaxaca.

El cálculo del número efectivo de alelos reveló una disminución en la diversidad alélica en ambos grupos, con una media de 3.25 ± 1.03 para los bovinos de Zimatlán y de 3.80 ± 1.42 para los bovinos de Ecatepec. Estos valores, tanto de número de alelos, como de número efectivo de alelos resultan bajos cuando se les compara con lo reportado por Martínez y colaboradores (2012) en su estudio de diversidad genética en 27 poblaciones de ganado bovino criollo del continente americano, quienes reportan una media de 14.21 ± 3.74 alelos por *locus* y un promedio de número efectivo de alelos de 4.08 ± 0.57 . Este dato que sugiere una pérdida de la variabilidad genética en los bovinos criollos de Oaxaca, lo que podría significar que probablemente esta población está sufriendo o ha sufrido una situación de cuello de botella. No obstante, se requieren de más análisis para confirmar esta hipótesis.

La prueba de equilibrio Hardy-Weinberg por *locus* analizado, reveló la presencia de dos *loci* desbalanceados en los bovinos de Zimatlán (HEL9, INRA35) y cuatro en los bovinos de Ecatepec (BM8125, HEL9, HAUT24, TGLA53). Por otro lado, el cálculo de los valores de heterocigosidad esperada (H_e) en los bovinos de Zimatlán arrojó una media de 0.6702 ± 0.0261 , oscilando entre 0.8371 (TGLA122) a 0.2745 (INRA35), mientras que en los bovinos de Ecatepec los valores de H_e oscilaron entre 0.8922 (TGLA53) a 0.3604 (INRA35), con una media estimada de 0.7123 ± 0.0240 . En lo que respecta al cálculo de heterocigosidad observada (H_o), los bovinos de Zimatlán mostraron un valor de H_o promedio de 0.6594 ± 0.0192 , variando entre 0.8846 (BM8125) a 0.2308 (INRA35). Por otra parte, en los bovinos de Ecatepec los valores de H_o por *locus* oscilaron entre 0.9394 (BM8125) a 0.3235 (INRA35), con una media de 0.6375 ± 0.0172 . Al comparar los datos de H_o obtenidos en el presente trabajo, con los reportados para otras poblaciones bovinas del mundo, se observó que los valores fueron superiores a los reportados por Chaudhari y colaboradores (Chaudhari *et al.*, 2009) en dos poblaciones bovinas autóctonas de la india: Kenkatha ($H_o= 0.470$) y Galao ($H_o= 0.535$). Sin embargo, fueron inferiores a lo reportado en cinco poblaciones bovinas nativas de China ($H_o: 0.69 - 0.76$) (Zhou *et al.*, 2005), y una población bovina nativa de Bulgaria ($H_o= 0.78$) por Teneva y colaboradores (Teneva *et al.*, 2005), así como a lo reportado por Martínez y colaboradores para las 27 poblaciones de bovinos criollos de América ($H_o= 0.7196 \pm 0.004$) (Martínez *et al.*, 2012). Al comparar los valores de diversidad genética obtenidos para las poblaciones Zimatlán y Ecatepec (Zimatlán: $N_e=3.25$, $H_e=0.670$, $H_o=0.659$; Ecatepec: $N_e=3.80$, $H_e=0.712$, $H_o =0.638$) con los reportados por los mismos autores en otro estudio de diversidad de bovinos criollos de México (Delgado *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2012), se observó que estos fueron inferiores en todos los casos (Criollo

Poblano: $N_e=4.67$, $H_e=0.774$, $H_o=0.693$; Criollo de Baja California: $N_e=4.18$, $H_e=0.760$, $H_o=0.742$; Criollo de Chihuahua: $N_e=4.33$, $H_e=0.777$, $H_o=0.719$; Criollo de Nayarit: $N_e=4.72$, $H_e=0.788$, $H_o=0.749$; Criollo de Chiapas: $N_e=4.77$, $H_e=0.782$, $H_o=0.741$). Estos datos sugieren que los bovinos criollos de Oaxaca presentan una variabilidad genética moderada, por lo que se requiere tomar medidas para determinar las posibles causas de la erosión genética y evitar una mayor pérdida de la diversidad del ganado bovino criollo de Oaxaca.

En lo que respecta al análisis de las relaciones genéticas de los bovinos criollos de Zimatlán y Ecatepec, esta se llevó a cabo mediante la estimación de la distancia genética en pares de poblaciones (Nei, 1972), utilizando como poblaciones de referencia dos razas de ganado bovino especializado y de distribución mundial: Jersey (*Bos taurus*) y Brahman (*Bos indicus*), y una población Ibérica (Retinto). El resultado del análisis reveló que la mayor cercanía se encuentra entre los dos grupos de bovinos criollos de Oaxaca, tal como puede observarse en la matriz de distancia genética presentada en la figura 2. Este primer dato sugiere que los dos grupos de bovinos criollos de Oaxaca, no ha logrado separarse genéticamente a pesar de la distancia geográfica existente entre ellos. Por otro lado, en lo que respecta a la relación de los bovinos criollos con las poblaciones de referencia utilizadas, se observó una menor distancia con el bovino Ibérico, coincidiendo con Martínez y colaboradores (2012), quienes mencionan que, a pesar de presentar diferencias entre poblaciones, los bovinos criollos latinoamericanos aun muestran una fuerte relación con sus ancestros Ibéricos.

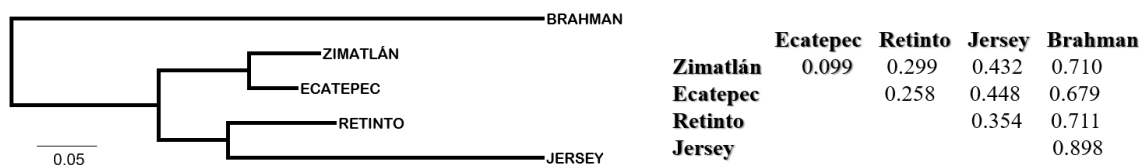


Figura 2. Dendrograma y matriz de distancias genéticas de Nei (*Dendrogram and Nei's genetic distance matrix*).

Para tener una perspectiva visual de las distancias genéticas entre poblaciones, se generó un dendrograma (figura 2) en el que se observa que los dos grupos de bovinos criollos de Oaxaca presentan la menor distancia entre pares de poblaciones, agrupándose dentro de un *cluster* que une a los bovinos de la subespecie *Bos taurus*, separados completamente de la única población *Bos indicus* utilizada en el presente estudio. La escasa distancia mostrada entre los dos grupos de bovinos criollos de Oaxaca, coincide con el valor de F_{ST} estimado (0.0226) significativo ($p=0.01$) entre estas poblaciones, lo que reafirma la existencia de una escasa diferenciación genética entre ambos grupos.

Finalmente se evaluó la estructura poblacional de los dos grupos de bovinos criollos de Oaxaca con ayuda del programa Structure y el posterior cálculo del K óptimo mediante el método Evanno. Los resultados revelaron la existencia de cuatro *clusters* (K4) de acuerdo con la estimación del K óptimo (figura 3), en los cuales el mayor porcentaje de los genomas de los bovinos de Zimatlán (95.6 %) y Ecatepec (91.7 %) se agrupan en un solo *cluster* de los cuatro generados por el método bayesiano (Figura 3), confirmando que los dos grupos de bovinos criollos de Oaxaca, son en realidad una sola población escasamente diferenciada.

El análisis de estructura poblacional también demostró que aún existe muy poca influencia del *Bos indicus* en los bovinos criollos de Oaxaca, probablemente por las condiciones geográficas de la zona, que han impedido la integración de los bovinos de razas exóticas cebuinas, poco

adaptadas al medio de la región, tal como lo habían sugerido previamente Pérez y Fuentes-Mascorro, quienes sugieren que al ser criados en libertad, los bovinos criollos se han adaptado a la geografía particular del estado, con pendientes que han actuado como barrera física para la introducción de ganado cebuino, los cuales suelen morir desbarrancados por no estar adaptados a estas condiciones geográficas (Pérez 2011; Fuentes-Mascorro y colaboradores. 2012).

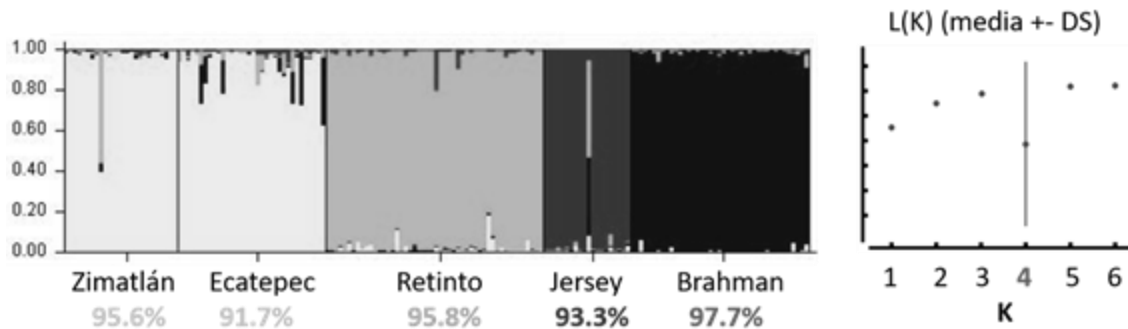


Figura 3. Proporción de animales de cada población predefinida en cada uno de los cuatro clusters estimados mediante el programa Structure y definidos por el método Evanno (*Proportion of animals of each pre-defined population in each of the four estimated clusters using the Structure software and defined by the Evanno method*).

CONCLUSIONES

El presente trabajo representa el primer estudio de diversidad genética y estructura poblacional del ganado bovino criollo de Oaxaca empleando marcadores moleculares microsatélites. Los resultados obtenidos muestran que los bovinos criollos de Oaxaca presentan un grado de variabilidad genética moderado, así como una estructura poblacional homogénea y perfectamente diferenciada de otras poblaciones, no existiendo diferenciación genética entre los bovinos de las dos regiones del estado evaluadas a pesar de su localización geográfica.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México para la realización del presente trabajo, el cual se llevó a cabo con fondos del Programa de Repatriación CONACYT.

BIBLIOGRAFÍA

- Barker J.S.F. 1994. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: *5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production* (ed. by Guelph Uo), pp. 501-8, Guelph and Ontario, Canada.
- Chaudhari M.V., Parmar S.N.S., Joshi C.G., Bhong C.D., Fatima S., Thakur M.S. & Thakur S.S. 2009. Molecular characterization of Kenkatha and Gaolao (*Bos indicus*) cattle breeds using microsatellite markers. *Animal Biodiversity and Conservation* 32, 71-6.
- Delgado J.V., Martínez A.M., Acosta A., Álvarez L.A., Armstrong E., Camacho E., Cañón J., Cortés O., Dunner S., Landi V., Marques J.R., Martín-Burriel I., Martínez O.R., Martínez R.D., Melucci L., Muñoz J.E., Penedo M.C.T., Postiglioni A., Quiróz J., Rodellar C., Sponenberg P., Uffo O., Ulloa-Arvizu R., Vega-Pla J.L., Villalobos A., Zambrano D., Zaragoza P., Gama L.T. & Ginja C. 2012. Genetic characterization of Latin-American Creole cattle using microsatellite markers. *Animal Genetics* 43, 2-10.

- Dissing J., Rudbeck L. & Marcher H. 1996. A Five Minute Procedure for Extraction of Genomic DNA from Whole Blood, Semen and Forensic Stains for PCR. In: *16th Congress of the International Society for Forensic Haemogenetics (Internationale Gesellschaft für forensische Hämo-genetik e.V.)*, Santiago de Compostela, 12–16 September 1995 (eds. by Carracedo A, Brinkmann B & Bär W), pp. 269-71. Springer Berlin Heidelberg.
- Earl D.A. & vonHoldt B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4, 359-61.
- Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611-20.
- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. 2007. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1, 0.
- FAO. 2007a. Plan de acción mundial sobre los recursos zoogenéticos y la declaración de Interlaken. Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura, Interlaken, Suiza.
- FAO. 2007b. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. Commission on genetic resources for food and agriculture, Rome.
- Fuentes-Mascorro G., Pérez Vargas E. & Carmona Medero M.A. 2012. Los bovinos criollos de Oaxaca y su importancia. In: *Emozología de recursos zoogenéticos. Oaxaca y Zulia* (ed. by ediciones A), Oaxaca, México.
- Goudet J. 1995. FSTAT (Ver. 2.3.9.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86, 485-6.
- Martínez A.M., Carrera M.P., Acosta J.M., Rodríguez-Gallardo P.P., Cabello A., Camacho E. & Delgado B.J.V. 2004. Genetic characterisation of the Blanca Andaluza goat based on microsatellite markers. *South African Journal of Animal Science* 34, 17-9.
- Martínez A.M., Gama L.T., Cañón J., Ginja C., Delgado J.V., Dunner S., Landi V., Martín-Burriel I., Penedo M.C.T., Rodellar C., Vega-Pla J.L., Acosta A., Álvarez L.A., Camacho E., Cortés O., Marques J.R., Martínez R., Martínez R.D., Melucci L., Martínez-Velázquez G., Muñoz J.E., Postiglioni A., Quiroz J., Sponenberg P., Uffo O., Villalobos A., Zambrano D. & Zaragoza P. 2012. Genetic Footprints of Iberian Cattle in America 500 Years after the Arrival of Columbus. *Plos One* 7, e49066.
- Nei M. 1972. Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist* 106, 283-92.
- Park S. 2001. Excel Microsatellite Toolkit v. 3.1. Animal Genomics Lab, University College, Dublin, Ireland.
- Pérez V.E. 2011. Caracterización zoométrica del bovino criollo en los municipios de San Pedro el Alto y Tequisistlán, Oaxaca. In: *Facultad de Estudios Superiores de Cuatitlán* p. 56. Universidad Autónoma de México, México.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155, 945-59.
- Raymond M. & Rousset F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-9.
- Saitou N. & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.
- Takezaki N., Nei M. & Tamura K. 2010. POPTREE2: Software for Constructing Population Trees from Allele Frequency Data and Computing Other Population Statistics with Windows Interface. *Molecular Biology and Evolution* 27, 747-52.
- Teneva A., Todorovska E., Tyufekchiev N., Kozelov A., Atanassov A., Foteva A., Ralcheva S. & Zlatarev S. 2005. Molecular characterization of Bulgarian livestock genetic resources 1. Genetic diversity in Bulgarian Grey Cattle as revealed by microsatellite markers. *Biotechnology in Animal Husbandry* 21, 35-41.
- Weir B.S. & Cockerham C.C. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* 38, 1358-70.
- Yeh F.C., Yang R.C., Mao J., Ye Z. & Boyle T.J.B. 1999. POPGENE, the Microsoft Windows-based userfriendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. (ed. by Resources DoR). University of Alberta, Edmonton, Alta.

Zhou G., Jin H., Zhu Q., Guo S. & Wu Y. 2005. Genetic diversity analysis of five cattle breeds native to China using microsatellites. *Journal of Genetics* 84, 77-80.