

COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS CAPN1-316 Y CAPN1-4751 DEL GEN DE LA CALPAINA EN TRES POBLACIONES DE GANADO CRIOLLO BOLIVIANO

Pereira J.A.C.^{1*}, Falomir-Lockhart A.H.², Loza A.¹, Villegas-Castagnasso E.E.²,
Rojas P.¹, Carino M.², Ripoli M.², Giovambattista G.²

¹Departamento de Genética. Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Facultad de Ciencias Veterinarias, Santa Cruz - Bolivia. *antonios8@hotmail.com.

²IGEVET. CONICET - La Plata. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias. La Plata - Argentina.

RESUMEN

La terneza de la carne está en parte determinada por el sistema proteico calpaína (*CAPNI*) / calpastatina (*CAST*). Bolivia posee en los llanos tres biotipos de ganado Criollo: los Yacumeños, los Chaqueños y los Saavedreños. El objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia alélica y genotípica del gen de la *CAPNI* en tres poblaciones de ganado Criollo de Bolivia. Se obtuvieron muestras de sangre de 28 Criollos del Chaco (CCH), 85 Criollos Yacumeños (CYA) y 30 Criollos Saavedreños (CSV). El ADN se extrajo utilizando el kit comercial Wizard[®] Genomic Purification, y posteriormente se tipificaron dos polimorfismos (*CAPNI-316* y *CAPNI-4751*) del gen *CAPN1* mediante el método ARMS-PCR. Las frecuencias alélicas y genotípicas, las heterocigosidades esperadas y observadas, así como, el índice F_{IS} y el desequilibrio de ligamiento (LD) fueron calculadas mediante los programas MS-Tools y Genepop. Las frecuencias de los alelos asociados a mayor terneza para las poblaciones de CCH, CYA y CSV fueron: 23%, 22% y 33 % para el alelo C del SNP *CAPNI-316* y 75%, 76% y 60% para el alelo C del *CAPNI-4751*. La heterocigosidad observada en las tres poblaciones se hallan en un rango de 0,30 a 0,46 para el marcador *CAPNI-316* y de 0,21 a 0,60 para el polimorfismo *CAPNI-4751*. Los resultados demuestran que los bovinos criollos en las poblaciones analizadas poseen altas frecuencias alélicas para las variantes asociadas a mayor terneza de la carne. Por otra parte, no se observaron valores significativos de LD ($P > 0,01$) entre los dos polimorfismos tipificados en las poblaciones estudiadas. Sería necesario tipificar ambos polimorfismos en futuros programas de selección asistida por marcadores genéticos.

Palabras clave: Marcadores genéticos; Estructura genética; Ganado Criollo; Terneza; Calpaína.

**COMPARISON OF ALLELIC AND GENOTYPIC FREQUENCIES OF THE
POLYMORPHISMS CAPN1-316 AND CAPN1-47151 OF THE CALPAIN GENE
AMONG THREE BOLIVIAN CRIOLLO CATTLE POPULATIONS**

ABSTRACT

Meat tenderness is in part determined by the calpain (*CAPN1*) / calpastatin (*CAST*) genes. In the lowlands of Bolivia, three well differentiated Creole cattle populations can be distinguished: the Yacumeños, Chaqueños and Saavedreños. The main objective of this research was to determine the allelic and genotypic frequencies of two polymorphisms of the calpain gene in three Creole cattle populations in Bolivia. Blood samples of 28 Creole cattle from Chaqueño cattle (CCH), 85 from Yacumeño cattle (CYA) and 30 from Saavedreño cattle (CSV) were collected. Total DNA was extracted using the commercial kit Wizard® Genomic Purification and subsequently two polymorphisms (*CAPN1-316* and *CAPN1-4751*) of the *CAPN1* gene were genotyped by the amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) method. Allelic and genotypic frequencies, expected and observed heterozygosities, the F_{IS} index and the magnitude of linkage disequilibrium (LD) were calculated using the software MS-Tools and Genepop. The allelic frequencies of variants associated with tenderness in the three populations CCH, CYA and CSV were 23%, 22% and 23% for the *CAPN1-316* and 75%, 76% and 60% for the *CAPN1-4751*. The observed heterozygosities in the three populations fluctuated between 0.30 and 0.46 for the *CAPN1-316* marker and between 0.21 and 0.60 for the *CAPN1-4751* marker. The results showed that the analysed populations of Creole cattle presented high frequencies of the alleles previously associated with tenderness in meat. The analysis of LD, however, did not show evidence of linkage between the two markers. It is necessary to perform a genetic analysis for both polymorphisms if included in future selection programs.

Keywords: Molecular markers; Genetic structure; Creole cattle; Tenderness; Calpain.

INTRODUCCIÓN

El bovino Criollo boliviano, es sin duda alguna, un recurso zoogenético de gran importancia para el sector ganadero (Vargas, 2012). Debido a la influencia de la cordillera de Los Andes, Bolivia posee tres regiones ecológicas muy marcadas: los valles, el altiplano y los llanos orientales. Estos últimos representan el 60% del territorio nacional y en ella se encuentra el 80% de la producción de ganado

bovino. En los llanos se encuentran tres biotipos de ganado Criollo. a) El Criollo Yacumeño seleccionado por más de 35 años en las pampas húmedas del departamento del Beni. Este ganado ha sido denominado por De Alba (2012) como el ganado ejemplo de “seleccionar sin contradecir la naturaleza”. Este autor, en base a datos fielmente registrados en el ganado Yacumeño concluye que es precoz, de maduración lenta pero de longevidad extrema. b) El Criollo Chaqueño evolucionó en territorios bolivianos con una precipitación de 400 mm de lluvia por año. Ganado que para producir y reproducirse utiliza recursos forrajeros arbóreos. Este ganado Criollo Chaqueño está muy bien adaptado a zonas subtropicales extremadamente secas (Wilkins, 1992). c) Por último, se encuentra el Criollo Saavedreño el cual es un Criollo seleccionado para doble propósito adaptado a zonas donde existen pasturas cultivadas y predominan los cultivos agrícolas de soya, maíz y girasol dando posibilidad utilizar como alimento del ganado residuos agroindustriales (Rivera, 2006). Independientemente de la región donde evolucionaron estos tres biotipos, todos han demostrado ser fértiles, rústicos y con buena mansedumbre. Estos atributos, deberían bastar para que sean la fuente principal de producción de carne en los llanos tropicales de Bolivia. Sin embargo, a partir de la segunda mitad el siglo pasado la población de ganado Criollo en Bolivia ha ido disminuyendo paulatinamente, cediendo su lugar al ganado cebuino, en especial a la raza Nelore. Si bien el Nelore ha demostrado tener buena ganancia de peso en base a pasturas en el medio tropical boliviano (Pereira y Calderón, 2002, Pereira *et al.*, 2006) su calidad de carne es considerada inferior al ganado de tipo europeo. Esto podría representar una ventaja para el ganado Criollo, el cual es un *Bos taurus*. La calidad de la carne posee varios componentes y está determinada por muchos factores (Carduza *et al.*, 2002, Robinson *et al.*, 2012, Vasquez *et al.*, 2007), además varios estudios han señalado que la terneza de la carne es uno de los que más influyen en las preferencias del consumidor final (Miller *et al.*, 1995, Koohmaraie *et al.*, 2002, Juszczuk-Kibiack *et al.*, 2008). La terneza esta en parte determinada por el complejo enzimático de calpaína (*CAPNI*) / calpastatina (*CAST*), dos enzimas que juegan un rol importante en la proteólisis del musculo en el proceso de maduración de la carne (Geesink *et al.*, 1999, Riley *et al.*, 2003, Koohmaraie *et al.*, 2005, Morris *et al.*, 2006). El objetivo del presente trabajo fue comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de dos polimorfismos de la *CAPNI*, el *CAPNI-316* y el *CAPNI-4751* en tres poblaciones pertenecientes a tres biotipos del ganado Criollo boliviano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de sangre de 28 Criollos del chaco (CCH), 85 Criollos Yacumeños (CYA) y 30 Criollos Saavedreños (CSV). Estas tres poblaciones son

consideradas como las predominantes en las zonas bajas de Bolivia. Se extrajo ADN utilizando el kit comercial Wizard® Genomic Purification Promega, WI, USA. Dos polimorfismos nucleótidos sencillos (SNPs) del gen calpaína: *CAPNI-316* (AF252504: g.5709 C>G) y *CAPNI-4751* (AF248054: g.6545 C>T), fueron tipificados para el presente estudio mediante el método ARMS-PCR diseñado por Rincón y Medrano (2006). Esta técnica utiliza un juego de cuatro primers en un único tubo de reacción. Dos de estos oligonucleótidos son alelo específico y amplifican en direcciones opuestas con cada uno de los restantes primers externos. Los genotipos pueden ser detectados directamente en un gel de electroforesis por presencia o ausencia de los productos de amplificación alelo específico. En lo que respecta a los SNPs el *CAPNI-316* se halla en el exón 9 y produce un cambio no-sinónimo de glicina por alanina, mientras que el *CAPNI-4751* se halla en el intrón 17. Las frecuencias alélicas y genotípicas, las heterocigosidades esperadas y observadas, así como, el índice F_{IS} y el desequilibrio de ligamiento (LD) fueron calculadas mediante los programas MS-Tools y Genepop (Raymond y Rousset, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla I y II se muestran los resultados de las frecuencias alélicas y genotípicas para los dos SNPs de la calpaína analizados en el presente trabajo.

Tabla I. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *CAPNI-316* del gen de la calpaína en el ganado Criollo Chaqueño, Yacumeño y Saavedreño en Santa Cruz, Bolivia (*Allelic and genotypic frequencies of the polymorphism CAPNI-316 of the calpain gene in Chaqueño, Yacumeño and Saavedreño Creole cattle in Santa Cruz, Bolivia*)

Población	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
	CC	CG	GG	C	G
Chaqueño	0,05	0,36	0,59	0,23	0,77
	CC	CG	GG	C	G
Yacumeño	0,05	0,35	0,60	0,22	0,78
	CC	CG	GG	C	G
Saavedreño	0,12	0,44	0,44	0,33	0,67

Las frecuencias alélicas encontradas para ambos polimorfismos relacionados a mayor ternesa de la carne fueron de 23% y 75% para el CCH, de 22% y 76% para el CYA y de 33% y 60% para el CSV para el *CAPNI-316* y *CAPNI-4751* respectivamente. Los resultados encontrados para el alelo C, el cual es considerado favorable en ambos polimorfismos estudiados, concuerdan con muchos de los

trabajos realizados en ganado *B. taurus* (Page *et al.*, 2004, Corva *et al.*, 2007, Bonilla *et al.*, 2010, Allais *et al.*, 2011).

Tabla II. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *CAPNI-4751* del gen de la calpaína en el ganado Criollo Chaqueño, Yacumeño y Saavedreño en Santa Cruz, Bolivia (*Allelic and genotypic frequencies of the polymorphism CAPNI-4751 of the calpain gene in Chaqueño, Yacumeño and Saavedreño Creole cattle in Santa Cruz, Bolivia*)

Población	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
	CC	CT	TT	C	T
Chaqueño	0,56	0,38	0,06	0,75	0,25
	CC	CT	TT	C	T
Yacumeño	0,58	0,37	0,05	0,76	0,24
	CC	CT	TT	C	T
Saavedreño	0,36	0,48	0,16	0,60	0,40

Sin embargo, debido al largo proceso de diferenciación entre ambas líneas de bovinos (europeos y criollos) es importante comparar las frecuencias alélicas halladas en este estudio con trabajos realizados en otras poblaciones de ganado Criollo Sudamericano. Cuetia *et al.* (2011, 2012) estudiaron 10 grupos de ganado Criollo colombiano y obtuvieron un rango de 0,096% (Criollo Caqueteño) a 0,44% (Criollo Blanco Ojinegro) para el polimorfismo *CAPNI-316*, dando una frecuencia alélica promedio de 0,21% en los todos los grupos estudiados. El Promedio para el alelo C del polimorfismo *CAPNI-4751* para los 10 grupos reportados por el mismo autor fue de 0,55% con un rango de 0,33% en ganado Blanco Ojinegro a 0,80% en el ganado Lucerna. Los valores medios para ambos polimorfismos concuerdan con los reportados en el presente estudio demostrando la consistencia de las frecuencias para estos polimorfismos en ganado Criollo en Sudamérica. Los polimorfismos *CAPNI-316* y *CAPNI-4751* que han sido previamente asociados a mayor ternera presentaban una mayor frecuencia alélica en las poblaciones de bovinos Criollos estudiadas en el presente estudio con respecto al ganado cebú existente en Bolivia. Estudios realizados por Morales *et al.* (2013) en ganado Brahman en Bolivia encontraron una frecuencia alélica de 0% para el *CAPNI-316* y de 14% para el *CAPNI-4751*, mientras que Suzano *et al.* (2013) que trabajo en ganado Nelore encontró una frecuencia alélica de 10% para el *CAPNI-316* y 2% para el *CAPNI-4751*. Con respecto a las frecuencias genotípicas, la tabla I indica que en el CCH está frecuencia fue de 0,05% para el homocigoto CC, 0,36% para el heterocigoto (CG) y de 0,59% para el homocigoto GG. Cuando se comparan estos resultados con el CYA se observa mucha similitud, siendo las frecuencias

genotípicas encontradas para el CYA de 0,05 % para el homocigoto CC, 0,35% para el heterocigoto y de 0,60% para el homocigoto GG. Por último se observó que estas frecuencias genotípicas, que fueron muy parecidas para el CCH y CYA, difieren algo con respecto al ganado CSV. Las frecuencias genotípicas encontradas en el ganado CSV para el *CAPNI-316* fueron de 0,12% para el homocigoto CC, 0,44% para el heterocigoto y de 0,44% para el homocigoto GG. La tabla II indica las frecuencias genotípicas para el *CAPNI-4751* los patrones encontrados son similares en los tres biotipos, las frecuencias genotípica para el CCH y CYA fueron similares y ligeramente diferentes al CSV. En lo que respecta a la heterocigosidad esperada (h_e) y observada (h_o) para el polimorfismo *CAPNI-316* el presente estudio no mostró diferencias estadística ($P > 0,05$) entre las tres poblaciones de ganado Criollo, encontrándose estas poblaciones en equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo, para el polimorfismo *CAPNI-4751* se encontraron diferencias estadísticas con respecto a las proporciones teóricas ($P < 0,05$) para las poblaciones CCH y CYA (ver tabla III y IV).

Tabla III. Número de alelos (n_a), heterocigosidad esperada (h_e), observada (h_o) y estadístico F_{IS} estimado para el polimorfismo *CAPNI-316* del gen de calpaína en el ganado Criollo Chaqueño, Yacumeño y Saavedreño en Santa Cruz, Bolivia (*Allelic number (n_a), expected (h_e) and observed (h_o) heterozygosity and F_{IS} statistic of the polymorphism CAPNI-316 of the calpain gene in Chaqueño, Yacumeño and Saavedreño Creole cattle in Santa Cruz, Bolivia*)

Población	Muestras	n_a	h_e	h_o	Fis	Significación (P)
Chaqueño	28	2	0,36	0,31	0,15	0,57
Yacumeño	85	2	0,35	0,39	-0,13	0,34
Saavedreño	30	2	0,45	0,46	-0,03	1,00

P (<0,05)

Tabla IV. Número de alelos (n_a), heterocigosidad esperada (h_e), observada (h_o) y estadístico F_{IS} estimado para el polimorfismo *CAPNI-4751* del gen de calpaína en el ganado Criollo Chaqueño, Yacumeño y Saavedreño en Santa Cruz, Bolivia (*Number of alleles (n_a), expected (h_e) and observed (h_o) heterozygosity and F_{IS} statistic of the polymorphism CAPNI-4751 of the calpain gene in Chaqueño, Yacumeño and Saavedreño Creole cattle in Santa Cruz, Bolivia*)

Población	Muestras	n_a	h_e	h_o	Fis	Significación (P)
Chaqueño	28	2	0,38	0,21	0,44	0,03
Yacumeño	85	2	0,37	0,45	-0,25	0,03
Saavedreño	30	2	0,48	0,60	-0,23	0,26

P (<0,05)

El valor F_{IS} para el ganado CCH, CYA y CSV para el polimorfismo *CAPNI-316* fue de 0,15, -0,13 y -0,03, respectivamente. Mientras que para el *CAPNI-4751* estos valores fueron de 0,44 para el CCH, -0,25 para el CYA y -0,023 para el CSV. Estos valores demuestran que en el CCH se detectaron una mayor cantidad de animales homocigotos mientras que en las otras dos poblaciones sucede lo contrario. Por último, el estudio del LD no mostro diferencia significativa ($P>0,01$) con respecto a los dos polimorfismos, lo que implica que ambos polimorfismos se segregan independientemente.

CONCLUSIONES

Se observaron altas frecuencias alélicas de las variantes que han sido asociados a mayor terneza de la carne en las tres poblaciones de Criollo estudiadas. Esto podría ser considerado como una ventaja a ser aprovechada por los procesos de selección dentro de esta raza, sin dejar de trabajar en los múltiples factores que permiten obtener carne con más terneza. Por otra parte, el análisis del LD no mostró diferencias significativas en las poblaciones estudiadas, por lo que sería necesario tipificar ambos polimorfismos en futuros programas de selección asistida por marcadores genéticos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Fondo Argentino de Cooperación Sur-Sur y Triangular (FO.AR.) que auspicia el proyecto FO.AR. 6286, al Proyecto de Ganado Criollo del Centro de Investigación Agrícola Tropical dependiente de la Gobernación del Departamento de Santa Cruz, al Proyecto de Conservación de Ganado Criollo Yacumeño perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma Gabriel René Moreno y a los productores de Ganado Criollo del Chaco del Departamento de Santa Cruz – Bolivia.

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* 99, 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. & Irueta 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 ternera 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 alelica 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 genético 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).