

# BIODIVERSIDAD GENÉTICA EN BOVINOS CRIOLLOS DEL URUGUAY. ANÁLISIS CON MARCADORES MOLECULARES

## GENETIC BIODIVERSITY IN URUGUAYAN CREOLE CATTLE. ANALYSIS WITH MOLECULAR MARKERS

Postiglioni, A.<sup>1</sup>, G. Rincón<sup>1</sup>, L. Kelly<sup>1</sup>, S. Llambí<sup>1</sup>, G. Fernández<sup>1</sup>, M. D'Angelo<sup>1</sup>, G. Gagliardi<sup>1</sup>, J. Trujillo<sup>1</sup>, M. de Bethencourt<sup>1</sup>, K. Guevara<sup>1</sup>, A. Castellano<sup>2</sup> y M.V. Arruga<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Área Genética. Laboratorio de Análisis Genéticos de Animales Domésticos. Avda. A. Lasplace, 1550. C.P. 11600. Facultad Veterinaria. UDELAR. Uruguay. Mailto: alipos@adinet.com.uy

<sup>2</sup>Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular. Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza. Facultad de Veterinaria. Zaragoza. España.

### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Conservación. Raza introducida. Marcadores genéticos.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Conservation. Introduced breed. Genetic markers.

### RESUMEN

Los bovinos Criollos del Uruguay constituyen una reserva genética de alrededor de 1000 animales, ubicada al sureste del país en un ecosistema de montes serranos. Su caracterización genética se ha abordado principalmente con marcadores cromosómicos, inmunológicos, moleculares, permitiendo analizar su grado de variación y relación con razas Criollas de la región e iberoamericanas. Los resultados preliminares han permitido considerarla un recurso cuya diversidad genética se ha mantenido por la presión de la selección natural. Se ha demostrado: a) ausencia de marcadores característicos de raza cebú (*Bos indicus*); b) presencia de translocación heterocigota rob 1/29; c) presencia de fenogrupos del sistema B descritos en razas iberoamericanas. Los análisis de variabilidad genética y su comparación con reservas de la región e iberoamericanas se realizaron con los siguientes fragmentos genómicos: a) secuencias codificantes para proteínas de la leche y suero ( $\kappa$ -CN,  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA); b) secuencias codificantes para el complejo

de histocompatibilidad BoLa (DBR3); c) secuencias repetidas de dinucleótidos; microsatélites (CYP21, BM2113); d) secuencias dispersas al azar en el genoma, RAPDs. Para estos marcadores, la población se encuentra en equilibrio génico, presentando una heterocigosidad esperada de  $He = 0,8$ .

Mediante la técnica de RAPD se realiza un estudio comparativo entre bovinos Criollos, Holando Uruguayo, Hereford y bovinos de isla Gran Canaria, obteniéndose una mayor similitud entre Holando y Hereford que entre éstos y el Criollo. Se demuestra un alto porcentaje de genoma compartido entre el Criollo Uruguayo y el de isla Gran Canaria (0,72). Estos resultados permiten considerarla una reserva genética promoviendo su conservación *in situ* como especie domesticada (*Bos taurus*) de alto valor económico. Esta conservación genética se debe realizar en aquel entorno en que han desarrollado potencialmente sus propiedades específicas (rusticidad, alta fertilidad, longevidad).

## SUMMARY

Uruguayan Creole cattle constitute a genetic resource of around 1000 animals. They inhabit ecosystems with autochthonous bushes located southeast of our country. Their genetic characterization has been performed using chromosome, immunogenetic and molecular markers. Genetic variation and relationship with other Creole and Iberian breeds were evaluated. The genetic diversity of this animal resource have been maintained mainly by natural selection pressure. It has been demonstrated : a) absence of specific markers of cebuins breeds (*Bos indicus*); b) presence of heterozygous translocation rob 1/29; c) presence of B system phenogroups found in iberoamerican breeds. Breed genetic variability comparison were carried out with the following genomic fragments: a) encoding sequences of milk and serum proteins; b) encoding sequences of histocompatibility complex; c) repetitive sequence of dinucleotides; microsatellites (CYP21; BM2113); d) random amplified polymorphic DNA (RAPD). The existence of H-W equilibrium and an expected heterozygosity ( $H_e$ ) value of 0.8 were shown. RAPD technique was performed to compare Uruguayan Creole cattle with Holando-Uruguayo, Hereford and Great Canaria island cattle breeds. The highest genome similarity was observed between Holstein-Friesian and Hereford breeds, rather than these breeds and Creole cattle. A high percentage of the bovine genome was shared among Uruguayan Creole and Great Canaria island cattle (0.72). These results permitted to consider the Uruguayan Creole cattle as a genetic resource, promoting its *in situ* conservation as a domesticated specie (*Bos taurus*) with a high economic value. The genetic conservation should be carried out in their natural habitat where they potentially manifest their particular features (rusticity, high fertility, longevity).

## INTRODUCCIÓN

La conservación de la diversidad

genética se refiere a la protección de especies, ecosistemas, y a aquellas propuestas que perfilan un desarrollo sostenible. La conservación *in situ* de especies domesticadas pretende mantener los entornos en donde éstas han desarrollado sus propiedades específicas, siendo de particular interés la búsqueda de aquellas variantes alélicas ocultas producto del proceso de la domesticación (Glowka y Burhenne, 1994; De Vicente y Tanksley, 1993).

Los primeros vacunos introducidos en América datan del segundo viaje de Cristóbal Colón (siglo XV). Diversas razas que habitaban en los alrededores de Sevilla (Berrenda, Retinta, Negra Andaluza, Casere) desembarcaron en la isla La Española dando lugar a una progresiva distribución de los bovinos en el nuevo continente (Primo, 1992). En Uruguay, la introducción de vacunos fue realizada entre los años 1611 y 1620. Más tarde, a fines del siglo XIX y principios del XX, diferentes razas comerciales (Holstein-Friesian, Hereford, Aberdeen Angus, Jersey, Normando y Charolais) fueron introducidas a nuestro país estableciéndose un proceso de introgresión genética (cruzamiento absorbente) frente al primitivo Criollo. Actualmente, existe una reserva genética de alrededor de 1000 animales ubicada al sureste del país (Depto. de Rocha), en región fronteriza con Brasil (Río Grande do Sud) perteneciente a los Servicios de Parque del Ejército (SE.PA.E). Esta ocupa un ecosistema natural (sierras rocosas, montes indígenas, arroyos), caracterizándose por su variabilidad en la coloración y distribución de manchas en su pelaje, cuernos en forma de lira, que los asemeja a sus ancestros

## MARCADORES MOLECULARES EN BOVINOS DEL URUGUAY

ibéricos. Recientemente, se han realizado estudios étnicos con análisis de faneras (forma de cuernos, coloración de capa, pigmentación de mucosas y pezuñas) que han demostrado la existencia de los siguientes tipos de pigmentación: 53,5 p.100 pigmento castaño; 38,6 p.100 pigmento blanco y 7,9 p.100 pigmento negro, con 10 variaciones para el pigmento castaño, nueve para el blanco y dos para el negro (Fernández *et al.*, 2001).

Esta población se ha mantenido aislada alrededor de 55 años en condiciones similares a las que existían en la Banda Oriental. Según el libro *Restauración de las Fortalezas. La formación de sus parques* (Arredondo, 1955), el origen de la población de bovinos Criollos del Uruguay (BCU) proviene de animales encontrados en las sierras

de Aiguá, cerca de *La Coronilla* (Depto. de Maldonado) y de Arroyo Malo (Depto. de Treinta y Tres), regiones limítrofes del suroeste del Brasil.

Frente a una serie de resultados generados de investigaciones del Área Genética (Postiglioni *et al.*, 1995; 1996; Gagliardi *et al.*, 1998) se establece un Convenio entre el SE.PA.E. y las Áreas de Genética y Mejoramiento Genético Animal de la Facultad de Veterinaria.

Con el propósito de conocer su caudal genético y aplicarlo a una caracterización y conservación *in situ* como especie domesticada de gran valor económico, se desarrollan investigaciones basadas en marcadores cromosómicos, inmunológicos, moleculares. En este trabajo se resumen las evidencias



**Figura 1.** Metafases somáticas de bovinos Criollos del Uruguay. (Somatic Metaphases In Uruguayan Creole cattle).

a) Metafase de hembra con translocación heterocigota 1/29 ( $2n=59/rob1;29$ ).

b) Metafase de macho. Se observa cromosoma sexual Y de morfología submetacéntrica, característico de la especie *Bos taurus*.

acerca de la caracterización genética de la reserva uruguaya de bovinos Criollos (BCU), demostrando su conservación como recurso sustentable de especie domesticada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### MARCADORES CROMOSÓMICOS

Se realizó un muestreo al azar de 99 animales para control de cariotipo. Se utilizó la técnica estándar de cultivo linfocitario para bovinos. Los resultados indicaron la presencia de un cromosoma Y, tipo submetacéntrico en todos los machos analizados (**figura 1**). Esta morfología del cromosoma sexual Y, se utiliza como marcador de especie (*Bos taurus*), ya que el cariotipo de *Bos indicus* se define por un cromosoma Y acrocéntrico (Kieffer y Cartwright, 1968). Se encontraron familias (madre/cría) que presentaron la siguiente fórmula cromosómica:  $2n=59/rob(1;29)$  (**figura 1**), siendo esta translocación robertsoniana de tipo monocéntrica al tratamiento con bandedo C (Postiglioni *et al.*, 1995; 1996). Estos resultados coinciden con aquellos descritos para bovinos Criollos venezolanos (Muñoz *et al.*, 1995) y encontrada en posibles razas ancestrales ibéricas (Retinta, Berrenda, Andalucía), por lo que se considera un marcador cromosómico en estudios de conservación (Arruga *et al.*, 1987; Rangel-Figueroa e Iannuzzi, 1991).

### MARCADORES INMUNOLÓGICOS

Se realizó un muestreo al azar de 46 animales para determinación de grupos sanguíneos los que fueron comparados con razas Criollas americanas e

ibéricas. Este se analizó sobre 43 reactivos pertenecientes a 8 sistemas de grupos sanguíneos (A, B, C, F, J, L, S, Z). Se obtuvieron 21 fenogrupos (alelos) en el sistema B de los cuales 5 fueron específicos de la población en estudio; 12 fenogrupos se comparten con otras razas Criollas y 4 estuvieron presentes en razas ibéricas. El factor Z' del sistema A, es reconocido como un marcador de cebuinos. Su ausencia en BCU potencia lo descrito anteriormente en relación a la ausencia de un cromosoma Y acrocéntrico, descartando la posible introducción del genoma de *Bos indicus* en esta reserva (Gagliardi *et al.*, 1998)

### MARCADORES MOLECULARES DE SECUENCIAS CODIFICANTES

#### *Proteínas de la leche y suero. ( $\kappa$ -CN, $\beta$ -LG, $\alpha$ -LA)*

El análisis de variantes alélicas de estas proteínas en ambos sexos, se realizó por la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), complementada por digestión con las siguientes enzimas de restricción: HinfI ( $\kappa$ -CN), HaeIII ( $\beta$ -LG), MnlI ( $\alpha$ -LA) a los efectos de identificar mutaciones puntuales en los fragmentos génicos de las respectivas proteínas lácteas (Medrano *et al.*, 1990a, b; Bleck y Bremel, 1993). La PCR/RFLP se realizó sobre 82 muestras tomadas al azar de la reserva. El ADN se aisló de acuerdo a la técnica de John *et al.*, (1991). Se calcularon frecuencias alélicas y genotípicas para cada uno de los *loci* realizándose la prueba de  $\chi^2$  ( $p > 0,05$ ) para estimar el equilibrio génico poblacional (**tabla I**).

Los datos indican equilibrio génico,

MARCADORES MOLECULARES EN BOVINOS DEL URUGUAY

**Tabla I.** Distribución de frecuencias génicas y genotípicas de proteínas lácteas en bovinos Criollos del Uruguay. (Genic and genotypes frequencies of milk proteins in Uruguayan Creole cattle).

Proteínas lácteas	Frecuencias génicas		Frecuencias genotípicas			$\chi^2$
	Alelo A	Alelo B	AA	AB	BB	
$\kappa$ -caseína	0,51	0,49	0,26	0,50	0,24	0,05 p>0,80
$\beta$ -lactoglobulina	0,49	0,51	0,24	0,50	0,26	0,057 p>0,80
$\alpha$ -lactoalbúmina	0,28	0,72	0,07	0,40	0,53	0,124 p>0,20

con superioridad de heterocigotas ( $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -lactoglobulina), a diferencia de lo que se puede observar en razas bovinas sujetas a una intensa presión de selección (Postiglioni *et al.*, 1998a, 2000). Golijow *et al.* (1996) también encuentran dos variantes alélicas para la  $\kappa$ -caseína en diferentes poblaciones de bovinos Criollo Argentino (BCA), pero éstas divergen en su distribución entre los diferentes planteles. La heterogeneidad genética observada entre las subpoblaciones argentinas se explicaría por el tamaño finito poblacional, la deriva genética o selección, el tipo de apareamientos en la población. En la reserva de BCU la distribución de las frecuencias alélicas se mantienen por superioridad de los heterocigotas (50 p.100), siendo similar a la de ciertos planteles argentinos (Golijow *et al.*, 1996).

En relación a la  $\alpha$ -LA, los BCU no tienen fijado el alelo B como se describe (Bleck y Bremel, 1993) en otras razas de bovinos lecheros (Simmental, Charolais, Brahman, Jersey). La frecuencia del alelo A, resultó similar a la raza Holstein-Friesian (32 p.100) y a la descrita (Postiglioni *et al.*, 2000) en Holando-Urugayo (27 p.100). La presencia de dicho alelo en la población

se podría deber a la existencia de portadores (40 p.100).

**Sistema de histocompatibilidad mayor (BoLA). Gen DRB3**

Este es un gen altamente polimórfico habiéndose descrito hasta el presente 63 alelos (Van Eijk *et al.*, 1992 y Davies *et al.*, 1996). Se encuentra ubicado en el cromosoma 23 ligado al microsatélite CYP21.

Para su estudio se utilizó una mues-

**Tabla II.** Distribución de frecuencias alélicas del gen BoLA-DRB3.2 en bovinos Criollos del Uruguay. (Distribution of allelic frequencies of gen BoLA DRB3.2 in Uruguayan Creole cattle).

DRB3.2 PCR-RFLP	Patrones de corte: Rsal-BstYI-HaeIII	Frecuencias génicas
02	bba	0,038
10	fba	0,115
15	iba	0,115
16	jbd	0,231
18	lbf	0,115
20	lbb	0,077
25	oaa	0,038
36	lba	0,115
44	kbi	0,038

**Tabla III.** Frecuencias genotípicas y heterocigosidad esperada de microsatélites en bovinos Criollos del Uruguay. (Genotype frequencies and expected heterozygosity of microsatellites in Uruguayan Creole cattle).

CYP 21	BM2113
A = 0,07	A = 0,23
B = 0,14	B = 0,03
C = 0,23	C = 0,03
D = 0,18	D = 0,13
E = 0,17	E = 0,37
F = 0,07	F = 0,23
G = 0,04	
H = 0,04	
I = 0,02	
J = 0,01	
He = 0,8527	He = 0,739

tra de 13 animales seleccionados al azar. Se aplicó la metodología PCR/RFLP (semianidado), con las siguientes enzimas de restricción: RsaI, BstYI, HaeIII. Los resultados (**tabla II**) han mostrado una variación de 9 tipos entre los 13 animales analizados (Kelly *et al.*, 2000) de los cuales, 6 resultaron comunes a los descritos en BCA. Giovambattista, *et al.* (1996) estudiaron 194 BCA pertenecientes a 7 plantales, habiendo encontrado 21 tipos de los 63 ya descritos. La identificación de 9 tipos en los 13 bovinos BCU analizados, donde 3 de ellos no son compartidos con BCA, es un indicador que potencia la variación independiente de la reserva de BCU, frente a la de BCA.

#### MARCADORES MOLECULARES DE SECUENCIAS REPETIDAS

Se utilizaron secuencias de dinu-

cleótidos altamente polimórficos (CYP21, BM2113). El CYP21 es un MS que pertenece a un intrón del gen que codifica para la *steroid 21 hidroxylase* ubicado en el cromosoma 23. Se han descrito 19 alelos para diferentes razas bovinas (Usha *et al.*, 1995). El BM2113 es otro MS ubicado en el cromosoma 2 del bovino habiéndose descrito 11 alelos (Sunden *et al.*, 1993). La heterocigosidad esperada, demostrada para estos microsatélites correspondió a  $He = 0,8$  con una variación alélica de 10 y 6 respectivamente (**tabla III**) (Postiglioni *et al.*, 1998b).

#### MARCADORES MOLECULARES DE SECUENCIAS DISTRIBUIDAS AL AZAR (RAPDs)

La técnica de PCR-RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) ha permitido determinar patrones de amplificación genómica característicos de la reserva BCU, los que fueron comparados con razas comerciales del Uruguay (Holando, Hereford) mediante el cálculo de bandas compartidas (BSF). La proporción mayor de bandas se encontró entre Holstein-Friesian y Hereford (0,81), estableciéndose una menor variación genética entre éstos que entre Hereford/Criollo (0,77) (Rincón *et al.*, 1998, 2000a). Además, se han incorporado bovinos de isla Gran Canaria siendo las BSF indicadores de que estas razas comparten un alto porcentaje de su genoma (0,72) (Rincón *et al.*, 2000b).

En *síntesis*, la reserva genética de BCU ha demostrado poseer:

- pigmentación basal: castaño, blanco y negro.
- translocación heterocigota 1/29, como marcador cromosómico.

## MARCADORES MOLECULARES EN BOVINOS DEL URUGUAY

- ausencia de cromosoma Y, específico de *Bos indicus*.

- variabilidad genética basada en marcadores moleculares de tipo I y II, con Heterocigosidad esperada de media a alta.

- patrones genómicos propios, diferencias entre su estructura genómica y las de razas sintéticas del Uruguay, bandas compartidas con razas ibero-americanas.

Estos resultados permiten considerarla una reserva genética promoviendo su conservación *in situ* como especie domesticada (*Bos taurus*) de alto valor económico. Esta conservación

genética se debe realizar en aquel entorno en que han desarrollado potencialmente sus propiedades específicas (rusticidad, alta fertilidad, longevidad).

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Sra. Iris Hernández, funcionaria del Laboratorio por la colaboración en la preparación del material. El trabajo fue financiado por UDELAR (CSIC), Facultad de Veterinaria (CIDEA), Proyecto P022/94, BID/CONICYT.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arredondo, H. 1955. Los planteles Criollos. En: La restauración de las fortalezas. La formación de sus parques. *Biblioteca Ejército Nacional*.
- Arruga, M.V. e I. Zarazaga. 1987. La translocación Robertsoniana 1/29 en el Ganado vacuno. Su incidencia en las razas vacunas españolas. *Genét. Ibér.*, 39: 61-75.
- Bleck, G.T. and R.D. Bremel. 1993. Sequence and single-base polymorphisms of the bovine  $\alpha$ -lactalbumin 5' flanking region. *Gene*, 126: 213-218.
- Davies, C.J., L. Andersson and S.A. Ellis. 1996. Nomenclature for factors of the BoLA system. 1996 report of the ISAG BoLA nomenclature Committee. *Anim. Genet.*, 28: 159-193.
- De Vicente, M.C. and S.D. Tanksley. 1993. QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. *Genetics*, 134: 585-586.
- Fernández, G., M. Rodríguez, C. Silveira y C. Barba. 2001. Estudio étnico de los bovinos Criollos del Uruguay: II. Análisis de las faneras. *Arch. Zootec.*, 50: 119-124.
- Gagliardi, R., L. Kelly, M. D'Angelo y A. Postiglioni. 1998. Comparación de los bovinos Criollos del Uruguay con razas ibéricas y americanas. *VI Congreso Nacional de Veterinaria y I Congreso de especialistas en Pequeños Animales. Uruguay*.
- Giovambattista, G., C.D. Golijow, F.N. Dulout and M.M. Lojo. 1996. Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. *Anim. Genet.*, 27: 55-56.
- Glowka, L. and F. Burhenne. 1994. A Guide to the Convention on Biological Diversity. IUCN. *The World Conservation Union*.
- Golijow, C.D., G. Giovambattista, M. Poli, F.N. Dulout and M.M. Lojo. 1996.  $\kappa$ -casein gene frequencies support subdivision and historical origin of Argentine Creole cattle (1996). *Brazilian Journal of Genetics*, 19: 583-586.
- John, S.W., M. Weitzner, R. Rozen and C.R. Sriver. 1991. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Research*, 19: 408.
- Kelly, L., M. D'Angelo, G. Giovambattista, R. Gagliardi, G. Rincón y A. Postiglioni. 2000. Estudio de los polimorfismos del gen BoLA DRB3.2 en bovinos Criollos del Uruguay. *XXI Congreso Mundial de Buiatría*. 10100/537 (pu-

- blicación virtual: CD).
- Kieffer, N. and T. Cartwright. 1968. Sex chromosome polymorphism in domestic cattle. *J. Hered.*, 59: 34-36.
- Medrano, J.F. and E. Aguilar-Córdova. 1990a. Genotyping of bovine Kappa-Casein *loci* following DNA sequence amplification. *Biotechnology*, 8: 144-146.
- Medrano, J.F. and E. Aguilar-Córdova. 1990b. Polymerase Chain reaction amplification of bovine  $\beta$ -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Animal Biotechnology*, 1: 73-77.
- Muñoz, M.G., D. Ocanto, M.L. Maddriz, R. Medina and O. Veray. 1995. Incidence of 1/29 translocation in Venezuelan Creole pure and crossbreed cows used in reproductive programs. *Theriogenology*, 43: 1055-1060.
- Postiglioni, A., P. Mones and R. Gagliardi. 1995. Robertsonian translocation heterocygote in Uruguay Criollo cattle. *XI Congreso Brasileiro de Reproducao Animal*. pp.258.
- Postiglioni, A., S. Llambí, R. Gagliardi and M. de Bethencourt. 1996. Genetic Characterization of a Sample of Uruguayan Creole Cattle. I. Cytogenetic Characterization of a Sample of Uruguayan Creole Cattle. *Arch. Zootec.*, 45: 209-213.
- Postiglioni, A., G. Rincón, L. Kelly, M. D'Angelo, R. Gagliardi and D. de Andrés Cara. 1998a. Genetic Characterization of a Sample of Uruguayan Creole Cattle. II. Genetic variation in a Sample of Uruguayan Creole Cattle. Primer Congreso de Recursos Genéticos en Animales Domésticos. S.E.R.G.A. Córdoba, España. *Arch. Zootec.*, 47: 259-266.
- Postiglioni, A., G. Rincón, S. Llambí, L. Kelly, M. D'Angelo y M.V. Arruga. 1998b. Análisis de la estructura genética de los bovinos Criollos del Uruguay. Su relación con razas ibero-americanas. *XVI PANVET 98*. TL.b116, pp.262.
- Postiglioni, A., G. Rincón, J. Barrera, L. Kelly, S. Llambí y J. Trujillo. 2000. Distribución diferencial de variantes alélicas de proteínas lácteas ( $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina) en razas bovinas del Uruguay. *XXI Congreso Mundial de Buiatría*. 10100/489 (publicación virtual: CD).
- Primo, A.T. 1992. El ganado bovino ibérico en las Américas: 500 años después. *Arch. Zootec.*, 41: 421-432.
- Rangel-Figueiredo, T. and L. Iannuzzi. 1991. A cattle breed close to 58 diploid number due to high frequency of rob (1:29). *Hereditas*, 115: 73-78.
- Rincón, G. y A. Postiglioni. 1998. Variabilidad genómica en bovinos Criollos del Uruguay basados en marcadores de ADN polimórficos amplificados al azar (PCR- RAPD's). *XVI PANVET 98*. TL.b117, pp. 262.
- Rincón, G., M. D'Angelo, R. Gagliardi, S. Llambí and A. Postiglioni. 2000a. Genomic polymorphism in Uruguayan Creole cattle using RAPD and microsatellite markers. *Research in Veterinary Science*, 69: 171-174.
- Rincón, G., A. Postiglioni, S. Llambí, A. Castellano y M.V. Arruga. 2000b. Caracterización poblacional entre diferentes razas bovinas (Hereford, Holando Uruguayo, Criollo Uruguayo y Criollo de Isla Gran Canaria) con marcadores RAPD. *XXI Congreso Mundial de Buiatría*. 530.034.10100/530 (publicación virtual:CD).
- Sunden, S.L.F., R.T. Stone, M.D. Bishop, S.M. Kappes, J.W. Keele and C.W. Beattie. 1993. A highly polymorphic bovine microsatellite *locus*: BM2113. *Animal Genetics*, 24: 69.
- Usha, A.P., S.P. Simpson and J.L. Williams. 1995. Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Anim. Genet.*, 23: 483-496.
- Van Eijk, M.J.T., J.A. Stewart-Haynes and H.A. Lewin. 1992. Extensive polymorphism of BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics*, 23: 483-96.