

# POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA KAPPA-CASEÍNA EN GANADO CRIOLLO LIMONERO

## Genetic Polymorphism of Kappa-Casein in Creole Limonero Bovine

*Inioska Rojas*<sup>2</sup>, *José Aranguren-Méndez*<sup>1</sup>, *María Portillo*<sup>1</sup>, *Yenen Villasmil-Ontiveros*<sup>1</sup>,  
*Emiro Valbuena*<sup>1</sup>, *Xomaira Rincón*<sup>1</sup>, *Gloria Contreras*<sup>3</sup> y *Luis Yañez*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación en Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia.

<sup>2</sup>Posgrado en Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.

<sup>3</sup>Instituto Nacional Investigaciones Agropecuarias. Fax: 0058 261 7596100.

E-mail: [jaaranguren@luz.edu.ve](mailto:jaaranguren@luz.edu.ve) - [atilioaranguren@gmail.com](mailto:atilioaranguren@gmail.com)

### RESUMEN

Con el objeto de estudiar el polimorfismo del gen CSN3 en la raza bovina Criollo Limonero, se extrajeron muestras séricas de 163 individuos (machos y hembras), los cuales fueron caracterizados mediante la técnica PCR-RFLP. Los resultados obtenidos indican que las frecuencias encontradas correspondieron a 0,11; 0,56 y 0,33 para los AA, AB y BB, respectivamente, correspondiendo a frecuencias alélicas de 0,39 para el alelo A y 0,61 para el B, respectivamente. Cabe destacar que a partir de esta información de la CSN3 y su relación con caracteres, tales como la producción de leche y rendimiento quesero, se pueden llevar a cabo planes de mejoramiento asistido por marcadores, garantizando el mantenimiento de la variabilidad genética de estas poblaciones locales que se caracterizan por censos reducidos y la amenaza constante por cruzamientos con razas mejoradoras o comerciales, que buscan incrementar el volumen de producción de leche en detrimento de la calidad del producto; así mismo, se indica la ventaja potencial que presenta la leche del ganado Criollo Limonero en la producción de quesos, por mostrar mayoritariamente alelos del tipo B de la CSN3.

**Palabras clave:** Caseína, Criollo Limonero, RFLP, ADN.

### ABSTRACT

In order to assess the polymorphism of CSN3 gen in Limonero Creole breed, blood samples were collected from 163 male and female individuals, with which characterization through

RFLP-PCR was conducted. Results showed that genotypic frequencies were 0.11, 0.56 and 0.33 for AA, AB and BB, respectively. Allelic frequencies were 0.39 and 0.61 for allele A and B, accordingly. It is important to mention that with this information of CSN3 and its relationship with some traits such as milk production and cheese productivity, markers-assisted genetic improvement plans can be undertaken, which would maintain genetic variability of these local populations characterized by small numbers of animals and by the constant threat of crossbreeding with improved or commercial breeds, with the objective of increasing milk production over product quality; moreover, a potential advantage of Limonero Creole breed in milk production by its having mainly B-type alleles in CSN3 is shown.

**Key words:** Casein, Limonero Creole, RFLP, DNA.

### INTRODUCCIÓN

El Criollo Limonero es una raza local venezolana originaria de bovinos (*Bos taurus*) hispanos traídos a América durante la colonia, caracterizándose por su gran resistencia a las condiciones tropicales adversas, su fertilidad y temperamento lechero [31]. La mayor concentración de estos bovinos se encuentra ubicada en la región nor-oeste del Lago de Maracaibo y más específicamente, en los márgenes de los ríos Limón y Guasare del municipio Mara del estado Zulia, Venezuela [30, 31].

Las potencialidades de esta raza han estado dirigidas hacia la producción de leche, siendo este rubro de gran importancia, ya que es el principal elemento para la rentabilidad de los rebaños lecheros, los de doble propósito tropical y en la industria láctea y es donde estas razas locales podrían tener acogida en planes de mejora: en este aspecto se debe desta-

car que en la última década, la producción nacional ha mostrado tendencias negativas, lo cual afecta en gran escala la calidad de vida de la población [2, 3].

La leche, es un fluido biológico que se forma en la glándula mamaria de las hembras de los mamíferos y que contiene casi todos los nutrientes necesarios para la alimentación de los mamíferos recién nacidos, lo que la hace un alimento completo y de sumo interés para estudios y evaluación de sus componentes [5]. Por esta razón, los diferentes componentes de la leche han sido objeto de numerosos estudios, destacándose por su amplia función las evaluaciones de genes que codifican las proteínas lácteas en varias especies, debido a su gran potencial adicional, tal como el uso en la selección asistida por marcadores (MAS), así como, para la caracterización y diferenciación de las poblaciones [1, 3, 7, 13, 18, 23, 26, 27].

Las proteínas de la leche se pueden dividir en dos grupos: las caseínas y las proteínas del suero [2, 3, 11]. Las caseínas son las principales proteínas presentes en la leche de bovino y representan el 80% del contenido proteico total de la misma, constituidas por las  $\alpha$ s1-caseína,  $\alpha$ s2-caseína,  $\beta$ -caseína y k-caseína (CSN3), las cuales a su vez existen en varias formas moleculares, las variantes genéticas de estas proteínas en especial las de la CSN3 se han asociado a la calidad y cantidad del queso obtenido con este tipo de leche [14].

Las caseínas están codificadas por genes autosómicos estrechamente ligados, lo que implica que la unidad de transmisión genética sea prácticamente el haplotipo [10]. El gen de la CSN3 se encuentra en el cromosoma 6 (6q31) y posee once variantes alélicas (A, B, C, E, F1, F2, G1, G2, H, I, y J) [12]. No obstante se han reportado los alelos A y B como los más frecuentes, de ellos la variante alélica B se ha asociado con un aumento en el rendimiento y calidad de los quesos, de tal manera que, los producidos con este tipo de leche por poseer un mayor contenido proteico con hasta un 9%, resultan en una cuajada más firme, menor tiempo de coagulación (53 vs. 60 min) y cerca de 5 a 10% más de rendimiento quesero, siendo esta característica de gran importancia para la industria láctea en comparación a los producidos con leche que presenta la variante alélica A [17, 19]. Algunos estudios han indicado que el genotipo de la CSN3 explicó hasta el 25% de la varianza fenotípica total de la concentración de las proteínas lácteas en hatos Holstein-Friesian [6, 19-21].

La CSN3 está conformada por 169 aminoácidos, con regiones variables en los codones 136 y 148 del tercer exón; la variante A contiene treonina en el codón 136 (ACC) y ácido aspártico en el 148 (GAT), mientras que la variante B contiene isoleucina (ATC) y alanina (GCT) en los mismos sitios antes señalados [11].

La determinación de dichas proteínas puede realizarse por varias metodologías, no obstante, dentro de ellas se señala la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Restringidos) [16] para genotipar la CSN3, ya que no depende del

sexo, edad o estado fisiológico, siendo por lo tanto este procedimiento el más preciso y económico y permite además la visualización de los alelos en geles de agarosa [9]. Otra de las ventajas de estas técnicas moleculares es que en el caso de evaluación de machos, donde normalmente se requieren 5 a 6 años para una prueba de progenie, por medio de éstas se puede adelantar ya que permite identificar genotipos de interés en machos jóvenes [4].

El ganado Criollo Limonero, considerado patrimonio nacional, en la actualidad se encuentra en peligro de extinción, dado que su censo efectivo es bastante reducido (350 animales puros) [31]; de allí que se halla planteado como política bandera, su difusión para evitar la desaparición de esta raza, como ya ocurrió con en el Criollo Quebrada Arriba [8]. Estas poblaciones autóctonas suponen una fuente de información genética interesante, que hoy es desconocida y que podría resultar esencial para los estudios de estas razas locales y su potencial en la producción animal [26].

El objetivo de este estudio fue determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de la CSN3 en el ganado Criollo Limonero, empleando el uso de la técnica molecular PCR-RFLP.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio del polimorfismo de la k-CN se genotiparon 163 bovinos (71 machos y 92 hembras) de la raza Criollo Limonero, provenientes de un rebaño de 350 animales puros localizado en la estación local carrasquero adscrita al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA- Zulia).

El ADN genómico se extrajo a partir de glóbulos blancos (leucocitos) de muestras sanguíneas tomadas de la vena yugular a través de tubos vacutainer® que contenían EDTA como anticoagulante y siguiendo la metodología descrita por Aranguren y col. [1].

Con base a la secuencia de la proteína CSN3 cuyo gen posee 850 pb se amplificó un fragmento de 350 pb utilizándose los oligonucleótidos JK5: ATCATTTATGGCCATTCCAC-CaG y JK3 CCCATTTGCGCTTCTCTGTAACAGA, seleccionado a partir de secuencias reportadas por Medrano y Aguilar-Córdova [16].

La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25  $\mu$ L, cuya reacción contenía 2,5  $\mu$ L de buffer, 2 mM  $MgCl_2$ , 0.1 mM dntp's, 0,6 pmol primers, 0,63 U de Taq polimerasa y ADN 50 ng. Amplificando los fragmentos esperados en un termociclador (Mastercycler ep-gradient (S), Eppendorf) estableciendo una primera etapa de activación de la polimerasa a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos (94°C durante 45 segundos, 60°C por 45 segundos y 72°C durante 45 segundos). El programa térmico finalizó con una extensión a 72°C durante 5 min, finalmente los geles se tiñeron con bromuro de etidium y se visualizaron las bandas en un transluminador (UVP, High performance 302 nm, Canada).

El análisis de las variantes alélicas de CSN3 se realizó por la metodología de la RFLP a través de la digestión del producto de la PCR con la enzima *Hinf I* (Promega)®, para un volumen total de 20 µL, se añadió 0,5 µL (5U) de la enzima, 6,5 µL de agua, 2 µL de Buffer B, 1 µL de BSA y 10 µL del producto amplificado, luego se incubó (Selecta Precistern 4L, Barcelona-Spain) por 4 horas según la metodología descrita anteriormente [16].

Las frecuencias alélicas fueron calculadas por conteo directo, además se determinó si los genes y genotipos estuvieron en equilibrio Hardy-Weinberg, mediante la prueba Ji-cuadrado [24]. Las frecuencias genotípicas y alélicas se determinaron a través del programa Biosys-2 [25].

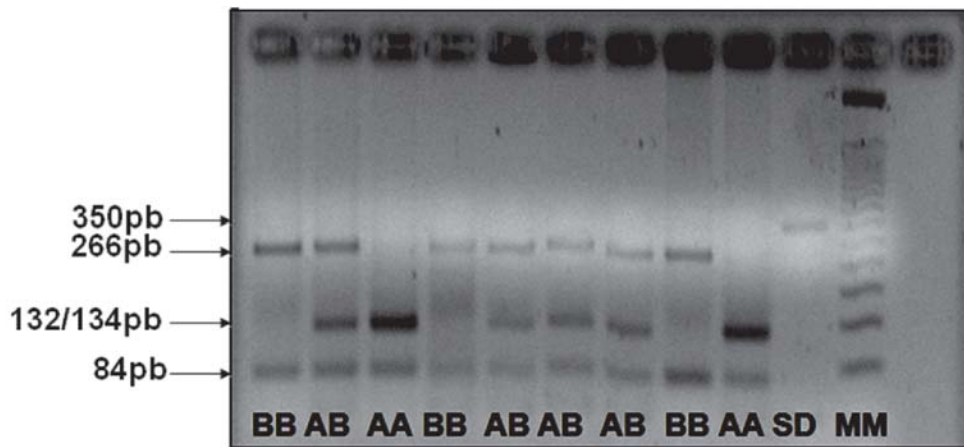
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El producto amplificado correspondió a un fragmento de 350 pares de bases (pb) ubicado entre el exón IV y el intrón IV de dicho gen. La digestión con la enzima *Hinf I* permitió la diferenciación genotípica de la CSN3 en la población de ganado bovino Criollo Limonero, observándose para el genotipo AA dos bandas de 132/134 pb y una de 84 pb, mientras que para el genotipo AB se observaron tres bandas con pesos moleculares de 266, 132/134 y 84 pb, respectivamente; por su parte los individuos con el genotipo BB presentaron dos bandas, la primera de 266 pb y la segunda de 84 pb (FIG. 1).

Las frecuencias genotípicas obtenidas correspondieron a 0,11 para el homocigoto AA; 0,56 para el heterocigoto AB y 0,33 para los homocigotos BB y frecuencias alélicas de 0,39 para el alelo A y 0,61 para el alelo B (TABLA I), estando dicho gen en equilibrio H-W ( $P > 0,05$ ).

Como se puede apreciar, en este estudio, la variante B de la CSN3 fue más predominante, presentando una frecuencia de 0,61 mientras que la del alelo A correspondió a tan sólo 0,39. Estos valores en las frecuencias alelicas resultaron ser bastante similares a lo obtenido en ganado Rubia Galega, Chaqueño Boliviano y al ganado N'Dama Africano [14, 29]. No obstante, difiere a lo obtenido en otras razas locales del continente americano tales como: Criollo del Perú, Criollo Uruguayo, Criollo Pantaneiro, Criollo Cubano, Criollo Argentino, Saavedreño, y Chusco [13, 14, 22, 26, 28]. Al igual a lo encontrado en Brasil, en donde la frecuencia del alelo B estudiado en varias razas (Sindhi, Gyr X Holstein, Gyr, Guzarat, y Nellore) osciló entre 0,01 y 0,30, muy inferior a la obtenida para el alelo A [4].

Estudios previos indican que, a pesar de la existencia de varios alelos de la CSN3 en razas bovinas, han sido los alelos A y B los más comunes y se encuentran en la mayoría de las razas bovinas en proporciones variables, siendo más frecuente el alelo A en las razas Holstein, Friesian, Ayrshire, Danés Rojo y Cebú Índico; mientras que, la variante B, en cambio es más frecuente en las razas Jersey, Normando y Cebú Africano



**FIGURA 1. ELECTROFORESIS DEL PRODUCTO DE DIGESTIÓN CON *HINF I*, AGAROSA 3%, MOSTRANDO LOS FRAGMENTOS (GENOTIPOS) DE LA CSN3; MM: MARCADOR PESO MOLECULAR (50PB); AB=CSN3<sup>AB</sup>; BB=CSN<sup>BB</sup>; AA=CSN3<sup>AA</sup>; SD: PRODUCTO NO DIGERIDO / ELECTROPHORESIS OF THE DIGESTIÓN PRODUCT WITH *HINF I*, AGAROSE 3%. SHOWED FRAGMENTS (GENOTYPE) OF THE CSN3: MM: MOLECULAR WEIGHT MARKER, AB=CSN3<sup>AB</sup>; BB=CSN<sup>BB</sup>; AA=CSN3<sup>AA</sup>; SD: UNDIGESTED PCR PRODUCT LANES.**

**TABLA I  
FRECUENCIAS GÉNICAS Y GENOTÍPICAS PARA CSN3 EN GANADO CRIOLLO LIMONERO / ALLELIC AND GENOTYPIC FREQUENCES OF CSN3 IN CRIOLLO LIMONERO CATTLE BREED.**

Raza	Nº	Frecuencias génicas		Frecuencias genotípicas		
		A	B	AA	AB	BB
Criollo Limonero	163	0,39	0,61	(18) 0,11	(91) 0,56	(54) 0,33

[4, 14, 15, 23]. Por otro lado, Viana y col. [29], indican que a diferencia de lo que ocurre con las razas de producción lechera, las frecuencias del alelo B de la CSN3 son similares o superiores a las del alelo A, en este sentido habría que exceptuar a las razas lecheras o lechero-mantequeras, como la Jersey y Normanda, que son razas con una alta frecuencia para el alelo B con valores de 0,77 y 0,56, respectivamente.

La alta frecuencia de la variante B de la CSN3 en esta población podría ser planteada como una de las vías para mejorar la eficiencia lechera para su transformación en queso, por lo que se recomienda identificar toros con el genotipo BB y difundirlo a través de la inseminación artificial (IA), por ejemplo o bien utilizarlos en cruzamiento dirigidos.

## CONCLUSIONES

La presencia mayoritaria del alelo B en la leche del ganado Criollo Limonero, indica que esta raza tiene alta potencialidad para su utilización en la elaboración de quesos que pudiesen ser considerados artesanales, dado que esta variante se encuentra vinculada con un incremento en el rendimiento de los quesos, debido a que su leche posee un mayor contenido proteico y por lo tanto, da un cuajo más firme, con menores tiempos de coagulación, mayor rendimiento y mejor calidad. Asimismo, se indica que la técnica PCR-RFLP es una herramienta sencilla de aplicar en programas de mejoramiento genético y además de bajo costo.

## RECOMENDACIONES

Se debe aprovechar las bondades del ganado Criollo Limonero y así difundirlo en rebaños de ganado doble propósito, ya que además de sus ventajas de adaptación al medio, resistencia a enfermedades y su habilidad para pastorear, se ha encontrado una presencia mayoritaria del alelo B de la CSN3, el cual pareciera estar según la literatura revisada, asociado con un mayor contenido de grasa y proteínas; asimismo, sería recomendable diseñar estudios donde se relacionen las características con la composición de la leche y características productivas y reproductivas con los alelos de la CSN3.

## AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento de la presente investigación (CC-0928-06).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARANGUREN-MÉNDEZ, J.; JORDANA, J.; AVELLANET, R.; TORRENS, M. Estudio de la variabilidad genética en raza bovina Mallorquina para propósitos de conservación. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XII (5): 358-366. 2002.
- [2] ARANGUREN-MÉNDEZ, J. Aplicación de la genética molecular para la selección de caracteres de interés en la producción de leche. En: **Alcances y Perspectivas en la Mejora Genética de la Ganadería Doble Propósito.** XLIII Reunión del GIRARZ. Maracaibo 24-26/03. Venezuela. 84-98 pp. 2006.
- [3] ARANGUREN-MÉNDEZ, J.; ROJAS, I. Aplicación de la genética molecular en la selección de caracteres de interés para la producción de leche. En: **Desarrollo sostenible de la ganadería doble propósito.** Cap. XVIII. C. González-Stagnaro, N. Madrid Bury, E. Soto Belloso (Eds). Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo (Venezuela). 65-74 pp. 2008.
- [4] AZEVEDO, A.L.S.; NASCIMENTO, C.S.; STEINBERG, R.S.; CARVALHO, M.R.S.; PEIXOTO, M.G.C.D.; TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S.; GUIMARES, S.E.F.; MACHADO, M.A. Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. **Genet. and Molec. Res.** 7(3):623-630. 2008.
- [5] BALLESTER, M. La  $\beta$ -lactoglobulina y su aplicación en transgénesis. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra- España. Tesis de Doctorado. 174 pp. 2005.
- [6] BOBE, G. Milk protein genotypes explain variation of milk protein composition. A.S. Leaflet R. 1901. En: **Iowa State University Animal Industry Report.** Iowa-USA. 35-38 pp. 2004.
- [7] BONVILLANI, A.; DI RENZO, M.; TIRANTI, I. Genetic polymorphism of milk protein loci in Argentinian Holstein cattle. **Genet. and Molec. Biol.** 23(4): 819-823. 2000.
- [8] CAROLI, A.; CHESSA, S.; CHIATTI, F.; RIGNANESE, D.; MELENDEZ, B.; RIZZI, R.; CERIOTTI, G. Short communication: Carora cattle show high variability in  $\alpha$ s1-casein. **J. Dairy Sci.** 91:354-359. 2008.
- [9] CERVANTES, P.; LUNA, M.; HERNÁNDEZ, A.; PÉREZ-GIL, F.; PONCE, P.; UFFO, O. Polimorfismo genético en el locus de la kappa-caseína, en vacas de diferentes razas y cruces en el trópico mexicano. **Rev. Salud Anim.** 29(2) 78-84. 2007.
- [10] CHESSA, S.; BUDELLI, E.; GUTSCHER, K.; CAROLI, A.; ERHARDT, G. Short Communication: Simultaneous Identification of Five  $\kappa$ -casein (CSN3) Alleles in Domestic Goat by Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism. **J. Dairy Sci.** 86(11): 125-126. 2003.
- [11] EIGEL, W.N.; BUTLER, J.E.; ERNSTROM, C.A.; FARREL, H.M. J.R.; HARKALKAR, V.R.; JENNES, R.; WHITNEY, R.M. Nomenclature of proteins of cow milk: fifth edition. **J. Dairy Sci.** 67: 1599-1631. 1984.

- [12] FORMAGGIONI, P.; SUMMER, A.; MALCARNE, M.; MARIANI, P. Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in *bos genus*. 1999. Univ degli Studi di Parma An della Facolta di Med Vet. On Line: <http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/index2.htm>. 10-06-2008.
- [13] LARA, M.; GAMMA, L.; BUFARAH, G.; SERENO, J.; COLEGADO, E.; ABREU, U. Genetic polymorphisms at the k-casein locus in Pantaneiro cattle. **Arch. Zoot.** 51: 99-105. 2002.
- [14] LIRÓN, J.; RIPOLI, M.; D LUCA, J.; PERAL, P.; GIOVAMBATTISTA, G. Analysis of genetic diversity and population structure in Argentine and Bolivian creole cattle using five loci related to milk production. **Genet. and Molec. Biol.** 25(4): 413-419. 2002.
- [15] LÓPEZ, E.; VÁSQUEZ, N. Determinación del sexo y genotipificación del gen de la  $\kappa$ -caseína en embriones bovinos. **Rev. Col. Cien. Pec.** 17:231-240. 2004.
- [16] MEDRANO, J.; AGUILAR-CÓRDOVA, E. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. **Biotechnol.** 8:144-146. 1990.
- [17] NARANJO, J.; POSSO, A.; CÁRDENAS, H.; MUÑOZ, J. Detección de variantes alélicas de la kappa-caseína en bovinos Hartón del Valle. **Acta Agro.** 56:1. 26-32. 2007.
- [18] NG-KWAI-HANG, K.; GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of milk proteins. Chap. 16. In: **Advanced Dairy Chemistry**. Vol. 1. 740-816 pp. 2003.
- [19] NG-KWAI-HANG, K.; GROSCLAUDE, F. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian Cows. **J. Dairy Sci.** 69: 22-26. 1986.
- [20] OJALA, M.; FAMULA, T.; MEDRANO, J. Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. **J. Dairy Sci.** 80: 1776-1785. 1997.
- [21] OSTERSEN, S.; FOLDAGER, J.; HERMANSEN, J. Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. **J. Dairy Sci.** 89: 207-219. 1997
- [22] POSTIGLIONI, A.; RINCÓN, G.; NELLY, L.; LLAMBÍ, S.; FERNÁNDEZ, G.; D'ANGELO, M.; GAGLIARDI, G.; TRUJILLO, J.; DE BETHENCOURT, M.; GUEVARA, K.; CASTELLANO, A.; ARRUGA, M. Biodiversidad genética en bovinos criollos del Uruguay. Análisis con marcadores moleculares. **Arch. Zoot.** 51: 195-202. 2002.
- [23] RIPOLI, M.; CORVA, P.; ANTONINI, A.; DE LUCA, J.; ROJAS, F.; DULOUT, F.; GIOVAMBATTISTA, G. Asociación entre cinco genes candidatos y producción de leche en la raza criolla Saavedreña. **Arch. Zoot.** 52: 89-92. 2003.
- [24] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. The SAS system for windows. Cary. University North of Caroline. USA. Versión 9.2. 2002.
- [25] SWOFFORD, D.; SELANDER, R. BIOSYS 2: a Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. **J. of Hered.** 72: 281-287. 1981.
- [26] UFFO, O.; MARTÍN, I.; MARTÍNEZ, S.; RONDA, R.; OSTA, R.; RODELLAR, C.; ZARAGOZA, P. Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. **AGRI.** 39: 15-24. 2006.
- [27] VAN EENENNAAM, A.; MEDRANO, J. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 74: 1730-1742. 1991.
- [28] VELI, E.; RIVAS, E.; RIVAS, V.; VERASTEGUI, M.; PASTOR, S. Evaluación de la variabilidad de genes de kappa caseína en poblaciones de bovinos criollos de Ticllos y Huaschao, región Ancash. 2004. En Linea: <http://www.inia.gob.pe/genetica/zoogeneticos/articulo%20V%20Congreso.pdf>. 10-06-2008.
- [29] VIANA, J.; FERNÁNDEZ, A.; IGLESIA, A.; SÁNCHEZ, L.; BECERRA, J. Análisis de los genotipos más frecuentes de la k-caseína en la raza vacuna Rubia Galega mediante PCR/RFLPs. **Arch. Zoot.** 50: 91-96. 2001.
- [30] VILLASMIL, Y. Caracterización genética de bovinos de la raza Criollo Limonero utilizando marcadores moleculares de ADN del tipo microsatélites. Universidad del Zulia. Tesis de Maestría. 97 pp. 2007.
- [31] VILLASMIL-ONTIVEROS, Y.; ROMÁN-BRAVO, R.; YÁÑEZ-CUÉLLAR, L.; CONTRERAS, G.; JORDANA, J.; ARANGUREN-MÉNDEZ, J. Diversidad genética de la raza criollo limonero utilizando marcadores de ADN microsatélites. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XVIII (4): 415-423, 2008.