



Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado esta tesis consta de dos secciones claramente definidas, por este motivo se separaron los resultados y discusión de cada grupo de caracteres. Primero se empezará con lo referido al estudio de marcadores candidatos para caracteres crecimiento, para luego seguir con los candidatos para el color de la carne. Adicionalmente en el Anexo 6 se incluyen los artículos publicados relacionados a los resultados que se describirán en esta sección.

3.1 ESTUDIO SOBRE MARCADORES DE GENES CANDIDATOS PARA CARACTERES DE CRECIMIENTO

3.1.1 Puesta a punto de las técnicas de genotipificación

Como se mencionó en la sección “Materiales y Métodos”, fueron utilizadas varias técnicas para la determinación de los genotipos en las diferentes poblaciones. En el caso de los marcadores de genes candidatos para caracteres de crecimiento, las técnicas utilizadas dependieron del tipo de marcador. Para los microsatélites se utilizó la técnica análisis de fragmentos por electroforesis capilar. Por su parte, en los SNPs se utilizaron las técnicas de PCR-RFLP y PCR-Pirosecuenciación. En esta sección mostraremos ejemplos de la lectura de los resultados obtenidos.

Multiplex de Microsatélites

En el presente estudio se incluyeron 5 microsatélites: 4 de ellos pertenecían al cromosoma BTA5 (BP1, ETH10, IGF1 y RM029) y el restante, que se localiza en el cromosoma BTA1, que se utilizó como control (BM1824). En la Figura 3.1 se muestra la fotografía de un gel de poliacrilamida utilizado para verificar el resultado de la reacción de PCR, previo a correr los amplificadores en el secuenciador. Además, se presentan los electroferogramas obtenidos con el software Fragment Profiler (GE Healthcare) para cada microsatélite analizado.

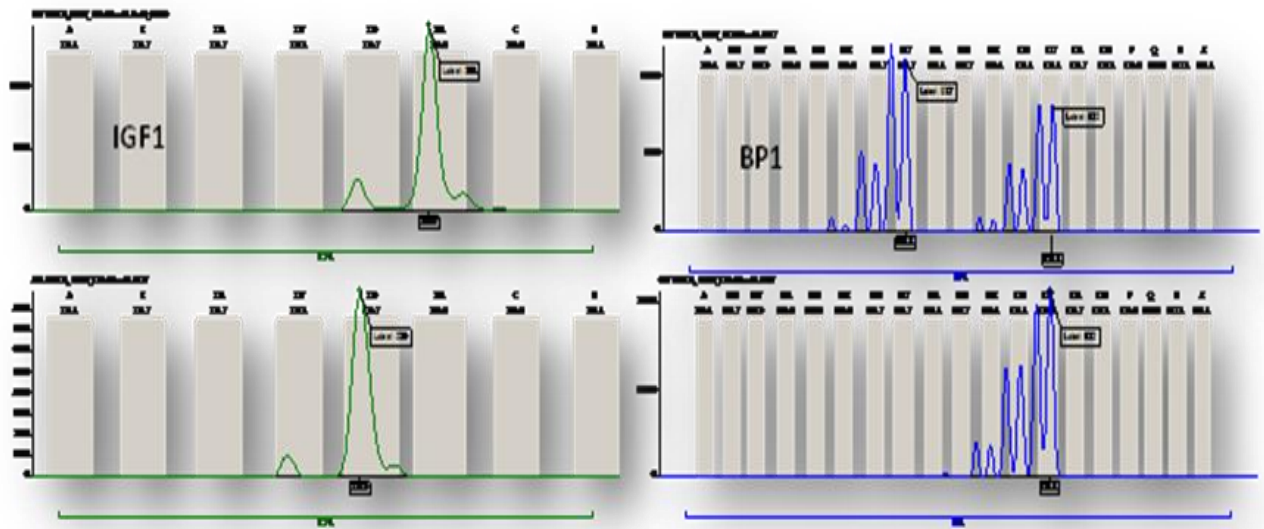
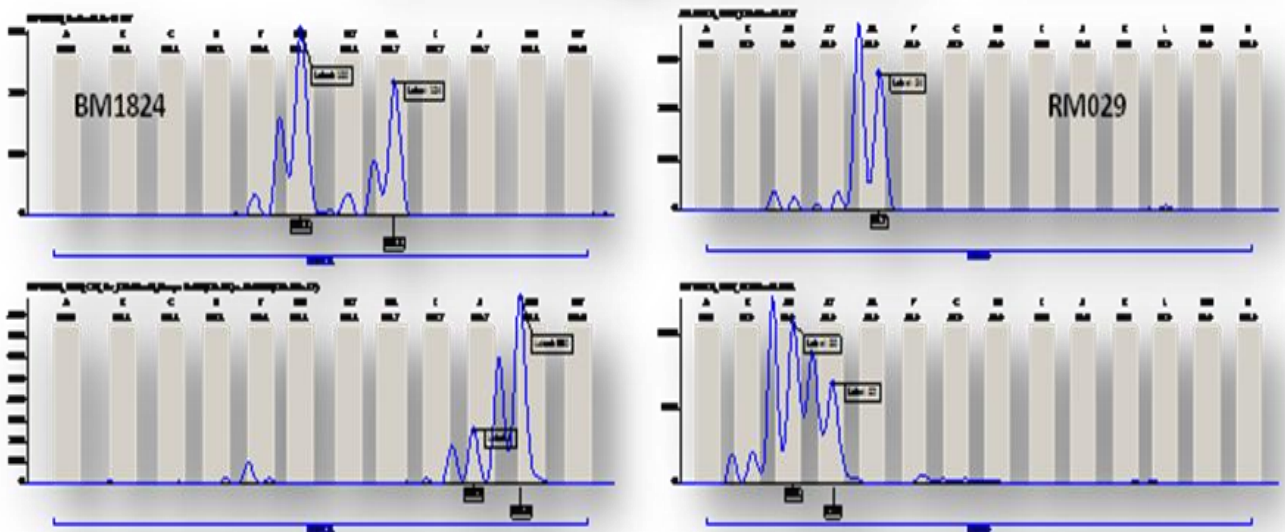
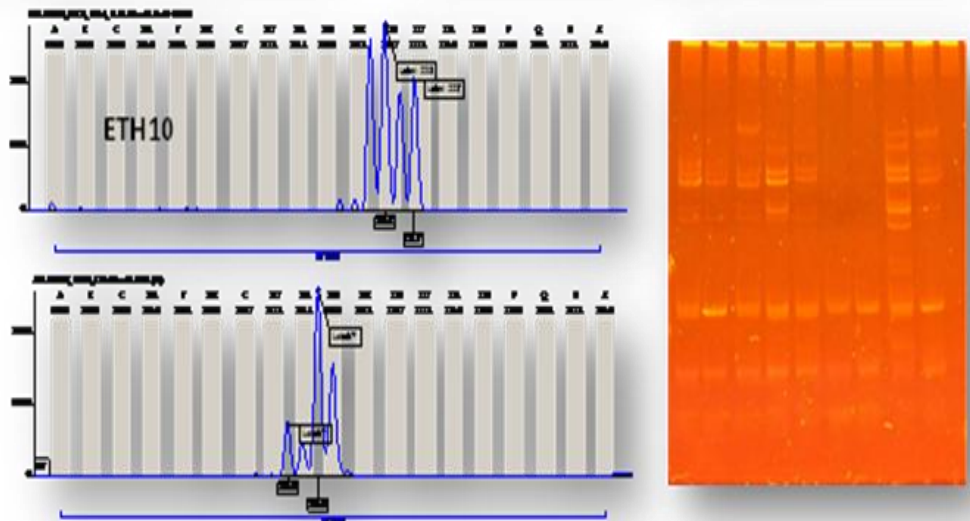
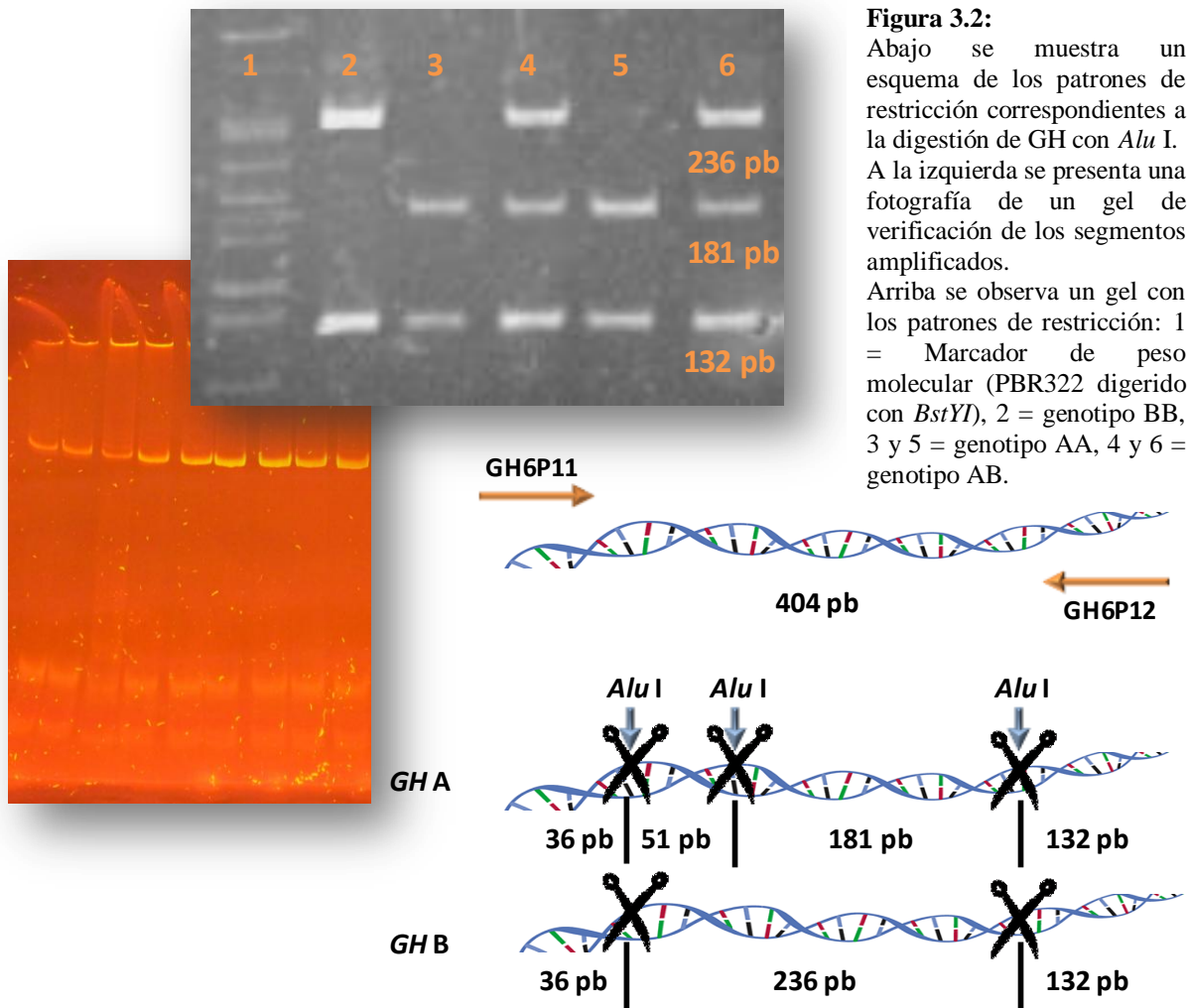


Figura 3.1: Se muestran ejemplos de electroferogramas para cada microsatélite, incluyendo los *Bin Set*. A la derecha también se presenta una fotografía de un gel con el multiplex amplificado luego de la corrida electroforética. El teñido se realizó con Bromuro de Etidio y se fotografió con luz UV.



PCR-RFLP

La determinación del genotipo del SNP L217V del exón 5 del gen GH se realizó mediante dos técnicas. La técnica de PCR-RFLP utilizada originalmente, fue luego reemplazada por la técnica de PCR-Pirosecuenciación debido a que esta última era más exacta y permitía ser automatizada. Independientemente de esto, un porcentaje de los genotipos para este gen fueron obtenidos por ambas técnica para validar su equivalencia. En la Figura 3.2 se pueden observar un esquema de los cortes de la enzima en el segmento amplificado, y un gel de acrilamida donde se discriminan los patrones de restricción.



Pirosecuenciación

Para los SNPs (GH y GHRc) se optó por la técnica de Pirosecuenciación, cuando estuvo disponible, pues como ya se mencionó tiene la gran ventaja de ser más exacta y permitir la automatización. En la Figura 3.3 se pueden observar ejemplos de los pirogramas obtenidos para ambos genes y los histogramas teóricos para cada secuencia. La secuencia de lectura del equipo

es la reversa complementaria para el caso del GHRc, ya que la cadena purificada era la *Forward* y el primer interno de secuenciación permitía la polimerización de la cadena reversa.

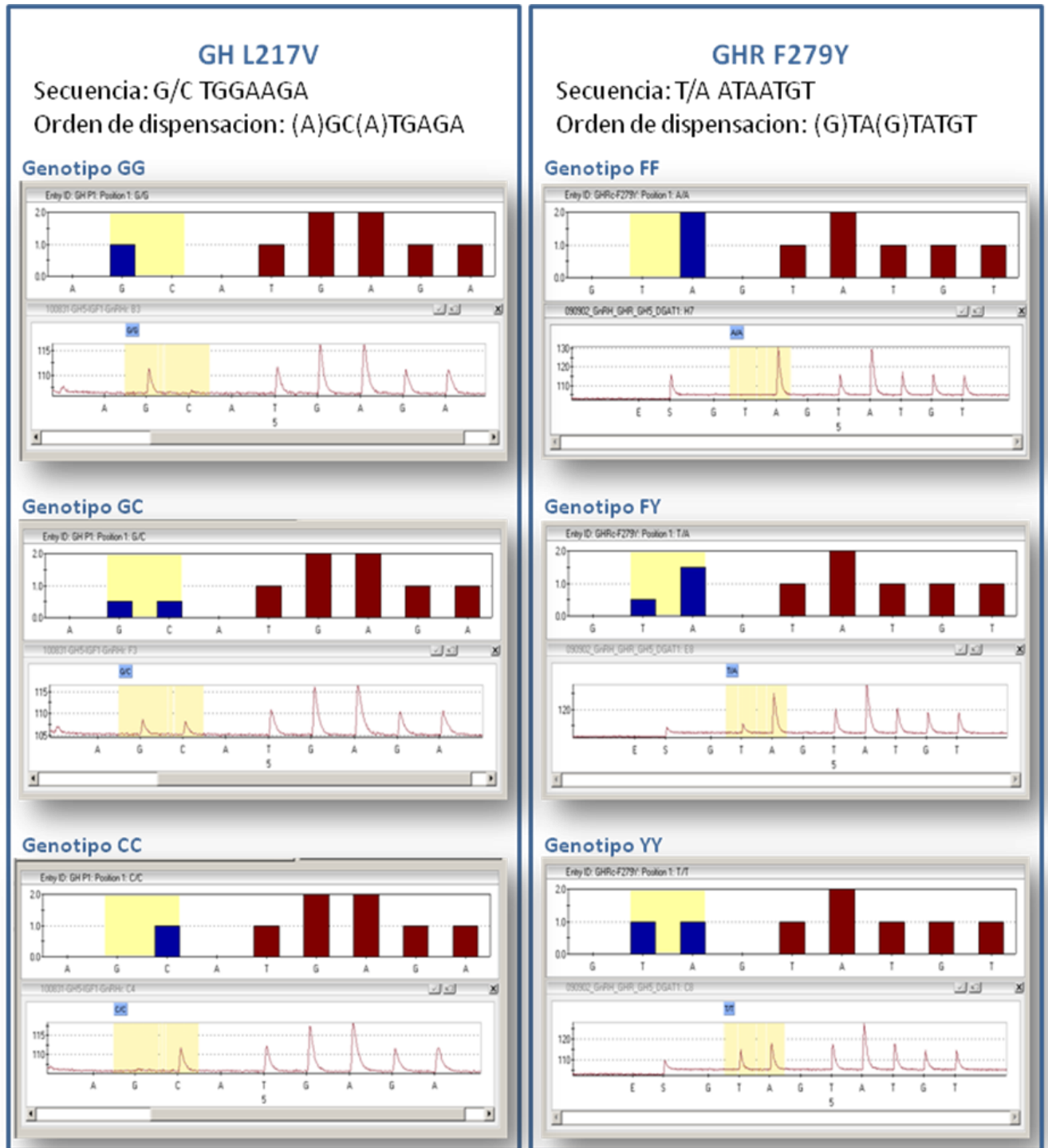


Figura 3.3: Se presentan ejemplos de pirogramas y sus histogramas teóricos, para cada genotipo de los SNPs: L217V del gen GH y F279Y del gen GHRc. En la parte superior se puede leer la secuencia de lectura y el orden de dispensación de nucleótidos del equipo. Las bases entre paréntesis no pertenecen a la secuencia y son controles negativos agregados por el equipo.

3.1.2 Variabilidad genética

A un grupo de animales de diferentes razas y orígenes, se les determinó el genotipo con el objetivo de evaluar la variabilidad genética a distintos niveles. Las razas Hereford y Angus tuvieron mayor atención ya que se utilizaron posteriormente en los análisis de asociación.

Estudio preliminar en Microsatélites

Los microsatélites son marcadores con una gran variabilidad y por lo tanto muy informativos, sin embargo requieren estandarización entre laboratorios y controles a lo largo del tiempo. Además, es necesario un operario entrenado para su lectura, ya que muchas veces los patrones de un marcador en particular pueden generar confusiones y errores en la lectura. Por estos motivos se decidió primero hacer un ensayo sobre un pool de muestras perteneciente a diferentes razas: Angus, Brahman, Charolais, Criollo Argentino, Criollo Boliviano, Criollo Uruguayo, Hereford, Holando, Jersey, Nelore, Normando, Retinta y Wagyu. El objetivo de este ensayo fue, por un lado, determinar el rango de peso molecular de los alelos, y por el otro, establecer un patrón de referencia (*Bin Set*) para estandarizar la lectura de cada genotipo. Los resultados del estudio realizado sobre 37 animales de las 13 razas se presentan en la Tabla 3.1. A lo largo del tiempo se utilizó una muestra de la raza Nelore como control interno de la técnica.

Tabla 3.1: Rango de peso molecular y número de alelos encontrados para cada microsatélite estudiado. Los animales pertenecían a 13 razas tanto taurinas como cebuinas.

Microsatélite	Alelo Mínimo	Alelo Máximo	Nº de alelos encontrados
BM1824	180	194	8
BP1	302	326	9
ETH10	210	226	8
RM029	78	102	5
IGF1	225	231	3

Estudio de variabilidad entre razas: Angus, Criollo Argentino y Hereford

Se utilizaron tres razas seleccionadas para la producción de carne, en el estudio de variabilidad genética entre razas: Angus y Hereford seleccionadas por ser las principales razas criadas en nuestro país, y el Criollo Argentino por ser la única raza bovina autóctona y un posible reservorio de material genético (Giovambattista *et al.*, 2001). Estos resultados se utilizaron, además, como referencia en estudios posteriores de variabilidad y de asociación. Los animales analizados, que pertenecían a las Pruebas de comportamiento XIV, XV y XVI del INTA Balcarce, incluyeron 110 toros: 49 Angus, 24 Criollos y 37 Hereford, pertenecientes a 16, 3 y 7 establecimientos,

respectivamente. El análisis incluyó para cada marcador: número de alelos, frecuencias génicas, heterocigosidad esperada para cada locus (h_e), y sobre todos los locus (H_e), equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) estimado por el estadístico F_{IS} . Los resultados se presentan en las Tablas 3.2 y 3.3.

Tabla 3.2: Frecuencias génicas para los marcadores estudiados en las tres razas (AA: Angus, CRA: Criollo Argentino, HE: Hereford). Entre paréntesis se presenta el número de veces en que se encontró el alelo en la población.

BM1824	Alelo	180	182	184	190	192			
	AA	0,549 (45)	0,049 (4)	0,232 (19)	0,146 (12)	0,024 (2)			
	CRA	0,083 (4)	0,250 (12)	0,563 (27)	0,104 (5)	-			
	HE	0,328 (21)	-	0,406 (26)	0,266 (17)	-			
BP1	Alelo	302	308	310	312	314	318	316	322
	AA	0,267 (23)	0,070 (6)	0,023 (2)	0,419 (36)	-	-	0,012 (1)	0,209 (18)
	CRA	-	-	0,043 (2)	0,435 (20)	0,370 (17)	0,065 (3)	-	0,087 (4)
	HE	0,059 (4)	-	0,029 (2)	0,397 (27)	-	0,015 (1)	-	0,500 (34)
ETH10	Alelo	214	216	218	220	222	226		
	AA	0,012 (1)	0,060 (5)	0,417 (35)	0,214 (18)	0,298 (25)	-		
	CRA	-	0,063 (3)	0,354 (17)	0,271 (13)	0,292 (14)	0,021 (1)		
	HE	0,015 (1)	0,118 (8)	0,294 (20)	0,294 (20)	0,279 (19)	-		
RM029	Alelo	80	82	84	90	96	100	102	
	AA	0,163 (15)	0,315 (29)	0,500 (46)	0,022 (2)	-	-	-	
	CRA	-	0,283 (13)	0,674 (31)	-	-	0,022 (1)	0,022 (1)	
	HE	0,032 (2)	0,194 (12)	0,726 (45)	-	0,016 (1)	0,032 (2)	-	
		IGF1		Alelo	229	231			
				AA	0,986 (71)	0,014 (1)			
				CRA	0,800 (32)	0,200 (8)			
				HE	0,741 (43)	0,259 (15)			
GHRc	Alelo	F	Y			GH	Alelo	A	B
	AA	0,900 (27)	0,100 (3)				AA	0,809 (55)	0,191 (13)
	CRA	1,000 (14)	-				CRA	0,923 (24)	0,077 (2)
	HE	0,543 (25)	0,457 (21)				HE	0,800 (40)	0,200 (10)

Todos los marcadores resultaron polimórficos en las razas estudiadas a excepción del GHRc en la raza Criolla, donde el alelo F se encontró fijado. En los marcadores con más de dos alelos la frecuencia mínima fue de 1,2%, pero siempre se observaron al menos dos marcadores con frecuencias mayores al 10%. Para estos, se encontraron alelos exclusivos de cada raza: en AA alelos 192 del BM1824, 316 del BP1 y 90 del RM029; en CRA alelos 314 del BP1, 102 del RM029 y 226 del ETH10; y en HE alelo 96 del RM029. En los marcadores bialélicos (IGF1, GH y GHRc), a

excepción del GHRc en CRA e IGF1 en AA, todos los alelos tuvieron una frecuencia mayor al 10%, hecho que permitiría una Selección Asistida por Marcadores.

Tabla 3.3: Resultados para los cálculos de heterocigosidad esperada para cada locus (h_e), y todos los locus (H_e), equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) estimado por el estadístico F_{IS} , y el desequilibrio de ligamiento, en las tres razas productoras de carne estudiadas. En el caso del HWE, los valores significativamente desviados del equilibrio se resaltan en negrita.

Locus	Heterocigosidad Esperada			Heterocigosidad Observada			HWE F_{IS} W&C (P-val)		
	AA	CRA	HE	AA	CRA	HE	AA	CRA	HE
BM1824	0,628	0,616	0,667	0,561	0,542	0,750	0,108 (0,025)	0,123 (0,663)	-0,126 (0,733)
BP1	0,712	0,675	0,597	0,419	0,565	0,529	0,415 (0,000)	0,166 (0,253)	0,114 (0,547)
ETH10	0,697	0,727	0,746	0,690	0,875	0,735	0,009 (0,118)	-0,209 (0,390)	0,014 (0,122)
RM029	0,630	0,475	0,441	0,457	0,217	0,226	0,278 (0,000)	0,548 (0,001)	0,491 (0,003)
IGF1	0,028	0,328	0,390	0,028	0,200	0,310	-	0,397 (0,128)	0,207 (0,338)
PROMEDIO	0,539	0,564	0,568	0,431	0,480	0,510			
GHRc	0,186	0,000	0,507	0,200	0,000	0,391	-0,077 (1,000)	-	0,233 (0,402)
GH	0,314	0,148	0,327	0,324	0,154	0,320	-0,031 (1,000)	-0,043 (1,000)	0,020 (1,000)
PROMEDIO	0,250	0,074	0,417	0,262	0,077	0,356			

La diversidad encontrada para los microsatélites estudiados, en las muestras analizadas, fue similar para las tres razas seleccionadas: Hereford, Angus y Criollo, y son comparables con los encontrados en la bibliografía. Particularmente en el caso de los microsatélites, los datos de frecuencias génicas publicados difieren según el marcador. Los marcadores ETH10 y BM1824 son parte del panel de la ISAG (*International Society for Animal Genetics*), y por esto existe abundante información al respecto. Los valores informados de h_e en diferentes razas varían entre 0,22 y 0,89 para ETH10 y entre 0,43 y 0,86 para BM1824. En el caso de las razas estudiadas, algunos de los valores informados para ETH10 son: en Angus 0,67 y 0,75, en Criollos 0,58 y 0,63, y en Hereford 0,63 y 0,73. Mientras que para el BM1824 son: en Angus 0,72 y 0,79, en Criollos 0,61 y 0,74, y en Hereford 0,61 y 0,70 (Lirón 2004; Sherman *et al.*, 2004; Radko *et al.*, 2005; Amstrong *et al.*, 2006; Stankovic *et al.*, 2009; Van der Goor *et al.*,

2009; Montoya *et al.*, 2010; Novoa y Usaquén, 2010). Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los precedentes. Para los marcadores BP1, IGF1 y RM029 es escasa la información publicada, sin embargo las h_e encontradas son del orden de las publicadas para otros microsatélites. No obstante, Moody *et al.*, (1996) estudiaron en ganado Hereford las frecuencias de IGF1, e informaron dos alelos que se corresponden con los encontrados en este trabajo. Las frecuencias que publicaron estos autores para el alelo equivalente al 229 fueron entre 0,60 y 0,95. Por lo tanto, los resultados aquí presentados estarían dentro del rango previamente encontrado. Adicionalmente se han informado otros dos alelos para este marcador, 225 y 227 (Regitano *et al.*, 1999), exclusivos de razas cebuinas. Los resultados para las tres razas muestran una ausencia de estos alelos, hecho que es consistente con el origen taurino de las mismas.

Respecto de los SNPs, las frecuencias encontradas en la bibliografía para GH muestran al alelo A como mayoritario en casi todas las razas taurinas informadas (Angus, Ayshire, Charolais, Hereford, Holando, Jersey, Simental, Wagyu, razas Criollas, razas Escandinavas, razas Ibéricas, razas del noreste Europeo), con una frecuencia que varía desde 0,396 a 0,955 (Grochowska *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2001; Ge *et al.*, 2003; Vasconcellos *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Rogberg-Muñoz *et al.*, 2006; Ripoli *et al.*, 2010). En cebuinos, los estudios realizados en las razas Nelore, Brahman, Gyr, Guzerá evidenciaron que el alelo A estaría fijado (Kemenes *et al.*, 1999; Beauchemin *et al.*, 2006; Curi *et al.*, 2006). En nuestras poblaciones los valores obtenidos para las tres razas son similares a los obtenidos anteriormente por otros autores. En Hereford, Moody *et al.*, (1996) encontraron frecuencias entre 0,35 y 0,75 para diferentes poblaciones, mientras que en Angus las frecuencias informadas varían entre 0,38 y 0,77 (Ge *et al.*, 2003; Vasconcellos *et al.*, 2003; Villegas-Castagnasso *et al.*, 2006). En el caso de los Criollos, Vasconcellos *et al.* (2003) y Rogberg-Muñoz *et al.* (2006), estimaron la frecuencia del alelo A para varias razas Criollas encontrando valores entre 0,52 y 1,00. Adicionalmente, desde el punto de vista del crecimiento, Reis *et al.*, (2001) estudiando razas de Portugal encontraron frecuencias más altas del alelo A en aquellas con un mayor tamaño corporal, y sugirieron una posible incidencia de este SNP en la determinación del crecimiento.

Por su parte, el GHRC ha sido asociado con caracteres de producción de leche (Blott *et al.*, 2003; Viitala *et al.*, 2006) y por este motivo es un gen candidato para

caracteres de crecimiento en los que puede existir una influencia materna (peso al destete, ganancia diaria pre-destete, etc.). En ganado lechero el alelo F ha sido asociado con mayor productividad, y las frecuencias informadas para razas lecheras (Ayshire, Holando, Jersey, Modenese, Red Danish) han sido entre 0,727 y 1,000 (Viitala *et al.*, 2006; Fontanesi *et al.*, 2007; Varvio *et al.*, 2008; Waters *et al.*, 2010). En razas seleccionadas para la producción de carne y doble propósito (Angus, Charolais, Hereford, Italian Brown, Reggiana, Rendena, Simmental) los valores informados del alelo F han sido inferiores, entre 0,455 y 0,962 (Fontanesi *et al.*, 2007; Varvio *et al.*, 2008). Por otro lado, White *et al.* (2007) encontraron en ganado cruza de razas británicas y continentales una frecuencia extremadamente baja (aproximadamente 11%) del alelo F. Finalmente en razas con baja presión de selección, como en las razas nativas Escandinavas y las razas Africanas, los valores de frecuencia del alelo F también han sido elevados, 0,967 y 1 respectivamente (Varvio *et al.*, 2008). Estas diferencias de frecuencia podrían estar reflejando la importancia de este gen como determinante de la producción lechera, en este sentido, las mayores frecuencias del alelo F en ganado lechero apoyarían esta hipótesis. Más aún, dentro de las razas para producción de carne, la raza Hereford es conocida por su moderada a baja producción lechera y en ella ambos alelos están en frecuencias similares. Por otro lado, el hecho de que razas nativas, que en general han sufrido poca selección, presenten el alelo F en alta frecuencia podría indicar una ventaja comparativa de los animales con este alelo. En este sentido, las madres con mayor producción de leche pudieron haber criado terneros más fuertes y sanos, que pudieron haber tenido una mayor capacidad de supervivencia. En nuestras poblaciones los resultados obtenidos coinciden con los previamente informados para Hereford, 0,455 y Angus, 0,864 (Varvio *et al.*, 2008). En el caso del Criollo, no fueron encontrados datos anteriores, sin embargo el alelo F está fijado como en las razas africanas y las razas nativas escandinavas (con baja presión de selección).

Estudio de variabilidad de diferentes poblaciones de una misma raza

Con el objetivo de estimar la variabilidad entre rodeos con diferentes criterios de selección dentro de una misma raza, se estudiaron las frecuencias génicas de los rodeos Experimental (RodE) y Comercial (RodC). El objetivo de selección en el RodE apunta a aumentar el peso al destete (PD) sin variar el peso al nacimiento (PN) a través de un

Índice (Melucci *et al.*, 2009). Por su parte en el RodC el criterio busca animales de bajo PN, buenas tasas de ganancia y un peso adulto moderado. Para tener una imagen de la raza en general, se utilizaron como población de referencia (PR) una submuestra (N=17) de los animales Hereford provenientes de las Pruebas de Comportamiento del INTA Balcarce. Para esto se tomaron animales que no compartieran abuelos y que no pertenecieran al RodE y RodC. Los mismos parámetros antes mencionados se calcularon y se presentan en la Tablas 3.4 y 3.5 y en la Figura 3.5.

Tabla 3.4: Se muestran los diferentes alelos y frecuencias génicas encontradas en la Población de Referencia, el Rodeo Comercial, el Rodeo Experimental y los diferentes grupos del Rodeo Experimental.

Locus	Alelo	Población de Referencia	Rodeo Comercial	Rodeo Experimental			
		N	17	91	1996-2007	1996-1999	2000-2003
				157	39	50	68
BM1824	180	42,86	8,62	19,86	27,14	16,3	18,46
	182	7,14	0,57	-	-	-	-
	184	21,43	61,49	57,19	51,43	61,96	56,92
	190	28,57	19,54	21,92	21,43	21,74	22,31
	192	-	9,77	1,03	-	-	2,31
BP1	302	9,38	0,56	0,32	-	-	0,74
	310	6,25	5,62	0,32	1,35	-	-
	312	50	67,98	43,18	59,46	44,9	33,09
	314	3,13	-	-	-	-	-
	316	3,13	-	-	-	-	-
	322	28,13	25,28	56,17	39,19	55,1	66,18
	324	-	0,56	-	-	-	-
ETH10	214	-	-	5,26	4,17	8,16	3,73
	216	12,5	6,11	3,62	-	3,06	5,97
	218	25	15	39,14	54,17	36,73	32,84
	220	34,38	31,67	19,74	16,67	21,43	20,15
	222	28,13	46,11	32,24	25	30,61	37,31
	226	-	1,11	-	-	-	-
RM029	80	-	-	0,32	-	-	0,76
	82	15,38	12,64	15,91	7,89	13	22,73
	84	84,62	87,36	83,77	92,11	87	76,52
IGF1	229	61,54	67,24	69,73	61,11	70,65	73,85
	231	38,46	32,76	30,27	38,89	29,35	26,15
GH	A	79,17	62,8	95,35	98,57	90	95,54
	B	20,83	37,2	4,65	1,43	10	4,46
GHRc	F	81,82	81,98	34,77	36,11	36,05	30,36
	Y	18,18	18,02	65,23	63,89	63,95	69,64

Tabla 3.5: Se presentan los resultados de la Heterocigosidad esperada y observada para cada locus y sobre todos los loci (Promedio), en la Población de Referencia, el Rodeo Comercial, el Rodeo Experimental y los diferentes grupos del Rodeo Experimental. Además se presenta el estadístico F_{IS} (Weir & Cockerham) con su P-val (entre paréntesis) como estimador del Equilibrio de Hardy Weinberg (HWE), las desviaciones significativas ($P < 0,05$) se presentan en negrita.

Locus	Población de Referencia	Rodeo Comercial		Rodeo Experimental			
		1996-2007	1996-1999	2000-2003	2004-2007	2004-2007	2004-2007
N	17	91	39	50	68	68	
BM1824	0,709	0,570	0,625	0,548	0,596	0,596	
BP1	0,677	0,473	0,499	0,500	0,456	0,456	
ETH10	0,748	0,664	0,623	0,725	0,713	0,713	
RM029	0,271	0,222	0,147	0,228	0,366	0,366	
IGF1	0,492	0,443	0,482	0,419	0,389	0,389	
Heterocigosidad Esperada	0,579	0,475	0,475	0,484	0,504	0,504	
Micros.							
GHR	0,312	0,297	0,468	0,466	0,427	0,427	
GH	0,344	0,47	0,029	0,182	0,086	0,086	
Promedio SNPs	0,328	0,383	0,248	0,324	0,256	0,256	
BM1824	0,571	0,644	0,571	0,413	0,677	0,677	
BP1	0,750	0,494	0,378	0,612	0,441	0,441	
ETH10	0,688	0,700	0,667	0,694	0,746	0,746	
RM029	0,000	0,046	0,000	0,140	0,106	0,106	
IGF1	0,462	0,563	0,611	0,543	0,369	0,369	
Heterocigosidad Observada	0,494	0,489	0,446	0,481	0,468	0,468	
Micros.							
GHR	0,364	0,337	0,5	0,488	0,357	0,357	
GH	0,417	0,573	0,029	0,2	0,054	0,054	
Promedio SNPs	0,39	0,455	0,264	0,344	0,205	0,205	
BM1824	0,200 (0,221)	-0,130 (0,133)	0,032 (0,600)	0,087 (0,090)	0,249 (0,061)	-0,137 (0,510)	
BP1	-0,111 (0,916)	-0,058 (0,470)	0,038 (0,685)	0,245 (0,159)	-0,228 (0,149)	0,032 (0,858)	
ETH10	0,083 (0,218)	-0,065 (0,045)	-0,012 (0,149)	-0,071 (0,269)	0,044 (0,030)	-0,047 (0,364)	
RM029	1,000 (0,005)	0,794 (0,000)	0,669 (0,000)	1,000 (0,000)	0,390 (0,024)	0,711 (0,000)	
IGF1	0,065 (1,000)	-0,273 (0,014)	-0,141 (0,116)	-0,273 (0,160)	-0,301 (0,071)	0,052 (0,749)	
GHR	-0,177 (1,000)	-0,135 (0,285)	0,022 (0,850)	-0,070 (0,730)	-0,047 (1,000)	0,164 (0,334)	
GH	-0,230 (1,000)	-0,221 (0,061)	-0,045 (1,000)	-	-0,100 (1,000)	0,380 (0,088)	
HWE F_{IS} W&C (P-val)							

La variabilidad, medida a través de h_e y H_e , fue mayor en PR que en RodE y RodC (Tabla 3.5). Esto era esperable, ya que la muestra PR estaba constituida por animales provenientes de diferentes rodeos. Si además, cada uno de estos rodeos posee un cierto grado de consanguinidad, dado por la propia dinámica de la cría extensiva, podría existir estructuración poblacional. Es por esta razón, que la h_o y la H_o dependen de las frecuencias génicas de los rodeos de origen de las muestras, mientras las h_e y la H_e dependen de las frecuencias génicas estimadas en el pool (*Efecto Wahlund*). Adicionalmente, es esperable que el número de alelos sea mayor en pooles de muestras que en rodeos consanguíneos. Sin embargo, como se ve en la tabla Tabla 3.4, las tres poblaciones presentaban un número de alelos similar. En este caso el mayor tamaño de la muestra de RodC (91) y RodE (158) respecto de PR (17), estaría compensando el efecto de la consanguinidad. A pesar de las diferencias, los valores encontrados de estos parámetros para las poblaciones están dentro del rango esperable publicado previamente por otros autores.

En particular, para los loci ETH10 y BM1824 los valores de h_e en PR son similares a los encontrados para la raza por otros autores: ETH10 0,63 y 0,73, BM1824 0,61 y 0,70 (Radko *et al.*, 2005; Van der Goor *et al.*, 2009). Sin embargo para RodE y RodC los valores son menores, o se encuentran cercanos a los valores inferiores de referencia. Esto nuevamente se explica por la consanguinidad de estos rodeos, a diferencia de los muestreos usualmente realizados para estudios de variabilidad genética, que buscan individuos no emparentados. Nuevamente, BP1, RM029 e IGF1 no disponen de gran información, sin embargo los valores de frecuencia del alelo 229 (Tabla 3.4) se ubicaron en el rango entre 0,60 y 0,95, informado por Moody *et al.* (1996), para dos rodeos seleccionados y un grupo de muestras de semen de toros que estaban disponibles en el mercado.

Para los SNPs, los valores fueron muy variables entre los diferentes grupos. Sin embargo, las frecuencias encontradas para RodC se asemejan más a las de RP, que las de RodE, esto puede estar explicando en parte la extensa presión de selección aplicada sobre RodE. Es llamativo el bajo valor de la frecuencia del alelo F encontrado para RodE en GHRc, este alelo ha estado asociado a producción lechera y encontrado en mayor frecuencia en las razas lecheras (Viitala *et al.*, 2006). Una selección hacia un mayor peso al destete puede haber influido no solo sobre el efecto genético directo,

capacidad del individuo para crecer, sino también en el efecto genético materno, capacidad de la madre para criar al ternero. En un estudio realizado por Melucci *et al.*, (2009) sobre el RodE, demostraron el efecto de la selección sobre los BLUPs para peso al destete directo y materno, y encontraron un aumento de ambos con el tiempo. En este sentido, las frecuencias en este gen podrían haberse visto afectadas, al ser un gen de importancia en la capacidad y calidad de la leche.

Al observar la desviación del HWE vemos en el RodC que los marcadores ETH10, RM029 e IGF1 se encuentran en desequilibrio, estos tres marcadores se ubican en la región entre 65 y 82 cM del BTA5, donde se han descrito varios QTL relacionados con crecimiento (Casas *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004). En este sentido y debido al ligamiento, marcadores neutros cercanos a genes responsables de una determinada característica, pueden ver afectadas sus frecuencias. Esto ha sido confirmado por varios autores, en particular Pereira *et al.* (2005) encontraron variaciones en las frecuencias de GH e IGF1 debido a la selección en ganado Canchim. Los QTLs descritos anteriormente para esta zona del BTA5 se relacionan a medidas de crecimiento pre y post-destete como tasa de ganancia diaria pre-destete y en engorde, peso de la carcasa, etc. (Casas *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Stone *et al.*, 2005). Esto explicaría porque esta región estaría siendo más afectada en RodC que en RodE. Sin embargo, las desviaciones del equilibrio de HWE pueden no solo ser causadas por la selección, sino también otros factores poblacionales como la deriva génica y la migración, o experimentales como alelos nulos. Para evaluar esta posibilidad, se incluyó el marcador BM1824 como control. Este STR está ubicado en una región del cromosoma 1 en la que no han sido detectados QTLs para crecimiento. Este marcador no presentó desviación del HWE en ninguna de las poblaciones estudiadas, esto refuerza la hipótesis que las desviaciones observadas en el equilibrio HWE se deban al efecto de la selección. Finalmente, es llamativo que el marcador RM029 presentara una desviación del HWE en las tres poblaciones y con un exceso de genotipos homocigotas en los tres casos. Aunque esto podría estar evidenciando la presencia de algún alelo nulo, la posibilidad no ha sido informada para este marcador, y los estudios realizados sobre el pedigrí de las poblaciones estudiadas no son concluyentes al respecto. Adicionalmente, la asociación de este marcador con los caracteres de crecimiento no fue

de gran significancia, hecho que desalienta la posibilidad de mayores estudios en este sentido.

Por su parte, el estudio de componentes principales (CPA) ayuda a comprender mejor las diferencias entre las poblaciones testeadas, para esto se basa en las frecuencias

Comp.	Eigen Value	% Variab
1	2616.14	70.065
2	1117.72	29.935

Marcador - Alelo	Comp. 1	Comp.2
BM1824 - 180	-0.037	0.518
BM1824 - 182	-0.037	0.103
BM1824 - 184	0.143	-0.620
BM1824 - 190	-0.016	0.137
BM1824 - 192	-0.051	-0.139
BP1 - 302	-0.044	0.138
BP1 - 310	-0.062	0.017
BP1 - 312	-0.193	-0.244
BP1 - 314	-0.014	0.048
BP1 - 316	-0.014	0.048
BP1 - 322	0.333	-0.001
BP1 - 324	-0.003	-0.007
ETH10 - 214	0.059	-0.007
ETH10 - 216	-0.058	0.103
ETH10 - 218	0.223	0.120
ETH10 - 220	-0.147	0.060
ETH10 - 222	-0.070	-0.260
ETH10 - 226	-0.007	-0.015
RM029 - 80	0.003	-0.000
RM029 - 82	0.023	0.037
RM029 - 84	-0.027	-0.037
IGF1 - 229	0.055	-0.092
IGF1 - 231	-0.055	0.092
GH - A	0.287	0.207
GH - B	-0.287	-0.207
GHR - F	-0.530	0.067
GHR - Y	0.530	-0.067

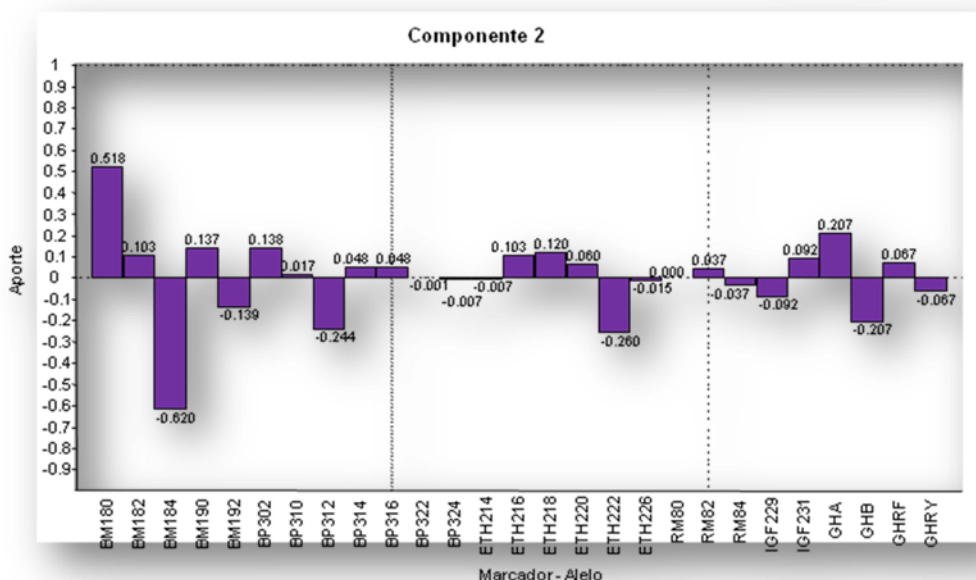
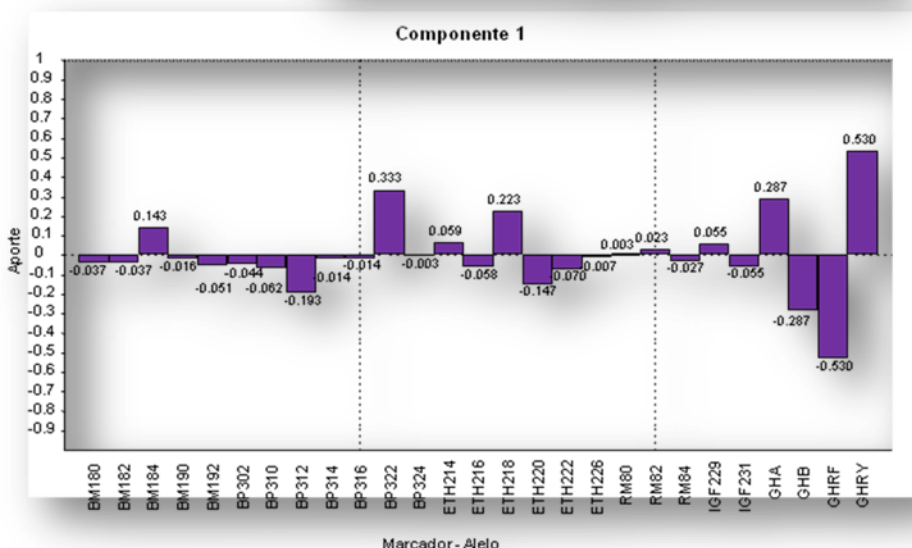
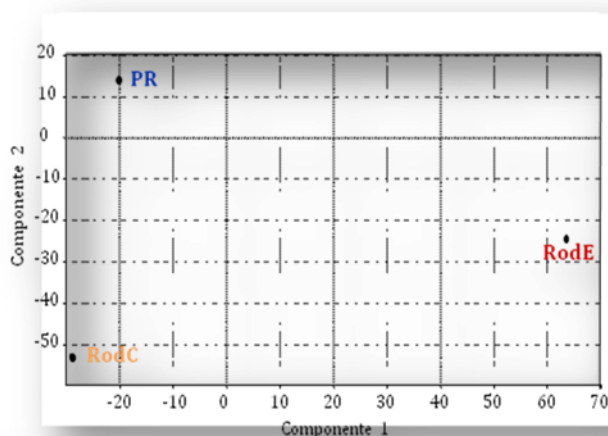


Figura 3.4: Se muestran los resultados del estudio de componentes principales realizado con el software PAST sobre las tres poblaciones Hereford (PR: Población de Referencia, RodC: Rodeo Comercial, RodE: Rodeo Experimental). En la parte superior se presentan la variabilidad explicada por los dos primeros componentes y el grafico de diferenciación de poblaciones. Además se presenta en la parte inferior el aporte de cada alelo a cada componente en forma de tabla y en forma gráfica.

de cada alelo en cada una de las poblaciones, y pondera como está aportando cada uno a dicha diferenciación. El análisis de CPA se realizó con el software PAST, y los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.4. Allí podemos ver que los dos primeros componentes explican casi al 100% de la variabilidad genética. El Componente 1, que explica el 70% de la variabilidad, está diferenciando el RodE de las otras poblaciones (PR y RodC), debido principalmente al aporte de los alelos de GHRc, seguido por alelos de GH, BP1 (alelo 322) y ETH10 (alelo 218). Consistentemente, estos dos últimos alelos aparecen asociados en este rodeo a los caracteres estudiados (ver Asociación). El segundo componente, que explica el 30% de la variación, permite diferenciar principalmente PR de RodC, siendo el aporte de los diferentes alelos bastante homogéneo. A excepción de dos alelos del marcador control BM1824 (alelos 180 y 184) que sobresalen, esto se debe a la gran diferencia de frecuencia para estos alelos que se observa entre estas dos poblaciones.

Estudio de variación de frecuencias a lo largo del tiempo en el Rodeo Experimental

Para evaluar el posible efecto de la selección sobre las frecuencias génicas a lo largo del tiempo, se estudiaron las frecuencias génicas de los marcadores ligados a genes candidatos para crecimiento en el RodE. Este rodeo se seleccionó durante 22 años utilizando un índice que incluye los BLUPs de PNd y PDD (Melucci *et al.*, 2009), por lo que las frecuencias de estos marcadores pudieron haberse visto alteradas debido a la selección. Para esto se separó el rodeo en 3 grupos según el año de nacimiento de los animales (1996-1999, 2000-2003 y 2004-2007). De este modo, un toro usado no compartiría el mismo grupo con sus hijos, ya que los toros servían al rodeo a los 2 y 3 años de edad. El análisis incluyó los mismos parámetros de diversidad genética anteriormente usados: número de alelos, frecuencias génicas, heterocigosidad esperada para cada locus (h_e), y heterocigosidad promedio (H_e), y el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) estimado por el estadístico F_{IS} . Adicionalmente, se evaluaron las diferencias entre grupos mediante un test exacto de Fisher. Los resultados de estos análisis se presentan en las Tabla 3.5 y 3.6, y Figura 3.6.

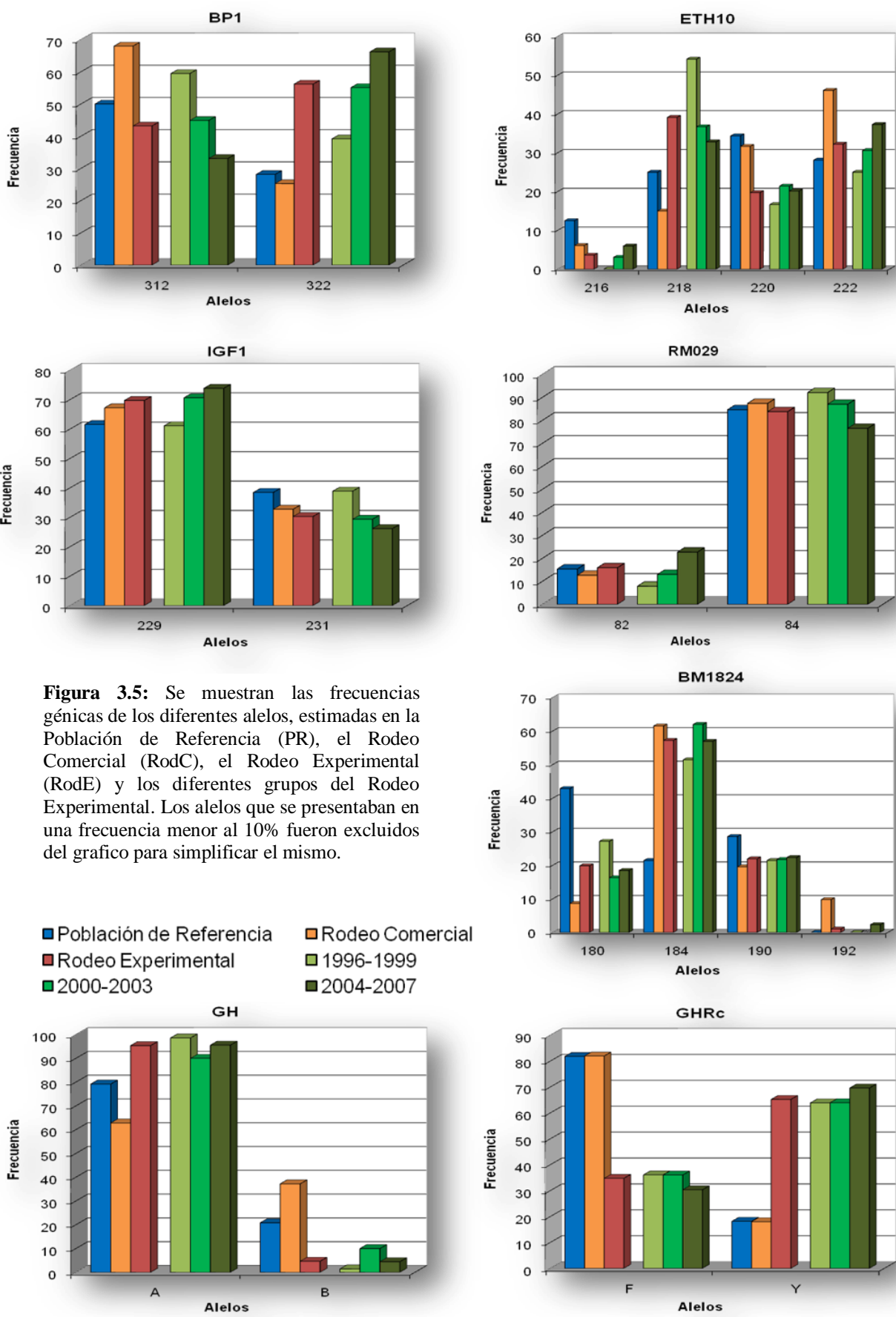


Figura 3.5: Se muestran las frecuencias génicas de los diferentes alelos, estimadas en la Población de Referencia (PR), el Rodeo Comercial (RodC), el Rodeo Experimental (RodE) y los diferentes grupos del Rodeo Experimental. Los alelos que se presentaban en una frecuencia menor al 10% fueron excluidos del grafico para simplificar el mismo.

- Población de Referencia
- Rodeo Comercial
- Rodeo Experimental
- 1996-1999
- 2000-2003
- 2004-2007

Los resultados del estudio entre rodeos y de variación durante el tiempo sugieren que la selección pudo haber influido en las frecuencias génicas de alguna de estas regiones cromosómicas. En particular, la variación de frecuencias a lo largo del tiempo en el RodE tiene primordial significancia. En este sentido el trabajo de Regitano *et al.*, (1999) demuestra que, si se aplica generación tras generación un criterio que considere alguna medición relacionada con el crecimiento, pueden variar las frecuencias a lo largo del tiempo de marcadores ligados a (o dentro de) genes candidatos para el crecimiento. Estos autores encontraron una variación en la raza Canchim (5/8 Charolais, 3/8 Nelore) de las frecuencias de polimorfismos de los genes GH e IGF1. Llamativamente todos los marcadores estudiados en esta tesis, excepto GH, muestran una tendencia hacia el aumento de la frecuencia de los alelos responsables de las asociaciones encontradas (ver sección Asociación). Así podemos ver que en los microsatélites BP1, RM029 e IGF1, todos los alelos presentados en la Figura 3.5 (con una frecuencia mayor al 10%) mostraron una tendencia a lo largo de las generaciones, y en el caso del ETH10 los alelos con tendencia fueron el 218 y 222. Para los SNPs, el GHRc fue el único gen que mostró alguna variación, observándose un leve aumento del alelo Y. Es interesante resaltar que justamente este alelo se halla en una frecuencia inusual para la raza en esta población. Parte de estas variaciones son tan importantes que evidencian diferencias significativas en los test de diferenciación de poblaciones (ver adelante Test de Fisher). Por otro lado, el microsatélite control BM1824, no muestra ningún tipo de tendencia en ninguno de sus alelos, hecho que confirmaría las hipótesis planteadas.

En la Tabla 3.6 vemos que el test de diferenciación de poblaciones resultó significativo ($P \leq 0,05$) entre los grupos 1996-1999 y 2004-2007 para todos los marcadores del BTA5 a excepción del IGF1 ($P \leq 0,08$). Por su parte, los grupos 2000-2003 y 2004-2007 se diferenciaron solamente en RM029 ($P \leq 0,08$), y los grupos 1996-1999 y 2000-2003 demostraban diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en GH únicamente. Como RodE está cerrado desde hace décadas y consecuentemente su tamaño efectivo es reducido, podría argumentarse que las variaciones en las frecuencias podrían deberse al efecto de la deriva génica y/o consanguinidad. Sin embargo, el marcador BM1824 incluido como control, ya que no está ligado a ningún gen candidato conocido, no mostró diferencias entre ninguno de los grupos. Por todo esto, se sugiere que las regiones cromosómicas estudiadas podrían estar siendo afectadas por la selección

debido a la presencia en sus inmediaciones de genes causales para los caracteres de crecimiento (ver sección de Asociación).

Tabla 3.6: Estimación de las diferencias entre las frecuencias génicas de los tres grupos del RodE, calculadas mediante el test exacto de Fisher.

Grupo	Locus/ P-Val						
	BM1824	BP1	ETH10	RM029	IGF1	GH	GHRc
1996-1999 vs 2000-2003	0,223	0,051	0,106	0,333	0,247	0,042	1,000
2000-2003 vs 2004-2007	0,386	0,095	0,410	0,070	0,646	0,167	0,451
1996-1999 vs 2004-2007	0,263	0,000	0,007	0,007	0,079	0,406	0,427

Las desviaciones significativas ($P < 0,1$) se presentan en **negrita**.

Como ya mencionamos el estudio de componentes principales permite detectar qué alelos son los que explican el mayor porcentaje de la diferenciación entre las poblaciones incluidas en el test. En el caso de los grupos generacionales del RodE, los dos primeros componentes están determinando casi el 100% de la variabilidad, y en particular el componente 1 explica el 89% de la variabilidad. Esto se puede ver claramente en el grafico de la Figura 3.6 donde, considerando únicamente el eje de las ordenadas, vemos una notoria separación de los tres grupos. Al analizar el aporte de cada alelo a cada componente, vemos que los alelos que más contribuyen al componente 1 son: dos variantes del marcador BP1 (alelos 312 y 322), seguido de un alelo del ETH10 (218), dos del RM029 (82 y 84) y los dos del IGF1 (229 y 231). Esta es otra evidencia de que estos marcadores han sido afectados por la selección a lo largo del tiempo, posiblemente debido a que estarían influenciando en la determinación de los caracteres utilizados para la selección, Peso al Nacer y al Destete. No es extraño que estos marcadores, y en particular estos alelos, hayan demostrado estar asociados con estos caracteres (ver más sección Asociación). En el segundo componente, el aporte de los diferentes alelos es más homogéneo entre los distintos genes. Sin embargo, los SNPs, de GH y GHRc constituyen el mayor aporte a este componente.

Comp.	Eigen Value	% Variab
1	782.4	89.157
2	95.1514	10.843

Marcador - Alelo	Comp. 1	Comp. 2
BM1824 - 180	-0.173	-0.312
BM1824 - 184	0.121	0.412
BM1824 - 190	0.015	-0.014
BM1824 - 192	0.037	-0.085
BP1 - 302	0.011	-0.027
BP1 - 310	-0.025	-0.028
BP1 - 312	-0.470	0.126
BP1 - 322	0.484	-0.070
ETH10 - 214	0.005	0.249
ETH10 - 216	0.105	-0.042
ETH10 - 218	-0.398	-0.228
ETH10 - 220	0.071	0.149
ETH10 - 222	0.215	-0.128
RM029 - 80	0.012	-0.028
RM029 - 82	0.254	-0.251
RM029 - 84	-0.266	0.279
IGF1 - 229	0.235	0.085
IGF1 - 231	-0.235	-0.085
GH - A	-0.075	-0.388
GH - B	0.075	0.388
GHRc - F	-0.092	0.209
GHRc - Y	0.092	-0.209

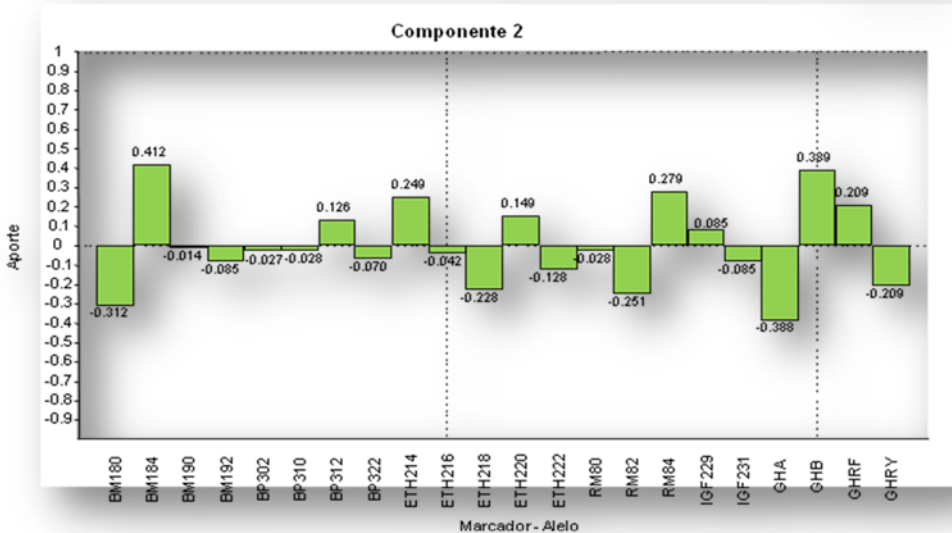
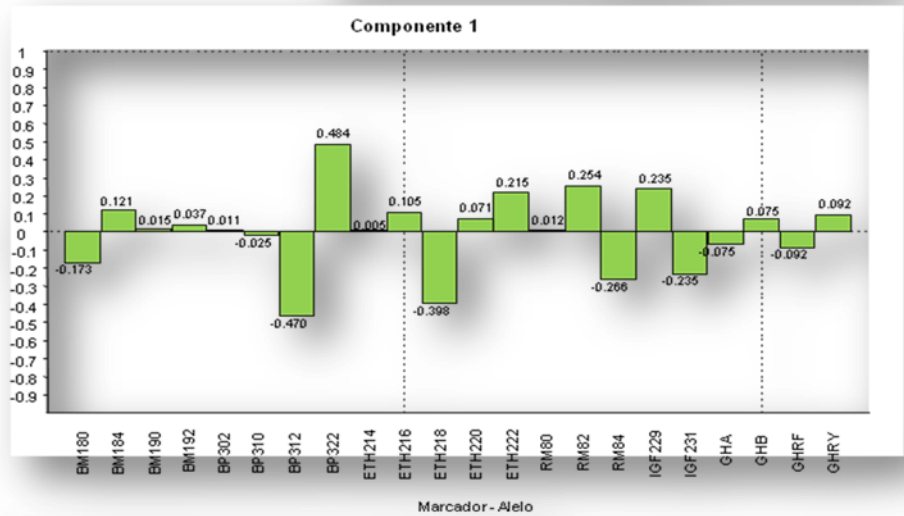
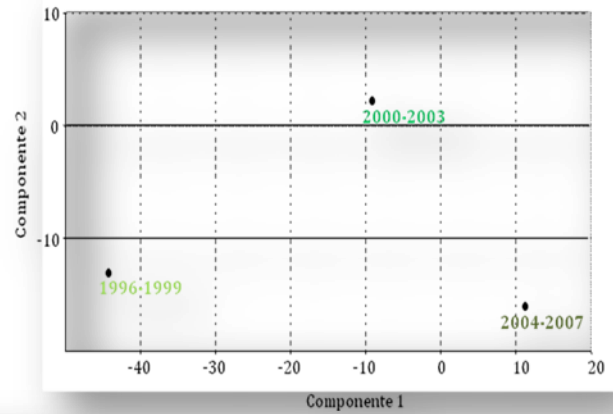


Figura 3.6: Se muestran los resultados del estudio de componentes principales realizado con el software PAST, sobre los grupos del RodE agrupados por año de nacimiento. En la parte superior se presentan la variabilidad explicada por los dos primeros componentes y el gráfico de diferenciación de grupos. Además se presenta en la parte inferior el aporte de cada alelo a cada componente en forma de tabla y en forma gráfica.

3.1.3 Inferencia de Genotipos

Con el objetivo de aprovechar la información de performance de los animales precedentes a este estudio, y de los cuales no se podía disponer de muestras de ADN, se infirieron los genotipos usando en el software Genoprob 2.0. Se incluyeron en este análisis los registros de pedigrí de RodE ($N_{\text{registros}} = 2474$) y RodC ($N_{\text{registros}} = 1754$). Los resultados del análisis se presentan en la Tabla 3.7.

Excepto para el marcador GHRc, el RodE tuvo una mayor eficiencia en recuperar genotipos que el RodC, esto puede deberse al reducido número de padres utilizado cada año y a la mayor consanguinidad del primero. Esto permite un mayor número de relaciones entre los animales y una mayor probabilidad de los genotipos inferidos. Además, si observamos dentro de los microsatélites o los SNPs, los marcadores con menor H_0 tuvieron un mayor porcentaje de recuperación, esto es lógico pues a mayor variabilidad es menos probable la inferencia. También por cuestiones de frecuencias, se produjo que ciertos genotipos fueran más fácilmente inferidos que otros, con lo cual en algunos casos se acentuó el desbalance natural de las frecuencias genotípicas. Por este motivo en algunos marcadores, ciertos genotipos quedaron desbalanceados en cuanto al número de datos, hecho que tuvo que ser corregido en el análisis estadístico.

Finalmente, esta estrategia permitió obtener un 44,3% más de genotipos de los que se pudieron tipificar, y se pudieron adicionar 346 animales a los estudios de asociación.

Tabla 3.7: Se presentan los resultados para la inferencia de genotipos en cada marcador y en cada rodeo. Abajo se muestra el porcentaje de genotipos recuperados (genotipos inferidos), respecto de los ingresados (genotipo tipificado) al programa.

	GH		GHRc		BP1		ETH10		IGF1		RM029		Total
	RodE	RodC	RodE	RodC	RodE	RodC	RodE	RodC	RodE	RodC	RodE	RodC	
Recuperados	160	7	23	48	82	22	31	5	65	9	119	55	626
Ingresados	143	83	139	88	154	90	152	90	147	87	154	87	1414
Porcentaje	111,9	8,4	16,5	54,5	53,2	24,4	20,4	5,6	44,2	10,3	77,3	63,2	44,3

3.1.4 Estudio de Asociación

Para la asociación de marcadores moleculares con caracteres de crecimiento, fueron utilizados como dato fenotípico los valores de cría (BLUPs, *Best Linear Unbiased Predictors*) provenientes de análisis independientes para cada rodeo. Por este motivo, los caracteres disponibles en cada uno eran diferentes. Sin embargo, los dos rodeos compartían los datos de Peso al Nacer directo (PNd), Peso al Destete directo (PDd), y Peso al Destete materno (PDm). Adicionalmente, el RodC disponía de los datos de Peso a los 400 días (P400), Peso a los 600 días (P600) y Área de Ojo de Bife (AOB). Si bien se ha producido una gran discusión sobre la validez o no del uso de BLUPs como dato fenotípico para análisis de asociación, como ya se mencionó, hay autores que consideran ventajoso el uso de BLUPs frente a los datos de campo (Miquel *et al.*, 2009).

En la tabla Tabla 3.8 se presentan los valores máximos, mínimos y promedio con su desviación estándar, de los BLUPs utilizados para las muestras analizadas en cada rodeo. Allí se puede ver que existía una diferencia entre los valores promedio para cada población, esto se debe a que los BLUPs provenían de análisis independientes para cada rodeo. Más aún, los rodeos no contaban con puentes genéticos que hubieran permitido un análisis conjunto. Por este motivo, los modelos fueron corridos

Tabla 3.8: BLUPs máximos, mínimos y promedio con su desviación estándar para cada rodeo.

	BLUP	Promedio ± DE	Máximo	Mínimo
RodE	PNd (Kg)	-1,7 ± 1,9	4	-7,4
	PDd (Kg)	6,3 ± 4,7	18,4	-12,2
	PDm (Kg)	3,0 ± 2,2	8,7	-5
RodC	PNd (Kg)	1,7 ± 0,9	3,6	-1
	PDd (Kg)	3,2 ± 2,9	11	-4
	PDm (Kg)	13,3 ± 5,6	24	1
	400W (Kg)	22,3 ± 7	37	9
	600W (Kg)	29,7 ± 10,2	52	5
	REA (cm2)	0,93 ± 0,88	3,6	-2,3

anidando el genotipo dentro de rodeo o bien incluyendo la interacción genotipo*rodeo. Para una mejor visualización se presentarán únicamente los resultados de los análisis de asociación que fueron significativos. Como ya se mencionó, se han encontrado tres regiones del BTA5 relacionadas con caracteres de crecimiento (Li *et al.*, 2004): de 0 a 30 cM (que incluye el microsatélite BP1), de 55 a 70 cM y de 70 a 80 cM (que entre ambas incluyen a los microsatélites IGF1, ETH10 y RM029). Además, los genes GH y GHRC donde se encuentran los SNPs estudiados están en los cromosomas BTA19 y

BTA20, respectivamente. Se analizará cada región cromosómica por separado y se discutirán los resultados, luego se integrará la información.

Microsatélite BP1: región 0 a 30 cM del BTA5

En la Tabla 3.9 se presentan los resultados para el marcador BP1 ubicado alrededor de los 20cM del BTA5, muy cercano al gen Myf5, que codifica para el factor de crecimiento de miocitos. En la Figura 3.7 se puede apreciar más claramente las diferencias entre los promedios de los BLUPs para cada característica estudiada.

Tabla 3.9: Se presentan los resultados significativos en el análisis de asociación para el marcador BP1. El número de animales utilizados en el análisis para cada genotipo se presenta entre paréntesis.

Genotipo (N)	PDd (Kg)***	PDm (Kg)***	P400 (Kg)*	P600 (Kg)*	AOB (cm ²)**
310/312 (5)	9,6 ± 5,2 ^{A,B,C,D}	3,0 ± 4,1	20,20 ± 9,42 ^a	25,40 ± 11,52 ^A	-0,25 ± 1,42 ^{A,B}
310/322 (2)	18,0 ± 4,2 ^A	4,0 ± 1,4	30,50 ± 6,36 ^{a,b}	42,50 ± 13,44 ^{A,B}	0,90 ± 0,57
RodC 312/312 (49)	13,4 ± 5,5 ^{B,E}	2,9 ± 2,5 ^a	20,73 ± 6,49 ^{b,D}	28,37 ± 9,61 ^{B,C}	1,26 ± 0,94 ^A
312/322 (36)	15,1 ± 5,8 ^{C,E}	4,1 ± 3,4	24,29 ± 7,12 ^D	32,86 ± 9,80 ^C	0,91 ± 0,77 ^B
322/322 (3)	16,3 ± 4,2 ^D	7,7 ± 2,9 ^a	25,67 ± 7,37	31,67 ± 5,69	0,83 ± 0,40
312/312 (29)	1,9 ± 2,7 ^F	2,9 ± 6,6 ^B	-	-	-
RodE 312/322 (114)	2,8 ± 1,9 ^F	5,9 ± 4,7 ^B	-	-	-
322/322 (80)	3,8 ± 1,9 ^F	8,3 ± 4,0 ^B	-	-	-

Genotipo (N)	PDd (Kg)**	PDm (Kg)***
Ambos 312/312 (78)	7,7 ± 0,4 ^{A,b}	2,9 ± 0,5 ^{A,B}
Rodeos 312/322 (150)	9,0 ± 0,3 ^A	5,0 ± 0,4 ^{A,c}
322/322 (83)	10,0 ± 1,0 ^b	8,0 ± 1,3 ^{B,c}

Los resultados del modelo anidado en rodeo se presentan como RodE y RodC, mientras que los del modelo con interacción se presentan como Ambos Rodeos. La significancia del modelo se indica en cada carácter: * P < 0,1, ** P < 0,05, *** P < 0,01. Los valores que aparecen con igual letra resultaron significativamente diferentes: minúsculas P < 0,1, MAYÚSCULAS P < 0,05.

Como vemos en la Tabla 3.9, el marcador BP1 presentó una asociación significativa con casi todos los caracteres de crecimiento estudiados, ya que únicamente con PNd la asociación no fue significativa en alguna medida. Es interesante el hecho de que las asociaciones con mayor significancia se presentaran en las primeras etapas del crecimiento (PDd y PDm), donde justamente se diferencian y producen gran parte de las células que componen el músculo. Además, el hecho de que la asociación se presentara

en los dos rodeos de manera absolutamente consistente, y en los dos análisis en similar significancia refuerza el hallazgo. En estos caracteres se observa que el alelo 322 estaría determinando un mayor crecimiento respecto al alelo 312 (Figura 3.7). En particular para el PDd, los animales con genotipo 312/322 presentaron un promedio 16,5% mayor ($P < 0,05$) que los de genotipo 312/312, y los de genotipo 322/322 presentaron un promedio 29,9% mayor ($P < 0,1$) que los de genotipo 312/312. Para el PDm, los animales con genotipo 312/322 presentaron un promedio 72,4% mayor ($P < 0,05$) que los de genotipo 312/312, y los de genotipo 322/322 presentaron un promedio 60,0% mayor ($P < 0,1$) y 175,9% mayor ($P < 0,05$) que los de genotipo 312/322 y 312/312, respectivamente. Adicionalmente, el efecto aditivo fue significativo para ambos caracteres (Tabla

Tabla 3.10: Se presentan el Efecto Aditivo y la Dominancia para el BP1 en el análisis con interacción.

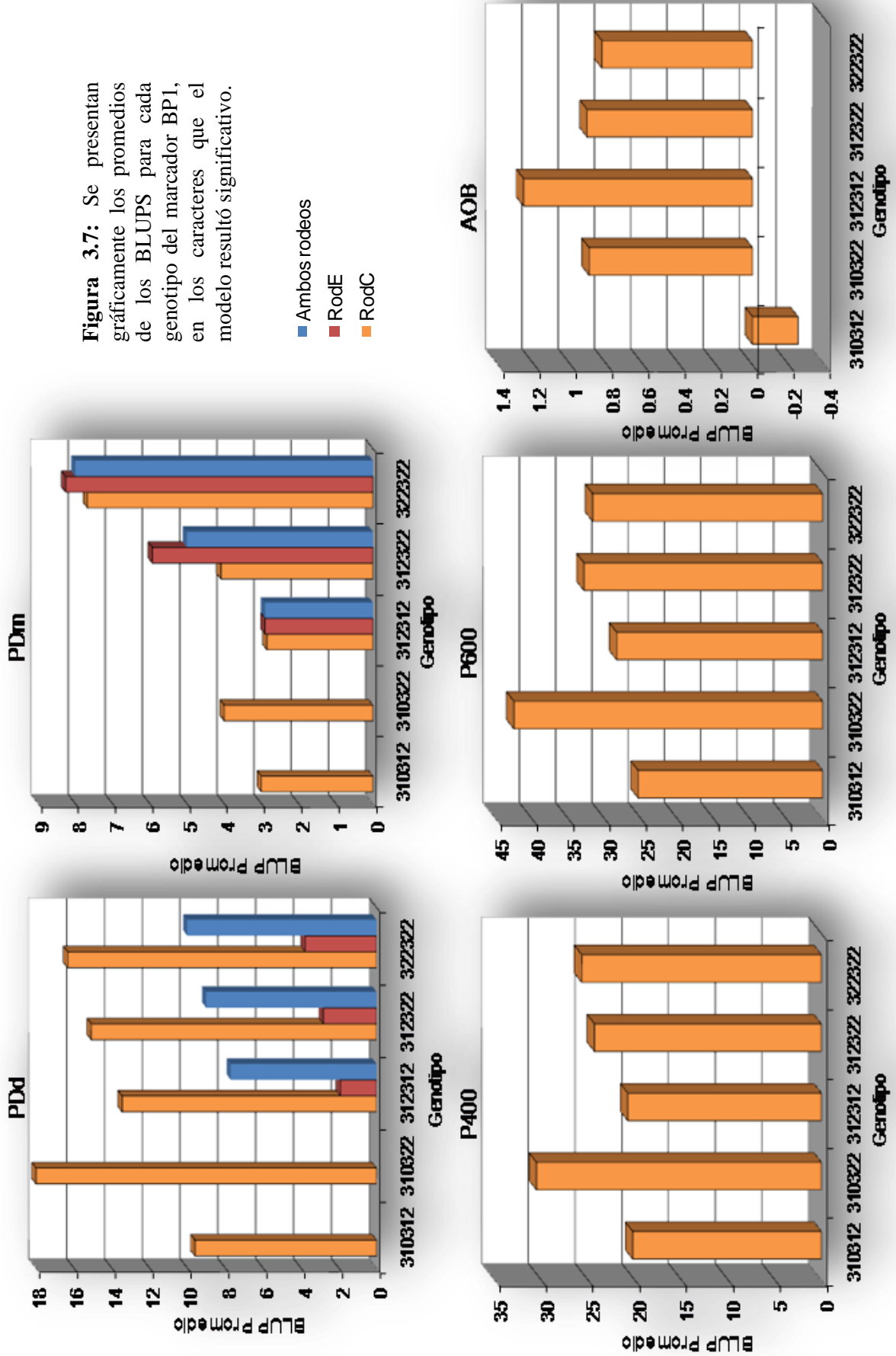
Caracter	Efecto aditivo	Dominancia
PDd (Kg)	2,37 ± 1,08*	0,08 ± 0,63 NS
PDm (Kg)	5,06 ± 1,38**	-0,42 ± 0,81 NS

El Efecto Aditivo fue estimado como la diferencia entre homocigotas, y la Dominancia como la diferencia entre el promedio de los homocigotas respecto del heterocigota. Significancia: * $P < 0,1$, ** $P < 0,05$, NS no significativo.

3.10), siendo 2,37 kg mayor para el PDd y 5,06 Kg para el PDm. Reforzando aún más este efecto positivo del alelo 322, se puede observar en el análisis realizado sobre el RodC que el genotipo 310/322 fue un 87,5% superior al 310/312 ($P < 0,05$). Recientemente, McClure *et al.* (2010) encontraron un QTL para peso al destete en la región comprendida entre 17.28 - 29.42 cM, y el pico del QTL se ubicó en este mismo marcador, BP1. Previamente, Li *et al.* (2004) ya había informado la asociación de un SNP del Myf5 con ganancia de peso diarias pre-destete en líneas comerciales de Ganado *Bos taurus*, por lo tanto nuestros resultados estarían en consistencia con ellos.

En un trabajo realizado por Melucci *et al.* (2009) sobre el RodE, encontraron una baja heredabilidad (h^2) del PDd en 20 años de selección y, extrañamente, una correlación positiva entre el PDd y el PDm ($rG = 0,37$). Por su lado, Meyer (1997) había encontrado que las estimaciones de dicha correlación para rodeos no experimentales eran usualmente negativas. Así, el hallazgo de una influencia positiva del alelo 322 sobre los BLUPs de PDd y PDm, y el aumento significativo ($P \leq 5 \times 10^{-5}$) que ha sufrido este alelo a lo largo de las generaciones, sugerirían que este alelo podría estar contribuyendo a dicha correlación positiva entre ambos caracteres.

Figura 3.7: Se presentan gráficamente los promedios de los BLUPS para cada genotipo del marcador BPI, en los caracteres que el modelo resultó significativo.



En las pesadas de medición más tardía (P400 y P600) la significancia no fue tan importante ($P < 0,1$), sin embargo los datos provenían de un solo rodeo y para algunos genotipos el N no era demasiado grande, hecho que puede estar afectando la potencia del análisis. A pesar de esto, la significancia entre los genotipos, que a su vez tenían mayor N, fue mayor que la del modelo, manteniéndose la influencia positiva del alelo 322. En este sentido, para P400 el genotipo 312/322 resultó 17,4% mayor que el 312/312 ($P < 0,05$), y el 310/322 fue 51% mayor que el 310/312 ($P < 0,1$). En el caso de P600, el genotipo 312/322 resultó 15,8% mayor que el 312/312, y el 310/322 fue 67,3% mayor que el 310/312, todas con una alta significancia ($P < 0,05$). Esto sugeriría que la región sigue teniendo alguna relación con el crecimiento en etapas de crecimiento más cercanas a la adultez, aunque se requeriría un estudio sobre una población más grande para confirmarlo.

Finalmente, la relación con el crecimiento de la medición del AOB, radica en que es un parámetro utilizado para evaluar la muscularidad del animal, y es un buen indicador de la cantidad de carne en la res. Por este motivo, es una medida que se relaciona con el crecimiento a lo largo de todas las etapas de crecimiento del animal. El modelo de asociación del BP1 con AOB fue significativo al 5%, sin embargo únicamente el genotipo 310/312 fue significativamente ($P < 0,05$) menor al 312/312 y al 312/322, en 1,51 y 1,16, respectivamente. En este sentido, la tendencia de influencia de los diferentes alelos no es tan clara como en los casos anteriores, por lo tanto se requeriría un N mayor para realizar una evaluación con mayor certeza. No obstante, el microsatélite BP1 se ubica en una posición cromosómica cercana al Myf5, cuyo producto es un factor de crecimiento y diferenciación de miocitos que interviene en el desarrollo muscular. Por lo tanto, la asociación de BP1 con AOB podría estar reflejando esta función del Myf5. En esa misma región cromosómica existen otros genes que, por su función, podrían ser los genes causales para las asociaciones encontradas. Algunos ejemplos son el Factor de Crecimiento de Miocitos 6 (Myf6), el Inhibidor de la Familia del Crecimiento 4 y la proteína asociada a la división celular 3 (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview).

Microsatélites ETH10, IGF1 y RM029: Región 55 a 85cM del BTA5

Los análisis de asociación significativos entre los marcadores ubicados en la región entre 55 y 85 cM del cromosoma BTA5 y los BLUPs de crecimiento se presentan en la Tabla 3.11. Todos los análisis resultaron significativos para PDd

Tabla 3.11: Se presentan los resultados significativos en el análisis de asociación para los marcadores IGF1, RM029 y ETH10.

IGF1		PNd (Kg)**	PDd (Kg)**	P600 (Kg)**
RodC	229/229 (38)	1,70 ± 0,28	14,76 ± 5,06 ^A	32,4 ± 9,1 ^{a,B}
	229/231 (42)	1,43 ± 0,26	13,05 ± 5,88	28,6 ± 10,4 ^{a,D}
	231/231 (3)	2,60 ± 0,98	20,67 ± 2,52 ^A	44,0 ± 6,9 ^{B,D}
RodE	229/229 (76)	-2,33 ± 0,20 ^{A,B}	3,16 ± 1,74	-
	229/231 (86)	-1,43 ± 0,18 ^A	2,81 ± 2,21	-
	231/231 (39)	-1,29 ± 0,27 ^B	1,59 ± 2,72	-
RM029		PDd (Kg)**	P600 (Kg)*	
RodC	82/82 (9)	16,78 ± 1,22 ^A	36,0 ± 3,5 ^A	
	82/84 (12)	14,17 ± 1,05	32,3 ± 3,0	
	84/84 (105)	12,62 ± 0,36 ^A	28,5 ± 1,0 ^A	
RodE	82/82 (17)	2,80 ± 0,89	-	
	82/84 (21)	3,14 ± 0,80	-	
	84/84 (220)	3,12 ± 0,25	-	
ETH10		PNd (Kg)***	PDd (Kg)***	
RodC	216/220 (3)	2,00 ± 0,94	20,7 ± 2,1 ^{A,b,C}	
	216/222 (5)	1,12 ± 0,73	10,8 ± 1,6 ^A	
	218/218 (2)	2,30 ± 1,15	19,0 ± 2,5	
	218/220 (6)	1,53 ± 0,66	15,3 ± 1,5	
	218/222 (18)	1,56 ± 0,38	12,5 ± 0,9 ^b	
	218/226 (2)	2,65 ± 1,15	21,0 ± 2,5	
	220/220 (7)	1,76 ± 0,61	15,1 ± 1,4	
	220/222 (27)	1,50 ± 0,31	13,8 ± 0,7	
	222/222 (11)	1,65 ± 0,49	11,8 ± 1,1 ^C	
	RodE	214/214 (2)	0,44 ± 1,15	5,1 ± 2,5
214/216 (2)		-2,30 ± 1,15	4,5 ± 2,5	
214/218 (6)		0,29 ± 0,66 ^{A,B}	3,9 ± 1,5	
214/220 (2)		-1,34 ± 1,15	5,6 ± 2,5	
214/222 (4)		-0,59 ± 0,81	2,8 ± 1,8	
216/218 (3)		-1,99 ± 0,94	2,3 ± 2,1	
216/222 (6)		-3,67 ± 0,66 ^B	3,0 ± 1,5	
218/218 (23)		-1,18 ± 0,34 ^C	2,8 ± 0,8	
218/220 (36)		-1,60 ± 0,27	2,99 ± 0,60	
218/222 (45)		-2,14 ± 0,24	3,14 ± 0,53	
220/220 (6)		-1,38 ± 0,66	1,99 ± 1,46	
220/222 (19)		-1,58 ± 0,37	3,08 ± 0,82	
222/222 (16)		-3,30 ± 0,41 ^{A,C}	1,86 ± 0,89	

El número de animales utilizados en el análisis para cada genotipo se presenta entre paréntesis. Los resultados del modelo anidado en cada rodeo se presentan como RodE y RodC. La significancia del modelo se indica en cada carácter: * P < 0,1, ** P < 0,05, *** P < 0,01. Los valores que aparecen con igual letra resultaron significativamente diferentes: minúsculas P < 0.1. MAYÚSCULAS P < 0.05.

($P < 0,05$ y $P < 0,01$), sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió con el marcador BP1, no se observó asociación alguna con el PDm. Para el resto de los marcadores, se observaron asociaciones del ETH10 e IGF1 con PNd ($P < 0,05$), y del IGF1 y RM029 con P600 ($P < 0,05$ y $P < 0,1$, respectivamente). Por su parte, los caracteres P400 y AOB no presentaron asociación para ninguno de los marcadores.

En el caso del ETH10, si bien en el modelo la asociación fue muy significativa ($P < 0,01$) para los caracteres PNd y PDd, el microsatélite posee un gran número de alelos, con lo cual las diferencias significativas entre genotipos se encontraron únicamente para RodE en PNd y para RodC en PDd. En el primer caso, el genotipo 214/218 produciría en promedio terneros al nacer de 3,96 y 3,59 Kg más que los genotipos 216/222 y 222/222, respectivamente, mientras que el genotipo 218/218 resultaría en promedio 2,12 Kg más pesado que el genotipo 222/222. En el caso del PDd, los animales del RodC con genotipo 216/220 fueron 9,9, 8,2 y 8,9 Kg más pesados que los genotipos 216/222, 218/222 y 222/222, respectivamente (Tabla 3.11). Independientemente de todo esto y para ambos caracteres, los alelos 216 y 222 estarían produciendo un peso promedio menor que los alelos 214 y 218 (Figura 3.8).

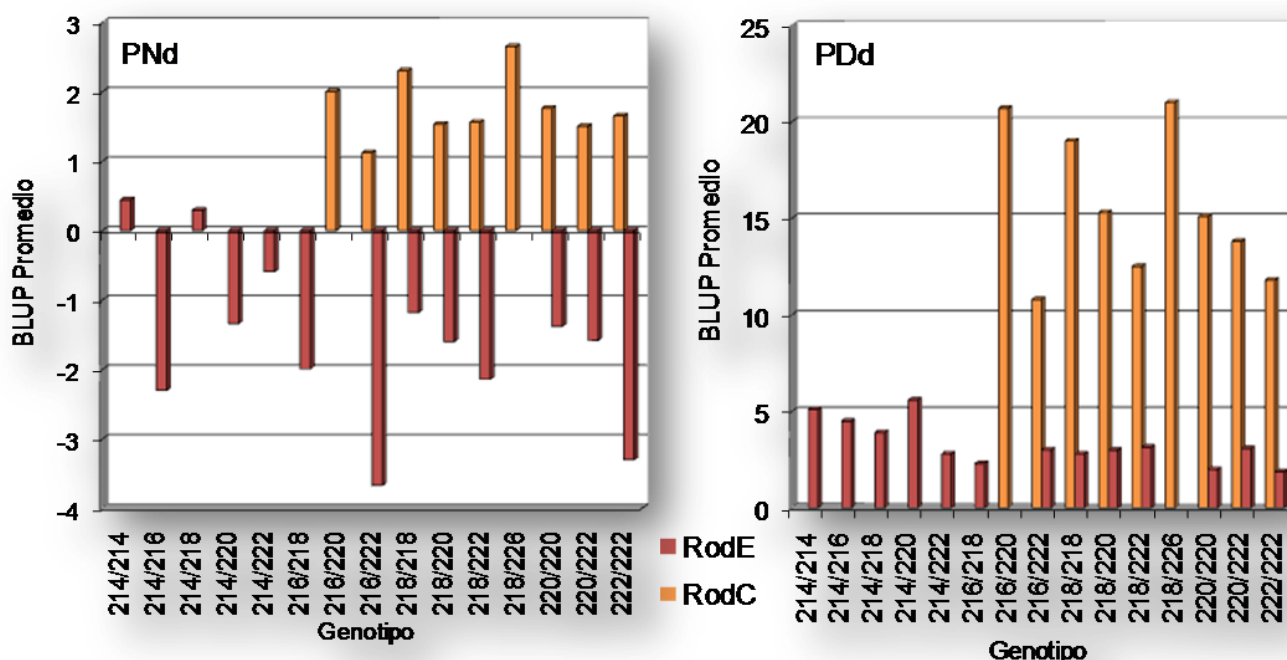


Figura 3.8: Se presentan gráficamente los promedios para los genotipos de ETH10 para los caracteres que resultaron significativos (PNd y PDd).

Por su parte, el marcador RM029 fue el que mostró menor significancia en las asociaciones testeadas, resultando significativo el PDd ($P < 0,05$) y observándose una tendencia ($P < 0,1$) para el P600. Así mismo, los BLUPs promedio de los genotipos no se muestran tan consistentes como en los otros marcadores, ya que si bien las diferencias

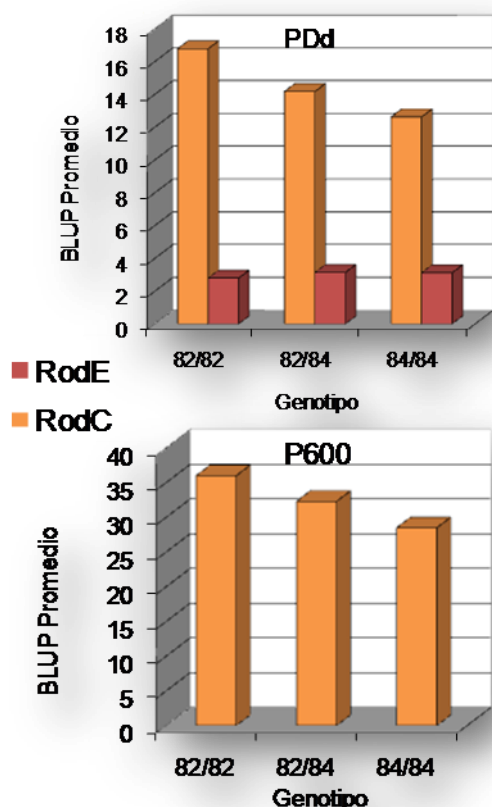


Figura 3.9: Se presentan gráficamente los promedios para los genotipos de RM029 para los caracteres que resultaron significativos (PDd y P600).

significativas se detectaron en el RodC, los efectos comparativos entre genotipos son diferentes en cada rodeo (Tabla 3.11 y Figura 3.9). No obstante, en ambos caracteres para el RodC, se observó un efecto significativamente positivo ($P < 0,05$) del genotipo 82/82 respecto del 84/84, dando en promedio valores 33,0% y 26,3% superiores para PDd y P600, respectivamente.

En el caso del IGF1, la asociación resultó significativa ($P < 0,05$) para los caracteres PNd, PDd y P600, aunque las diferencias entre genotipos siempre tuvieron significancia en uno solo de los rodeos. Pese a esto, los resultados muestran que el alelo 229 produciría animales más livianos que el alelo 231. En este sentido, para el PNd los animales del RodE con genotipo 229/229 fueron en promedio 0,90 y 1,04 Kg más livianos ($P < 0,05$) que los de genotipo 229/231 y 231/231, respectivamente. En el RodC, aunque no se encontró significancia estadística para las diferencias, el promedio de PN mayor fue el de los animales con genotipo 231/231. Para el PDd los animales del RodC con genotipo 229/229 fueron en promedio 5,91 Kg más livianos ($P < 0,01$) que los de genotipo 231/231. En este marcador se observa un comportamiento similar al de los otros de esta región (ETH10 y RM029), ya que el modelo resultó significativo para la asociación con PDd, pero las diferencias entre genotipos fueron significativas únicamente para RodC. En este sentido, Melucci et al.

(2009) habían encontrado en el RodE una varianza aditiva del PDd llamativamente baja, y lo justificaron por la alta presión de selección aplicada sobre este rodeo. Esta baja varianza podría estar enmascarando las diferencias explicadas por los genotipos, y por este motivo no hubiesen resultado significativas. En el análisis del P600, solamente con datos del RodC, el genotipo 231/231 produjo animales 15,4 y 11,6 Kg más pesados ($P < 0,05$) que los genotipos 229/231 y 229/229, respectivamente (Figura 3.10, Tabla 3.11).

En estudios anteriores, otros autores han publicado asociaciones de alelos del microsatélite IGF1, con mediciones de crecimiento. En 1996, Moody y colaboradores encontraron en varias poblaciones Hereford de USA un efecto de este microsatélite en BLUPs (EPD, *Expected Progeny Differences*) para peso al nacer y para tasa de ganancia desde el nacimiento a los 180 días (tasa de ganancia pre-destete). En ambos casos el alelo 229 producía menores pesos y tasas de ganancia que el alelo 231. Por su parte, Andrade *et al.* (2008) y Pereira *et al.* (2005) también encontraron una asociación de este marcador con el PNd y PDd en la raza Canchim (Charolais-Nelore 5/8). Andrade *et al.* (2008) detectaron que el alelo 225 estaría asociado con pesos mayores, esto es consistente con el origen cebuino de este alelo, ya que las razas cebuinas son generalmente más pesadas que las taurinas. Adicionalmente, y contrariamente a nuestros hallazgos, sugieren que el alelo 231 estaría asociado con pesos menores. No obstante, el análisis no incluye el genotipo 231/231 (por no haberse encontrado) y las

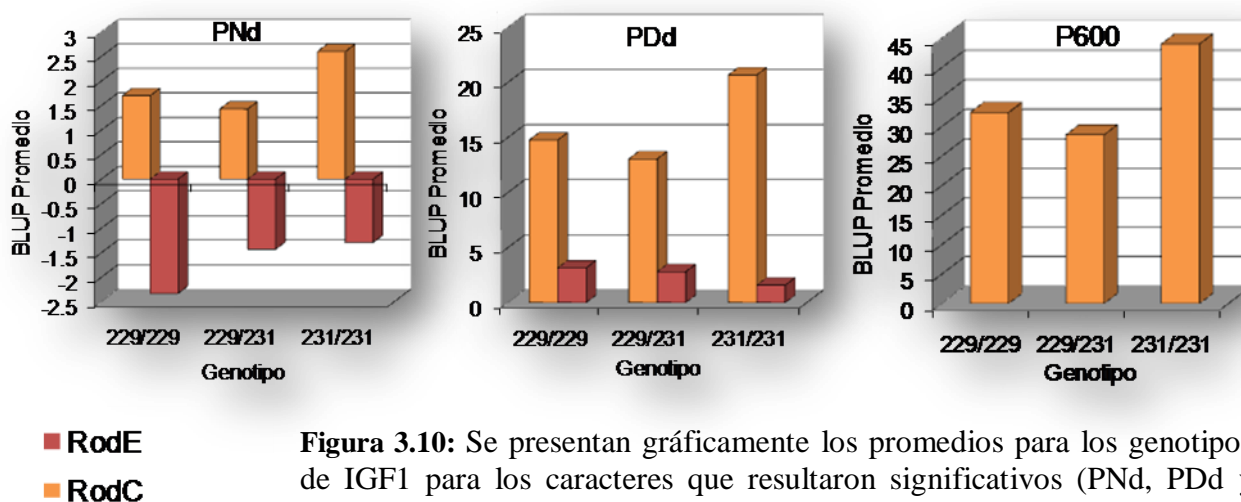


Figura 3.10: Se presentan gráficamente los promedios para los genotipos de IGF1 para los caracteres que resultaron significativos (PNd, PDd y P600).

diferencias entre los genotipos 229/229 y 229/231 no son muy grandes, más aún, para el PDd el promedio del 229/231 es mayor que el del 229/229. Por todo esto podemos decir que nuestros resultados no diferirían de los informados por estos autores. Otros autores también han encontrado asociaciones con marcadores en el entorno del gen IGF1, así se pueden citar los trabajos de Ge *et al.* (2001) que encontraron una asociación entre el polimorfismo IGF1/SnaBI y la tasa de ganancia en los 20 días post-destete en Angus, Li *et al.* (2004) que observaron un efecto de dominancia del IGF1 en el PN en razas *Bos taurus*, y Machado *et al.* (2003) que detectaron un QTL asociado a varios caracteres de crecimiento cerca del IGF1 en la raza Canchim.

Para realizar el análisis tomando los genotipos de pares de genes, se decidió utilizar dos pares de marcadores, por un lado ETH10 e IGF1 y por el otro IGF1 y RM029. Este agrupamiento se realizó en base al orden que ocupan en el cromosoma los marcadores: ETH10 (60.836.475 pb), IGF1 (71.198.741 pb) y RM029 (80.417.234 pb), apareándose los marcadores en posiciones cromosómicas cercanas. En estos análisis fue necesario eliminar un número importante de datos para que cada celda del análisis incluyera al menos 2 animales. En las Tablas 3.12 y 3.13 se presentan los resultados para el análisis de

asociación para el primer segmento cromosómico (ETH10 - IGF1) y para el segundo (RM029 - IGF1), tomando los genotipos de a pares. En ambos casos la representación gráfica no simplificaba su visualización, con lo cual se decidió no presentarla.

Tabla 3.12: Se presentan los resultados significativos en el análisis de asociación para los genotipos tomados en conjunto de los marcadores RM029 - IGF1.

	Genotipo RM029 - IGF1 (N)	PNd (Kg)***	PDd (Kg)*
RodC	82/82 - 229/229 (5)	2,4 ± 0,7	16,8 ± 1,6
	82/82 - 229/231 (3)	1,7 ± 0,9	15,3 ± 2
	82/84 - 229/231 (3)	0,1 ± 0,9	8,6 ± 2 ^A
	84/84 - 229/229 (25)	1,5 ± 0,3	14,4 ± 0,7
	84/84 - 229/231 (34)	1,4 ± 0,2	13,2 ± 0,6
	84/84 - 231/231 (2)	2,4 ± 1,1	20,5 ± 2,5 ^A
RodE	82/82 - 229/229 (9)	-1,4 ± 0,5	3,4 ± 1,2
	82/82 - 229/231 (8)	-2,2 ± 0,5	2 ± 1,2
	82/84 - 229/229 (5)	-2,4 ± 0,7	3,1 ± 1,6
	82/84 - 229/231 (7)	-2,2 ± 0,6	3,4 ± 1,3
	84/84 - 229/229 (55)	-2,5 ± 0,2 ^A	3 ± 0,4
	84/84 - 229/231 (64)	-1,1 ± 0,2 ^A	2,8 ± 0,4
	84/84 - 231/231 (11)	-1,1 ± 0,5	3,5 ± 1

El número de animales utilizados en el análisis para cada genotipo se presenta entre paréntesis. Los resultados del modelo anidado en cada rodeo se presentan como RodE y RodC. La significancia del modelo se indica en cada carácter: * P < 0,1, *** P < 0,01. Los valores que aparecen con igual letra resultaron significativamente diferentes: P < 0,05.

Tabla 3.13: Se presentan los resultados significativos en el análisis de asociación para los genotipos tomados en conjunto de los marcadores ETH10 - IGF1.

	Genotipo ETH10 – IGF1 (N)	PNd (Kg)***	PDd (Kg)***	400W (Kg)**	600W (Kg)**
	216/220 - 229/229 (2)	2,2 ± 1,1	21 ± 2,4 ^{a,b,c}	30,0 ± 4,2 ^{A,B,C}	43,5 ± 0,7 ^{a,B,C,d,E}
	216/222 - 229/231 (4)	1,3 ± 0,8	9,5 ± 1,7 ^{a,d}	21,3 ± 3,2	27,7 ± 7,4 ^a
	218/220 - 229/229 (5)	1,6 ± 0,7	16 ± 1,5	26,0 ± 10,3 ^{D,E,F}	34,6 ± 15,3 ^{F,G,H}
	218/222 - 229/229 (9)	1,8 ± 0,5	14 ± 1,2	24,9 ± 5,5 ^{G,H,I}	33,1 ± 7,6 ^{I,J,K}
	218/222 - 229/231 (8)	1,2 ± 0,5	11,3 ± 1,2	17,5 ± 8,1 ^{A,D,G,J,K}	22,9 ± 1,1 ^{B,F,I,L,M,N,o}
RodC	218/226 - 229/229 (2)	2,6 ± 1,1	21 ± 2,4 ^{d,e,F}	25,5 ± 0,7	40,0 ± 0,0 ^{L,P,Q}
	220/220 - 229/231 (7)	1,7 ± 0,6	15,1 ± 1,3	26,3 ± 8,0 ^{J,L,M}	33,7 ± 10,0 ^{M,R,S}
	220/222 - 229/229 (8)	1,2 ± 0,5	10,5 ± 1,2 ^{b,e}	17,0 ± 3,5 ^{B,E,H,L,N,o}	23,3 ± 5,5 ^{C,G,J,P,R,u}
	220/222 - 229/231 (15)	1,4 ± 0,4	15 ± 0,8	24,4 ± 7,8 ^{K,N,P}	31,5 ± 0,5 ^{d,N,v}
	222/222 - 229/229 (2)	-	-	26,5 ± 6,4 ^o	37,0 ± 2,8 ^{o,u,w}
	222/222 - 229/231 (7)	1,3 ± 0,6	9,7 ± 1,3 ^{C,F}	17,4 ± 6,8 ^{C,F,I,M,P}	23,1 ± 8,9 ^{E,H,K,Q,S,v,w}
	214/216 - 229/231 (2)	-2,2 ± 1,1	4,4 ± 2,4	-	-
	214/218 - 229/231 (5)	0,2 ± 0,7 ^{a,B}	3,7 ± 1,5	-	-
	214/222 - 229/231 (2)	0,1 ± 1,1	2,4 ± 2,4	-	-
	216/218 - 229/229 (2)	-1,8 ± 1,1	2,8 ± 2,4	-	-
	216/222 - 229/229 (2)	-2,5 ± 1,1	3,4 ± 2,4	-	-
	216/222 - 229/231 (2)	-4,8 ± 1,1 ^{a,C}	2 ± 2,4	-	-
	218/218 - 229/229 (5)	-1 ± 0,7	3,9 ± 1,5	-	-
	218/218 - 229/231 (13)	-1,1 ± 0,4 ^D	2 ± 0,9	-	-
	218/220 - 229/229 (16)	-2,1 ± 0,4	3,3 ± 0,8	-	-
	218/220 - 229/231 (14)	-1,2 ± 0,4 ^E	2,5 ± 0,9	-	-
RodE	218/222 - 229/229 (16)	-2,7 ± 0,4	2,9 ± 0,8	-	-
	218/222 - 229/231 (24)	-2 ± 0,3	3 ± 0,7	-	-
	218/222 - 231/231 (3)	0,9 ± 0,9 ^{C,F}	3,7 ± 2	-	-
	220/220 - 229/229 (2)	-1,6 ± 1,1	2,6 ± 2,4	-	-
	220/220 - 229/231 (3)	-0,2 ± 0,9	1,1 ± 2	-	-
	220/222 - 229/229 (8)	-2,4 ± 0,5	3,7 ± 1,2	-	-
	220/222 - 229/231 (5)	-0,9 ± 0,7	3,6 ± 1,5	-	-
	220/222 - 231/231 (2)	-1,1 ± 1,1	2 ± 2,4	-	-
	222/222 - 229/229 (9)	-4 ± 0,5 ^{B,D,E,F}	1,4 ± 1,1	-	-
	222/222 - 229/231 (5)	-1,9 ± 0,7	2,6 ± 1,5	-	-

El número de animales utilizados en el análisis para cada genotipo se presenta entre paréntesis. Los resultados del modelo anidado en cada rodeo se presentan como RodE y RodC. La significancia del modelo se indica en cada carácter: ** P < 0,05, *** P < 0,01. Los valores que aparecen con igual letra resultaron significativamente diferentes: minúsculas P < 0,1, MAYÚSCULAS P < 0,05.

La interpretación de los resultados no fue sencilla en estos casos ya que el número de variantes resultó elevado. No obstante, una primera mirada nos muestra la gran significancia de la asociación con PNd en ambos análisis, lo que nos podría estar indicando una fuerte influencia de esta región sobre este carácter. Además, se vio una diferencia en la significancia en las mediciones siguientes, mientras para el primer segmento se mantuvo una asociación significativa con PDd, P400 y P600, en el segundo

segmento se detectó solamente una tendencia para PDd. Esto podría indicar la presencia de más de un gen influyendo sobre el crecimiento en la región cromosómica abarcada por estos 3 marcadores. En este sentido, Curi *et al.* (2005) no encontró acoplamiento alguno entre los alelos de los microsatélite IGF1 y los del polimorfismo IGF1/SnaBI, pese a encontrarse en el mismo gen. No obstante, se han publicado asociaciones demostradas con ambos marcadores, hecho que podría estar sustentando la hipótesis de la presencia de al menos 2 genes relacionados al crecimiento en la región del gen IGF1. En relación a esto, existen otros genes en la región que por su función podrían estar afectando el crecimiento, algunos ejemplos son: proteína relacionada a actina, Proteína C de unión a la miosina, miosina IA, cadena corta de la miosina 6B, integrina, mioglobina y glicosiltransferasa (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview). Adicionalmente, se puede ver el efecto a favor de mayores pesos encontrado anteriormente para los alelos de los diferentes marcadores: 214 y 218 del ETH10, 231 del IGF1 y 82 del RM029. Más aún, casi todos los genotipos con mayores promedios en los caracteres de crecimiento presentaban alguno de estos alelos. Además, en estos análisis se repite lo observado y ya comentado para los genes en particular, las diferencias significativas entre genotipos en cada característica analizada se encontraron en uno de los rodeos: para PNd en RodE y para PDd en RodC.

Finalmente, se calcularon en esta región cromosómica las fases de ligamiento entre los marcadores cercanos, como en los genotipos de a pares. Las fases ETH10-IGF1 pudieron ser calculadas únicamente para 146 animales, debido a que el número de animales analizados no era suficiente para compensar el alto grado de polimorfismo que presentó el ETH10. Por su parte, las fases IGF1-RM029 pudieron ser reconstruidas en 227 animales. Los análisis de asociación no fueron significativos en ninguno de los casos. Esto probablemente se deba a tres motivos fundamentales: primero al número de datos, ya que la cantidad de fases reconstruidas fue considerablemente menor que los genotipos disponibles. Segundo a la variabilidad, ya que al acoplar dos genes los haplotipos posibles es el producto del número de alelos en cada gen, por ejemplo para la fase IGF1-RM029 de 2 alelos y 3 genotipos posibles por gen, pasamos a 4 haplotipos y 10 genotipos posibles, hecho que disminuye mucho los animales por cluster en el análisis. Tercero, la influencia del segmento cromosómico, como ya hemos visto en el RM029 y en el estudio de genotipos de a pares IGF1-RM029, presentaron pocas

asociaciones respecto del IGF1, hecho que sugiere que el o los genes responsables se encuentren en el entorno del IGF1, por lo tanto, no es extraño que las fases no detecten tan claramente la influencia de este/os genes.

SNPs de GH y GHRc: BTA19 y BTA20

En el caso de los SNPs, los análisis de significancia fueron dispares, ya que GHRc no presentó significancia alguna con todos los caracteres estudiados. En principio se eligió este SNP por pertenecer a la vía de la hormona de crecimiento y por haber sido asociado con diferentes parámetros de producción lechera en ganado lechero (Blott *et al.*, 2003; Viitala *et al.*, 2006). En este sentido, como en las primeras etapas del crecimiento el animal se alimenta principalmente de leche, se planteó una posible influencia de este gen a través de la producción lechera. Más aún al disponer de un BLUP que estima el efecto materno sobre el crecimiento al destete, este era un buen candidato para testear la asociación.

Sin embargo, el análisis de asociación no fue significativo y por eso sólo se presentan en la Tabla 3.14 los BLUPs promedio para cada genotipo, en los caracteres medidos en las primeras etapas del crecimiento del individuo.

Tabla 3.14: BLUPs promedio con su desviación estándar para los genotipos del GHRc. El número de animales utilizados en el análisis para cada genotipo se presenta entre paréntesis. Los resultados del modelo anidado fueron no significativos.

	Genotipo (N)	PNd (Kg)	PDd (Kg)	PDm (Kg)
RodC	FF (48)	1,70 ± 0,28	13,4 ± 0,58	3,53 ± 0,70
	FY (27)	1,53 ± 0,37	14,9 ± 0,77	3,88 ± 0,90
RodE	FF (15)	-1,01 ± 0,51	2,27 ± 1,03	5,25 ± 1,19
	FY (66)	-1,30 ± 0,24	3,07 ± 0,49	5,08 ± 0,57
	YY (63)	-2,03 ± 0,25	3,07 ± 0,50	5,70 ± 0,58

En estudios anteriores sobre este mismo marcador, White *et al.* (2007) encontraron en animales *Bos taurus* que el genotipo YY producía menor rendimiento carnicero y mayor área de ojo de bife que el genotipo FY, entre otros caracteres testeados. No obstante, las dos poblaciones estudiadas no fueron consistentes en el análisis, ya que una de ellas no presentó asociación alguna. Por su parte, Waters *et al.* (2010) no encontraron asociación de este SNP con varias mediciones de crecimiento en la raza Holando, sin embargo detectó una gran influencia de dos SNPs de la región promotora del gen con peso de la vaca adulta y peso de la progenie. Esta asociación de la región promotora fue observada por otros autores previamente, Hale *et al.* (2000)

habían encontrado la asociación de un microsatélite en la región promotora del GHRc, con peso al destete y de carcasa en Angus. Mientras Curi *et al.* (2005) encontraban asociación del mismo microsatélite con tasa de ganancia y peso final, en ganado Nelore, Canchim y Angus x Nelore. Por otro lado, Sherman *et al.* (2007) también encontró asociaciones en ganado sintético (*Bos taurus*) de dos SNPs en el gen GHRc con varias mediciones relacionadas a crecimiento como ganancia diaria y peso maduro, entre otras. Finalmente, Ge *et al.* (2003) encontró una asociación en un SNP, también de la región promotora, con niveles plasmáticos de IGF1. Todos estos estudios en general encontraron asociaciones del promotor con el crecimiento, demostrando así la influencia del gen, no obstante casi no hubo asociaciones detectadas del SNP F279Y, por lo tanto este marcador no estaría en acoplamiento con la mutación causal.

Tabla 3.15: Resultados significativos en el análisis de asociación para el GH.

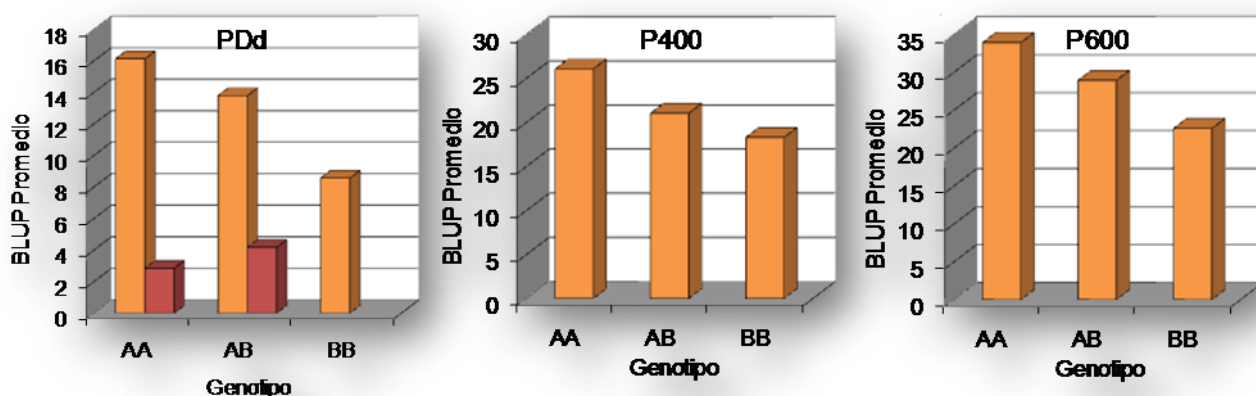
	Genotipo (N)	PDd (Kg)***	P400 (Kg)***	P600 (Kg)**
	AA (21)	16,1 ± 0,8 ^A	26,0 ± 1,4 ^{A,B}	33,9 ± 2,1 ^A
RodC	AB (46)	13,8 ± 0,5 ^B	21,0 ± 0,9 ^A	28,9 ± 1,4
	BB (7)	8,6 ± 1,4 ^{A,B}	18,2 ± 2,5 ^B	22,5 ± 3,6 ^A
	AA (130)	2,85 ± 0,3 ^A	-	-
RodE	AB (13)	4,18 ± 1,0 ^A	-	-

El número de animales utilizados en el análisis para cada genotipo se presenta entre paréntesis. Los resultados del modelo anidado en cada rodeo se presentan como RodE y RodC. La significancia del modelo se indica en cada carácter: ** P < 0,05, *** P < 0,01. Los valores que aparecen con igual letra resultaron significativamente diferentes: P < 0,05.

rol central que ocupa la Hormona de Crecimiento en el desarrollo del animal a nivel óseo, muscular y adiposo. En particular, las diferencias significativas entre genotipos se observaron sólo en el RodC, siendo el alelo A el responsable por promedios mayores en los BLUPs (P<0,05). Asimismo, se encontró que en PDd el genotipo AA y AB tenían un peso 7,5 Kg y 5,2 Kg superior, respectivamente, que el genotipo BB. Por su parte, en el P400 el genotipo AA produjo animales 5 Kg y 7,8 Kg más pesados que el genotipo AB y BB, respectivamente, y en el P600, el genotipo AA produjo animales 11,4 Kg más pesados que el genotipo BB (Figura 3.11). En el RodE, el genotipo BB tuvo que ser

Por su parte, el SNP L217V del exón 5 del gen GH presentó asociación con varios de los caracteres de crecimiento. Los resultados de asociaciones positivas se presentan en la Tabla 3.15. Las asociaciones más significativas (PDd y P400) coinciden con etapas de gran anabolismo, esto es consistente con el

excluido ya que tenía una única observación, y la distribución de los datos fue muy dispar, hecho que podría haber afectado la potencia del análisis. En este mismo sentido, el hallazgo de que el genotipo AB produjo promedios de BLUPs mayores que el AA con significancia estadística, podría ser reflejo de la mala distribución de los datos en el análisis. Adicionalmente, la mayoría de los genotipos de esta población fueron tipificados por la técnica PCR-RFLP. En particular el genotipo B es el detectado por el corte de la enzima, y por tal motivo puede haber errores en la tipificación debido a falla en el corte de la enzima (principalmente de errores de genotipos heterocigotas en lugar de BB). Como ya se comentó se decidió desarrollar la técnica de pirosecuenciación por ser más exacta y fácil de implementar, sin embargo al momento de realizar esta tesis no se pudo retipificar el 100% de las muestras. Por lo tanto, los resultados en esta población podrían tener un sesgo y por lo tanto deben ser considerados con cierta cautela.



■ RodE **Figura 3.11:** Se presentan gráficamente los promedios para los genotipos de
 ■ RodC GH para los caracteres que resultaron significativos (PDd, P400 y P600).

Estudios anteriores determinaron la asociación de este marcador con varios caracteres de crecimiento. En 2006, Curi *et al.* encontraron asociación de este marcador en ganado Nelore y cruzas con razas Angus, Simental y Charolais, con diferentes mediciones de crecimiento. Las asociaciones detectadas incluyeron: peso del animal a la faena (alrededor de 15 meses), tasa de ganancia diaria en feedlot (110 días) y peso de carcasa. En todos los casos, el genotipo AA (LL) producía valores mayores que el genotipo AB (LV). Nuestros resultados son coincidentes con estos ya que detectaron la

asociación en un período de desarrollo similar al estudiado aquí y con una influencia similar de los alelos. Di Stacio *et al.* (2002) estudió la asociación de este SNP en la raza Piemontese, pero no pudo establecer ninguna asociación con mediciones de peso y tasas de ganancia hasta los 11 meses, probablemente la ausencia de asociación se haya debido a que las mediciones fueron muy tempranas. En este sentido los resultados de Unanian *et al.* (2000) en la raza Nelore, dan sustento a esta hipótesis, ya que encontraron diferencias entre el genotipo AA y AB en las ganancias de peso durante los meses 12 a 15 de vida, pero no pre-destete, del destete a los 12 meses, ni a los 16 meses. Por su parte Katoh *et al.* (2008), encontraron en la raza Wagyu diferencias significativas de casi 40 Kg en el peso a los 10 meses, de los animales con genotipo AA y AB respecto del BB. Además encontraron diferencias en la concentración plasmática de IGF1, leptina y la GH basal, en todos los casos el alelo A determinaba un valor mayor. En resumen, los datos publicados previamente y los presentados aquí, estarían reflejando una influencia del alelo A del SNP L217V del exón 5 de la GH a favor del crecimiento en las etapas de mayor desarrollo del individuo, este período es diferente en las diferentes razas.

Microsatélite BM1824: BTA1 (Marcador control)

El marcador BM1824 (BTA1, 122cM) se incluyó en el análisis como un marcador control, ya que no se ha demostrado que esté ligado a ningún gen conocido relacionado con el crecimiento. Solamente se registra un QTL para peso al nacer en una amplia región que comprende los 100 a 135 cM del BTA1 (Casas *et al.*, 2003). En nuestros análisis, ningún carácter relacionado a crecimiento presentó asociación con este marcador.

3.2 ESTUDIO SOBRE MARCADORES CANDIDATOS CARACTERES DE COLOR DE CARNE

3.2.1 Búsqueda de polimorfismos en genes candidatos

Dos genes candidatos se estudiaron para testear su asociación con el color de la carne: Mb y GSTP1. Para cada uno de ellos se realizó en primer lugar la búsqueda de polimorfismos tanto en zonas codificantes como no codificantes. Luego se realizaron estudios de asociación, ya sea con los polimorfismos encontrados o con marcadores ligados al gen.

Mioglobina

Para la búsqueda de variabilidad genética en este gen se seleccionó el exón II. Esta región codifica para el dominio de la proteína en mayor contacto con el grupo Hemo, responsable del color de la carne (Figura 3.16). Para esto se utilizó la estructura 3D de la proteína homóloga equina, ya que al momento del comienzo del estudio no se disponía de la estructura 3D de la proteína bovina. El alto porcentaje de homología (88%) entre las Mb de ambas especies permitió esta alternativa, más aún, este gen se encuentra conservado entre los mamíferos (Anexo 3). En la Figura 3.16 se puede ver el alineamiento de las secuencias del ARNm y de la proteína bovina, junto con la proteína equina, allí se puede observar la similitud de este segmento entre las dos especies. En la misma figura se muestra la estructura tridimensional de la proteína equina desde dos ángulos diferentes, donde se puede apreciar las secciones de la proteína que conforman el bolsillo donde se aloja el grupo Hemo, y en amarillo la fracción que corresponde al exón II. Es importante destacar que este segmento de la secuencia contiene la información tanto de la Histidina proximal (H_{64}) que se ubica en la 5ta posición del grupo Hemo, como de la distal (H_{93}), muy cercana a la 6ta posición.

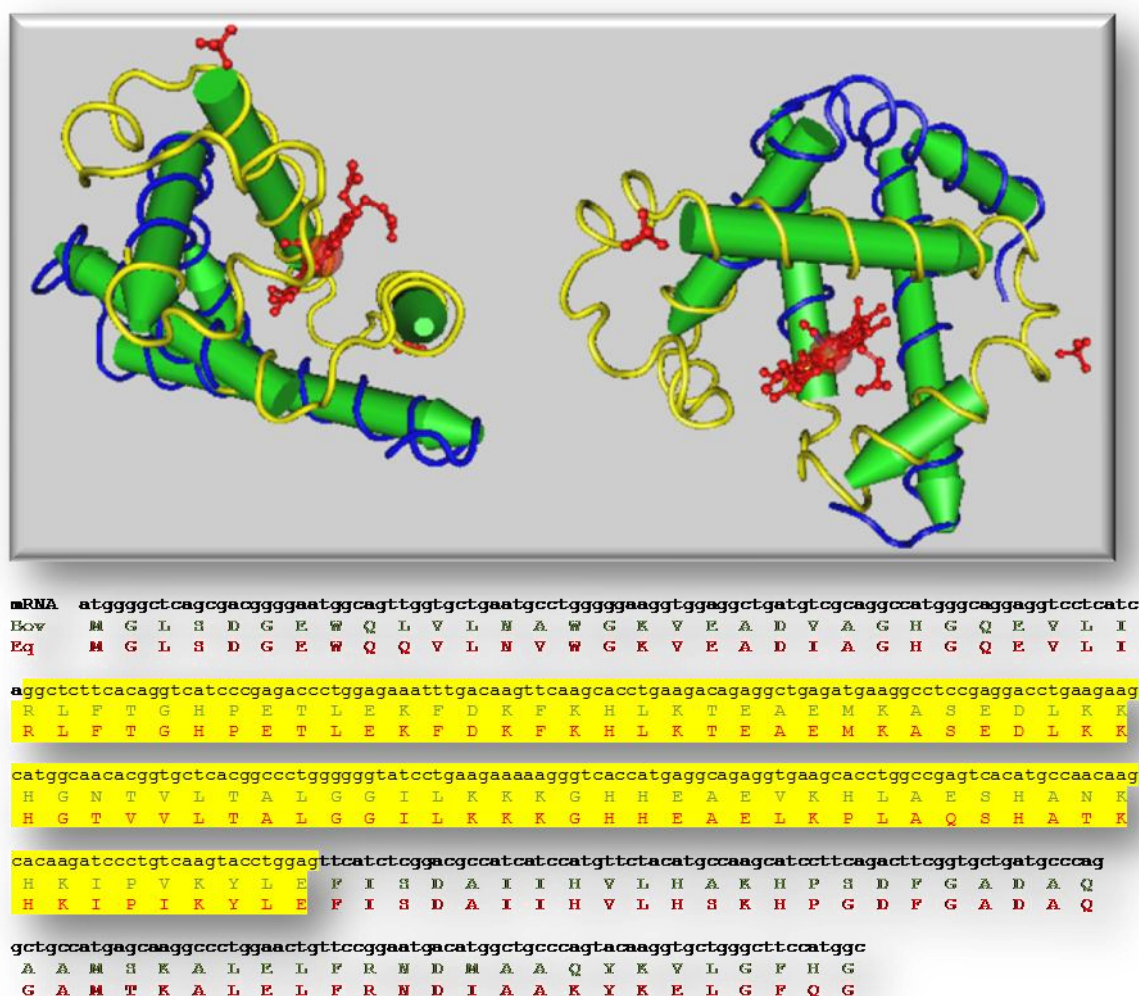


Figura 3.16: En el panel superior dos vistas de la Mb equina obtenidas con el software Cn3D. El grupo hemo y las moléculas de solvente aparecen en rojo, la cadena se presenta como una cinta (azul y amarillo), con las hélices α representadas por flechas (verdes). En el panel inferior, secuencias ARNm bovino de la Mb, su traducción a la proteína bovina y su homóloga equina. En todos los caso se resalta en amarillo la sección de cada secuencia que se corresponde con el exón II del gen bovino.

Una vez seleccionada la región a estudiar, se diseñaron los primers para amplificar el exón II a partir de ADN Genómico. Posteriormente, se comprobó la presencia de los productos de amplificación, obteniéndose imágenes similares a las que se mostraron en la Figura 3.2 para el gen GH. Subsiguientemente, se analizaron los amplificados positivos mediante la técnica PCR-SSCP con el fin de detectar polimorfismos. En la Figura 3.17 se muestran los patrones obtenidos por SSCP en un gel de poliacrilamida teñido con la técnica de nitrato de plata. Estos análisis permitieron detectar tres conformaciones alternativas (Figura 3.17), denominadas Mb1 (calle 7, raza Wagyu), Mb2 (no presentada) y Mb 3 (calle 9, raza Nelore). El siguiente paso fue la confirmación de que las conformaciones encontradas se correspondían con diferencias a nivel

de secuencia. Esto fue realizado por secuenciación directa y de las tres conformaciones, Mb1 y Mb2 resultaron ser conformaciones alternativas de la misma secuencia. Las pruebas de búsqueda de polimorfismo se realizaron sobre 53 animales de las razas Brahaman, Brangus, Charolais, Criollos de Argentina, Bolivia y Uruguay, Galloway, Hereford, Jersey, Nelore, Retinta y Wagyu. Los patrones encontrados para cada raza se presentan en la Tabla 3.16.

Para la realización de la secuenciación directa, se amplificaron nuevamente muestras de ADN de 15 animales (2 Angus, 2 Criollos, 1 Retinta, 1 Wagyu, 2 Brahaman y 7 Nelore), se verificó la amplificación y se corrieron en un secuenciador de ADN. En la secuencia se confirmó por un lado, que dos de los patrones encontrados en el SSCP (Mb1 y Mb2) no presentaban diferencias a nivel de secuencia, por lo tanto se debían a diferencias en el enrollamiento de las cadenas. Por el otro, se observó que las conformaciones Mb1 y Mb3 detectadas por SSCP se corresponden con una mutación puntual (SNP) a nivel de secuencia.

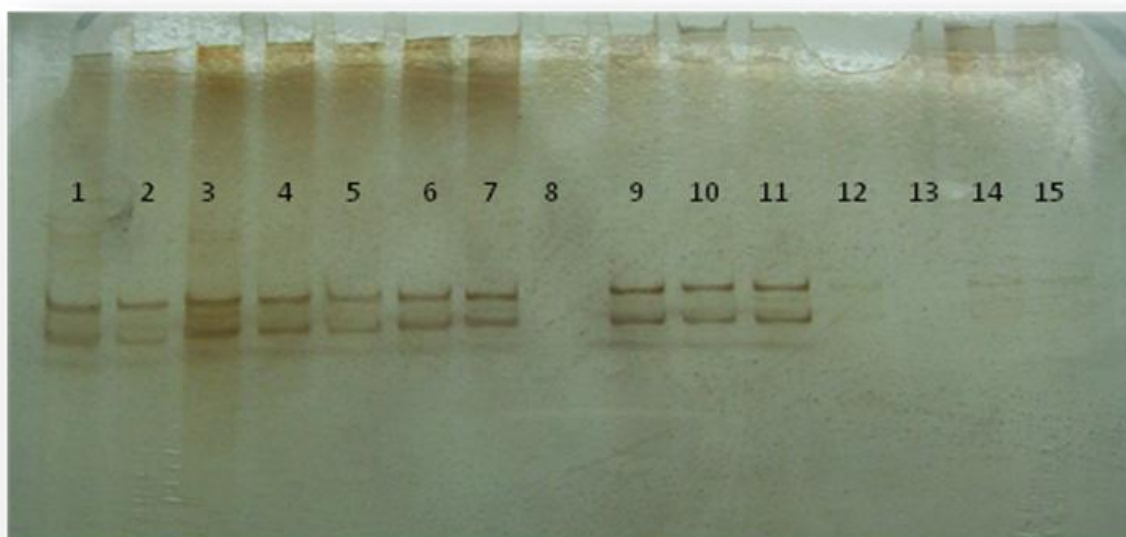


Figura 3.17: Gel de SSCP teñido con nitrato de plata donde se observan las variantes encontradas para el amplificado del exón II del gen de la mioglobina. Los patrones denominados Mb1 (calle 7) y Mb3 (calle 9) fueron luego confirmados como polimorfismos a nivel de secuencia por secuenciación directa.

El polimorfismo encontrado se corresponde con una transición sinónima, A por G, en la posición 5465 de la secuencia publicada en GeneBank NC 007303 (ver Anexo 1). La variante A se corresponde con el patrón Mb1 y la variante G con el patrón Mb3. Esta última variante se encontró exclusivamente en animales de razas con componente cebuino, tanto en estado homocigota como heterocigota. En la Figura 3.18 se pueden observar los electroferogramas de los tres posibles genotipos (AA, AG y GG).

Este resultado es consistente con la variabilidad previamente encontrada para el genoma bovino, Heaton *et al.* (2002) detectaron una densidad de 1 SNP cada 500 pb en *B. taurus* y en 2009 el Consorcio BovineHapMap detectaron 1 SNP cada 714 pb en Angus y Holando (*B. taurus*), y 1 SNP cada 285 pb en

Brahman (*B. indicus*). Así mismo, la baja variabilidad encontrada podría estar relacionada a la elevada similitud de secuencia observada para esta proteína entre diferentes grupos de animales. En el Anexo 3 se presentan los alineamientos (realizado con BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) de la secuencia de nucleótidos del exón 2 del gen que codifica para la mioglobina. La comparación de la secuencia de nucleótidos correspondiente al exón 2 bovino con la del ovino (97% homología), porcino (89% homología), humano (84% homología) y ratón (81% homología), y de la proteína completa (Anexo 4) con la de búfalo (99% homología), ovino (98% homología), equino (89% homología), porcino (89% homología) y conejo (89% homología), demuestran el alto grado de conservación de esta proteína. El SNP detectado corresponde a un cambio sinónimo, por lo que no modifica la estructura ni la función de la proteína. Sin embargo, no se puede descartar que dicho SNP pueda estar en desequilibrio de ligamiento con otras mutaciones en otros exones, regiones reguladoras, zonas de *splicing*, etc., que produzcan cambios fenotípicos y que permitan que este SNP pueda ser utilizado como marcador genético en ganados con sangre cebuina. Más adelante veremos que las mediciones relacionadas al color se realizaron en animales *Bos taurus*, por lo tanto este SNP no pudo ser considerado para los estudios de asociación.

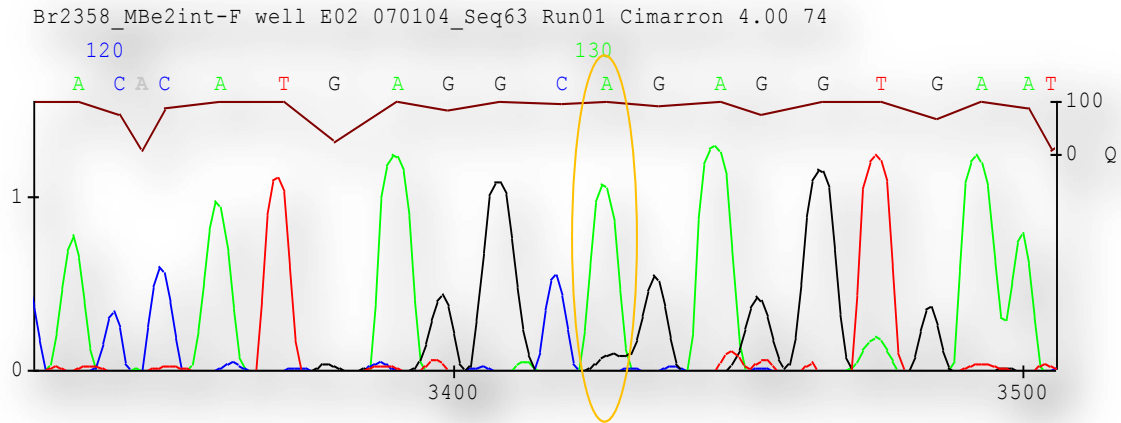
Curiosamente las secuencias ovinas que se encuentran en bibliografía, presentan como única variante en la posición en que se encontró en este trabajo el polimorfismo, una guanina. Esta diferencia coincide con la transición encontrada aquí, esto puede explicarse por dos motivos fundamentalmente: una posibilidad es que la mutación se haya dado previamente a la diferenciación de las especies y que por algún motivo en la domesticación del *Bos taurus* se

Tabla 3.16: Patrones del exón II de la mioglobina encontrados para las diferentes razas analizadas, en el estudio de rastreo de polimorfismos.

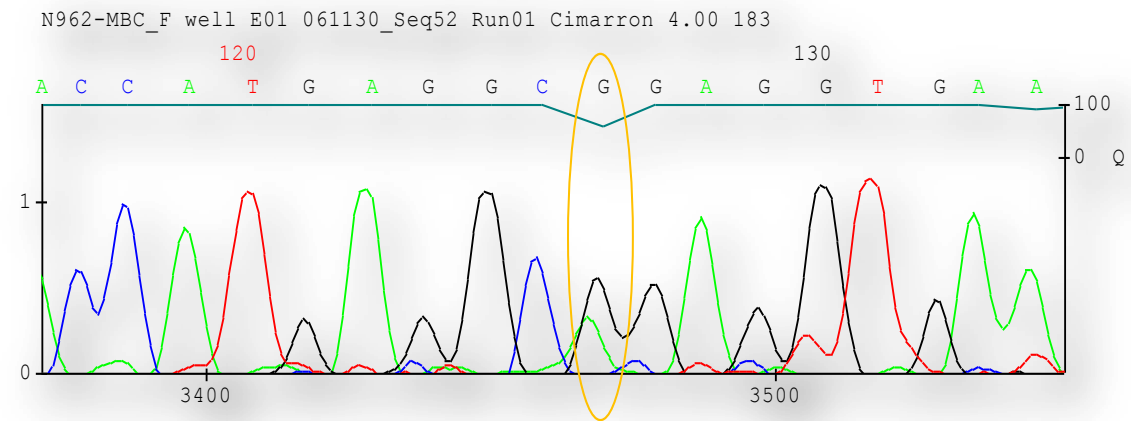
	Mb1	Mb2	Mb3	Mb1/Mb2	Mb1/Mb3	Mb2/Mb3	Total
Brangus		1	2				3
Brhama		5	1			1	7
Charolais	2						2
Criollo Argentino	1	5	1		1	1	9
Criollo Boliviano	2		2				4
Criollo Uruguayo		1					1
Galloway	1	1					2
Hereford	1						1
Jersey	1						1
Nelore	7	5	6	2		1	21
Retinta	1						1
Wagyu	1						1

perdió, o que tanto en ovinos como en *B. indicus* la mutación haya sido *de novo* hecho que se sostendría en la base de ser una mutación sinónima.

Genotipo AA



Genotipo AG



Genotipo GG

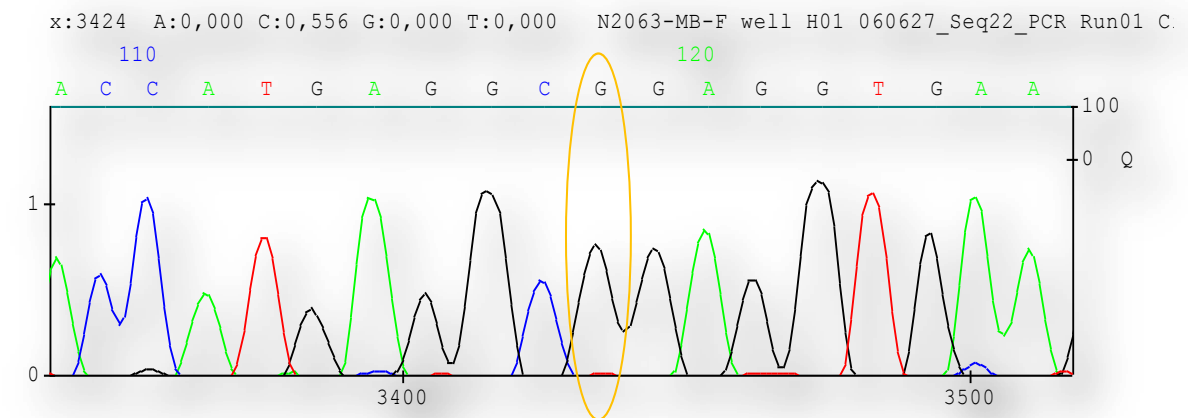


Figura 3.18: electroferogramas de la secuenciación de los tres genotipos del gen Mb: AA, AG y GG, obtenidos con el secuenciador MegaBACE 1000 y analizados con el Sequence Analyser (GE Healthcare).

Glutathion S-Transferasa Pi 1 (GSTP1)

Para la búsqueda de variabilidad genética en el gen GSTP1 se optó por realizar una secuenciación directa sobre un grupo de muestras que poseían datos de color, de esta manera la información podría ser utilizada para realizar una asociación. El segmento que se analizó contenía al exón 2 del gen, que codifica para los primeros 13 aminoácidos de la proteína, ya que a excepción de 1 base el exón I no se transcribe (región 3' UTR). En la Figura 3.19 y 3.20 se puede observar la estructura 3D de la proteína dimérica y varias vistas de uno de los monómeros donde se puede apreciar el sitio de unión a Glutathion (en rojo). Allí mismo se puede observar que la sección de la proteína codificada por la secuencia analizada (en amarillo) forma parte del bolsillo donde se aloja el Glutathion. En este sentido, posibles cambios en la secuencia de la región codificante podrían perturbar la estructura terciaria de la enzima, y por lo tanto el sitio de unión a este sustrato. Más aún, los posibles cambios en la región no codificante podrían afectar zonas de corte y empalme y por lo tanto los procesos de maduración del ARNm.

Las muestras utilizadas pertenecían a animales *B. taurus*, de las razas Angus, Hereford o cruza de estas, a excepción de dos muestras que eran cruza de un macho Limusin sobre hembra Angus x Hereford. El análisis de los electroferogramas demostró la presencia de 3 SNPs en el segmento analizado del gen de la proteína GSTP1, todos en la región no codificante del mismo. Las tres mutaciones resultaron transiciones C por T en las posiciones 326, 386 y 416 de la secuencia de referencia publicada en GeneBank NC 007330 - GeneID: 281806 (ver Anexo 2). Para simplificar se nombraron a estos SNPs: P1, P2 y P3, respectivamente. En los tres casos pudieron encontrarse los tres genotipos posibles: los dos homocigotas CC y TT, y el heterocigota CT. Sin embargo, el haplotipo de la secuencia publicada (con citosina en las tres posiciones), se encontró únicamente en forma heterocigota en tres animales.

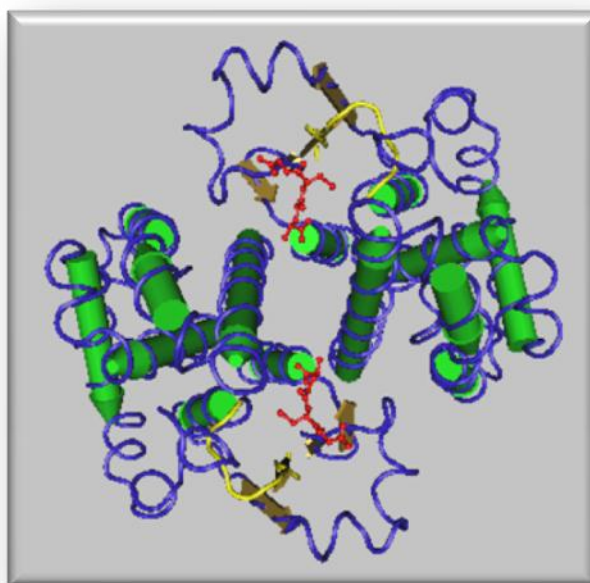


Figura 3.19: Estructura 3D de la proteína GSTP1 dimérica obtenida con el software Cn3D. El glutathion aparece en rojo, la cadena se presenta como una cinta (azul y amarillo), con las hélices α (verdes) y las hojas β (beige) representadas por flechas.

```

atgcctccctacaccatgctctacttccggttcaaggggcctgagggccatgagcatgctgctggccgaccagggccagagctggaaggaggaggtc
M P P Y T I V Y F P V Q G R C E A M R M L L A D Q G Q S W K E E V
gtagccatgcagagctggctgcagggcccaactcaaggcctcctgctgtaaggcagctccccaaagtccaggacggagacccctcacgctgtaccagtcc
V A M Q S W L Q G P L K A S C L Y G Q L P K F Q D G D L T L Y Q S
aatgcatcctgaggcacctggccgcaccctcgggctgtatgggaaggaacagcaggaggcggccctggtggacatggtgaatgacggtgtagaggac
N A I L R H L G R T L G L Y G K D Q Q E A A L V D M V N D G V E D
cttcgctgcaaaatcgtctcctcatttacaccaaactacgagggcagggaggactatgtgaaaggcgtgcccagcacctgaagcctttcgagacc
L R C K Y V S L I Y T N Y E A G K E D Y V K A L P Q H L K P F E T
ctgctgtcccagaaacaggggtggccaggccttcatcgtgggcgaccagatctcctttgaggactacaacctgctggacctgcttcggattcaccaggtc
L L S Q N K G G Q A F I V G D Q I S F A D Y N L L D L L R I H Q V
ctggccccagctgtctgactccttccccctgctctcagcctacgtggccgctctcaactcccgcccaagctcaaggccttccctggcctccccggag
L A P S C L D S F P L L S A Y V A R L N S R P K L K A F L A S P E
cacatgaaccggcccatcaacggcaatgggaacag
H M N R P I N G N G K Q
    
```

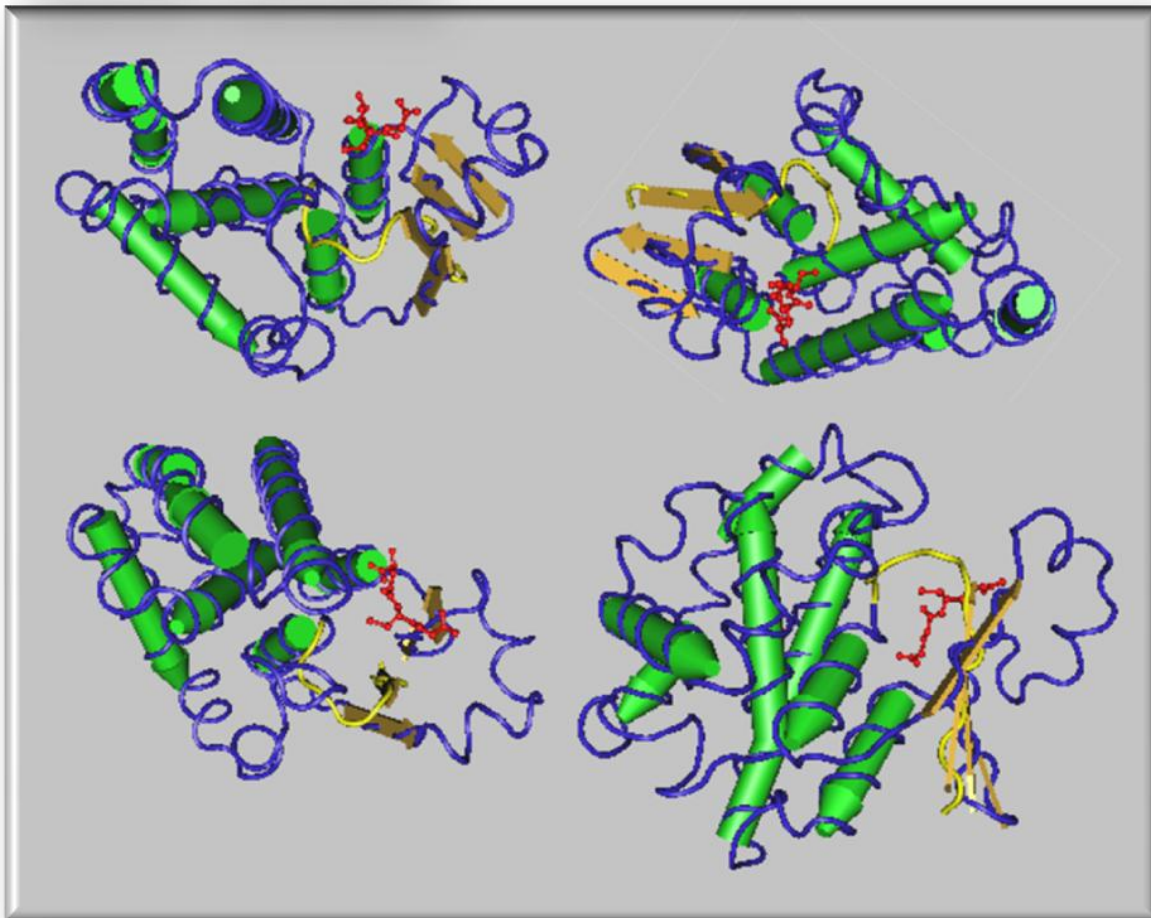


Figura 3.20: Arriba, secuencia ARNm bovino de la GSTP1 y su traducción a la proteína bovina. Abajo estructura 3D de un monómero de la proteína GSTP1, obtenida con el software Cn3D. El glutatión aparece en rojo, la cadena se presenta como una cinta (azul y amarillo), con las hélices α (verdes) y las hojas β (beige) representadas por flechas. En todos los casos se resalta en amarillo la sección de cada secuencia que se corresponde con el exón II del gen bovino.

Los resultados de la tipificación (por secuenciación directa) de las tres mutaciones en los amplificadores, de las 19 muestras analizadas, se presentan en la Tabla 3.17. Los electroferogramas de los tres genotipos de cada posición se muestran en la Figura 3.21. En

Tabla 3.17: Animales encontrados con cada uno de los genotipos para las tres posiciones polimórficas detectadas. Entre paréntesis se presenta la posición de cada mutación y debajo la secuencia flanqueante al polimorfismo.

	P1 (326)	P2 (386)	P3 (416)
Genotipo	GACGGC/TGGGGG	TTTTTC/TCCCTG	TCGAGC/TCTCCT
CC	3	11	12
CT	6	3	5
TT	10	5	2

ambos casos se presenta la secuencia flanqueante a cada uno de los polimorfismos. La variabilidad encontrada en este gen fue superior a la encontrada para el de la mioglobina. Esto era esperable, ya que el segmento analizado incluía tanto regiones codificantes como no codificantes, y para la mioglobina el segmento amplificado pertenecía completamente a una

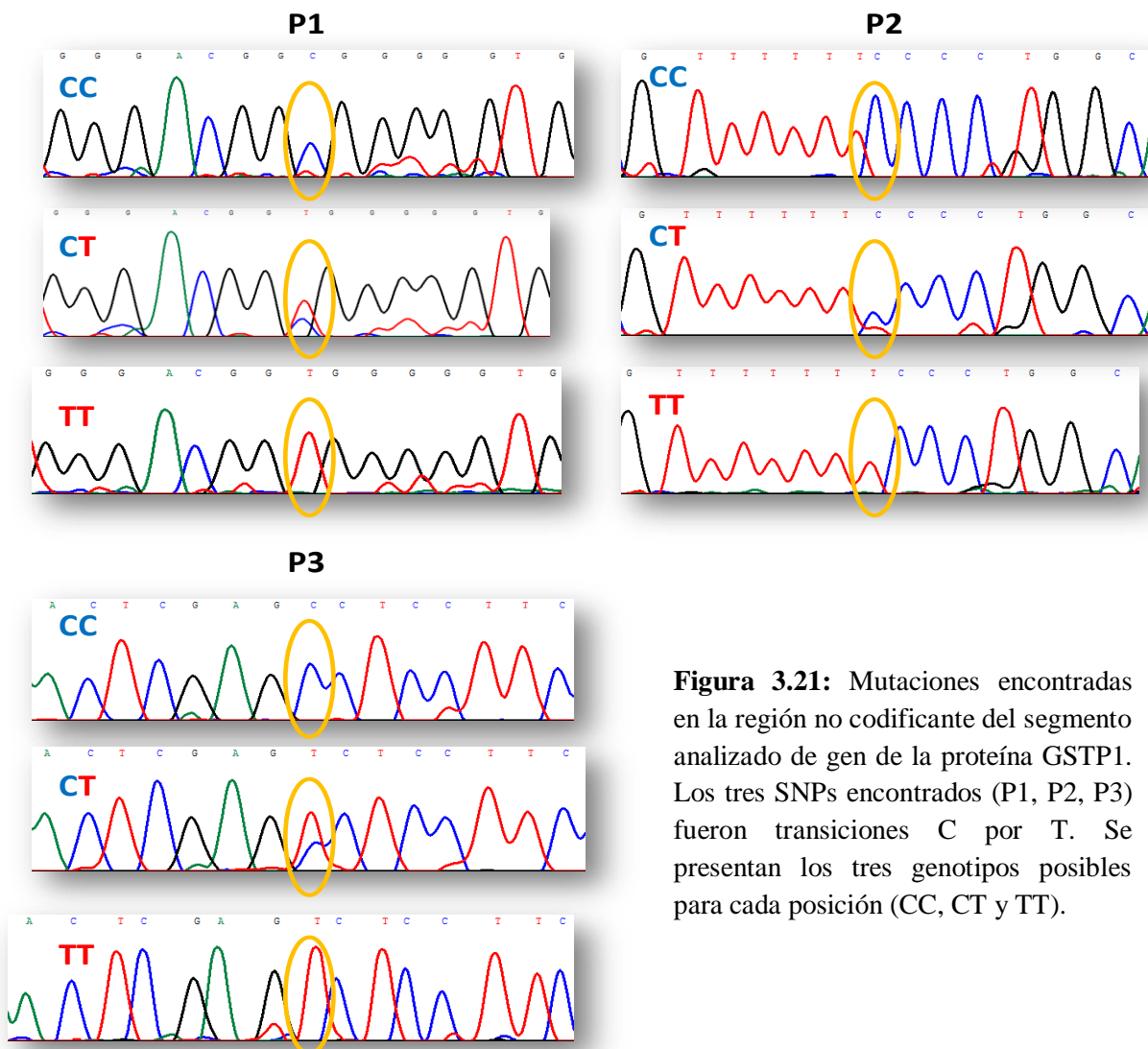


Figura 3.21: Mutaciones encontradas en la región no codificante del segmento analizado de gen de la proteína GSTP1. Los tres SNPs encontrados (P1, P2, P3) fueron transiciones C por T. Se presentan los tres genotipos posibles para cada posición (CC, CT y TT).

región codificante. En este sentido, el alineamiento con las proteínas homólogas de otras especies mostró una similitud del 92% con la equina, 90% con la canina, 87% con la humana y 86% con la de rata (Anexo 5).

3.2.2 Genotipificación y asociación

Al momento de comenzar esta tesis se había convenido con un frigorífico la posibilidad de disponer de 150 muestras de novillos faenados en condiciones comerciales. Estas muestras iban a incluir tres grupos, todos ellos con pH menor a 5,80, preseleccionadas subjetivamente en color claro, intermedio y oscuro. Por razones ajenas a nosotros este muestreo no pudo ser realizado. Finalmente, se pudo disponer de un número menor de muestras obtenidas en un frigorífico comercial: 45 de las razas Angus, Hereford y cruza de estas, y 5 de animales triple

Tabla 3.18: Valores promedios, desviación estándar, máximo y mínimo, de los parámetros mediciones de pH, del brillo (L*) y los parámetros de cromaticidad (a* y b*) en las muestras utilizadas para la asociación. Además se presentan los parámetros calculados Hue y Croma.

Medida	Promedio ± DE	Máximo	Mínimo
L*	35,98 ± 1,71	39,36	31,59
a*	22,78 ± 1,82	26,27	16,3
b*	12,01 ± 1,40	14,97	7,72
Hue	0,484 ± 0,023	0,527	0,406
Croma	25,76 ± 2,23	30,00	18,12
pH	5,52 ± 0,06	5,76	5,43

cruza con Limusin. Los valores promedios, con su desviación estándar, máximo y mínimo, para las mediciones realizadas sobre estas muestras se presentan en la Tabla 3.18.

Para la genotipificación y asociación se decidió realizar estrategias diferentes para cada uno de los genes. En el caso de la mioglobina, el polimorfismo encontrado se presentó únicamente en animales con algún componente cebuino, sin embargo se disponía de dos microsatélites cercanos al gen: RM029 e

IGF1. Por este motivo se decidió tipificar para estos animales los 4 microsatélites del cromosoma BTA5. Por su parte, en el caso de GSTP1 los polimorfismos fueron confirmados directamente en las muestras que tenían datos fenotípicos, así de las 19 muestras secuenciadas 17 pertenecían a este grupo.

Mioglobina: microsatélites BTA5

El gen de la mioglobina bovina se ubica en una región cercana a los 80 cM del cromosoma BTA5 (De Donato et al 2003). Por este motivo marcadores como el RM029 (Posición 80.417.234 pb) e IGF1 (71.198.741 pb), en las inmediaciones del gen, podrían encontrarse ligados a

mutaciones en el mismo que estén determinando

diferencias en el color de la carne.

Por este motivo se decidió buscar la

posible asociación de estos marcadores con las mediciones relacionadas con el color. Adicionalmente, se tipificaron los otros 2 microsatélites del cromosoma BTA5 ya incluidos en el multiplex de amplificación. Los resultados de las frecuencias génicas para los 4 marcadores se presentan en la Tabla 3.19. Las frecuencias encontradas son similares a las encontradas para las poblaciones Angus y Hereford, y en muchos casos intermedia a las de estas, lo que refleja la composición mixta de los animales faenados.

Por su parte, los análisis de asociación no presentaron ninguna significancia para los marcadores del BTA5, sin embargo el efecto de la covariable pH fue significativa en casi todos los casos. Independientemente de esto se testeó la posible influencia de los

Tabla 3.20: pH promedio para los genotipos de IGF. La significancia fue: * P < 0,1.

Genotipo IGF1 (N)	pH*
229229 (26)	5,53 ± 0,01
229231 (9)	5,49 ± 0,02

marcadores cercanos a la mioglobina (IGF1 y RM029), para los parámetros medidos (L*, a*, b*, pH, Hue y Croma) y el pH. Estos parámetros miden la luminosidad (L*), la

Tabla 3.19: Frecuencias de los marcadores BTA5 en las 50 muestras analizadas.

BP1		ETH10		RM029		IGF1	
Alelo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia
302	0,033	216	0,103	80	0,076	229	0,864
309	0,111	218	0,284	82	0,163	231	0,136
310	0,045	220	0,386	84	0,761		
312	0,389	222	0,227				
322	0,422						

en el pH, encontrándose una tendencia (P<0,1) para el IGF1 (Tabla 3.20). Este resultado podría estar asociada al hallazgo de Koshkoih *et al*, (2005) que encontraron un QTL para pH final de la carne alrededor de los 90 cM del BTA5. Adicionalmente, se presentan en la Figura 3.22 los promedios de los genotipos de los

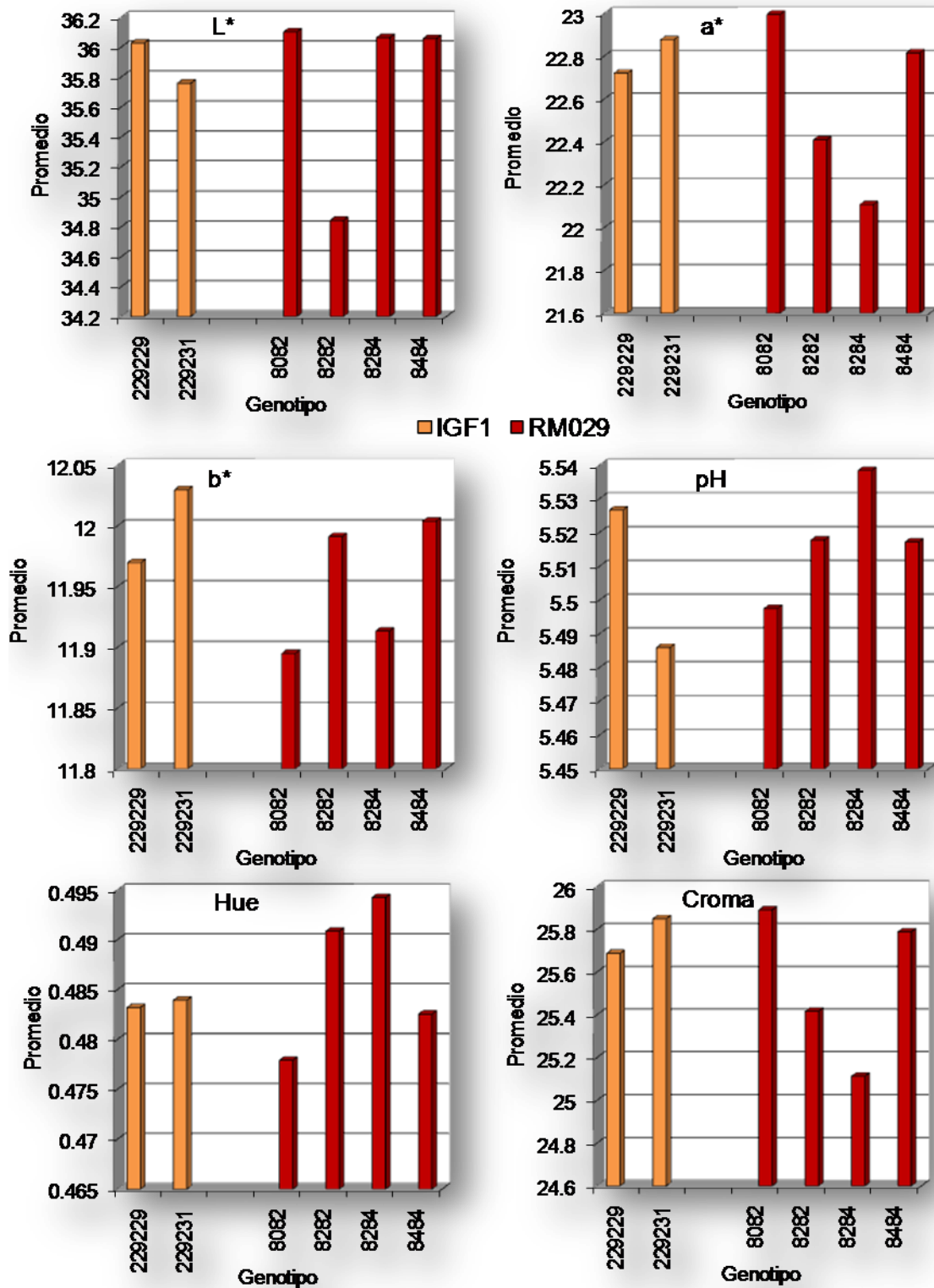


Figura 3.22: Se presentan en forma gráfica los promedios de los genotipos de los marcadores IGF1 y RM029, para los parámetros medidos (L*, a*, b* y pH) y calculados (Hue y Croma).

rojez de la carne (a mayor a^* y menor Hue, más rojo), las tonalidades amarillas (a mayor b^* más amarillo) y marrones (a menor Croma más marrón). Si bien no se detectaron diferencias significativas, para el IGF1, el genotipo 229/231 estaría dando promedios mayores en los parámetros de color (carne más roja, más amarilla, menos marrón) y menos brillante, que el genotipo 229/229. Por su parte, el marcador RM029 el genotipo 82/82 en promedio, aunque sin haberse detectado diferencias significativas, estaría dando carne menos brillante. Para los parámetros de color, la tendencia no es tan clara, pero en la serie genotípica 80/82, 82/82, 84/82 se observa en promedio una disminución de la rojez y un aumento de las tonalidades marrones, pero el genotipo 84/84 se aparta de esta tendencia.

En la bibliografía se encuentra suficiente información que demuestra el efecto de la conformación de la mioglobina sobre la estabilidad de la misma (Suman *et al.*, 2007). En este sentido, Kawano *et al.* (2004) estudiaron multímeros de mioglobina creados artificialmente por clonación en *E. coli*. En sus estudios demostraron una mayor estabilidad de la molécula y de la retención del O_2 con el número de monómeros, esto bajo condiciones de exposición al aire. Esta situación puede asimilarse a lo que ocurre post mortem en la superficie del músculo. Por su parte Yan *et al.* (2001) demostraron que ciertos elementos regulatorios favorecen la transcripción de la mioglobina en determinadas fibras del músculo esquelético. Todo esto sugeriría que cambios en el gen podrían generar diferencias en la concentración y/o estabilidad de la proteína en el músculo, y con ello del color.

SNPs en el gen GSTP1

Como se comentó anteriormente la tipificación se realizó por secuenciación directa de 17 de las muestras que habían sido evaluadas para las diferentes mediciones de color. Los resultados de las frecuencias génicas para los tres SNPs se presentan en la Tabla 3.21. Como se puede ver en todos los casos la frecuencia del alelo mínimo es mayor al 23,7%, hecho que permitiría utilizar estos SNPs en análisis de asociación y en una Selección Asistida por Marcadores.

Tabla 3.21: Frecuencias de los alelos para cada SNP del GSTP1, en las 17 muestras analizadas.

Alelo	P1	P2	P3
C	0,316	0,658	0,763
T	0,684	0,342	0,237

Por su parte los análisis de asociación, y pese a la cercanía de los marcadores, resultaron significativos únicamente para uno de los SNPs (P2). Sin embargo, el número de muestras analizadas no nos permite realizar conclusiones categóricas al respecto, y los resultados deberán confirmarse con un mayor número de muestras. En este sentido, será necesario el desarrollo de alguna técnica de genotipificación que permita el análisis de un mayor número de muestras. Bajo esta salvedad, los resultados de asociación que tuvieron algún grado de significancia se

Tabla 3.22: Resultados significativos en el análisis de asociación para el SNP P2 del GSTP1. El número de animales utilizados en el análisis para cada genotipo se presenta entre paréntesis. La significancia del genotipo se indica en cada carácter: ^x P < 0,1, ^{xx} P < 0,05, ^{xxx} P < 0,01. Los valores que aparecen con igual letra resultaron significativamente diferentes: P < 0,05.

Genotipo P2 (N)	a* ^{xxx}	b* ^x	Croma ^{xx}
CC (11)	22,58 ± 0,47 ^A	11,80 ± 0,41	25,49 ± 0,60 ^A
CT (2)	24,36 ± 1,10 ^B	12,71 ± 0,96	27,48 ± 1,41 ^B
TT (4)	19,69 ± 0,77 ^{A,B}	10,16 ± 0,67	22,16 ± 0,99 ^{A,B}

presentan en la Tabla 3.22. Podemos observar que las diferencias significativas se observan entre el genotipo TT y los genotipos CT y CC, dando estos últimos colores de carne más rojos (mayor a*) y menos marrones (mayor Croma). Además los promedios para b* indicarían una tendencia

(no significativa en este análisis) de los genotipos CC y CT hacia colores más amarillos que el TT. En este caso también se analizó la posible influencia de los marcadores en el pH, no encontrándose ninguna significancia. Adicionalmente, se analizaron los genotipos de a pares, encontrándose algún grado de significancia para la variable a* en los pares P1-P2 (P<0,1) y P2-P3 (P<0,05), sin embargo las diferencias entre las medias de los

genotipos no resultaron significativas. Finalmente, se presentan en la Figura 3.23 los promedios para todos los parámetros, medidos y calculados, en las muestras analizadas.

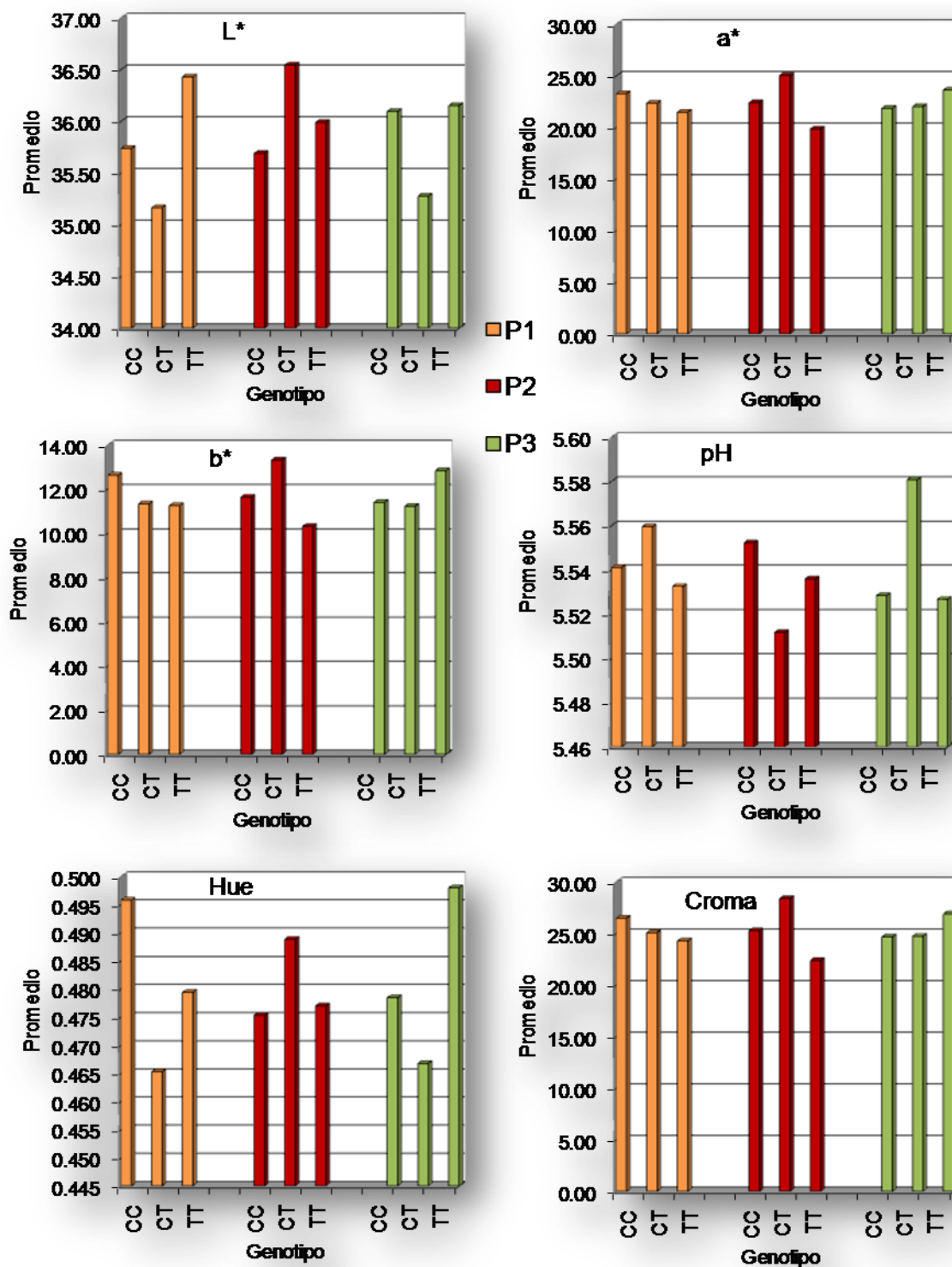


Figura 3.23: Se presentan en forma gráfica los promedios de los genotipos para cada una de los SNPs encontrados en el GSTP1, en los parámetros medidos (L^* , a^* , b^* y pH) y calculados (Hue y Croma).

Como ya se mencionó, el color de la carne es uno de los factores que más influyen en la venta de carne, ya que es la única característica percibida por el consumidor al momento de la compra (Andrés *et al.*, 2008). Además, las pérdidas generadas por la tonalidad oscura de la carne afectan a un 15% del producto mundial (Smith *et al.*, 2000). A pesar de todo esto, en bovinos el color de la carne ha sido poco estudiado desde el punto de vista genético. En la bibliografía, a diferencia de lo que ocurre en porcinos, existe poca información respecto de la asociación de marcadores moleculares con el color de la carne en bovinos. En este sentido, muy recientemente se ha publicado la existencia de un QTL para L* en el cromosoma BTA2 (Allais *et al.*, 2010), la asociación de un SNP en el gen CACNA2D1 (BTA4) con mediciones visuales de color (Yuan y Xu, 2010), y la asociación de SNPs en los genes CAST (BTA7), PRKAG3 (BTA2), GHR (BTA20) y SCD (BTA26) con los tres parámetros CIELAB (L*, a* y b*) en ganado Irlandés (Reardon *et al.*, 2010). Sin embargo el hallazgo más cercano al nuestro, ha sido el de Papaleo Mazzucco *et al.* (2010) que encontraron una asociación de L*, a* y b* con un SNP en el gen de la calpaína (CAPN1: BTA29 pos 45327209 – 45363832) en la raza Brangus. El gen aquí analizado GSTP1 se encuentra en el mismo cromosoma y a 2 cM del CAPN1 (pos 47513674 -47516542), por lo tanto ambos resultados podrían estar detectando un mismo QTL para los parámetros de color entre los 45 y 47 cM del BTA29.

