

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TRABAJO DE TESIS DOCTORAL**

**POLIMORFISMO Y ASOCIACION DE  
MARCADORES DE GENES CANDIDATOS  
PARA CARACTERES DE COLOR DE  
CARNE Y CRECIMIENTO EN BOVINOS**

**ANDRES ROGBERG MUÑOZ**

**DIRECTOR: GUILLERMO GIOVAMBATTISTA**

**CODIRECTORA: MARÍA CRISTINA AÑÓN**

**Lugar de Trabajo: Instituto de  
Genética Veterinaria  
(IGEVET – UNLP – CONICET)**

**2011**



*A María Inés, mi amor,  
que me alegra cada día  
y  
a mis queridos padres,  
siempre incondicionales*





*“Discurso del método para conducir bien la propia razón y buscar la verdad en las ciencias” René Descartes (1596 – 1650)*

*“Primero, no admitir jamás cosa alguna como verdadera sin haber conocido con evidencia que así era.”*

*“Segundo, dividir cada una de las dificultades que examinare, en tantas partes fuere posible y en cuantas requiriese su mejor solución.”*

*“Tercero, conducir con orden mis pensamientos, empezando por los objetos más simples y más fáciles de conocer, para ascender poco a poco, gradualmente, hasta el conocimiento de los más compuestos, e incluso suponiendo un orden entre los que no se preceden naturalmente”*

*“Último, hacer en todo recuentos tan integrales y unas revisiones tan generales, que llegase a estar seguro de no omitir nada.”*





# AGRADECIMIENTOS



Una tesis doctoral plasma en unas pocas hojas, un largo proceso de formación, entrenamiento, aprendizaje y generación de conocimiento. Han sido casi 5 años compartidos con un gran número de personas que siempre recordaré, ya sea como profesores, compañeros o amigos. Seguramente me olvide de alguno pero trataré de incluirlos a todos.

Quisiera agradecer primero y especialmente a Guille y Cristina, juntos fueron una guía imprescindible para que hoy pueda estar presentando esta tesis. Guille presente en todo momento, transmitiéndome siempre y sin reparos todos sus conocimientos, enseñándome el valor de la cooperación y la interdisciplinariedad, con la generosidad y la humildad del que sabe y no necesita demostrarlo. Cristina fue quien, con sus consejos y directivas, muchas veces me mostró el camino preciso y claro a seguir, cada charla con ella fue un mojón para redireccionar el rumbo y establecer objetivos, además me abrió muchas puertas que ayudaron a mi formación profesional y personal.

También quisiera agradecer a quienes permitieron mi incorporación y permanencia en el CIGEBA, hoy IGEVET, dándome un lugar donde trabajar y aprender. Mis gracias a los directores del Instituto, Fernando y Pilar, por la confianza depositada.

Por otro lado, quiero agradecer a mis compañeros y amigos del Instituto y del grupo en estos años: Vero, Egle, Diego, Elina, Pedro, Mariana, Silvina, Carlos, Julio, Analía, Cecilia, Juana, Orlando, Gisela, Alba, Gisel, Julián, Mónica, Laurita, María Elena, Daniel y Hernán. Todos ellos fueron importantes en este camino ya sea por sus enseñanzas y consejos, su ayuda y afecto, o simplemente por haber compartido momentos y charlas. Entre todos ayudaron a formarme, a crecer, e hicieron más divertida y alegre la cotidianeidad.

No quisiera dejar de agradecer a dos personas que fueron muy importantes en este aprendizaje, Lilita y Fito, fueron quienes me enseñaron, ayudaron y acompañaron en el difícil mundo de la estadística.

Hubo varias personas que, sabiéndolo o no, me ayudaron muchísimo proveyendo las muestras y los datos para que esta tesis fuera posible. Quiero agradecer al grupo de Zootecnia II de la Facultad de Veterinaria (UNLP), Andrés, Alberto, Nicolás, Roberto, Enrique; Alejandro y el grupo de carnes de Agronomía de la UBA; el Hno. Rubén y los monjes trapenses de la cabaña Los Ángeles; el personal del INTA Balcarce.

Me gustaría también agradecer a los evaluadores de esta tesis, que dedicarán su tiempo desinteresadamente. Ellos también ayudarán a mejorar este trabajo.

Quiero dedicarle unas líneas para agradecer a mis afectos. Mis padres y hermanos, que han estado, están y estarán presentes cada día, mi familia por adopción, y la larga lista de quienes compartieron y comparten día a día un pedacito de mi vida. Finalmente a mi esposa, que siempre me alienta y me acompaña.



# ÍNDICE





<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>1.1 CRECIMIENTO CORPORAL</b>	<b>8</b>
<b>1.2 COLOR DE LA CARNE</b>	<b>13</b>
1.2.1 Bases moleculares del color: elección del gen de la mioglobina	14
1.2.2 Grado de consumo de oxígeno y estado redox post-mortem: elección del gen GSTP1	17
<b>1.3 OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
1.3.1 Objetivos generales	19
1.3.2 Objetivos específicos	19
<i>Crecimiento corporal</i>	19
<i>Color de carne</i>	20
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
<b>2.1 POBLACIONES Y MUESTRAS</b>	<b>23</b>
<b>2.2 DATOS FENOTÍPICOS</b>	<b>25</b>
2.2.1 Crecimiento	25
2.2.2 Determinación del Color de la Carne	26
<i>Muestras de Carnicería</i>	26
<i>Muestras de carne obtenidas en Frigorífico</i>	27
<b>2.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN</b>	<b>27</b>
2.3.1 Extracción de ADN de carne	27
2.3.2 Extracción de ADN de semen congelado	28
2.3.3 Extracción de ADN de sangre por el método DNazol	28
2.3.4 Extracción de ADN de sangre por el método Chelex	29
2.3.5 Extracción de ADN de sangre por el método Orgánico	29
2.3.6 Extracción de ADN de pelo	29

2.3.7	Cuantificación de ADN	30
2.4	<b>ESTUDIO DEL POLIMORFISMO</b>	30
2.4.1	Gen de la Mioglobina (Mb)	30
2.4.2	Gen GSTP1	31
2.5	<b>GENOTIPIFICACIÓN</b>	32
2.5.1	PCR-RFLP	32
2.5.2	PCR-Pirosecuenciación	34
	<i>GHRc (F279Y)</i>	35
	<i>GH (L217V)</i>	36
2.5.3	PCR- Microsatélites	36
2.6	<b>VARIABILIDAD GENÉTICA</b>	37
2.7	<b>PEDIGRÍ E INFERENCIA DE GENOTIPOS</b>	38
2.8	<b>ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN</b>	38
2.8.1	Crecimiento	38
2.8.2	Color de la carne	40
3.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	43
3.1	<b>ESTUDIO SOBRE MARCADORES DE GENES</b>	45
	<b>CANDIDATOS PARA CARACTERES DE</b>	
	<b>CRECIMIENTO</b>	
3.1.1	Puesta a punto de las técnicas de genotipificación	45
	<i>Multiplex de Microsatélites</i>	45
	<i>PCR-RFLP</i>	47
	<i>Pirosecuenciación</i>	47
3.1.2	Variabilidad genética	49
	<i>Estudio preliminar en Microsatélites</i>	49
	<i>Estudio de variabilidad entre razas: Angus, Criollo</i>	49
	<i>Argentino y Hereford</i>	

<i>Estudio de variabilidad de diferentes poblaciones de una misma raza</i>	53
<i>Estudio de variación de frecuencias a lo largo del tiempo en el Rodeo Experimental</i>	59
<b>3.1.3 Inferencia de Genotipos</b>	<b>64</b>
<b>3.1.4 Estudio de Asociación</b>	<b>65</b>
<i>Microsatélite BP1: región 0 a 30 cM del BTA5</i>	66
<i>Microsatélites ETH10, IGF1 y RM029: Región 55 a 85cM del BTA5</i>	70
<i>SNPs de GH y GHRc: BTA19 y BTA20</i>	77
<i>Microsatélite BM1824: BTA1 (Marcador control)</i>	80
<b>3.2 ESTUDIO SOBRE MARCADORES CANDIDATOS</b>	<b>81</b>
<b>CARACTERES DE COLOR DE CARNE</b>	
<b>3.2.1 Búsqueda de polimorfismos en genes candidatos</b>	<b>81</b>
<i>Myoglobina</i>	81
<i>Glutation S-Transferasa Pi 1 (GSTP1)</i>	86
<b>3.2.2 Genotipificación y asociación</b>	<b>89</b>
<i>Mioglobina: microsatélites BTA5</i>	90
<i>SNPs en el gen GSTP1</i>	93
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>97</b>
<i>4.1 CARACTERES DE CRECIMIENTO</i>	99
<i>4.2 CARACTERES DE COLOR</i>	100
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>103</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>121</b>
<b>PUBLICACIONES (relacionadas a esta tesis)</b>	<b>135</b>





# RESUMEN



Desde la domesticación, los animales han sido seleccionados en base a fenotipos observables y/o medibles. El desarrollo de modelos matemáticos, la genética cuantitativa y la computación, durante el siglo XX, han permitido acelerar y mejorar la exactitud en la selección. Con el desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la biología molecular ha buscado establecer relaciones entre marcadores nucleicos y caracteres productivos, para usarlos como herramientas de selección. En esta tesis trataré de determinar las asociaciones entre marcadores cercanos a genes candidatos, con caracteres relacionados con el crecimiento del animal y con el color de la carne.

### ***Crecimiento Corporal***

Por su rol central en el desarrollo y crecimiento del animal, la vía de la Hormona de Crecimiento (GH) ha recibido una mayor atención. La acción biológica sobre los tejidos puede realizarse directamente, actuando sobre el metabolismo de lípidos e hidrocarburos, o indirectamente, a través de las somatomedinas (IGFs), principalmente a nivel óseo y muscular. Finalmente en el músculo, existen factores de transcripción específicos que determinan la diferenciación celular, entre ellos el Myf5. En base a esto, se decidió evaluar la asociación de marcadores ligados a los genes de GH, su receptor (GHRc), IGF1 y Myf5, con caracteres relacionados al crecimiento y la muscularidad: peso al nacer directo (PNd), peso al destete directo (PDd), peso al destete materno (PDm), peso a los 400 (P400) y 600 días (P600), y área de ojo de bife (AOB). Este estudio se realizó sobre un muestreo de 267 animales de dos rodeos Hereford, que a su vez contaban con una genealogía de 4228 animales con datos fenotípicos. Así mismo se realizó un estudio de variabilidad genética en las razas Angus, Criollo Argentino y Hereford (sobre una muestra de 137 animales), y una evaluación del efecto de diferentes criterios y del tiempo de selección sobre las frecuencias de estos marcadores.

El análisis de las frecuencias génicas demostró diferencias atribuibles a la selección aplicada sobre los dos rodeos estudiados, y una tendencia en las frecuencias de casi todos los marcadores analizados en los grupos generacionales dentro del rodeo cerrado. Los alelos más afectados resultaron ser aquellos asociados a los caracteres utilizados en el criterio de selección. En particular se demostraron asociaciones de los microsatélites BP1 (cercano a Myf5) con PDd, PDm y AOB, IGF1 (en región promotora del gen) con PNd, PDd y P600, ETH10 (cercano al IGF1) con PNd y PDd, y RM029 (cercano al IGF1) con PDd. El SNP L217V del GH asoció con las mediciones

PDd, P400 y P600, y el SNP F279Y del GHRC no asoció con ninguno de los caracteres. El estudio de marcadores de pares mostró asociación del par ETH10-IGF1 con todos los valores de peso directo y del par IGF1-RM029 únicamente con PNd. Estos sugieren la presencia de más de un gen en el entorno del IGF1 influenciando el crecimiento.

### ***Color de la Carne***

La definición de la calidad de la carne depende en gran medida de percepciones subjetivas del consumidor. No obstante, el primer atributo que el consumidor detecta es el color y por la decoloración un 15% de la carne vacuna pierde valor. Factores genéticos, ambientales, de transporte y de procesamiento, influyen en los atributos de la carne, sin embargo, en bovinos específicamente, los efectos genéticos han sido poco estudiados. A nivel molecular la carne debe su tonalidad rojiza principalmente a la mioglobina y sus derivados. Post-mortem, el músculo experimenta una serie de procesos que lo convierten en carne. Los factores más influyentes en la decoloración de la carne son la concentración residual de O<sub>2</sub>, la formación de radicales y el estado redox de la célula. En particular el glutatión ha demostrado tener un efecto sobre la oximioglobina, y las transferasas sirven como sensores del estado redox de la célula, entre ellas la Glutathion S-transferasa P1 (GSTP1) tiene función de detoxificación celular y de resistencia al estrés oxidativo. De este modo, se decidió la búsqueda de polimorfismos en los genes de la mioglobina y la GSTP1. Luego se realizó la evaluación de la asociación de los polimorfismos encontrados y otros marcadores ligados a estos genes, con diferentes parámetros colorimétricos, a partir de muestras obtenidas en frigorífico y evaluadas para color.

La búsqueda de polimorfismos sobre 53 animales de 12 razas, permitió encontrar cuatro mutaciones respecto de las secuencias publicadas de los dos genes estudiados. En la mioglobina se encontró una transición sinónima A por G, y en el GSTP1, 3 transiciones C por T en la zona intrónica. La asociación se realizó sobre 50 muestras con datos de pH y mediciones de parámetros colorimétricos CIELAB (L\*, a\* y b\*). El estudio exploratorio con microsatélites cercanos a la mioglobina (ETH10, IGF1 y RM029) no detectó ninguna asociación con los parámetros medidos o los parámetros calculados (Hue y Croma). Por su parte, los estudios con los SNPs del gen GSTP1, demostraron una posible asociación de uno de ellos con los parámetros a\* y Croma.





# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN



Desde los comienzos de la domesticación, el hombre ha seleccionado los animales basándose en los fenotipos observables y/o medibles de cada individuo. La existencia de diferencias entre individuos y entre razas ha permitido obtener animales con características deseables, diferentes según la zona, el tipo y objetivo de producción. Durante el siglo XX, el desarrollo de modelos matemáticos, la genética cuantitativa y la computación, han permitido un gran avance, celeridad y exactitud en los resultados de los programas de selección (Henderson y Quaas, 1976; Kirkpatrick y Heckman, 1989; Mrode, 2005). Sin embargo, este tipo de selección se encuentra a menudo con diversas dificultades: i) la heredabilidad de muchos caracteres (mayoritariamente cuantitativos) suele ser baja, ii) algunos caracteres no son medibles en etapas tempranas, o *in vivo*, o en animales de ambos sexos. Por último, y pese a su demostrada eficiencia, la selección fenotípica no contempla completamente la variabilidad genética, ni las complejas interacciones génicas que dan como resultado los caracteres cuantitativos.

La biología molecular desde sus comienzos, ha buscado establecer relaciones entre diferentes marcadores (polimorfismos proteicos, fingerprintings, microsatélites, etc.) y caracteres productivos, para usarlos como predictores del valor de cría del animal y por lo tanto, como herramientas para la selección (Andersson *et al.*, 1991; Dolf *et al.*, 1991; Georges *et al.*, 1993). A partir del desarrollo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se han utilizado muchos tipos diferentes de análisis para el estudio del polimorfismo genético en bovinos (Erlich, 1989). Entre ellos, se pueden citar la técnica de Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP, por *Restriction Fragment Length Polymorphism*); el Polimorfismo de la Conformación de Cadena Simple (SSCP, por *Single Strand Conformational Polymorphism*), el polimorfismo de Repeticiones Cortas en Tandem o microsatélites (STR, por *Short Tandem Repeats*) y la Secuenciación Directa (SBT, *Sequencing Based Typing*) (Orita *et al.*, 1989a; Theilmann *et al.*, 1989; Steffen *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1993). Más recientemente el desarrollo de nuevas tecnologías de alta performance (Pirosecuenciación, TaqMan, microarray) han permitido el estudio de grandes poblaciones de individuos (Kuimelis *et al.*, 1997; Ronaghi, 2001; Sobrino *et al.*, 2005) y con ello la Selección Asistida por Marcadores (MAS, por *Marker Assisted Selection*).

El fin último de la genómica es conocer cuántos genes integran el genoma, como actúan estos, como está regulada su función y como interaccionan entre sí, para dar el

fenotipo final del individuo. En el caso particular de la genética zootécnica, el objetivo es conocer aquellos genes responsables de caracteres de importancia económica, y estar en condiciones de utilizarlos para mejorar la producción (mayor número de animales y más resistentes, cantidad y calidad de la carne por animal, etc.). Desde la generación del mapa de ligamiento bovino (Barendse *et al.*, 1994), los marcadores de ADN se han utilizado para identificar loci o regiones cromosómicas (QTL, por *Quantitative Trait Loci*) que afectan tanto a caracteres cualitativos como cuantitativos. El marcador puede estar asociado a un gen mayor, ligado a éste o a varios genes con efectos aditivos. En este sentido, los marcadores moleculares presentan una gran ventaja desde el punto de vista de la selección, pues tienen una segregación simple, son codominantes, su determinación es exacta, simple y puede realizarse a partir de la etapa embrionaria de un individuo.

Existen dos estrategias usualmente seguidas para encontrar genes o regiones responsables de una característica dada: la detección de QTLs y el estudio de genes candidatos. La detección de QTLs requiere un gran número de registros fenotípicos y generalmente se utiliza en caracteres de medición rutinaria, como el peso, altura, pelaje, cuernos, etc.; mientras que el estudio de genes candidatos se utiliza generalmente en características que no tienen una medición rutinaria, como la terneza, color de carne, marmoleo, etc. (Dekkers, 2004). La MAS aprovecha los polimorfismos genéticos y la asociación de sus alelos con caracteres de importancia económica para ser usados en selección. De este modo, la MAS podría tener un impacto teórico del 5 al 20% principalmente en caracteres donde la selección cuantitativa encuentra dificultades, como ser caracteres no medidos rutinariamente, o medibles tardíamente, o post-mortem, o en animales de un solo sexo (Weller, 2007).

## **1.1 CRECIMIENTO CORPORAL**

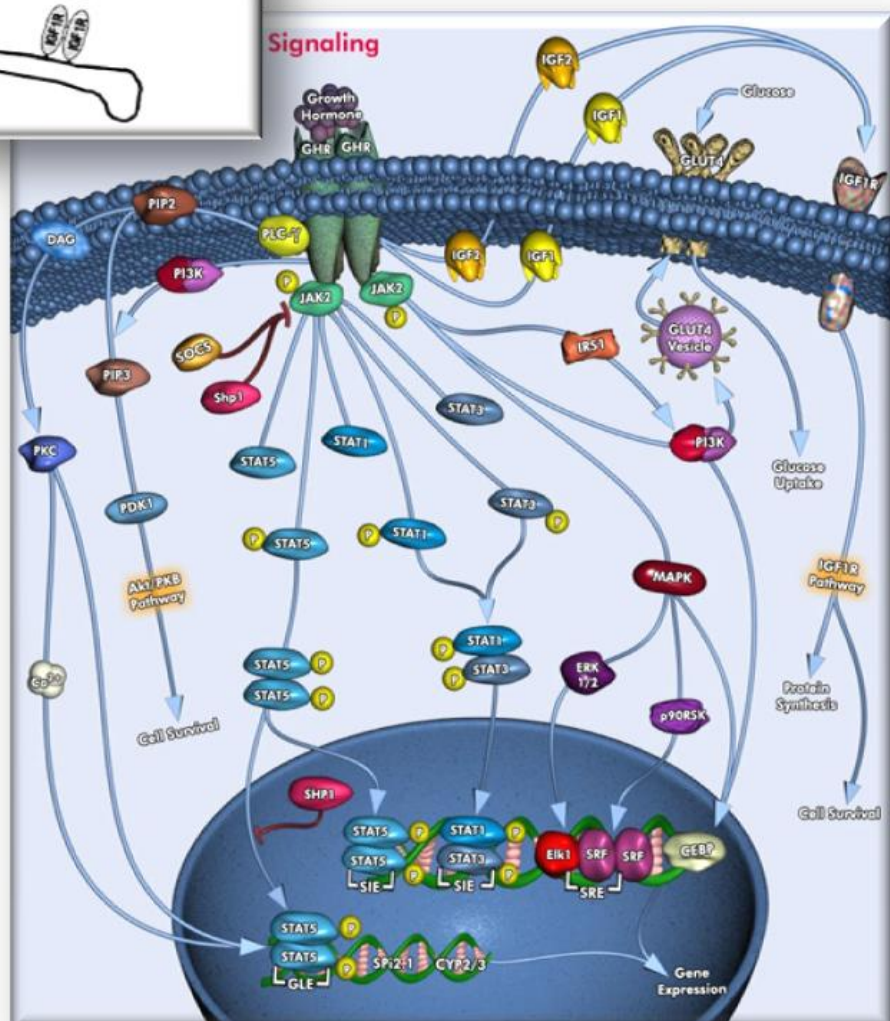
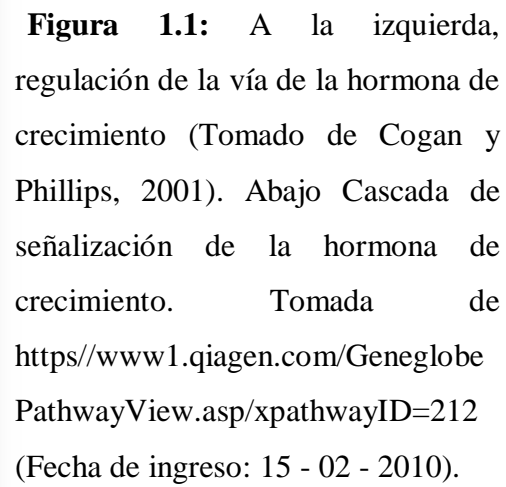
Dentro de los caracteres cuantitativos, el crecimiento corporal ha sido uno de los caracteres más estudiado debido a que varias medidas, sencillas de realizar, reflejan el crecimiento de un individuo: peso, altura, *frame* (calculado a partir de la altura al anca), ganancia diaria, etc. Por este motivo, desde el punto de vista molecular varios autores han detectado QTLs para diferentes caracteres asociados al crecimiento: peso al nacer, peso al destete, peso adulto, peso de faena, peso de carcasa, diferentes tasas de ganancia

diaria, etc. ([www.animalgenome.org/QTLdb/cattle.html](http://www.animalgenome.org/QTLdb/cattle.html); Casas *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Mizoshita *et al.*, 2005; [www.vetsci.usyd.edu.au/reprogen/QTL\\_Map](http://www.vetsci.usyd.edu.au/reprogen/QTL_Map)).

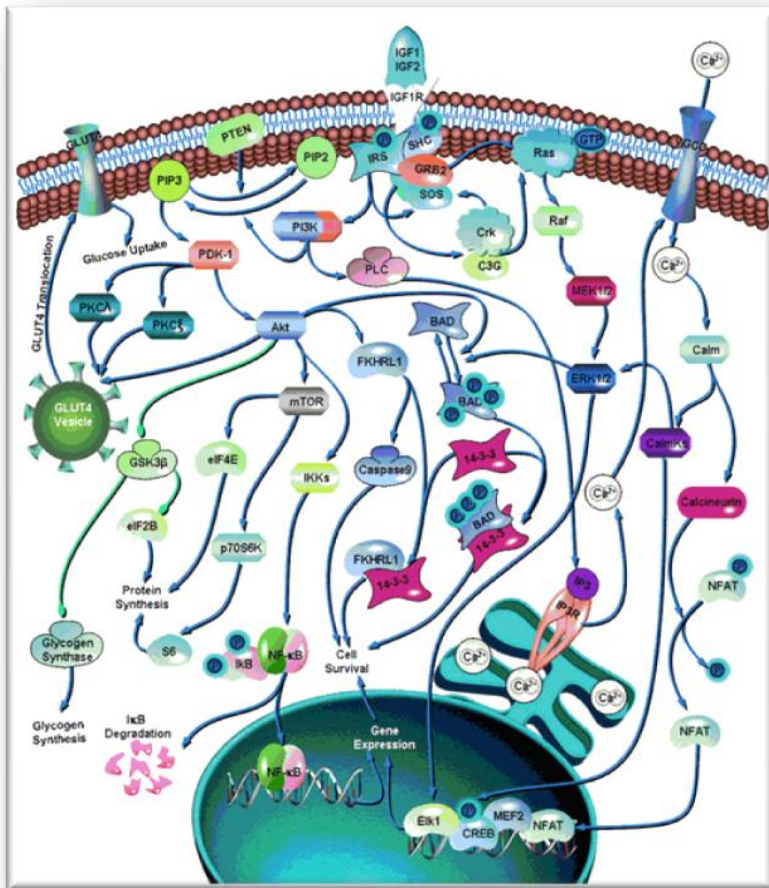
De las vías metabólicas asociadas al crecimiento, la de la hormona de crecimiento (GH, por *Growth Hormone*) ha recibido una mayor atención, ya que está implicada directamente en el desarrollo y crecimiento del animal (Bines y Hart, 1978; Gordon *et al.*, 1983; Cowan *et al.*, 1989; Ceelen 1995; Etherton, 2004). Las células somatotropas de la hipófisis anterior son las encargadas de la producción de GH, y su liberación está regulada a nivel hipotalámico, positivamente por la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH, *Growth Hormone Releasing Hormone*), y negativamente por la somatostatina (SST) (Chen, 2000; Cogan y Phillips, 2001; Renaville *et al.*, 2002). Una vez liberada la GH se une a su receptor GHRc y ejerce su efecto sobre los diferentes tejidos mediante una cascada de señalizaciones vía JAK2-STAT5 (Figura 1.1). La acción biológica de esta hormona sobre los tejidos puede englobarse en dos niveles:

- directo, principalmente sobre el metabolismo de lípidos e hidrocarburos.
- indirecto, a través de las somatomedinas (IGFs, por *Insulin Growth Factors*), liberadas principalmente en el hígado.

Desde el punto de vista del crecimiento corporal, el efecto directo de la GH se verá principalmente en las etapas tardías del crecimiento, a nivel de tejido muscular y adiposo. La dirección de los nutrientes hacia estos tejidos es afectada, provocando un aumento de la síntesis de proteínas y una disminución en la lipogénesis y la lipólisis (Etherton y Bauman, 1998). Sin embargo, en las primeras etapas del crecimiento del animal, mientras está en lactancia, la GH también influye a nivel materno (Bauman, 1999), regulando la producción de leche, y por lo tanto afectando la disponibilidad de nutrientes y el crecimiento del lactante. Se ha observado que la administración exógena de GH provoca un importante aumento (10 - 15%) de la producción láctea (Chillard, 1989). Por su parte el efecto indirecto (vía IGFs) se verá principalmente a nivel óseo y muscular. En general, los IGFs (IGF1 e IGF2) estimulan la replicación celular y ejercen otros efectos no relacionados con el crecimiento celular. En particular, en el músculo activan tanto la proliferación como la diferenciación celular. Sus efectos son mediados







**Figura 1.2:** Cascada de señalización de las somatomedinas I y II (IGF1 e IGF2). Tomada de [http://sabiosciences.com/pathway/phpsn\\_IGF1R\\_Signaling](http://sabiosciences.com/pathway/phpsn_IGF1R_Signaling) (Fecha de ingreso: 15-02-2010).

por el Receptor IGF1 (IGF1Rc, Figura 1.2), de tipo tirosinquinasa muy relacionado con el receptor de insulina (Navarro *et al.*, 1999). Durante la diferenciación de los miocitos aumenta su concentración 100 veces a nivel de membrana, por esto IGFs e IGF1R podrían actuar como factores autócrinos a nivel muscular (Tollefsen *et al.*, 1989).

Los factores de transcripción específicos del músculo juegan un

rol fundamental en la determinación y diferenciación celular. Estos, comprenden una familia de proteínas nucleares que comparten un 80% de similitud de secuencia, principalmente en un motivo hélice-bucle-hélice que interviene en la interacción con el ADN y la dimerización. La llamada familia MyoD incluye las proteínas MyoD, Myf5, Myf6 y miogenina (Brameld *et al.*, 1998). Se ha propuesto que MyoD y Myf5 actuarían en la determinación de los linajes celulares musculares, y posiblemente en la diferenciación. Esto fue encontrado en estudios con ratones *Knock Out* (mutantes para determinados genes). El trabajo realizado por Rudnicki *et al.* (1993) con ratones mutados en los genes codificantes para MyoD y Myf5, demostró que estos ratones nacían desprovistos de músculo esquelético. A nivel de diferenciación celular se observa que el efecto estimulante del IGF1 genera un aumento de la expresión de

miogenina y una disminución de la expresión de Myf5 (Florini *et al.*, 1991; Mangiacapra *et al.*, 1992).

A nivel genético, varios polimorfismos encontrados en estos genes han sido asociados con caracteres de crecimiento. Así es el caso del gen de la GH, que fue mapeado a la región cromosómica 19q26-qter en bovinos (Hediger *et al.*, 1990), y en el cual han sido informados varios polimorfismos (Hallerman *et al.*, 1987; Høj *et al.*, 1993; Yao *et al.*, 1996; Chikuni *et al.*, 1997). La hormona secretada consta de 191 aminoácidos (aa) y posee una gran homología (90%) con la GH porcina, aunque no tanto (35%) con la GH humana (Etherton y Bauman, 1998). Algunos de los polimorfismos informados en bovinos han sido asociados con peso al nacimiento, ganancia diaria pre-destete y ganancia diaria post-destete (Taylor *et al.*, 1998; Reis *et al.*, 2001; Ge *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2007). Por su parte el gen del GHRc ha sido ubicado en el cromosoma 20 (Moody *et al.*, 1995), codifica para una proteína transmembrana de 620 aa: 246 aa extracelulares que incluyen el sitio de unión de la GH, 24 aa transmembrana y 300 aa que comprenden el dominio citoplasmático. Dentro del dominio extracelular se han encontrado varios segmentos relacionados con la transmisión de señal intracelular (Wang y Wood, 1995). En cuanto a su influencia en los caracteres de crecimiento, varios autores han asociado polimorfismos del gen con medidas corporales, tasa de ganancia de peso, peso vivo y de la res (Hale *et al.*, 2000; Curi *et al.*, 2005; Di Stasio *et al.*, 2005).

Tanto el gen del IGF1 como del Myf5 se encuentran en el cromosoma 5 (BTA5) (Li *et al.*, 2004), en este cromosoma tres regiones cromosómicas (0 a 30 cM, 55 a 70 cM, and 70 a 80 cM) han sido asociadas con diferentes caracteres relacionados con el crecimiento (Casas *et al.*, 2000; McClure *et al.*, 2010). Myf5 ha sido mapeado alrededor de los 20 cM, en la zona de 0 a 30 cM, e IGF1 alrededor de 70 cM, dentro de la región 55 a 80 cM (Ihara *et al.*, 2004). En ambos genes se han detectado polimorfismos que resultaron asociados con diferentes caracteres de crecimiento. Li *et al.* (2004) encontraron un SNP en el Myf5 con asociación significativa para tasa de ganancia en diferentes etapas del crecimiento, pre-destete y en engorde. Por su parte, el IGF1 ha tenido un mayor estudio, tanto a nivel humoral como genético. Varios trabajos han confirmado la asociación entre los niveles circulantes de IGF1 con diferentes caracteres (Anderson *et al.*, 1988; Graml *et al.*, 1994; Kitagawa *et al.*, 2001), y diferentes



polimorfismos se han relacionado con peso al nacer, peso al destete y peso de faena (Moody *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2008). Sin embargo, han habido resultados contradictorios, que ponen en duda su real influencia (Ge *et al.*, 2001; Curi *et al.*, 2005).

## 1.2 COLOR DE LA CARNE

La calidad de la carne es un carácter difícil de definir en términos objetivos, ya que depende en gran medida de percepciones subjetivas del consumidor. Aún así, podría definirse como la aceptabilidad que el producto tendría en un mercado específico. Por esto, son utilizados una serie de atributos para caracterizar la calidad de la carne, ejemplo de ello son la terneza, el color, el sabor y la jugosidad. Recientemente, consumidores más conscientes sobre el impacto de la carne en la salud y el bienestar, han agregado a estas variables otros factores, como el contenido de lípidos y colesterol, e incluso ciertas propiedades nutraceuticas (Scollan *et al.*, 2006).

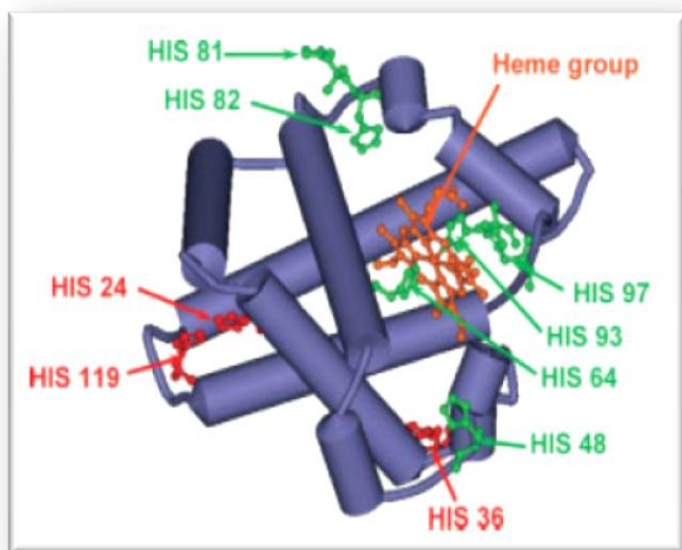
La carne que llega al consumidor, y por consecuencia sus atributos, está influenciada por una cantidad importante de factores: genéticos, ambientales y de transporte y procesamiento en toda la cadena. Se han realizado numerosos estudios en bovinos y en otras especies sobre gran parte de estas variables, buscando determinar el efecto de cada factor y en particular el de los factores genéticos (Priolo, 2001, Behrends *et al.*, 2003, Boles *et al.*, 2004, Dunne *et al.*, 2006, Walshe, 2006). En bovinos, los efectos genéticos que influyen en el color de la carne han sido poco estudiados. Esto se debe a la gran dificultad que presenta la medición del color de la carne *in vivo* sin dañar al músculo, además del gran efecto que tienen los factores de procesamiento sobre el color final de la carne, hecho que dificulta la homogenización de las medidas. No obstante, este atributo es de gran importancia a la hora de formar el precio de la carne, ya que el mismo es especialmente relevante para el consumidor (Ouali, 2006). La importancia económica de este factor fue calculada por Smith *et al.* (2000) en 1000 millones de dólares anuales en pérdidas, ya que un 15% de la carne vacuna pierde valor debido a la decoloración de la superficie.

Existen evidencias a nivel de la industria frigorífica que muestran una variabilidad en el color de la carne entre diferentes individuos independientemente de su raza, edad, pH, proceso de faena y transporte. En este sentido los factores genéticos

podrían ser responsables de dichas variaciones, como ya fue informado en la carne porcina (Otto *et al.*, 2007). Estos autores encontraron una influencia de varios marcadores (MC4R, LDHA, GLUT4, HMGA1, CAST) en dos de los parámetros colorimétricos usualmente utilizados. Por lo tanto, un estudio de los genes que influyen en el color final de la carne y de su variabilidad, podría ayudar a la selección de individuos que produzcan carne de mejor color y más estable en el tiempo.

### 1.2.1 Bases moleculares del color: elección del gen de la mioglobina

A nivel molecular la carne debe su tonalidad rojiza principalmente a la mioglobina, y sus gradaciones estarán dadas por la cantidad de ésta, y sus derivados, presentes en el tejido al momento de la observación (Tang *et al.*, 2004). La mioglobina es una proteína sarcoplasmática de 153 aa, que forman 8  $\alpha$ -hélices (A-H) unidas por segmentos cortos no-helicoidales (Figura 1.3). Dentro de su estructura primaria, las histidinas (His) son los residuos aminoacídicos de mayor importancia por su función.



**Figura 1.3:** Estructura 3-D de la mioglobina obtenida con Accelrys Software Inc. 3D (<http://www.accelrys.com/products/dstudio/>) tomada de Suman *et al.* (2007).

La estructura terciaria de la mioglobina genera un bolsillo hidrofóbico donde se aloja el grupo prostético: un grupo Hemo con un átomo de hierro en su centro. El hierro puede generar 6 enlaces, cuatro de los cuales se unen al anillo pirrólico a través de átomos de N, mientras que una 5<sup>ta</sup> posición está ocupada por la His-93 proximal, la sexta posición genera enlaces reversibles y es donde se une el O<sub>2</sub> proveniente de la sangre.

La His-64 distal influye estéricamente en este bolsillo hidrofóbico, afectando de este modo también el color (Mancini y Hunt, 2005).

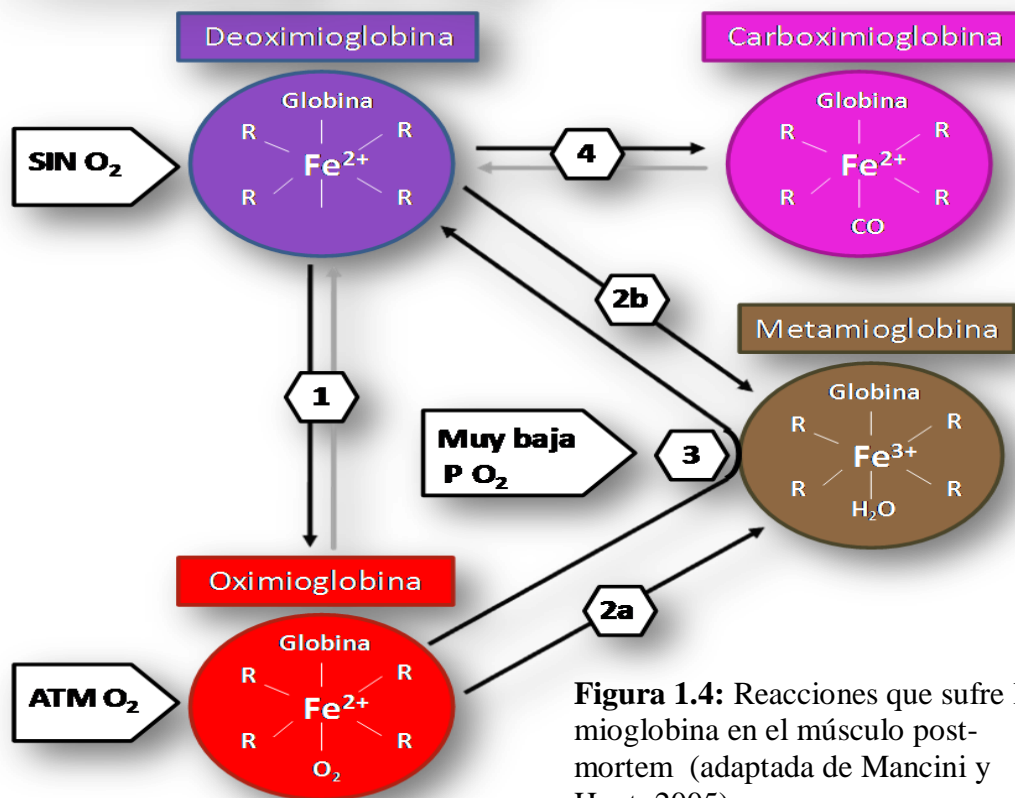
En la carne la mioglobina existe en cuatro formas según el estado de oxidación del hierro central y que ligando este unido a la 6<sup>ta</sup> posición del Fe:

- Deoximioglobina (DMb) que está libre de oxígeno y en estado ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ), de color púrpura y presente en la carne envasada al vacío.
- Oximioglobina (OMb) con oxígeno unido y en estado  $\text{Fe}^{+2}$ , de color rojo cereza.
- Metamioglobina (MMb) con oxígeno unido y en estado férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ), de color marrón.
- Carboximioglobina (COMb), con una molécula de Monóxido de Carbono (CO) unido en la 6<sup>ta</sup> posición y en estado  $\text{Fe}^{+2}$ , de color rojo/rosa brillante.

Una vez faenado el animal, el músculo pasa por diferentes procesos fisicoquímicos hasta convertirse en carne. La Figura 1.4 representa las diferentes reacciones relacionadas con el color que suceden durante ese proceso:

1. Oxigenación: cuando la DMb es expuesta al Oxígeno atmosférico esta une el  $\text{O}_2$  en la 6<sup>ta</sup> posición libre y forma OMb. Adicionalmente, la His-64 distal interacciona con el  $\text{O}_2$  ligado alterando la conformación y estabilidad de la proteína.
2. Oxidación: OMb y DMb pasan por este proceso, en que el  $\text{Fe}^{+2}$  central pasa a  $\text{Fe}^{+3}$  dando como resultado MMb. Este proceso es dependiente de diferentes factores como la presión parcial de oxígeno ( $\text{pO}_2$ ), temperatura, pH, luz, crecimiento microbiano, oxidación lipídica, etc. (Faustman y Cassens, 1990).
3. Reducción: MMb puede pasar a DMb, debido a la acción de la mioglobina reductasa (sistema enzimático reductor), con el consumo de  $\text{O}_2$ , y NADH. Estos dos reactivos son consumidos constantemente por el músculo post-mortem, con lo cual esta reacción queda detenida al cabo de un determinado tiempo. En este sentido, Bekhit *et al.* (2003) plantearon que la concentración de NADH sería más importante que la actividad de la MMB reductasa, en la estabilidad del color de la carne.
4. Carboxilación: La presencia de CO en la célula, ya sea como residuo del metabolismo o proveniente de la atmósfera, puede provocar su ingreso en la 6<sup>ta</sup> posición de coordinación vacante. Este proceso despierta fundamental interés debido a los nuevos sistemas de packaging con atmósferas modificadas.

- 1 (Oxigenación):  $\text{DMb} + \text{O}_2 \rightarrow \text{OMb}$   
 2a (Oxidación):  $\text{OMb} + [\text{Consumo de O}_2 \text{ o Baja PO}_2] - e^- \rightarrow \text{MMb} + \text{O}_2^-$   
 2b (Oxidación):  $[\text{DMb} - \text{hidroxilo} - \text{hidrogenión}] + \text{O}_2 \rightarrow \text{MMb} + \text{O}_2^-$   
 3 (Reducción):  $\text{MMb} + \text{consumo de O}_2 + \text{metamioglobina reductasa} \rightarrow \text{DMb}$   
 4 (Carboxilación):  $\text{DMb} + \text{CO} \rightarrow \text{COMb}$



**Figura 1.4:** Reacciones que sufre la mioglobina en el músculo post-mortem (adaptada de Mancini y Hunt, 2005).

La estabilidad de las diferentes mioglobinas ha sido estudiada en relación a la presencia de diferentes metabolitos y productos derivados del catabolismo post-mortem (Faustman y Cassens, 1991, Chan *et al.*, 1997). Se ha sugerido que la estructura primaria de la Mb bovina (más rica en His) predispone al ataque nucleofílico por parte de aldehídos derivados de la peroxidación lipídica, cuando se la compara con la Mb porcina. Esta inestabilidad se evidencia en la formación de aductos en cuatro residuos histidínicos (His 36, 81, 88, and 152) (Suman *et al.*, 2007). Así variaciones en el gen de la Mb podrían ser causantes de diferencias tanto a nivel de estructura primaria (secuencia aminoacídica), como terciaria (conformaciones estéricas) de la proteína. El gen de la Mb fue mapeado en el BTA5 (De Donato *et al.*, 2003), en una región cercana a los 80 cM. Hasta la fecha ha sido informada muy poca variabilidad en este gen bovino

(Agaba, 1994). Por lo expuesto, este gen podría ser considerado como gen candidato para el estudio de las influencias genéticas en el color de la carne.

### **1.2.2 Grado de consumo de oxígeno y estado redox post-mortem: elección del gen de la enzima Glutathion S-transferasa P1**

Como hemos dicho, el músculo post-mortem experimenta una serie de procesos que lo convertirán finalmente en carne. Paralelamente a las reacciones en la mioglobina se generan un gran número de cambios a nivel de metabolitos intracelulares. Esto fue estudiado por Faustman y Cassens (1991), quienes midieron la variación en el tiempo de varios compuestos químicos durante la maduración de la carne (4°C). En el tiempo de estudio se observó por un lado, la disminución del contenido de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y de los sulfhidrilos no proteicos (NPSH), y por el otro, el aumento del disulfuro de glutatión (GSSG), hipoxantina, xantina, del porcentaje de MMb, de la relación GSSG/NPSH y del extracto total lipídico.

Aunque los mecanismos correspondientes a estos procesos no han sido completamente explicados, se ha demostrado que los factores más influyentes en la decoloración de la carne son la concentración residual de O<sub>2</sub> y la formación de radicales (Ouali, 2006). Más aún, O'Keefe y Hood (1982) demostraron que los músculos con mayor consumo de O<sub>2</sub> tienden a decolorarse más rápido. Por su parte, Ledward (1985), consideró que si bien el consumo de O<sub>2</sub> es importante en la estabilidad del color, el factor de mayor importancia sería la actividad enzimática reductora. En este sentido, Seyfert *et al.* (2006) estudiaron el color de la carne proveniente de diferentes músculos durante 7 días. Su investigación confirmó que durante el período, la actividad enzimática reductora de MMb disminuyó cada día, y conjuntamente, todos los músculos variaron su color hacia tonalidades más oscuras y menos rojas.

Por otro lado, se ha postulado que otros factores que afectan el estado redox de la célula, como los subproductos de la peroxidación lipídica, también intervienen en la decoloración. Los ácidos grasos monoinsaturados, y en particular el 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), serían metabolitos importantes que afectarían indirectamente la estabilidad del color (Chan *et al.*, 1997; Suman *et al.*, 2007). Varios autores han comprobado que las dietas y sistemas de producción de los animales pueden variar el

color de la carne. Determinadas dietas con Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) retrasan la peroxidación lipídica y el deterioro del color (Chan *et al.*, 1998; Faustman *et al.*, 1998), mientras que los sistemas de producción pastoriles y extensivos producen una carne más oscura, debido a un aumento del poder oxidativo del músculo (Vestergaard *et al.*, 2000).

El glutatión (GSH) es un tripéptido (Cisteína, Glicina, Glutamato) con poder reductor que da cuenta del 76% de los NPSH intracelulares de la carne (Faustman y Cassens, 1991). El GSH actúa captando radicales libres y participa como cofactor en la degradación del  $H_2O_2$  por parte de la peroxidasa, ambos potentes oxidantes (Nelson y Cox, 2000), además puede conjugarse con el 4-HNE y con el 4-hidroxitildecenal por acción de las GSH transferasas (Alin *et al.*, 1985; Ishikawa *et al.*, 1986). El efecto del GSH sobre la OMb bovina fue probado por Tang *et al.* (2003). Contrariamente a lo esperado, ellos encontraron un aumento de la formación de MMb por la adición *in vitro* de GSH a pH 7,2 y 25 o 37 °C. Sin embargo, cuando el mismo ensayo fue realizado en presencia del citoplasma muscular (en particular utilizando la fracción de alto peso molecular) el efecto era inverso, el GSH inhibía la formación de MMb, por lo tanto el efecto protector del GSH en el tejido es indirecto.

Dentro de las transferasas, la Glutation S-transferasa P1 (GSTP1) tiene función de detoxificación celular y de resistencia al estrés oxidativo (Lo Bello *et al.*, 2001), de alguna manera sirve como sensor del estado redox en la célula para la maquinaria apoptótica (Pastore *et al.*, 2003). Más aún, Gelfi *et al.* (2004) demostraron la sobreexpresión de GSTP1 en personas que viven en altas montañas (Tibet), las que se encuentran en condiciones de baja  $pO_2$ . En este sentido, como la carne es un tejido en apoptosis y con una  $pO_2$  baja, que desciende con el tiempo, la enzima GSTP1 podría jugar un rol particular en el mantenimiento del poder reductor en el tejido post-mortem. Por lo tanto, se eligió el estudio del gen de la enzima GSTP1 (BTA29 pos 47513674 - 47516542), admitiendo que variantes en el gen podrían ser responsables de diferencias en la expresión, en la estructura de la enzima, y/o en la actividad enzimática.

### **1.3 OBJETIVO**

#### **1.3.1 Objetivos generales**

El objetivo general de esta tesis fue el generar conocimiento en el área de la genómica: se presenta la detección de nuevos polimorfismos en genes candidatos, y la asociación de diferentes marcadores (informados y originales), con dos características de importancia económica a nivel productivo y de la cadena cárnica: crecimiento corporal y color de carne.

Así mismo, durante el período de trabajo se valoró la formación del recurso humano, reflejado en las diferentes estrategias para la detección de nuevos polimorfismos (PCR-SSCP-secuenciación y PCR-secuenciación directa), en los distintos tipos de marcadores (microsatélites y SNPs), y la diversidad de técnicas para la detección alélica (PCR-RFLP, PCR-Pyrosecuenciación, PCR-SSCP y PCR-resolución de fragmentos).

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

##### ***Crecimiento corporal***

- Desarrollo y/o optimización de diferentes técnicas de detección de polimorfismos a nivel de ADN: PCR-RFLP para el gen GH, PCR-pirosecuenciación para el gen GHRc y GH, amplificación de cinco microsatélites (BP1, ETH10, IGF1, RM029 y BM1824) en multiplex y análisis de fragmentos.
- Estudio de la variabilidad genética de estos marcadores en poblaciones de las razas Angus, Criollo Argentino y Hereford.
- Análisis del efecto de la selección sobre las frecuencias de estos marcadores, cercanos a genes candidatos. Evaluación el efecto sobre la variabilidad genética de los marcadores seleccionados debido a diferentes criterios de selección, a través del estudio comparativo de dos rodeos Hereford, y el efecto del tiempo, a través de la comparación de grupos generacionales.
- Determinación la asociación de los marcadores y las regiones cromosómicas del BTA5 (usando los genotipos de dos marcadores cercanos), con los BLUPs relacionados a crecimiento: peso al nacer directo, peso al destete directo, peso al destete materno, peso a los 400 y 600 días, y área de ojo de bife.

***Color de carne***

- Búsqueda polimorfismos genéticos de los genes candidatos Mb y GSTP1. En particular, la secuenciación de segmentos seleccionados que desde la teoría presentaban una importancia funcional.
- Análisis exploratorio de una posible asociación de los polimorfismos encontrados con diferentes parámetros colorimétricos, a partir de muestras obtenidas en frigorífico y evaluadas para color.
- Análisis exploratorio de una posible asociación de marcadores (microsatélites) cercanos al gen de la Mb.





# Capítulo 2

## MATERIALES Y MÉTODOS



## 2.1 POBLACIONES Y MUESTRAS

En los diferentes estudios se utilizaron seis grupos de muestras:

- 1) Banco de ADN disponible en el IGEVET.
- 2) Muestras de carne obtenidas en una carnicería comercial.
- 3) Muestras de carne obtenidas en frigorífico.
- 4) Rodeo comercial Hereford “Cabaña Los Ángeles”.
- 5) Rodeo experimental Hereford Reserva 7 INTA Balcarce.
- 6) Pruebas de comportamiento (XIV, XV y XVI) del INTA Balcarce.

1) Se dispuso de las muestras del panel de ADN genómico del Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET, CCT La Plata – CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias – UNLP), este incluía 15 razas bovinas tanto taurinas como cebuinas. Los muestreos de sangre o pelo de individuos (machos y hembras) con un mínimo grado de parentesco posible fueron realizados entre 1993 y 2008. En la Tabla 2.1 se detallan los animales utilizados, raza, tipo de muestra, año de colecta y método de extracción.

2) En una carnicería del mercado local, se obtuvieron diferentes muestras de carne con el objeto de optimizar el método de medición en el equipo disponible para realizar esta medida. Se utilizaron dos cortes para evaluar si existía una gran variabilidad del color. Se solicitaron los cortes “Colita de Cuadril” y “Tortuguita” en forma de bife. Los cortes fueron realizados a cuchillo en forma longitudinal y transversal al músculo. Las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente y analizadas 2 horas después de realizado el corte.

**Tabla 2.1:** Se detallan los ADN tomados del panel de ADN genómico del IGEVET y utilizados en los diferentes estudios realizados. Se indica el tipo de muestra tomada originalmente, fechas de toma de la muestra y método de extracción.

Raza	N	Muestra	Metodo
Angus	12	Sangre	Orgánica
	3	Semen	pK/cloroformo
Criollo Argentino	12	Sangre	Orgánica
Criollo Boliviano	15	Sangre	Orgánica
Brahman	8	Sangre	Orgánica
Charolais	6	Sangre	DNAzol
Criollo Uruguayo	5	Sangre	DNAzol
Galloway	2	Sangre	DNAzol
Hereford	23	Sangre	DNAzol
Holando	5	Sangre	Orgánica
Jersey	4	Sangre	DNAzol
Nelore	25	Sangre	DNAzol y Chelex
Normando	2	Sangre	DNAzol
Retinta	4	Sangre	Orgánica
Wagyu	16	Pelo	NaOH
	8	Sangre	DNAzol
Shorthorn	1	Sangre	DNAzol

3) En un frigorífico comercial de la provincia de Buenos Aires se faenaron 50 animales en condiciones controladas. Los animales pertenecían a las razas Aberdeen Angus (6), Hereford (3) y sus cruza en diferentes proporciones (23 media sangre, 7 Angus  $\frac{3}{4}$  y 6 Hereford  $\frac{3}{4}$ ), más 5 muestras de animales triple cruza (padre Limusin y madre Angus x Hereford). Los animales nacieron en la primavera 2006 y fueron criados en la Estación Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Balcarce, Provincia de Buenos Aires, Argentina (37° 45' latitud S, 58° 18' longitud W, 130 m sobre el mar). Su alimentación se realizó sobre pasturas, principalmente de las especies *Lolium multiflorum*, *Dactylis glomerata*, *Bromus catarticus*, *Trifolium repens* y *T. pretense*. Al desposte (24 h después del sacrificio) se extrajeron muestras de tres bifos entre las costillas 12° y 13° de la media res izquierda. Las muestras se remitieron deshuesadas, envasadas al vacío y congeladas (-18 °C) al Laboratorio de Carnes de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, para la realización posterior de las mediciones de color y pH.

4) Las muestras del Rodeo Comercial (RodC) fueron obtenidas de una cabaña - ubicada en el Partido de Azul (centro de la Provincia de Buenos Aires). La Cabaña Los Ángeles cuenta con un volumen aproximado de 400 vacas de cría y una producción anual de 160 toros. El muestreo, realizado entre 2006 y 2008, incluyó sangre de 68 terneros (machos y hembras) y 17 vacas, y semen congelado de 18 toros. Todos los animales muestreados presentaban una conexión genética con un toro fundador (HHH ENF 972) nacido en 1980, a excepción de 6 toros utilizados para introducir un nuevo pool genético en el rodeo. Con el objetivo de maximizar la inferencia de genotipos a partir de las relaciones de parentesco, las hembras seleccionadas para muestrear tenían varias crías en el rodeo, y los toros habían sido utilizados desde 1986. Finalmente el árbol de relaciones de parentesco (pedigrí) registrado desde 1980 incluía 1754 animales.

5) El Rodeo experimental (RodE) constituye uno de los rodeos del INTA Balcarce, fundado en 1960 con el objetivo de experimentar condiciones de manejo en la cría. Desde 1986 hasta 2006 el rodeo estuvo cerrado, estabilizado en 100 vacas de cría y 4 toros en servicio. Los toros entraban en servicio a los dos años de edad y servían al rodeo dos años consecutivos, luego eran reemplazados por dos toros jóvenes; así los toros en servicio siempre tenían dos y tres años de edad (para una visión más detallada del rodeo ver Melucci *et al.* (2009)). El muestreo se realizó entre 2005 y 2007 de

animales ubicados entre las generaciones 2.19 y 8.16, presentando un coeficiente de consanguinidad promedio de 0,047. Las muestras de sangre tomadas pertenecían a 66 terneros (machos y hembras), 83 vacas y 9 toros. Adicionalmente el rodeo contaba con un árbol de relaciones de parentesco (pedigrí) que incluyó 2474 animales.

6) Con el objetivo de evaluar la diversidad y la frecuencia alélica en poblaciones no homogéneas, se tomaron muestras de sangre de los toros de las Pruebas de comportamiento XIV, XV y XVI del INTA Balcarce, realizadas de 2006 a 2008 (<http://www.inta.gov.ar/balcarce/index.htm>). Estas pruebas incluyeron 133 toros: 37 Hereford, 58 Angus, 25 Criollos y 13 cruza Angus x Hereford, pertenecientes a 7, 16, 3 y 1 establecimientos diferentes, respectivamente. La importancia de este estudio en estas razas radica en que Angus y Hereford son las razas mayoritarias en el país, y la raza Criolla es la única población autóctona, que constituye un germoplasma valioso de ser caracterizado por ser un potencial “reservorio de variabilidad genética” (Giovambattista *et al.*, 2001). Además, el conjunto de los animales Hereford sirvió como referencia de la variabilidad de esta raza en Argentina.

## 2.2 DATOS FENOTÍPICOS

### 2.2.1 Crecimiento

Los dos rodeos muestreados (RodE y RodC) utilizaban métodos de selección basados en el Modelo Animal (genética cuantitativa), con el uso de BLUPs (*Best Linear Unbiased Predictors*). Aunque los objetivos de selección de ambos rodeos no coincidían totalmente, algunas de las mediciones fueron equiparables.

El RodC ha sido seleccionado por más de 15 años utilizando los EBVs (*Estimated Breeding Values*) resultantes del modelo de evaluación genética implementado por BreedPlan® (<http://breedplan.une.edu.au/>). Este rodeo es constantemente evaluado para las variables relacionadas con el crecimiento: Peso al Nacer directo (PNd), Peso a los 200 días (equivalente al Peso al Destete directo, PDd), Habilidad Materna o Leche (equivalente al Peso al Destete materno, PDm), Peso a los 400 días (P400), Peso a los 600 días (P600) y Área de Ojo de Bife (AOB). El objetivo de selección aplicado en este rodeo, respecto del crecimiento corporal, es obtener un bajo peso al nacer y un peso adulto moderado (comunicación personal del propietario de la cabaña). De esta manera los valores de PNd y P600 son los más significativos al momento de elegir los toros que

serán padres de la cabaña. Los EBVs obtenidos por BreedPlan en 2008 fueron suministrados por el propietario de la Cabaña. La base contenía los valores de cría pertenecientes a 1754 animales relacionados, incluyendo los animales genotipados.

El RodE fue seleccionado desde 1986 hasta 1993 aplicando un índice de selección sobre los toros con el objetivo de aumentar la tasa de ganancia diaria pre-destete, sin aumentar el peso al nacer. El índice (I), obtenido por Melucci *et al.* (1983), se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$I_i = PN_i + 9374,76 RDG_i$$

siendo  $PN_i$  = el Peso al Nacer del toro  $i$  y  $RDG_i$  la tasa de ganancia diaria relativa desde el nacimiento al destete, calculada como el logaritmo del peso al momento de la medida (cada animal tuvo entre 5 y 8 medidas). A partir de 1994 y hasta 2006, el criterio de selección varió, utilizando el índice (X) propuesto por Melucci (1995):

$$X_i = BLUP_i(PDd) - 2,33 BLUP_i(PNd)$$

los BLUPs corresponden al peso al nacer directo y al peso al destete directo respectivamente, y fueron calculados a partir de un modelo animal de dos caracteres considerando el PNd, PDd y PDm. Al momento de realizar esta tesis, el modelo incluyó 2474 animales que contaban con datos fenotípicos o permitían establecer relaciones de parentesco entre ellos (para una visión más detallada del modelo de selección ver Melucci *et al.* (2009)). Por lo tanto, este rodeo contaba con información de campo y BLUPs, disponibles para los análisis de asociación.

### **2.2.2 Determinación del Color de la Carne**

#### ***Muestras de Carnicería***

Las muestras fueron procesadas en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CONICET. La medición del brillo ( $L^*$ ) y de los parámetros de cromaticidad ( $a^*$  y  $b^*$ ) fue realizada mediante espectrofotometría de reflectancia difusa, utilizando un colorímetro triestímulo Chromameter Minolta CR-300 (Minolta Co. Ltd., Japan). Este

método, como la mayoría de los métodos objetivos de medición de color, utiliza el sistema CIE (1986) que se basa en tres coordenadas: L\*, luminosidad, mide la luz reflejada (0 a 100 de luz completamente absorbida a completamente reflejada), a\* mide gradaciones del rojo (positivo) al verde (negativo), y b\* mide gradaciones del amarillo (positivo) al azul (negativo) (Priolo *et al.*, 2001). Las pruebas realizadas incluyeron zonas que contenían o no fibras musculares, con diferentes grados de grasa intramuscular y diferentes espesores de corte. Luego de estas pruebas se decidió realizar las medidas por triplicado, evitando zonas con grasa y/o fibras.

### ***Muestras de carne obtenidas en Frigorífico***

Estas muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Carnes de la Facultad de Agronomía (UBA). Luego de ser conservadas a -18 °C durante aproximadamente 12 meses, fueron descongeladas y llevadas a 4 °C durante 60 minutos para su oxigenación. De los trozos derivados se seccionó un bife de 2,5 cm de ancho cortado del músculo *Longissimus* entre la doceava y treceava costilla. Las mediciones de color se realizaron en el espacio L\* a\* b\* por medio de un colorímetro triestímulo Chromameter Minolta CR-300 (Minolta Co. Ltd.), evitando las medidas sobre tejido conectivo o grasa intramuscular. El área de medición circular fue de 8 mm de diámetro, usando el iluminante C y con iluminación difusa de una lámpara de Xenón. Previo a las mediciones, el colorímetro fue calibrado contra un estándar blanco (CR – A43) provisto por el fabricante. Se tomaron tres mediciones de cada muestra que luego se promediaron, para tener una única medida por bife. El pH fue medido con un peachímetro digital portátil Testo 230, con electrodo de penetración y sonda compensadora de temperatura (Testo GMBH. Ltd., Japan). Se tomaron tres lecturas de pH por muestra y se calculó el promedio.

## **2.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN**

### **2.3.1 Extracción de ADN de carne**

Se cortaron 0,07 g. de carne y se colocaron en 500 µl de buffer (0,01M Tris-HCl, 0,01M EDTA, 0,5% SDS, pH = 8) conteniendo 20 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y 30 µl de Ditiotreitól (DTT) 1 M. Luego se llevó el tubo a 55 °C durante toda la noche para la digestión del tejido. Al día siguiente se agregaron 500 µl de cloroformo, se mezclaron

las fases y se centrifugó el tubo a temperatura ambiente durante 5 min 12000 g. La fase superior (acuosa) se pasó a otro tubo, descartando la fase orgánica y la intermedia de compuestos anfifílicos. Este proceso se repitió 2 o 3 veces hasta que la fase intermedia fuera casi nula. La fase superior se pasó a un nuevo tubo y se le agregó acetato de amonio (concentración final 2,5 M) para precipitar las posibles proteínas remanentes, se centrifugó a temperatura ambiente a 14000 g durante 5 min. Se tomó el sobrenadante y se precipitó el ADN con 750 µl de etanol 100%, el mismo fue separado por centrifugación (15 min a 14000 g y temperatura ambiente). El pellet se lavó con 250 µl de etanol 70%, se centrifugó a temperatura ambiente 5 min a 12000 g y se descartó la fase líquida. Se secó el ADN a temperatura ambiente y se solubilizó en 200 µl de NaOH 8mM a 37 °C toda la noche.

### **2.3.2 Extracción de ADN de semen congelado**

Se tomaron 50 µl de semen para digestión total, para ello se agregaron 500 µl de buffer (0,01M Tris-HCl, 0,01M EDTA, 0,5% SDS, pH = 8) conteniendo 0,4 mg/ml de proteinasa K y 25 mM de DTT. Se permitió actuar a la enzima durante toda la noche a 55 °C en horno de hibridación. Luego de la digestión, se siguieron los mismos pasos de purificación, precipitación y lavado, que en la “Extracción de ADN de carne”.

### **2.3.3 Extracción de ADN de sangre por el método DNAzol**

A partir de 500 µl de sangre se obtuvieron Glóbulos Blancos por sucesivos lavados (hasta tres) con 500 µl de agua y posterior centrifugación a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Una vez que el precipitado obtenido fue blanco, se le agregaron 500 µl de DNAzol ® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y se disgregó con pipeta o vortex. La dispersión obtenida se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a 14.000 g y el sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo. El ADN, presente en el sobrenadante, se precipitó con 750 µl de etanol 100% y se separó por centrifugación a temperatura ambiente durante 15 min a 14000 g. El pellet se lavó con 250 µl de etanol 70% y se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a 12000 g. El ADN obtenido se secó a temperatura ambiente y se disolvió en 200 µl de NaOH 8mM a 37 °C durante toda la noche.



#### 2.3.4 Extracción de ADN de sangre por el método Chelex

A 500 µl de sangre se le agregaron 500 µl de agua y se incubó a temperatura ambiente 30 min. La dispersión luego se centrifugó a temperatura ambiente, a 14000 g, durante 3 min y el sobrenadante se descartó. Al precipitado así obtenido se le agregaron 200 µl de Chelex 5% y se incubó durante 30 min a 56° C. Se mezcló enérgicamente (vortex) 5 min y se incubó durante 8 min a 95 °C.

#### 2.3.5 Extracción de ADN de sangre por el método Orgánico

A partir de 500 µl de sangre se obtuvieron glóbulos blancos por sucesivos lavados (hasta tres) con 500 µl de agua y posterior centrifugación a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Una vez que el precipitado obtenido fue de color blanco, se le agregaron 500 µl de buffer (0,01M Tris-HCl, 0,01M EDTA, 0,5% SDS, pH = 8) conteniendo 20 µl de proteinasa K (10 mg/ml). Luego se llevó el tubo a 55 °C durante toda la noche para la digestión de las células. Al día siguiente se agregaron 500 µl de cloroformo, se mezclaron las fases y se centrifugó el tubo a temperatura ambiente durante 5 min 12000 g. La fase superior (acuosa) se pasó a otro tubo, descartando la fase orgánica y la intermedia de compuestos anfifílicos. Este proceso se repitió 2 o 3 veces hasta que la fase intermedia fuera casi nula. La fase superior se pasó a un nuevo tubo y se le agregó acetato de amonio (concentración final 2,5 M) para precipitar las posibles proteínas remanentes, se centrifugó a temperatura ambiente a 14000 g durante 5 min. Se tomó el sobrenadante y se precipitó el ADN con 750 µl de etanol 100%, el mismo fue separado por centrifugación (15 min a 14000 g y temperatura ambiente). El pellet se lavó con 250 µl de etanol 70%, se centrifugó a temperatura ambiente 5 min a 12000 g y se descartó la fase líquida. Se secó el ADN a temperatura ambiente y se solubilizó en 200 µl de NaOH 8 mM a 37 °C toda la noche.

#### 2.3.6 Extracción de ADN de pelo

Se cortaron y colocaron cinco a diez bulbos pilosos en un tubo de microcentrífuga, luego se agregó 50 µl de NaOH 0,2 M y se calentó a 95 °C durante 15 min. Inmediatamente después, la solución sobrenadante se trasvasó en un nuevo tubo y se neutralizó con 50 µl de una solución HCl 0,2 M - TRIS 1 M.

### **2.3.7 Cuantificación de ADN**

Las soluciones de ADN resultantes, conservadas en un freezer de -20 °C, se midieron en un espectofotómetro NanoView (GE healthcare, USA). A partir de los datos de absorbancia obtenidos, se prepararon soluciones de trabajo con una concentración final entre 12,5 y 18 ng/μl, que se conservaron en un freezer de -20 °C hasta su utilización.

## **2.4 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO**

Para el estudio de polimorfismo de genes candidatos para el color de la carne (Mb y GSTP1) se plantearon diferentes estrategias.

### **2.4.1 Gen de la Mioglobina (Mb)**

Con el objetivo de identificar qué secciones de la estructura primaria de la proteína poseían mayor contacto con el grupo Hemo, se utilizaron simulaciones de la estructura 3D de la mioglobina. Al no disponer en ese momento del diagrama bovino, se utilizó el de la mioglobina equina (GeneBank MMDB: 42426 PDB: 2IN4), se observó con el programa Cn3D (Chen *et al.*, 2003), y se identificó la zona de mayor contacto. Para ver la correspondencia de las zonas identificadas en la mioglobina bovina en el gen, se utilizaron las secuencias NC 007303, NM 173881, NP 776303.1 reportadas en GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que codifican para el gen de la mioglobina bovina (*Bos taurus*), el ARNm del mismo y la proteína respectivamente (Anexo 1). Por alineación de las secuencias se seleccionó el exón 2 del gen, como la zona codificante para la porción proteica en mayor contacto con el grupo Hemo (principal responsable del color), siendo esta la zona elegida para realizar la amplificación.

Se diseñaron primers en los extremos del exón 2 para buscar polimorfismos en la secuencia del mismo (Tabla 2.2) y estudiar la variabilidad genética en varias razas. Para esto se incluyeron muestras del panel de ADN genómico bovino del IGEVET. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 μl con las siguientes concentraciones de reactivos: ADN 100 μg totales, 10X PCR Buffer (Invitrogen) 5 μl, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, dNTPs 0,8 mM, Primers 1mM, Taq DNA Polimerasa (Invitrogen) 0,06 U/μl. El programa de ciclado utilizado fue el siguiente: 1 min a 94°C, 35 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 63°C y 45 s a 72°C, y una extensión final de 7 min a 72°C. Luego, para

verificar el producto obtenido por PCR, se mezclaron 3 µl del tubo con el amplificado con 1 µl de colorante no desnaturizante (4 g % sacarosa, 0,025 g % de Azul de Bromofenol). Estos fueron luego corridos en un gel de poliacrilamida (19:1) al 6 %, a 170 voltios durante 40 min, junto con marcadores de peso molecular. Las bandas de ADN se revelaron con bromuro de etidio 1 µg/ml durante 5 min y se observaron en un transiluminador UV. Se comprobó la presencia de una única banda de peso molecular coincidente con el teórico del gen amplificado.

El screening de polimorfismos se realizó por el método PCR-SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*), y se confirmó cada variante conformacional encontrada por secuenciación directa. Para realizar el SSCP, los productos de PCR se corrieron en geles de poliacrilamida (38:1) al 10% (Orita *et al*, 1989a,b), bajo las siguientes condiciones

de corrida: 16 h, 200 volts y 4° C. Luego, los geles se tiñeron con Nitrato de Plata según la técnica de Bassam *et al*. (1991) y

**Tabla 2.2:** Primers utilizados para el estudio del polimorfismo de los genes candidatos para color.

Gen	Nombre	Primer
GSTP1	GSTP1 V2 F	5'-CCgCTAACTggCTTCTTTgTgCAT-3'
	GSTP1 E1-2 R	5'-ACTgCTCggAAGACCTCACAgC-3'
Mioglobina	MBe2int-F	5'-ggCTCTTCACAggTCACCCgAg-3'
	MBe2int-R	5'-CTCCAggTACTTgACAgggATC-3'

se observaron con un transiluminador de luz visible. Una vez seleccionadas las posibles variantes, por diferencias en los patrones de bandas, una nueva alícuota de los productos de amplificación se purificaron con polietilenglicol 8000 y se corrieron en un secuenciador MegaBACE 1000 (GE Healthcare, USA) utilizando el DYEnamic ET Terminator Kit (GE Healthcare). Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Sequence Analyzer (GE Healthcare). Las secuencias se alinearon con el programa CLUSTAL-W 1.8 (Baylor College of Medicine - <http://searchlauncher.bmc.tmc.edu>), y las variaciones se determinaron por comparación directa con la secuencia existente en el GenBank para el gen de la mioglobina (NM 173881).

#### 2.4.2 Gen GSTP1

La secuencia NC 007330 (Anexo 2), incluida en el GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que codifica para el gen de la proteína GSTP1, se

utilizó para el diseño de primers específicos. Se diseñaron los primers GSTP1 V2 F y E1-2 R (Tabla 2.2) que amplifican 273 pb que incluyen el exón 2 y parte del segundo intrón del gen.

Las muestras utilizadas para la búsqueda de polimorfismos se seleccionaron del panel de ADN genómico bovino del IGEVET. Para las reacciones de PCR se incluyeron 100 ng de ADN en un volumen total de 50  $\mu$ l, que incluyó: 10X PCR Buffer (Invitrogen) 5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTPs 0,8 mM, Taq DNA Polimerasa (Invitrogen) 0,06 U/ $\mu$ l, primers 1mM. El programa de ciclado fue 2 min a 94°C, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 63°C y 75 s a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C.

Se comprobó la presencia de productos de PCR como se describió anteriormente (para el gen Mb) y los amplificados con una buena señal (que poseían una buena concentración del gen amplificado) se seleccionaron para secuenciar. El proceso de purificación, corrida y análisis realizado fue el mismo que el descrito anteriormente para el gen Mb. Los polimorfismos se determinaron por comparación directa con la secuencia informada en el GenBank para el gen de la GSTP1 bovina (NC 007330).

## **2.5 GENOTIPIFICACIÓN**

Para el estudio de asociación con los caracteres de crecimiento y color de carne se eligieron 6 genes como candidatos. Por un lado, para los caracteres de crecimiento se seleccionaron 4 genes, cuyos productos pertenecen a diferentes etapas de la vía de señalización de la Hormona de Crecimiento (GH). En tanto que, se utilizaron 3 técnicas de detección de polimorfismo: GH por corte con enzimas de restricción (PCR-RFLP), Receptor de GH (GHR) y GH por Pirosecuenciación, e IGF1 y Myf5 por microsatélites cercanos a los genes. Por otro lado, la posible asociación de los dos genes elegidos en relación al color de la carne se realizó: GSTP1 por secuenciación directa y Mb por microsatélites cercanos al gen.

### **2.5.1 PCR-RFLP**

Para la determinación del polimorfismo L217V del exón 5 (alelos A y B) del gen GH se utilizó la técnica descrita por Yao *et al.* (1996). La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25  $\mu$ l conteniendo 25 a 50 ng de ADN, 1X PCR buffer (Invitrogen), 0,15  $\mu$ M de cada primer (GH6P11 y GH6P12, Tabla 2.3), 200 mM de cada dNTP, 2

mM MgCl<sub>2</sub> y 0,5 unidades de Taq polymerase (Invitrogen). Las condiciones utilizadas fueron 92°C 4 min, 30 ciclos de 92°C 30 s, 59°C 1 min y 72°C 1 min, con una extensión final de 5 min a 72°C. Luego 3 µl de cada amplificado se utilizaron para verificar el grado de amplificación como se describió anteriormente para el gen Mb. Las muestras

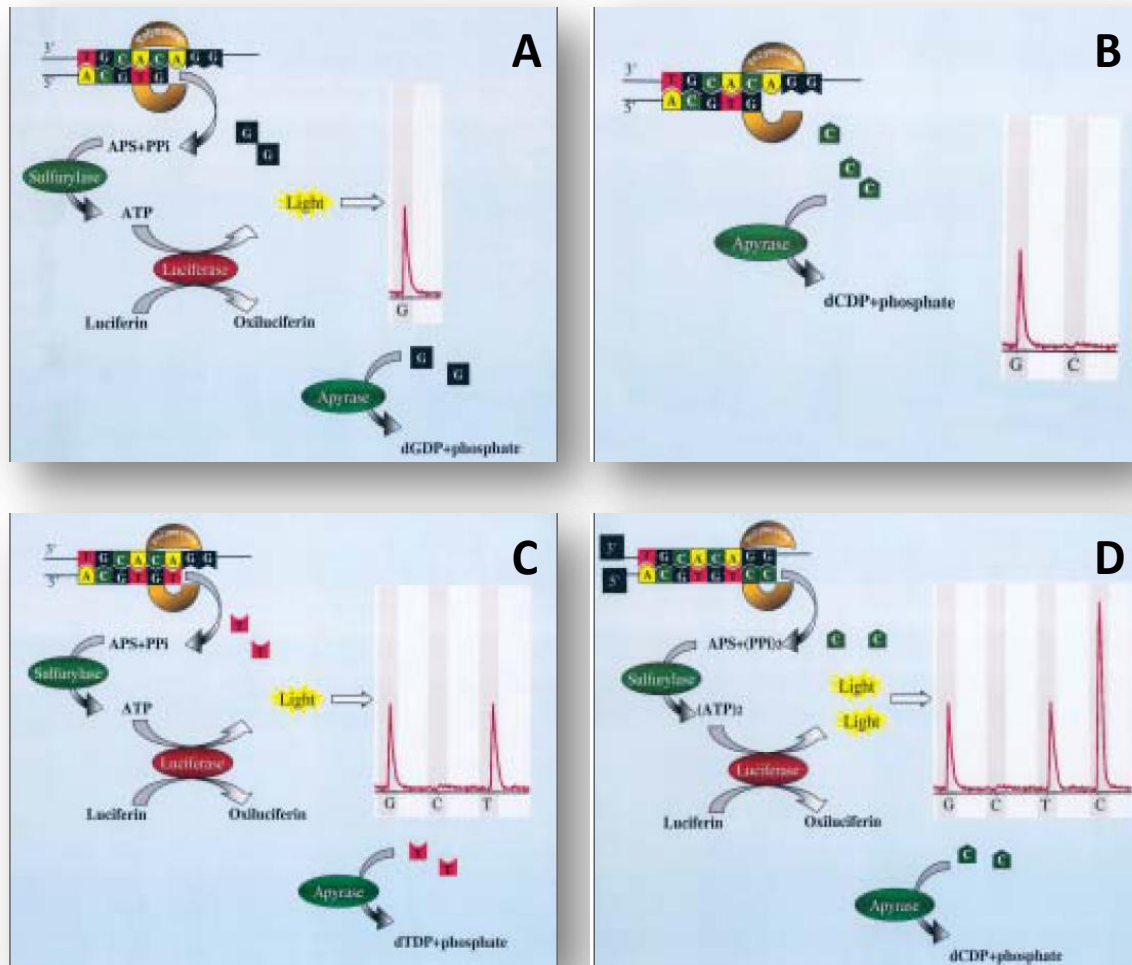
**Tabla 2.3:** Primers utilizados para la genotipificación de marcadores de los genes candidatos, con el tamaño del amplificado. Los prefijos **FAM** y **HEX** corresponden a fluorocromos, y **BIOT** a biotina.

Marcador/ Gen	Nombre	Primer	Amplificado (Rango)	Referencia
BM1824	BM1824 F	FAM 5' - gAgCAAggTgTTTTTCCAATC - 3'	180-192	<a href="http://www.isag.org.uk">www.isag.org.uk</a>
	BM1824 R	5' - CATTCTCCAACtGCTTCCTg - 3'		
BP1	BP1 F	FAM 5' - AAAATCCCTTCATAACAgTgCC - 3'	302-322	UnSTS:250709 ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> )
	BP1 R	5' - CATCgTgAATTCCAgggTTC - 3'		
ETH10	ETH10 F	FAM 5' - gTTCAggACTggCCCTgCTAACA - 3'	214-226	<a href="http://www.isag.org.uk">www.isag.org.uk</a>
	ETH10 R	5' - CCTCCAgCCCACCTTCTCTCTC - 3'		
IGF1	IGF1 F	HEX 5' - gCTTggATggACCATgTTg - 3'	225-231	Bishop et al. 1994
	IGF1 R	5' - CACTTgAggggCAAATgATT - 3'		
RM029	RM029 F	FAM 5' - ATATgTCTCTgCATATCTgTTTAT - 3'	80-86	Kossarek et al. 1994
	RM029 R	5' - CTAATCCCATAgTgAgCgACC - 3'		
GH	GH6P11	5'-TAGgggAgggTggAAAATggA-3'	404	Yao et al. 1996
	GH6P12	5'-gACACCTACTCagACAATgCg-3'		
	GH5 V2 R	BIOT-5'-ggCACTTCATgACCCTCaggT-3'	253	Estatesis
	GH5 V2-Int-1	5'-CCCTTggCaggAg-3'	---	
GHRc	GHR F	BIOT-5'-TgCTCTAATCTTTCTggTACCagg-3'	344	Blott et al. 2003
	GHR R	5'-CCTCCCCAAATCAATTACATTTCTC-3'		
	GHR seq	5'-TAGAAAATATgAgTAAA-3'	---	Estatesis

que presentaban una buena señal (en las que se logró una buena eficiencia de amplificación), se digirieron con la enzima de restricción. Para esto, 12 µl del amplificado se mezclaron con 3,1 µl de agua, 2,5 U de la enzima Alu I (Promega, Madison, WI) y 1,7 µl de Buffer (provisto por el fabricante de la enzima). La mezcla se incubó a 37°C durante toda la noche. Luego, todo el volumen de reacción se corrió en gel de poliacrilamida al 8% 1X TBE, a 120 volts, durante 1 hora. El gel se reveló con bromuro de etidio 1 µg/ml durante 5 minutos, y se observó con un transiluminador UV. Los genotipos se determinaron por observación directa e interpretación del patrón de bandas.

### 2.5.2 PCR-Pirosecuenciación

Para el estudio de los SNPs de los genes GH y GHRc se utilizó la técnica de pirosecuenciación. Esta técnica aprovecha la detección de la luminiscencia emitida por la luciferasa al romper una molécula adenosinatrifosfato (ATP). La incorporación de una base nitrogenada trifosfato (dNTP) en la síntesis de ADN por la polimerasa libera



**Figura 2.1:** Esquema de la técnica de pirosecuenciación (adaptada de Wang y Marincola 2003). Paso A: se dispensa el primer dNTP establecido en el orden (dGTP) y la Polimerasa cataliza su incorporación a la cadena. Este proceso se acompaña de la liberación de pirofosfato (PPi) en una cantidad que es equimolar con la cantidad de dNTP incorporado. Subsecuentemente, la ATP sulfurylase convierte el PPi + APS en ATP y este produce la conversión de luciferina en oxiluciferina en presencia de la enzima luciferasa. Este proceso emite luz en cantidades proporcionales al dNTP incorporado, que es captado por el equipo y presentado en forma de un pico. El dGTP no incorporado y el exceso de ATP, es degradado por una apirasa, y el equipo queda preparado para el próximo paso. Paso B: Se dispensa el segundo dNTP del orden (dCTP), como no es incorporado todo es degradado por la apirasa y no genera luz. Paso C: Se dispensa el tercer dNTP del orden (dTTP), se genera el pico por la incorporación de un dTTP y el exceso es degradado. Paso D: Se dispensa el cuarto dNTP del orden (dCTP), se genera un pico del doble de intensidad por la incorporación de dos dCTP y el exceso es degradado. Esto se repite para el resto de la secuencia.



una molécula de Pirofosfato (PPi), a partir de este y adenosilfosfosulfato (APS), en presencia de la enzima sulfirilasa se genera una molécula de ATP por cada base incorporada. Así la luminiscencia emitida por una reacción de la luciferasa acoplada, será proporcional al número de bases incorporadas. En la Figura 2.1 se esquematiza el método de pirosecuenciación. En el paso A: se dispensa el primer dNTP establecido en el orden (dGTP) y la Polimerasa cataliza su incorporación a la cadena. Este proceso se acompaña de la liberación de pirofosfato (PPi) en una cantidad que es equimolar con la cantidad de dNTP incorporado. Subsiguientemente, la ATP sulfurilasa convierte el PPi + APS en ATP y este produce la conversión de luciferina en oxiluciferina en presencia de la enzima luciferasa. Este proceso emite luz en cantidades proporcionales al dNTP incorporado, que es captado por el equipo y presentado en forma de un pico. El dGTP no incorporado y el exceso de ATP, es degradado por una apirasa, y el equipo queda preparado para el próximo paso.

### ***GHRc (F279Y)***

Para la determinación del genotipo del SNP ubicado en el exón VIII del gen GHRc, responsable de la sustitución F279Y, se utilizó la técnica de pirosecuenciación. Se amplificó un fragmento de 344pb por el método informado por Blott *et al.* (2003), en este caso el primer *forward* se biotiniló para adaptarlo a la técnica. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 µl conteniendo 25 a 50 ng de ADN, 1X PCR buffer (Invitrogen), 0,15 µM de cada primer (GHR F y GHR R, Tabla 2.3), 200 mM de cada dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,5 unidades de Taq polymerase (Invitrogen). Las condiciones empleadas fueron 45 ciclos de 94°C 45 s, 63°C 45 s y 72°C 45 s, con una extensión final de 10 min a 72°C. Las muestras se verificaron como se describió anteriormente para el gen Mb. Las cadenas biotiniladas se purificaron a partir 20 µl de los amplificados; para ello se mezclaron con 40 µl de Buffer de “binding” (Biotage AB, Uppsala, Sweden), 3 µl de perlas de sefarosa cubiertas con estreptoavidina (Streptavidin Sepharose™ High Performance, GE Healthcare, USA) y 17 µl de agua. La purificación se efectuó utilizando la plataforma de purificación PyroMark Prep Workstation (Biotage AB), mediante sucesivos lavados de 5 s con etanol 70%, NaOH 8mM y Washing Buffer Workstation (Biotage AB). Un primer interno de secuenciación (GHR-seq, Tabla 2.3), complementario a la cadena forward, se diseñó con el programa Pyrosequencing Primer

SNP Design 1.01 software (<http://www.pyrosequencing.com>). Las cadenas biotiniladas purificadas y lavadas se utilizaron como molde de la reacción de pirosecuenciación (Ronaghi *et al.*, 1998, 2001), en una mezcla de reacción que contenía 0,135  $\mu\text{M}$  del primer interno de secuenciación diluido en 45  $\mu\text{l}$  de Anealing Buffer (Biotage AB). La reacción se realizó en un PSQTM96 utilizando el Pyro Gold Reagent Kit (Biotage AB). Los resultados se interpretaron con el software PSQ (Biotage AB).

### ***GH (L217V)***

En el momento que se dispuso de la tecnología, se desarrollo una técnica de pirosecuenciación para el polimorfismo L217V del exón 5 del gen GH. Este método presentaba la ventaja de ser más exacto y permitía ser automatizado. Para la determinación del genotipo de cada individuo, se amplificó un fragmento de 253pb utilizando los primers GH6P11 y GH5 V2 R, que se biotiniló para ser utilizado en esta técnica. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25  $\mu\text{l}$  conteniendo 25 a 50 ng de ADN, 1X PCR buffer (Invitrogen), 0,15  $\mu\text{M}$  de cada primer (Tabla 2.3), 200 mM de cada dNTP, 2 mM  $\text{MgCl}_2$  y 0,5 unidades de Taq polymerase (Invitrogen). Las condiciones empleadas fueron 45 ciclos de 94°C 45 s, 63°C 45 s y 72°C 45 s, con una extensión final de 10 min a 72°C. Los pasos siguientes se realizaron del mismo modo que para GHRc pero con el primer interno de secuenciación GH5 V2-Int-1 (Tabla 2.3), complementario a la cadena reversa.

### **2.5.3 PCR-Microsatélites**

Tres de los genes elegidos se localizan en el BTA5: IGF1, Myf5 y Mb. Se tipificaron cuatro microsatélites cercanos a ellos, y con un posible grado de ligamiento: BP1 (posición: 14.382.552 pb) en las inmediaciones del gen Myf5, ETH10 (posición: 60.836.475 pb) e IGF1 (posición: 71.198.741 pb) cercanos al gen IGF1, y RM029 (posición: 80.417.234 pb) alrededor del gen Mb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview>). Para evaluar posibles efectos debidos al azar se seleccionó un quinto microsatélite, BM1824 (BTA1, 122cM), multi-alélico, en otro cromosoma y sin ligamiento conocido a algún gen estructural. La reacción de PCR se realizó en multiplex, en un volumen total de 12,5  $\mu\text{l}$  conteniendo 25 a 30 ng de ADN, 1X PCR buffer (Invitrogen), 200 mM de cada dNTP, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,04 U/ $\mu\text{l}$



Taq Platinum (Invitrogene<sup>TM</sup>) y las siguientes cantidades de los primers marcados con fluorescencia: 1,5 pmol ETH10, 2,5 pmol BM1824, 3 pmol FRM029, 6 pmol BP1y 10 pmol IGF1 (Tabla 2.3). Las condiciones empleadas fueron 2 min 94°C, 10 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 60°C, 30 s a 72°C, seguidos de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 58°C, 30 s a 72°C, y una extensión de 7 min a 72°C. Luego 3 µl de amplificado se utilizaron para verificar la amplificación como se describió anteriormente para el gen Mb. Los productos se corrieron en un secuenciador MegaBACE 1000 sequencer (GE healthcare) utilizando el DYE ET-ROX 550 (GE healthcare) como marcador de peso molecular. Los archivos crudos se analizaron con el programa Fragment Profiler (GE healthcare).

## 2.6 VARIABILIDAD GENÉTICA

Para el estudio de la variabilidad genética se utilizó el software GenePop 4.0 (Rousset 2008), con los algoritmos incluidos en el paquete se calculó: número de alelos, frecuencias génicas, heterocigocidad esperada para cada locus ( $h_e$ ), y todos los locus ( $H_e$ ). Adicionalmente, se utilizó el método de cadenas de Markov, incluido en el mismo paquete estadístico, para calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) estimado por el estadístico  $F_{IS}$ , y el desequilibrio de ligamiento.

En el caso de los genes de crecimiento, se realizó un estudio de variación de las frecuencias alélicas a lo largo del tiempo en el RodE, con el objetivo de evaluar el efecto de la selección sobre las frecuencias génicas de dichos genes. Para esto se dividieron los animales en tres grupos de contemporáneos: i) nacidos entre 1996 y 1999, ii) nacidos entre 2000 y 2003, y iii) nacidos entre 2004 y 2007. El intervalo de cuatro años corresponde al tiempo mínimo generacional, así un toro y su hijo no están sirviendo al rodeo al mismo tiempo, por lo tanto nos aseguramos que hijos y nietos de un mismo toro estén en grupos de contemporáneos diferentes. Las diferencias entre las frecuencias génicas de los tres grupos se contrastaron a través del Test Exacto incluido en el programa GenePop 4.0.

Dado que se cuenta con varios marcadores (microsatélites) en un mismo cromosoma (BTA5), se realizó un estudio de reconstrucción de fases en desequilibrio de ligamiento, en otras palabras se analizó la combinación de alelos presentes en cada uno de los dos cromosomas de un individuo dado. Para esto se utilizó el programa Phase v2.1.1 (Li y Stephens, 2003), que reconstruye esta información a partir de las posiciones

de los marcadores en el cromosoma y los genotipos para cada animal. La corrida se realizó con las opciones por defecto, y una vez obtenidas las posibles fases se aceptaron sólo aquellas en las que la probabilidad era mayor al 95%.

## **2.7 PEDIGRÍ E INFERENCIA DE GENOTIPOS**

Los dos rodeos estudiados (RodC y RodE) contaban con varias generaciones de registros genealógicos (pedigrí). En el caso del RodC la base contenía 1754 animales nacidos entre 1980 y 2007, mientras que la del RodE contenía 2474 animales nacidos entre 1960 y 2008. Utilizando la información de relaciones de parentesco, se han desarrollado programas que infieren genotipos en un árbol genealógico a partir de un núcleo de animales tipificados. Uno de ellos es el Genoprob 2.0 (Thallman *et al.*, 2001a, b), que se utilizó para inferir los genotipos de los microsatélites y de los genes GH y GHR, en los dos rodeos estudiados. Los animales muestreados y a los que se le determinó el genotipo se utilizaron como núcleo para inferir los genotipos de todos los animales incluidos en el pedigrí. Como parámetros de corrida (valores de probabilidad de cada meiosis y error) se utilizaron los establecidos por defecto en el programa, considerándose además penetrancia completa y ausencia de alelos nulos. Finalmente, se definieron 10 iteraciones para la corrida. Los resultados fueron procesados y se aceptó un genotipo para ser incluido en el análisis de asociación si su pGmax (probabilidad posterior de que el genotipo sea correcto) era superior a 0,95.

## **2.8 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN**

Para este estudio se incluyeron todos los animales que poseían datos genotípicos (por tipificación o por inferencia) y fenotípicos. Para todos los genes y todos los caracteres, el modelo de asociación fue similar y se utilizó el procedimiento GLM (General Lineal Model) del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, 1999).

### **2.8.1 Crecimiento**

En estos casos se realizaron análisis de asociación, independientes para cada locus, entre genotipos y BLUPs. Muchos estudios de asociación entre marcadores y variables cuantitativas se llevan a cabo utilizando los datos de campo, sin embargo en

algunos otros se utiliza BLUPs (Pereira *et al.*, 2005, Schulman *et al.*, 2008). En este sentido Miquel *et al.* (2009) plantea la ventaja de la utilización de BLUPs debido a que estos consideran las correlaciones existentes entre los diferentes caracteres.

Los dos rodeos utilizados en el análisis de asociación poseían información diferente, por un lado en el RodE se contaba con datos de PNd, PNm, PDd y PDm, mientras que en el RodC se contaba con valores de PNd, PDd, PDm, P400, P600 y AOB. Para los caracteres exclusivos de un solo rodeo se planteó un modelo lineal:

$$y_{ij} = \mu + GM_i + e_{ij}$$

donde  $y_{ij}$  es el BLUP del carácter  $i$  para el animal  $j$ ,  $GM_i$  es el efecto fijo del marcador y  $e_{ij}$  es el error. Para el caso de PNd, PDd y PDm se incluyeron en el análisis los dos rodeos aunque estos no presentaban puntos de contacto en su pedigrí, por lo cual hubo que incluir un efecto del rodeo en el modelo. Dependiendo del número de alelos que presentaba cada marcador se definieron dos modelos diferentes:

- i) Modelo para marcadores multialélicos (BM1824, ETH10 y BP1), la interacción entre rodeo (H) y el marcador (GM) no pudo ser estimada, por lo que se incluyó el efecto del marcador anidado en rodeo.

$$y_{ijk} = \mu + H_i + GM_{ij}(H_i) + e_{ijk}$$

- ii) Modelo para marcadores bialélicos (RM029, IGF1, GH y GHR), incluyó efectos fijos para H, GM y para la interacción H\*GM. En el caso del microsatélite BP1 se realizó un análisis con este modelo excluyendo los animales que presentaban el alelo 310 (presente solo en el RodC).

$$y_{ijk} = \mu + H_i + GM_{ij} + H_i * GM_{ij} + e_{ijk}$$

En un segundo paso, estos mismos modelos se utilizaron para el análisis de marcadores ubicados en el BTA5 en posiciones cercanas. Se realizó un análisis con los genotipos tomados de a pares para los marcadores ETH10-IGF1 e IGF1-RM029, y un

análisis con las fases obtenidas anteriormente para los marcadores IGF1-RM029. En todos los casos, para determinar la diferencia de las medias entre genotipos, pares de genotipos o fases, se utilizó el test de separación de medias de Bonferroni ( $P < 0,05$ ).

Finalmente, el efecto aditivo de cada alelo se estimó como la diferencia entre dos genotipos homocigota, mientras que el efecto de dominancia se obtuvo como un promedio de las diferencias entre los genotipos homocigota y el genotipo heterocigota.

### 2.8.2 Color de la carne

El análisis de asociación de marcadores con caracteres de color, se realizó a partir de los genotipos de las muestras obtenidas en el frigorífico con los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . Adicionalmente, a partir de los datos de  $a^*$  y  $b^*$ , se calcularon el ángulo Hunter (Hue) y la cromaticidad (Croma) que también fueron incluidos en el análisis:

$$Hue = \text{arcotangente} \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \quad Croma = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

Hue es una medida de la divergencia del eje rojo puro sobre espacio de color (Hunter y Harold, 1987), mientras Croma ha sido considerado como un buen parámetro para caracterizar los cambios de color, ya que este valor disminuye en la presencia de tonalidades marrones (Renner y Mazuel, 1985).

El modelo utilizado incluyó en todos los casos al pH como covariable, y la diferencia de las medias entre genotipos se determinó por el test de separación de medias de Bonferroni ( $P < 0,05$ ):

$$y_{ik} = \mu + GM_i + cov\ pH_i + e_{ik}$$

donde  $y_{ik}$  es el parámetro de color medidos o calculados  $i$  para el animal  $k$ ,  $GM_i$  el efecto del genotipo,  $cov\ pH_i$  es la covariable pH y  $e_{ik}$  el error.

Si bien el pH fue incluido como covariable en los modelos, podría llegar a estar influido de algún modo por estos genes. Por lo tanto, se evaluó esta posible asociación utilizando un modelo similar a los utilizados en los caracteres de crecimiento, con separación de medias de Bonferroni ( $P < 0,05$ ):

$$pH_{ik} = \mu + GM_i + e_{ik}$$

donde  $GM_i$  es el efecto del genotipo y  $e_{ik}$  el error.





# 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.

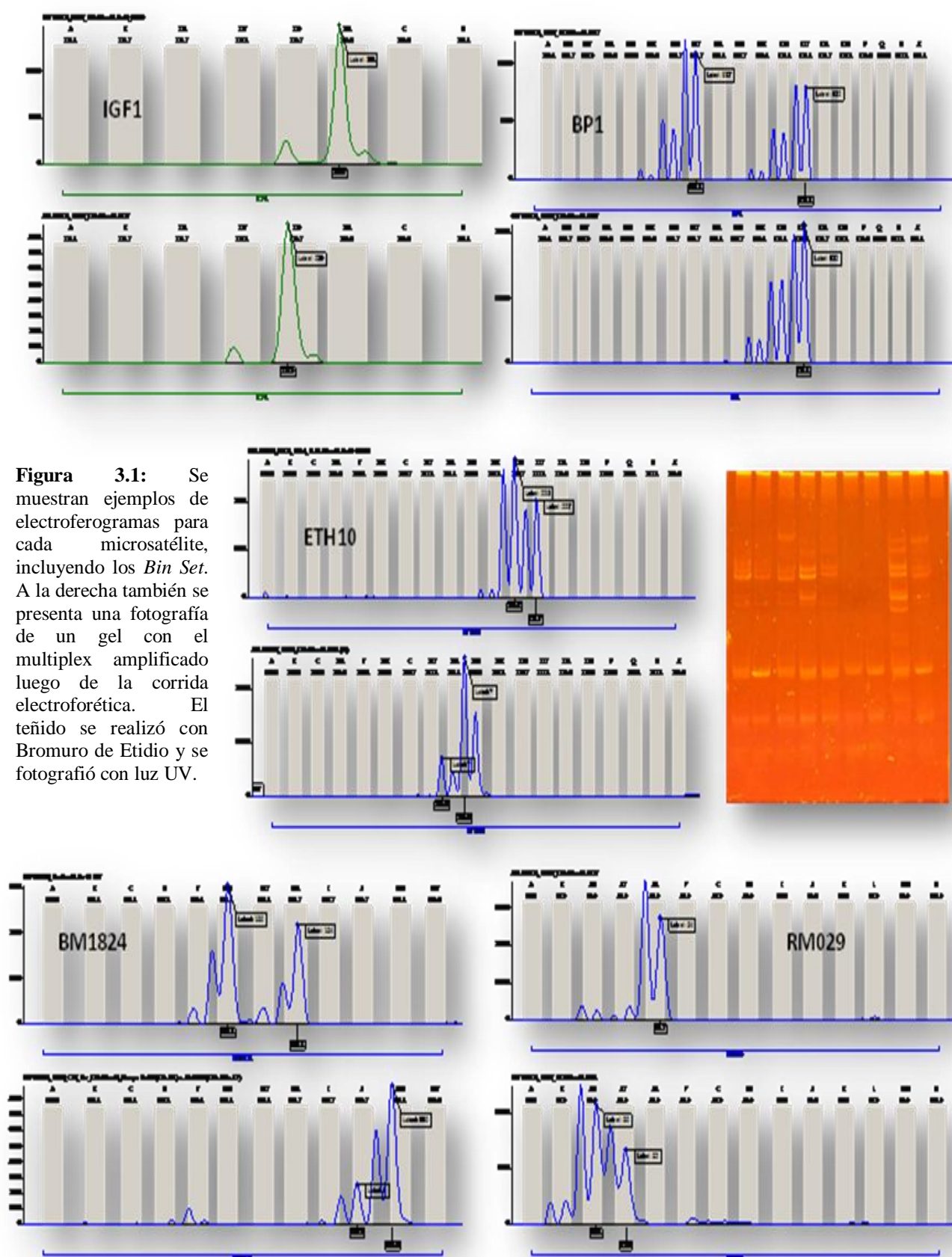
### ***3.1 ESTUDIO SOBRE MARCADORES DE GENES CANDIDATOS PARA CARACTERES DE CRECIMIENTO***

#### **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***

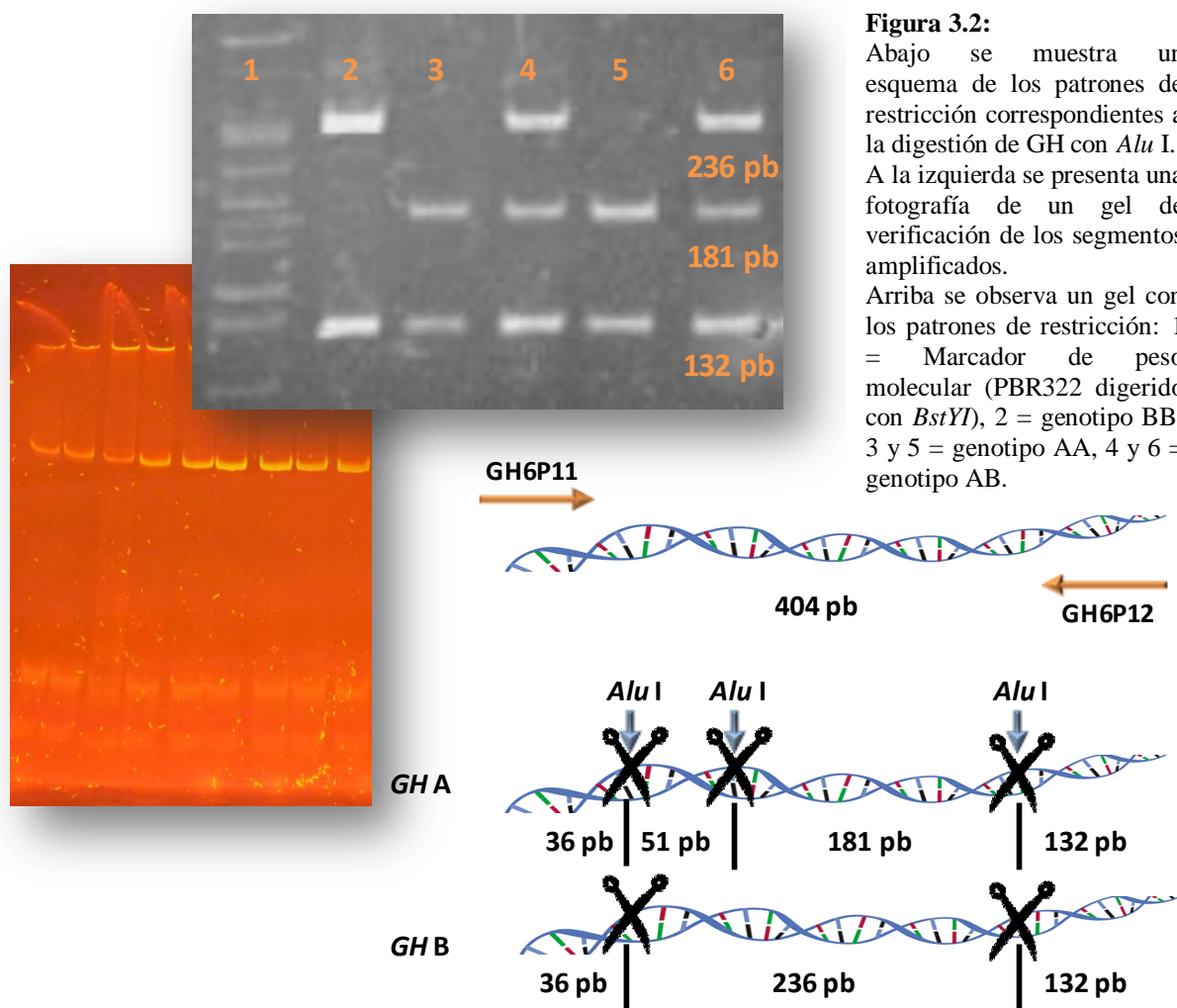
En el presente estudio se incluyeron 5 microsatélites: 4 de ellos pertenecían al cromosoma BTA5 (BP1, ETH10, IGF1 y RM029) y el restante, que se localiza en el cromosoma BTA1, que se utilizó como control (BM1824). En la Figura 3.1 se muestra la fotografía de un gel de poliacrilamida utilizado para verificar 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

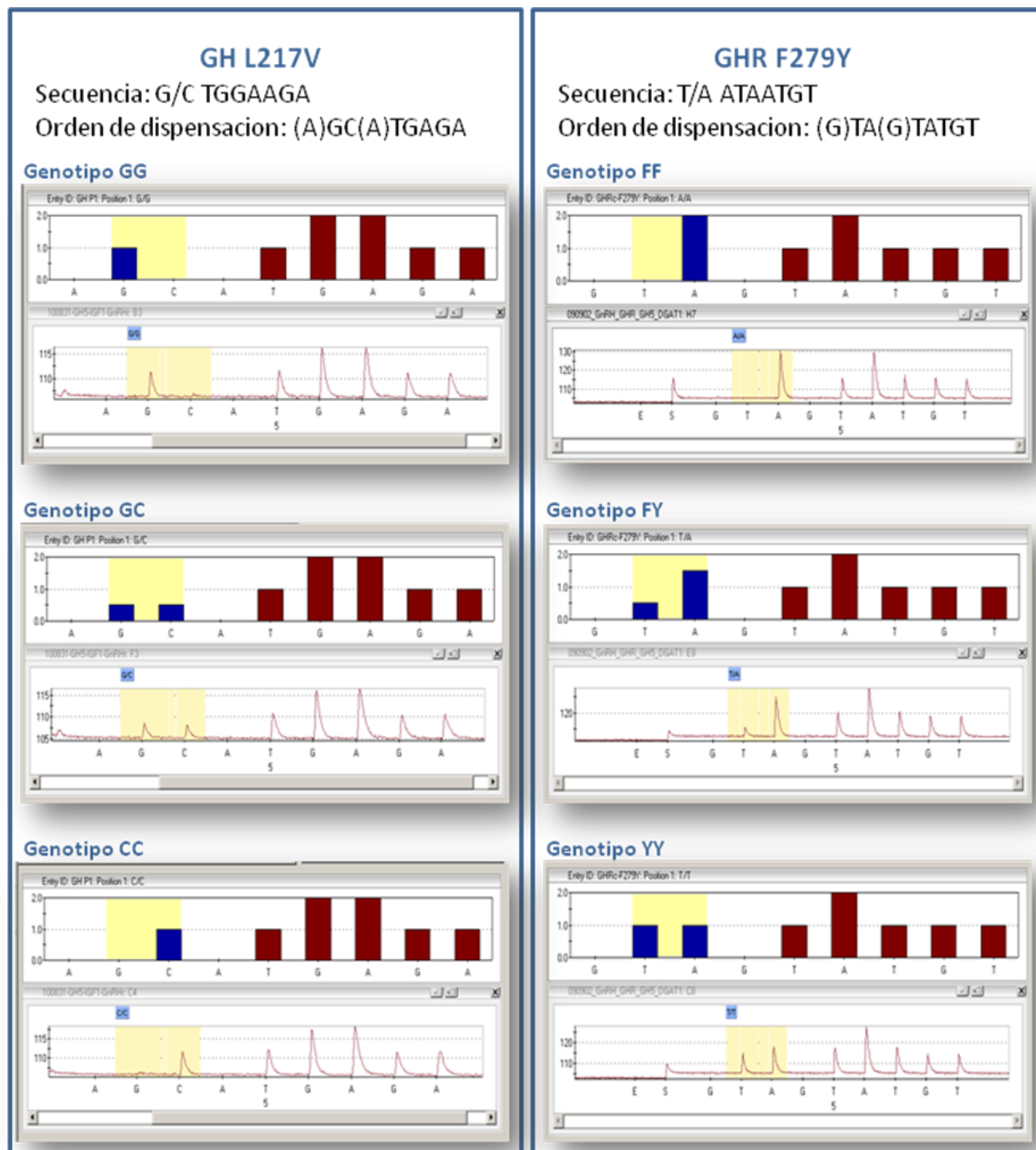
La determinación del genotipo del SNP L217V del exón 5 del gen GH se realizó mediante dos técnicas. La técnica de PCR-RFLP utilizada originalmente, fue luego reemplazada por la técnica de PCR-Pirosecuenciación debido a que esta última era más exacta y permitía ser automatizada. Independientemente de 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
<b>BM1824</b>	180	194	8
<b>BP1</b>	302	326	9
<b>ETH10</b>	210	226	8
<b>RM029</b>	78	102	5
<b>IGF1</b>	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			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)		
						GH				

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	<b>0,108</b> <b>(0,025)</b>	0,123 (0,663)	-0,126 (0,733)
BP1	0,712	0,675	0,597	0,419	0,565	0,529	<b>0,415</b> <b>(0,000)</b>	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	<b>0,278</b> <b>(0,000)</b>	<b>0,548</b> <b>(0,001)</b>	<b>0,491</b> <b>(0,003)</b>
IGF1	0,028	0,328	0,390	0,028	0,200	0,310	-	0,397 (0,128)	0,207 (0,338)
<b>PROMEDIO</b>	<b>0,539</b>	<b>0,564</b>	<b>0,568</b>	<b>0,431</b>	<b>0,480</b>	<b>0,510</b>			
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)
<b>PROMEDIO</b>	<b>0,250</b>	<b>0,074</b>	<b>0,417</b>	<b>0,262</b>	<b>0,077</b>	<b>0,356</b>			

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; Armstrong *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.

		Población de Referencia	Rodeo Comercial	Rodeo Experimental				
		N	17	91	1996-2007	1996-1999	2000-2003	2004-2007
		N	17	91	157	39	50	68
Locus	Alelo							
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.

N	Locus	Población de Referencia	Rodeo Comercial	Rodeo Experimental			
				1996-2007	1996-1999	2000-2003	2004-2007
		17	91	157	39	50	68
Heterocigosidad Esperada	BM1824	0,709	0,570	0,587	0,625	0,548	0,596
	BP1	0,677	0,473	0,500	0,499	0,500	0,456
	ETH10	0,748	0,664	0,702	0,623	0,725	0,713
	RM029	0,271	0,222	0,274	0,147	0,228	0,366
	IGF1	0,492	0,443	0,424	0,482	0,419	0,389
	Promedio	0,579	0,475	0,497	0,475	0,484	0,504
	Micros.						
	GHR	0,312	0,297	0,455	0,468	0,466	0,427
	GH	0,344	0,47	0,089	0,029	0,182	0,086
	Promedio SNPs	0,328	0,383	0,272	0,248	0,324	0,256
Heterocigosidad Observada	BM1824	0,571	0,644	0,568	0,571	0,413	0,677
	BP1	0,750	0,494	0,481	0,378	0,612	0,441
	ETH10	0,688	0,700	0,711	0,667	0,694	0,746
	RM029	0,000	0,046	0,091	0,000	0,140	0,106
	IGF1	0,462	0,563	0,483	0,611	0,543	0,369
	Promedio	0,494	0,489	0,467	0,446	0,481	0,468
	Micros.						
	GHR	0,364	0,337	0,445	0,5	0,488	0,357
	GH	0,417	0,573	0,093	0,029	0,2	0,054
	Promedio SNPs	0,39	0,455	0,269	0,264	0,344	0,205
HWE $F_{IS}$ W&C (P-val)	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)

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,

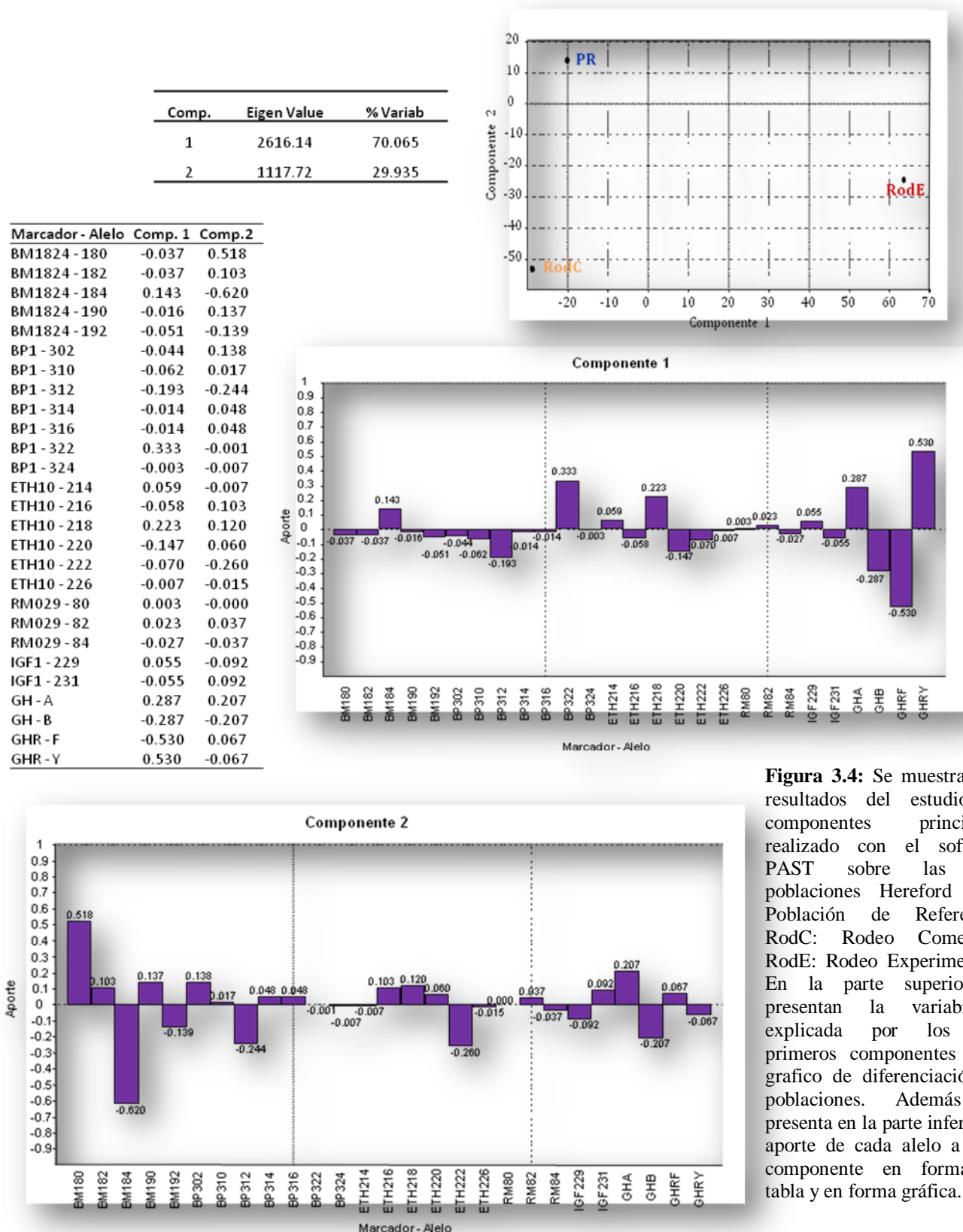
capacidad del individuo para crecer, sino también en el efecto genético materno, capacidad de la madre para criar al ternero. En un estudio realizado por Melucci *et al.*, (2009) sobre el RodE, demostraron el efecto de la selección sobre los BLUPs para peso al destete directo y materno, y encontraron 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

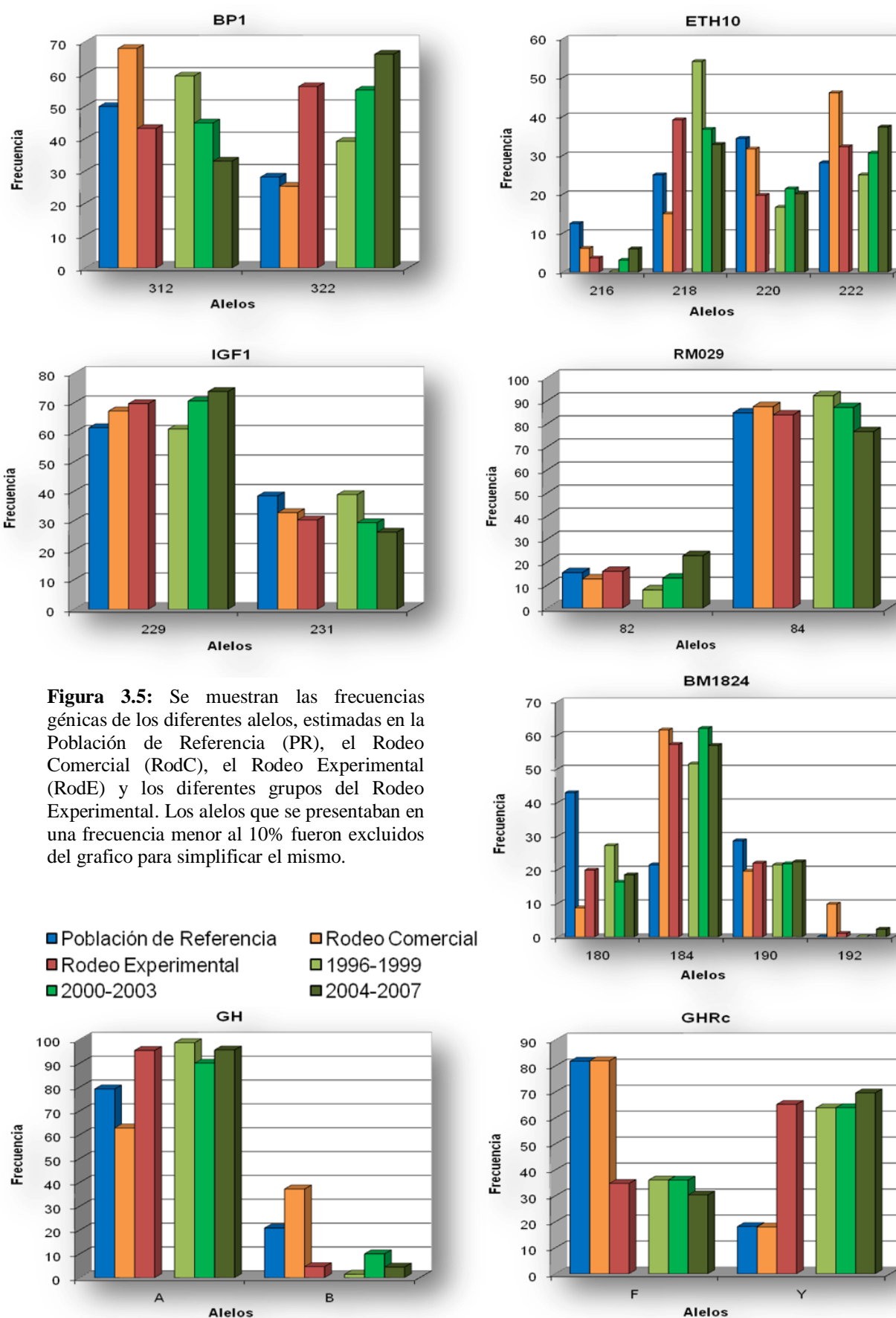


**Figura 3.4:** Se muestran los resultados del estudio de componentes principales realizado con el software PAST sobre las tres poblaciones Hereford (PR: Población de Referencia, RodC: Rodeo Comercial, RodE: Rodeo Experimental). En la parte superior se presentan la variabilidad explicada por los dos 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.





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.

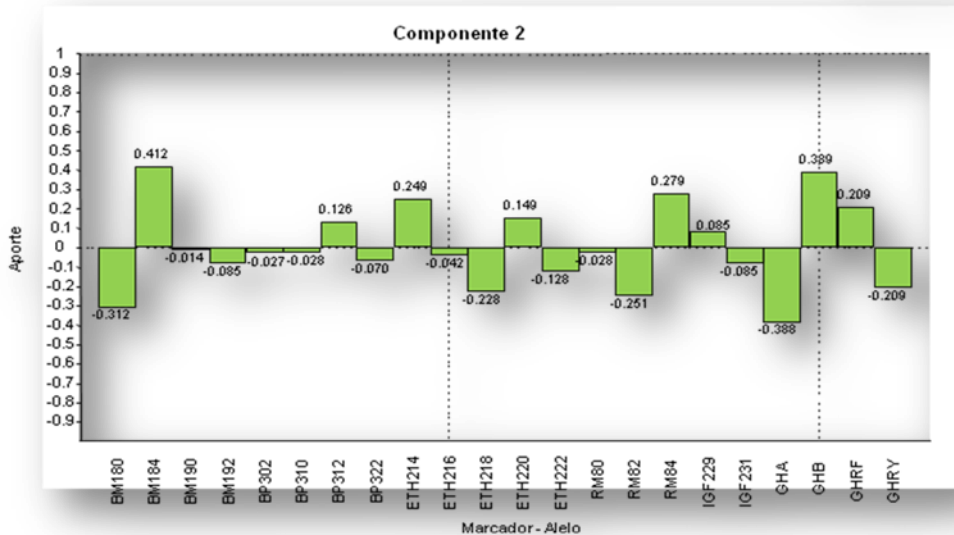
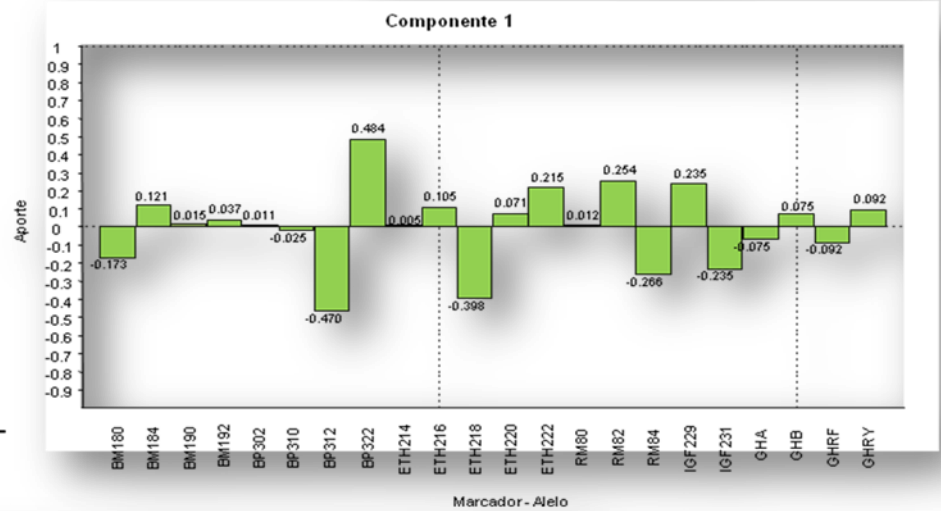
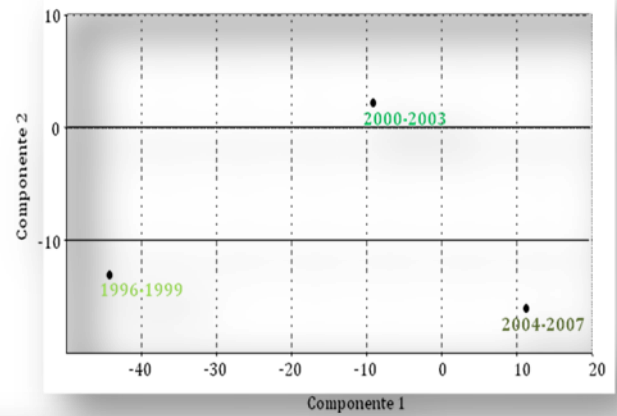
Grupo	Locus / P-Val						
	BM1824	BP1	ETH10	RM029	IGF1	GH	GHRc
1996-1999 vs 2000-2003	0,223	<b>0,051</b>	0,106	0,333	0,247	<b>0,042</b>	1,000
2000-2003 vs 2004-2007	0,386	<b>0,095</b>	0,410	<b>0,070</b>	0,646	0,167	0,451
1996-1999 vs 2004-2007	0,263	<b>0,000</b>	<b>0,007</b>	<b>0,007</b>	<b>0,079</b>	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  $H_o$  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 $\pm$ DE	Máximo	Mínimo
RodE	PNd (Kg)	-1,7 $\pm$ 1,9	4	-7,4
	PDd (Kg)	6,3 $\pm$ 4,7	18,4	-12,2
	PDm (Kg)	3,0 $\pm$ 2,2	8,7	-5
RodC	PNd (Kg)	1,7 $\pm$ 0,9	3,6	-1
	PDd (Kg)	3,2 $\pm$ 2,9	11	-4
	PDm (Kg)	13,3 $\pm$ 5,6	24	1
	400W (Kg)	22,3 $\pm$ 7	37	9
	600W (Kg)	29,7 $\pm$ 10,2	52	5
	REA (cm <sup>2</sup> )	0,93 $\pm$ 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 <sup>2</sup> )**
RodC	310/312 (5)	9,6 ± 5,2 <sup>A,B,C,D</sup>	3,0 ± 4,1	20,20 ± 9,42 <sup>a</sup>	25,40 ± 11,52 <sup>A</sup>	-0,25 ± 1,42 <sup>A,B</sup>
	310/322 (2)	18,0 ± 4,2 <sup>A</sup>	4,0 ± 1,4	30,50 ± 6,36 <sup>a,b</sup>	42,50 ± 13,44 <sup>A,B</sup>	0,90 ± 0,57
	312/312 (49)	13,4 ± 5,5 <sup>B,E</sup>	2,9 ± 2,5 <sup>a</sup>	20,73 ± 6,49 <sup>b,D</sup>	28,37 ± 9,61 <sup>B,C</sup>	1,26 ± 0,94 <sup>A</sup>
	312/322 (36)	15,1 ± 5,8 <sup>C,E</sup>	4,1 ± 3,4	24,29 ± 7,12 <sup>D</sup>	32,86 ± 9,80 <sup>C</sup>	0,91 ± 0,77 <sup>B</sup>
	322/322 (3)	16,3 ± 4,2 <sup>D</sup>	7,7 ± 2,9 <sup>a</sup>	25,67 ± 7,37	31,67 ± 5,69	0,83 ± 0,40
RodE	312/312 (29)	1,9 ± 2,7 <sup>F</sup>	2,9 ± 6,6 <sup>B</sup>	-	-	-
	312/322 (114)	2,8 ± 1,9 <sup>F</sup>	5,9 ± 4,7 <sup>B</sup>	-	-	-
	322/322 (80)	3,8 ± 1,9 <sup>F</sup>	8,3 ± 4,0 <sup>B</sup>	-	-	-
	Genotipo (N)	PDd (Kg)**	PDm (Kg)***			
Ambos Rodeos	312/312 (78)	7,7 ± 0,4 <sup>A,b</sup>	2,9 ± 0,5 <sup>A,B</sup>			
	312/322 (150)	9,0 ± 0,3 <sup>A</sup>	5,0 ± 0,4 <sup>A,c</sup>			
	322/322 (83)	10,0 ± 1,0 <sup>b</sup>	8,0 ± 1,3 <sup>B,c</sup>			

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.

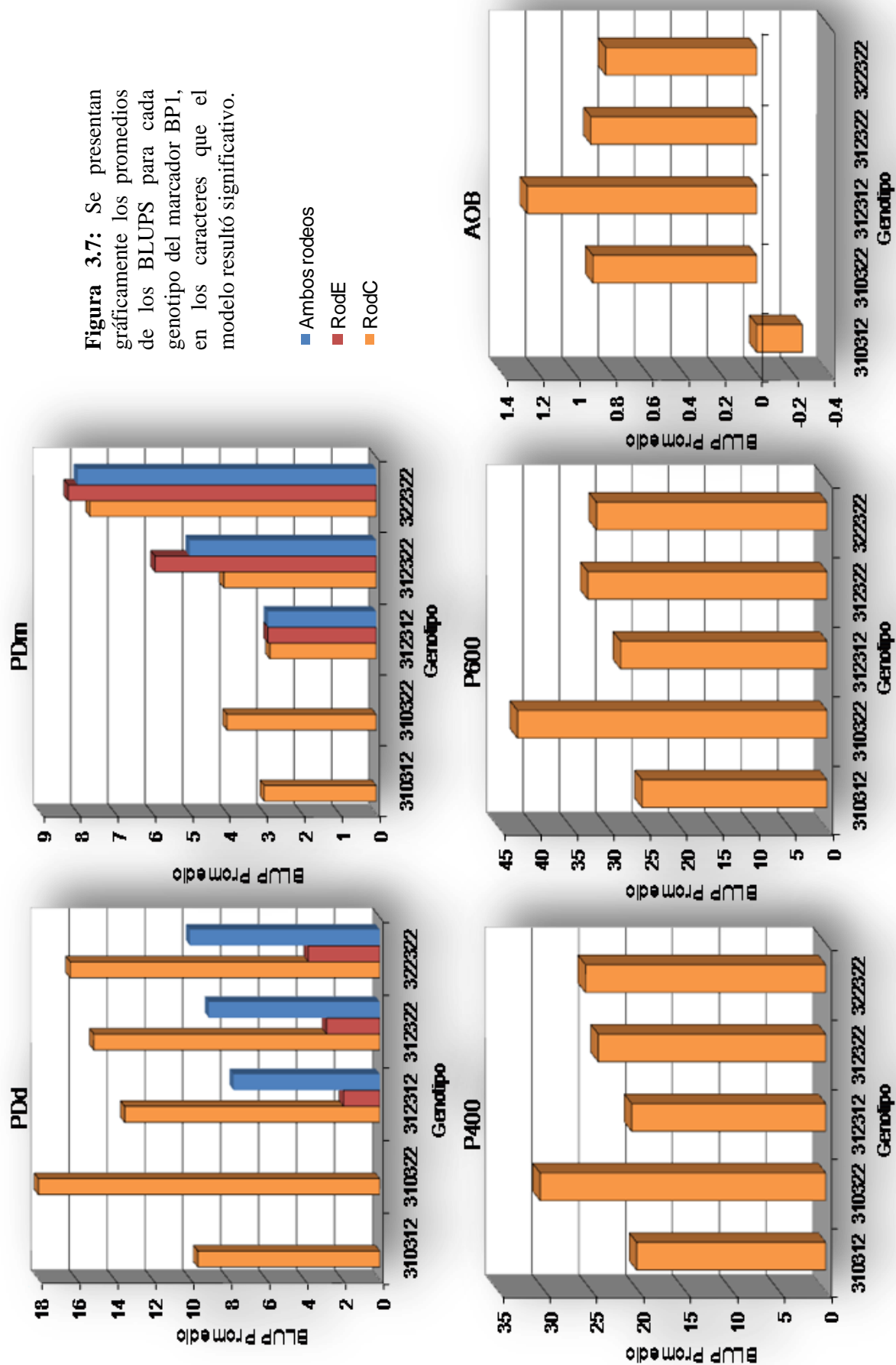
Caracter	Efecto aditivo	Dominancia
PDd (Kg)	2,37 ± 1,08*	0,08 ± 0,63 NS
PDm (Kg)	5,06 ± 1,38**	-0,42 ± 0,81 NS

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 ( $r_G = 0,37$ ). 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 BPL1, 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](http://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

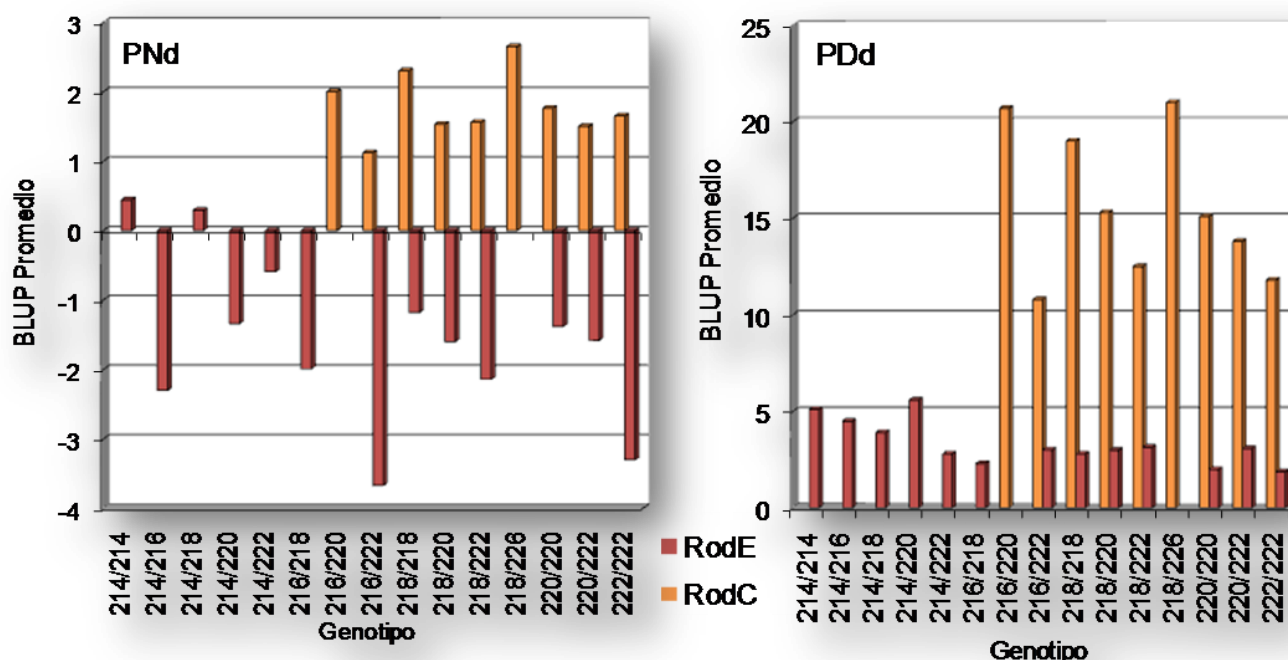
**Tabla 3.11:** Se presentan los resultados significativos en el análisis de asociación para los marcadores IGF1, RM029 y ETH10.

IGF1		PNd (Kg)**	PDd (Kg)**	P600 (Kg)**
RodC	229/229 (38)	1,70 ± 0,28	14,76 ± 5,06 <sup>A</sup>	32,4 ± 9,1 <sup>a,B</sup>
	229/231 (42)	1,43 ± 0,26	13,05 ± 5,88	28,6 ± 10,4 <sup>a,D</sup>
	231/231 (3)	2,60 ± 0,98	20,67 ± 2,52 <sup>A</sup>	44,0 ± 6,9 <sup>B,D</sup>
RodE	229/229 (76)	-2,33 ± 0,20 <sup>A,B</sup>	3,16 ± 1,74	-
	229/231 (86)	-1,43 ± 0,18 <sup>A</sup>	2,81 ± 2,21	-
	231/231 (39)	-1,29 ± 0,27 <sup>B</sup>	1,59 ± 2,72	-
RM029		PDd (Kg)**	P600 (Kg)*	
RodC	82/82 (9)	16,78 ± 1,22 <sup>A</sup>	36,0 ± 3,5 <sup>A</sup>	
	82/84 (12)	14,17 ± 1,05	32,3 ± 3,0	
	84/84 (105)	12,62 ± 0,36 <sup>A</sup>	28,5 ± 1,0 <sup>A</sup>	
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 <sup>A,b,C</sup>	
	216/222 (5)	1,12 ± 0,73	10,8 ± 1,6 <sup>A</sup>	
	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 <sup>b</sup>	
	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 <sup>c</sup>	
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 <sup>A,B</sup>	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 <sup>B</sup>	3,0 ± 1,5	
	218/218 (23)	-1,18 ± 0,34 <sup>c</sup>	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 <sup>A,c</sup>	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  $P < 0.05$ .

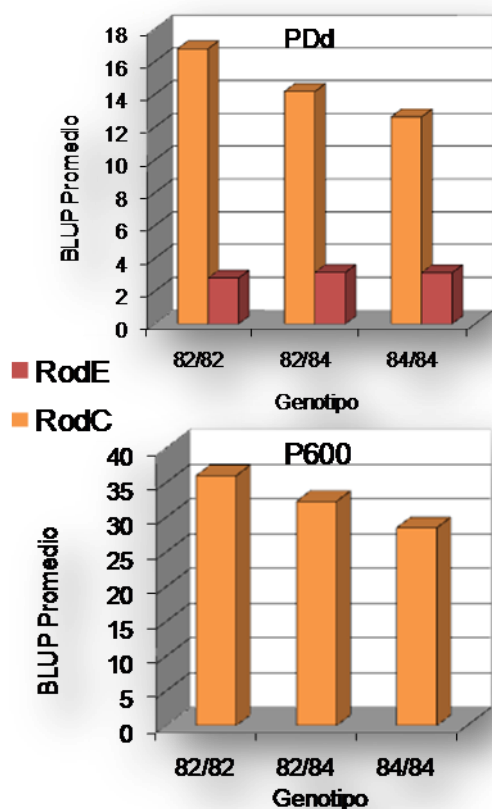
( $P < 0,05$  y  $P < 0,01$ ), sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió con el marcador BP1, no se observó asociación alguna con el PDm. Para el resto de los marcadores, se observaron asociaciones del ETH10 e IGF1 con PNd ( $P < 0,05$ ), y del IGF1 y RM029 con P600 ( $P < 0,05$  y  $P < 0,1$ , respectivamente).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

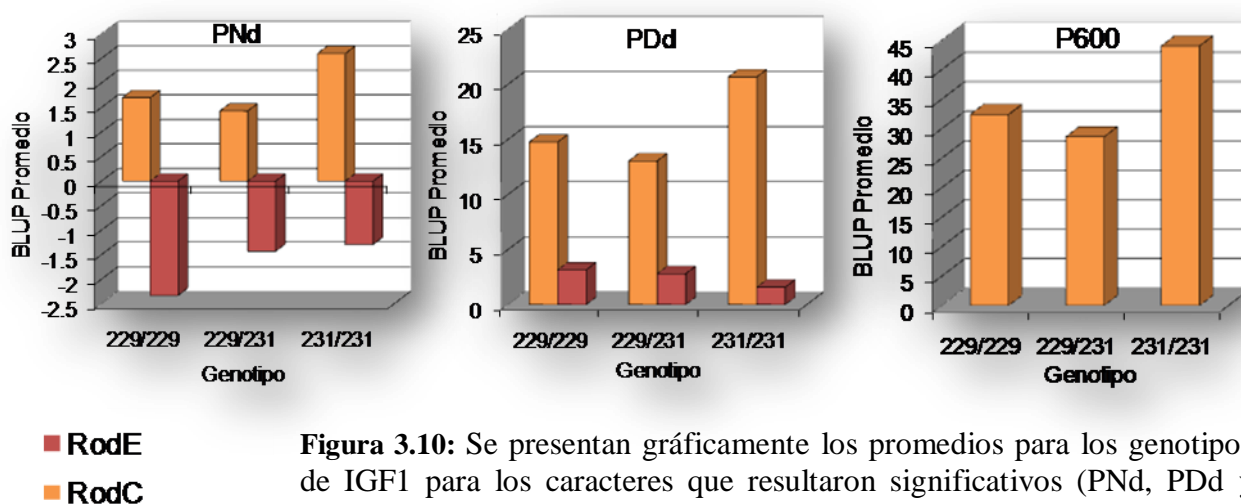
significativas se detectaron en el RodC, los efectos comparativos entre genotipos son diferentes en cada rodeo (Tabla 3.11 y Figura 3.9). No obstante, en ambos caracteres para el RodC, se observó un efecto significativamente positivo ( $P < 0,05$ ) del genotipo 82/82 respecto del 84/84, dando en promedio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

**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 <sup>A</sup>
	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 <sup>A</sup>
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 <sup>A</sup>	3 ± 0,4
	84/84 - 229/231 (64)	-1,1 ± 0,2 <sup>A</sup>	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:  $P < 0,05$ .

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 3.13:** 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)**
RodC	216/220 - 229/229 (2)	2,2 ± 1,1	21 ± 2,4 <sup>a,b,c</sup>	30,0 ± 4,2 <sup>A,B,C</sup>	43,5 ± 0,7 <sup>a,B,C,d,E</sup>
	216/222 - 229/231 (4)	1,3 ± 0,8	9,5 ± 1,7 <sup>a,d</sup>	21,3 ± 3,2	27,7 ± 7,4 <sup>a</sup>
	218/220 - 229/229 (5)	1,6 ± 0,7	16 ± 1,5	26,0 ± 10,3 <sup>D,E,F</sup>	34,6 ± 15,3 <sup>F,G,H</sup>
	218/222 - 229/229 (9)	1,8 ± 0,5	14 ± 1,2	24,9 ± 5,5 <sup>G,H,I</sup>	33,1 ± 7,6 <sup>I,J,K</sup>
	218/222 - 229/231 (8)	1,2 ± 0,5	11,3 ± 1,2	17,5 ± 8,1 <sup>A,D,G,J,K</sup>	22,9 ± 1,1 <sup>B,F,I,L,M,N,o</sup>
	218/226 - 229/229 (2)	2,6 ± 1,1	21 ± 2,4 <sup>d,e,F</sup>	25,5 ± 0,7	40,0 ± 0,0 <sup>L,P,Q</sup>
	220/220 - 229/231 (7)	1,7 ± 0,6	15,1 ± 1,3	26,3 ± 8,0 <sup>J,L,M</sup>	33,7 ± 10,0 <sup>M,R,S</sup>
	220/222 - 229/229 (8)	1,2 ± 0,5	10,5 ± 1,2 <sup>b,e</sup>	17,0 ± 3,5 <sup>B,E,H,L,N,o</sup>	23,3 ± 5,5 <sup>C,G,J,P,R,u</sup>
	220/222 - 229/231 (15)	1,4 ± 0,4	15 ± 0,8	24,4 ± 7,8 <sup>K,N,P</sup>	31,5 ± 0,5 <sup>d,N,v</sup>
	222/222 - 229/229 (2)	-	-	26,5 ± 6,4 <sup>o</sup>	37,0 ± 2,8 <sup>o,u,w</sup>
	222/222 - 229/231 (7)	1,3 ± 0,6	9,7 ± 1,3 <sup>C,F</sup>	17,4 ± 6,8 <sup>C,F,I,M,P</sup>	23,1 ± 8,9 <sup>E,H,K,Q,S,v,w</sup>
RodE	214/216 - 229/231 (2)	-2,2 ± 1,1	4,4 ± 2,4	-	-
	214/218 - 229/231 (5)	0,2 ± 0,7 <sup>a,B</sup>	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 <sup>a,C</sup>	2 ± 2,4	-	-
	218/218 - 229/229 (5)	-1 ± 0,7	3,9 ± 1,5	-	-
	218/218 - 229/231 (13)	-1,1 ± 0,4 <sup>D</sup>	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 <sup>E</sup>	2,5 ± 0,9	-	-
	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 <sup>C,F</sup>	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 <sup>B,D,E,F</sup>	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](http://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.

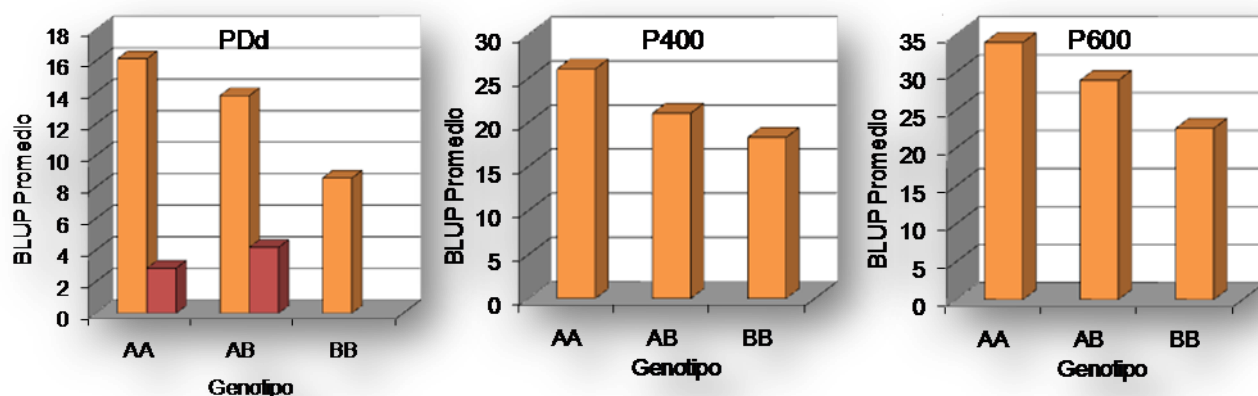
	Genotipo (N)	PDd (Kg)***	P400 (Kg)***	P600 (Kg)**
RodC	AA (21)	16,1 ± 0,8 <sup>A</sup>	26,0 ± 1,4 <sup>A,B</sup>	33,9 ± 2,1 <sup>A</sup>
	AB (46)	13,8 ± 0,5 <sup>B</sup>	21,0 ± 0,9 <sup>A</sup>	28,9 ± 1,4
	BB (7)	8,6 ± 1,4 <sup>A,B</sup>	18,2 ± 2,5 <sup>B</sup>	22,5 ± 3,6 <sup>A</sup>
RodE	AA (130)	2,85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

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:  $P < 0,05$ .

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

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

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  
■ RodC

**Figura 3.11:** Se presentan gráficamente los promedios para los genotipos de 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 cruza 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 Stasio *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.

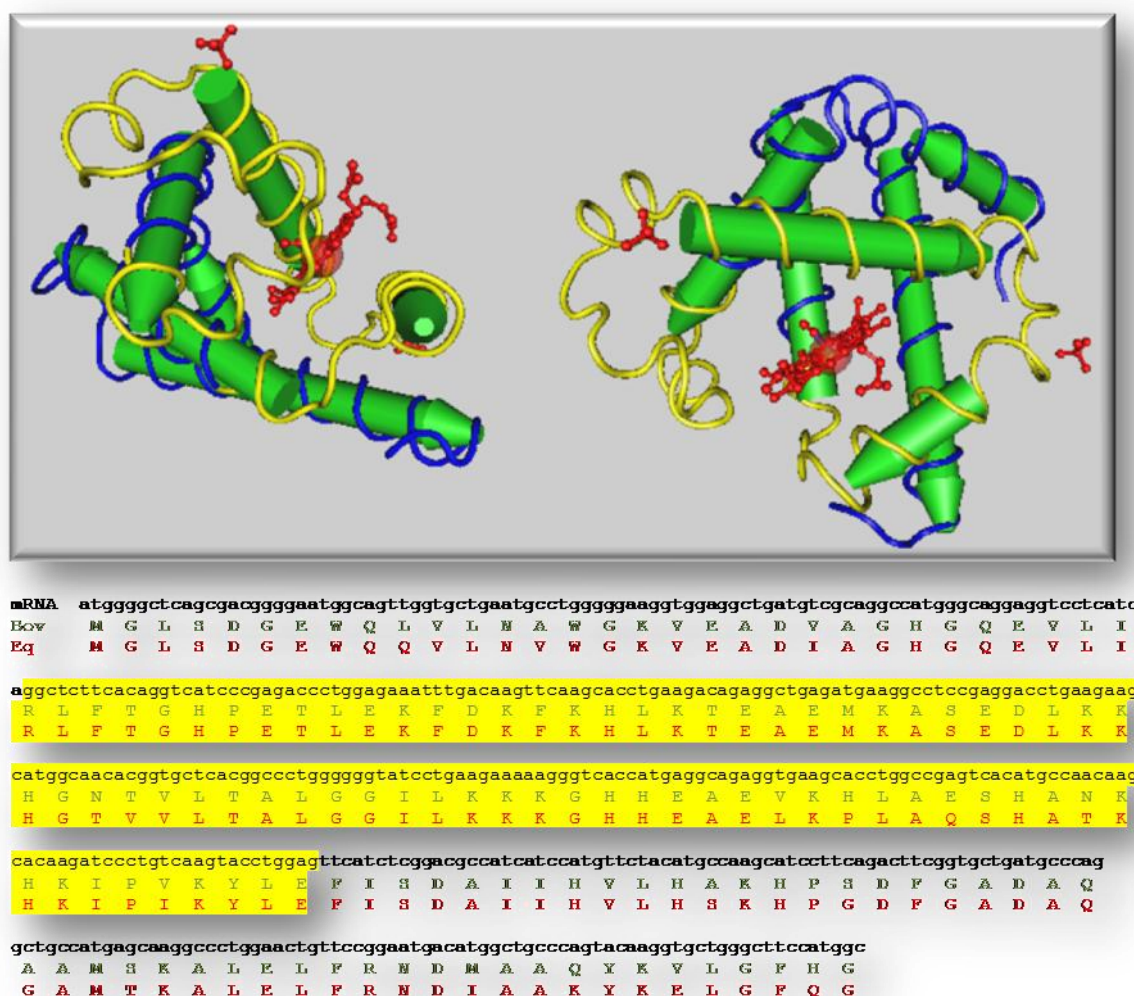
## ***3.2 ESTUDIO SOBRE MARCADORES CANDIDATOS CARACTERES DE COLOR DE CARNE***

### **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<sub>64</sub>) que se ubica en la 5ta posición del grupo Hemo, como de la distal (H<sub>93</sub>), muy cercana a la 6ta posición.



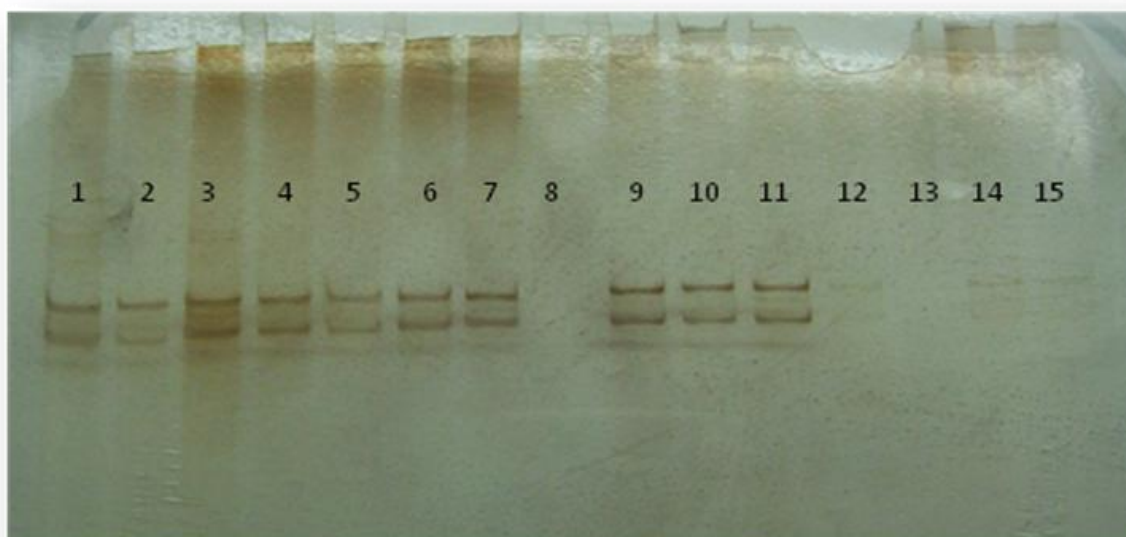
**Figura 3.16:** En el panel superior dos vistas de la Mb equina obtenidas con el software Cn3D. El grupo hemo y las moléculas de solvente aparecen en rojo, la cadena se presenta como una cinta (azul y amarillo), con las hélices  $\alpha$  representadas por flechas (verdes). En el panel inferior, secuencias ARNm bovino de la Mb, su traducción a la proteína bovina y su homóloga equina. En todos los casos 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 Brahman 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

**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
Brhman		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

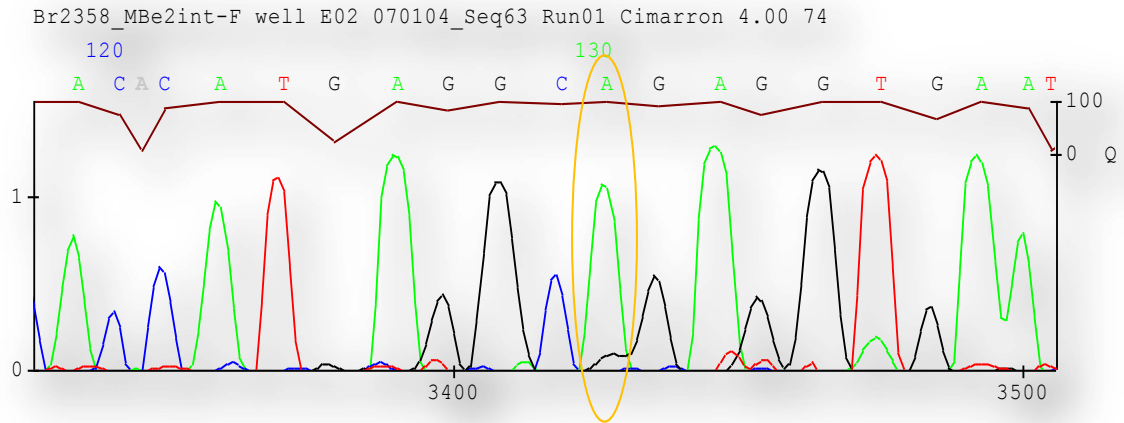
Brahman (*B. indicus*). Así mismo, la baja variabilidad encontrada podría estar relacionada a la elevada similitud de secuencia observada para esta proteína entre diferentes grupos de animales. En el Anexo 3 se presentan los alineamientos (realizado con BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) de 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

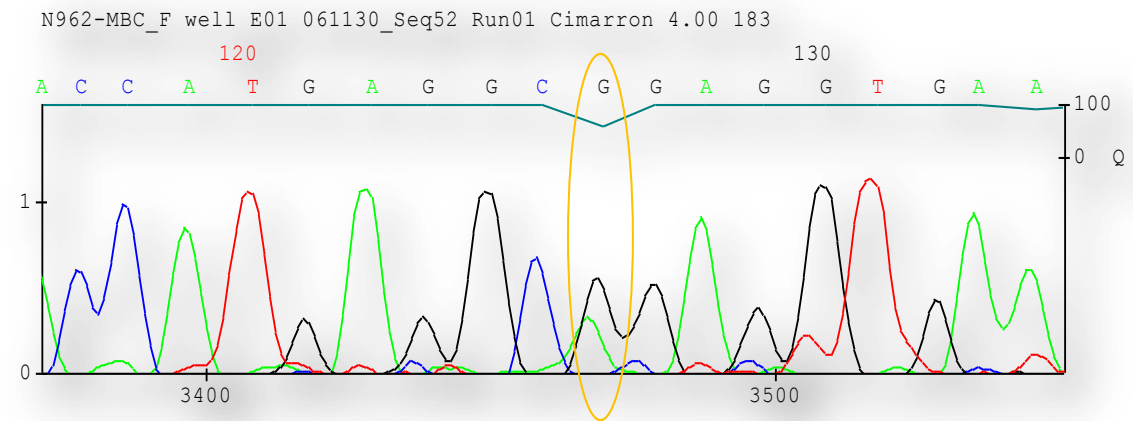


perdió, o que tanto en ovinos como en *B. indicus* la mutación haya sido *de novo* hecho que se sostendría en la base de ser una mutación sinónima.

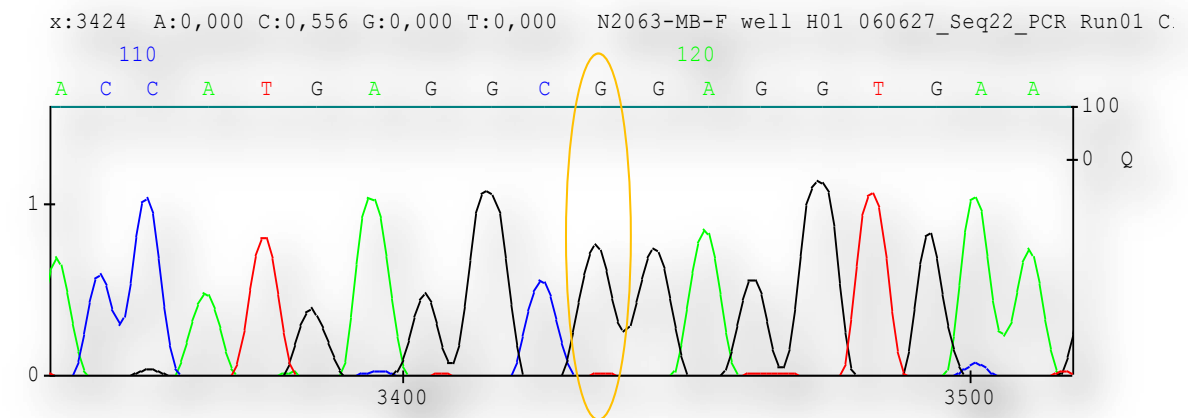
### Genotipo AA



### Genotipo AG



### Genotipo GG

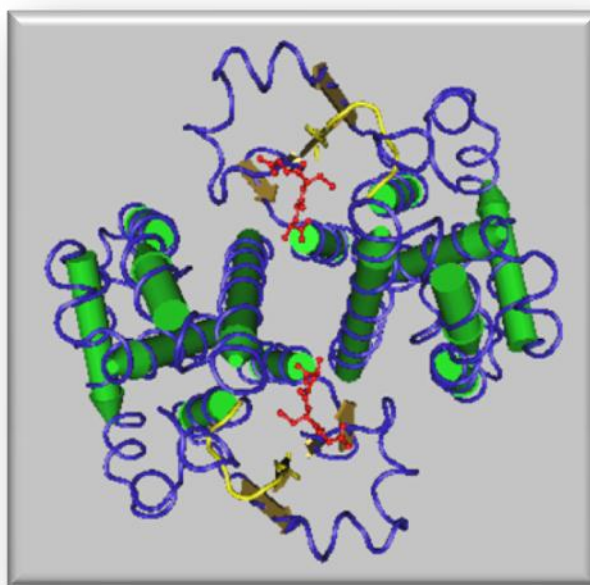


**Figura 3.18:** electroferogramas de la secuenciación de los tres genotipos del gen Mb: AA, AG y GG, obtenidos con el secuenciador MegaBACE 1000 y analizados con el Sequence Analyser (GE Healthcare).

***Glutation 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 Glutación (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 Glutación. 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 cruce 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 glutatión aparece en rojo, la cadena se presenta como una cinta (azul y amarillo), con las hélices  $\alpha$  (verdes) y las hojas  $\beta$  (beige) representadas por flechas.

```

atgacctccctacaccatgctctacttcccggttcaaggggcgctgcgagggccatgcgcattgctgctggccgaccagggccagagctggaaggaggaggtc
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

gtagccatgcagagctggctgcagggccactcaaggcctcctgctgtacgggcagctccccaagttccaggacggagacctcacgctgtaccagtcc
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

aatgccatcctgcggcacctgggcccgcaccctcgggctgtatgggaaggaccagcaggaggcgccctggtggacatggtgaatgacgggtgtagaggac
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

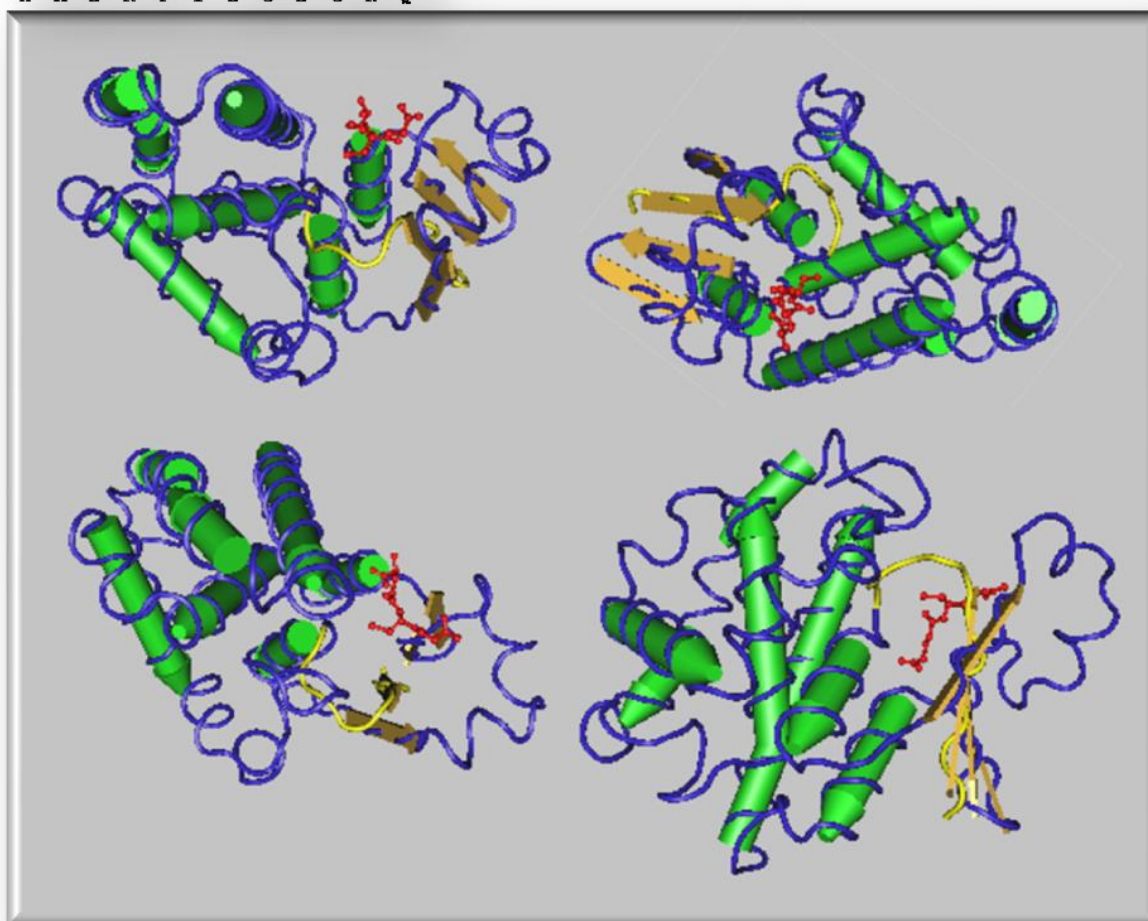
cttcgctgcaaatacgtctccctcatttacaccaaactacgaggcaggcaaggaggactatgtgaaggcgctgccccagcacctgaagcctttcgagacc
L R C K Y V S L I Y T N Y E A G K E D Y V K A L P Q H L K P F E T

ctgctgtcccagaaacagggtggccaggccttcctcgtgggcgaccagatctcctttgcggactacaacctgctggacctgcttcggattcaccaggtc
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

ctggccccagctgtctggactccttccccctgctctcagcctacgtggcccgctcctaactcccgcccgaagctcaaggccttctggcctccccggag
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

```



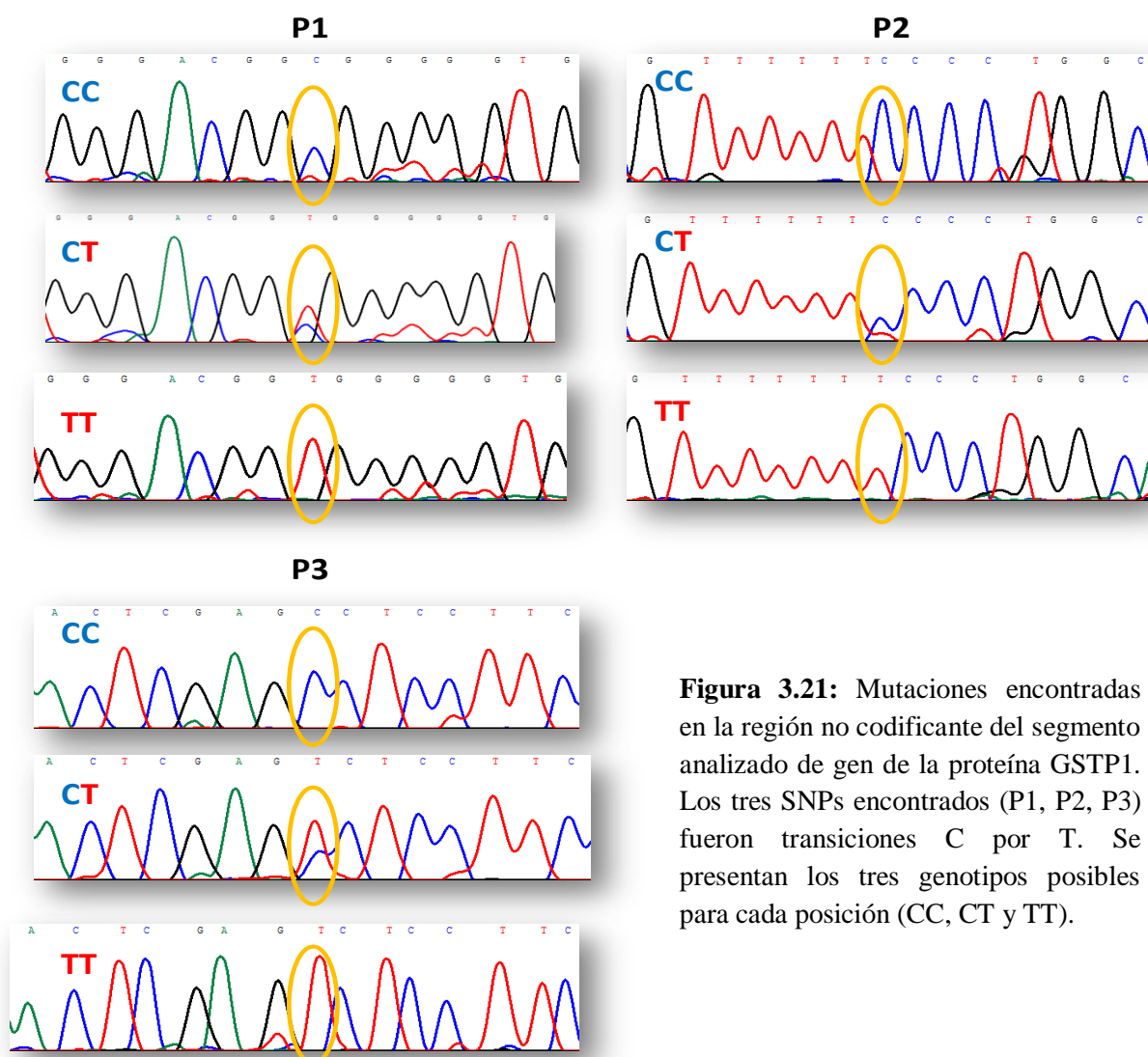
**Figura 3.20:** Arriba, secuencia ARNm bovino de la GSTP1 y su traducción a la proteína bovina. Abajo estructura 3D de un monómero de la proteína GSTP1, obtenida con el software Cn3D. El glutatión aparece en rojo, la cadena se presenta como una cinta (azul y amarillo), con las hélices  $\alpha$  (verdes) y las hojas  $\beta$  (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 $\pm$ DE	Máximo	Mínimo
$L^*$	$35,98 \pm 1,71$	39,36	31,59
$a^*$	$22,78 \pm 1,82$	26,27	16,3
$b^*$	$12,01 \pm 1,40$	14,97	7,72
Hue	$0,484 \pm 0,023$	0,527	0,406
Croma	$25,76 \pm 2,23$	30,00	18,12
pH	$5,52 \pm 0,06$	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

**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						

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.

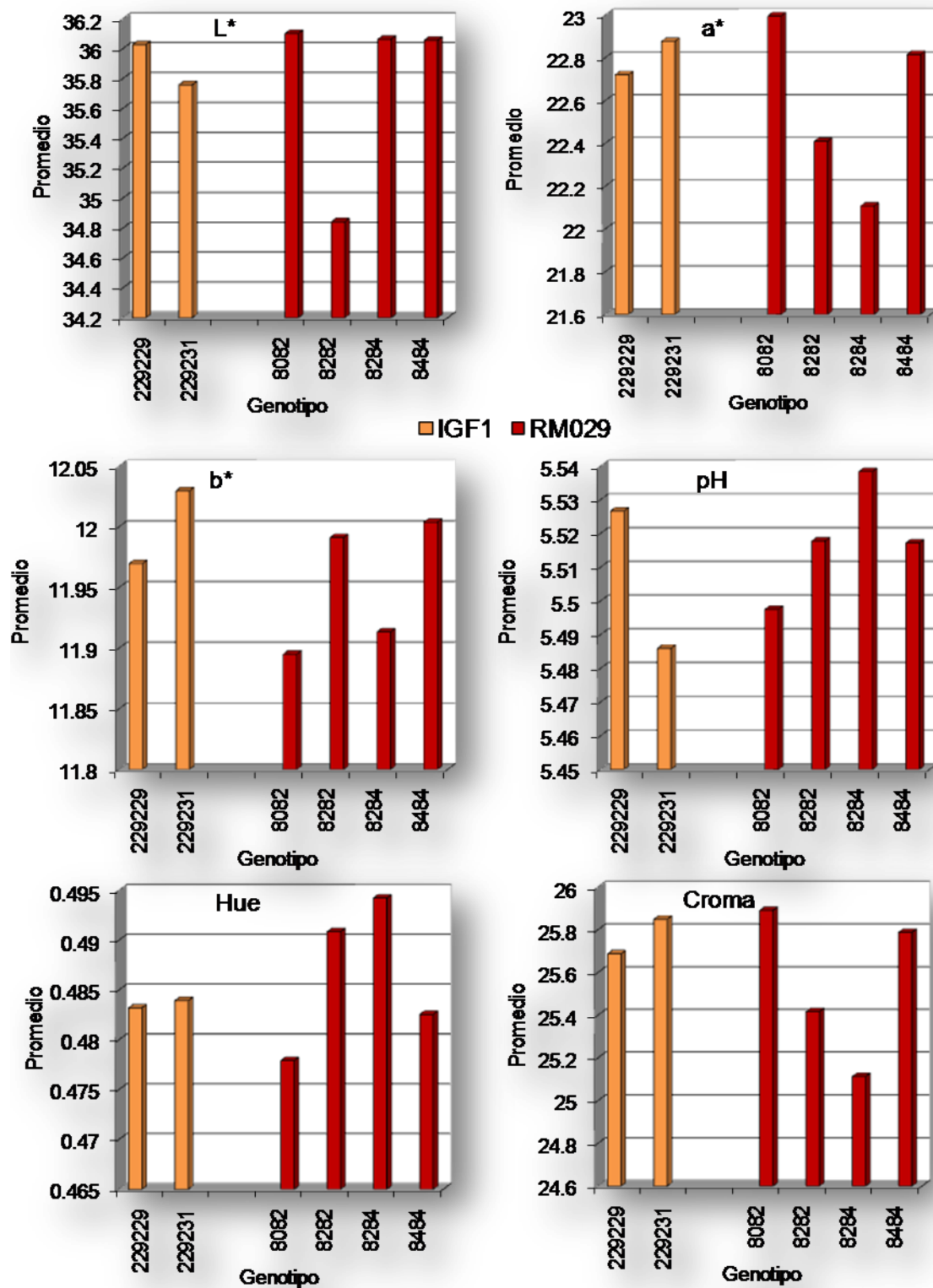
Por su parte, los análisis de asociación no presentaron ninguna significancia para los marcadores del BTA5, sin embargo el efecto de la covariable pH fue significativa en casi todos los casos. Independientemente de esto se testeó la posible influencia de los

**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 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

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



**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

presentan en la Tabla 3.22.

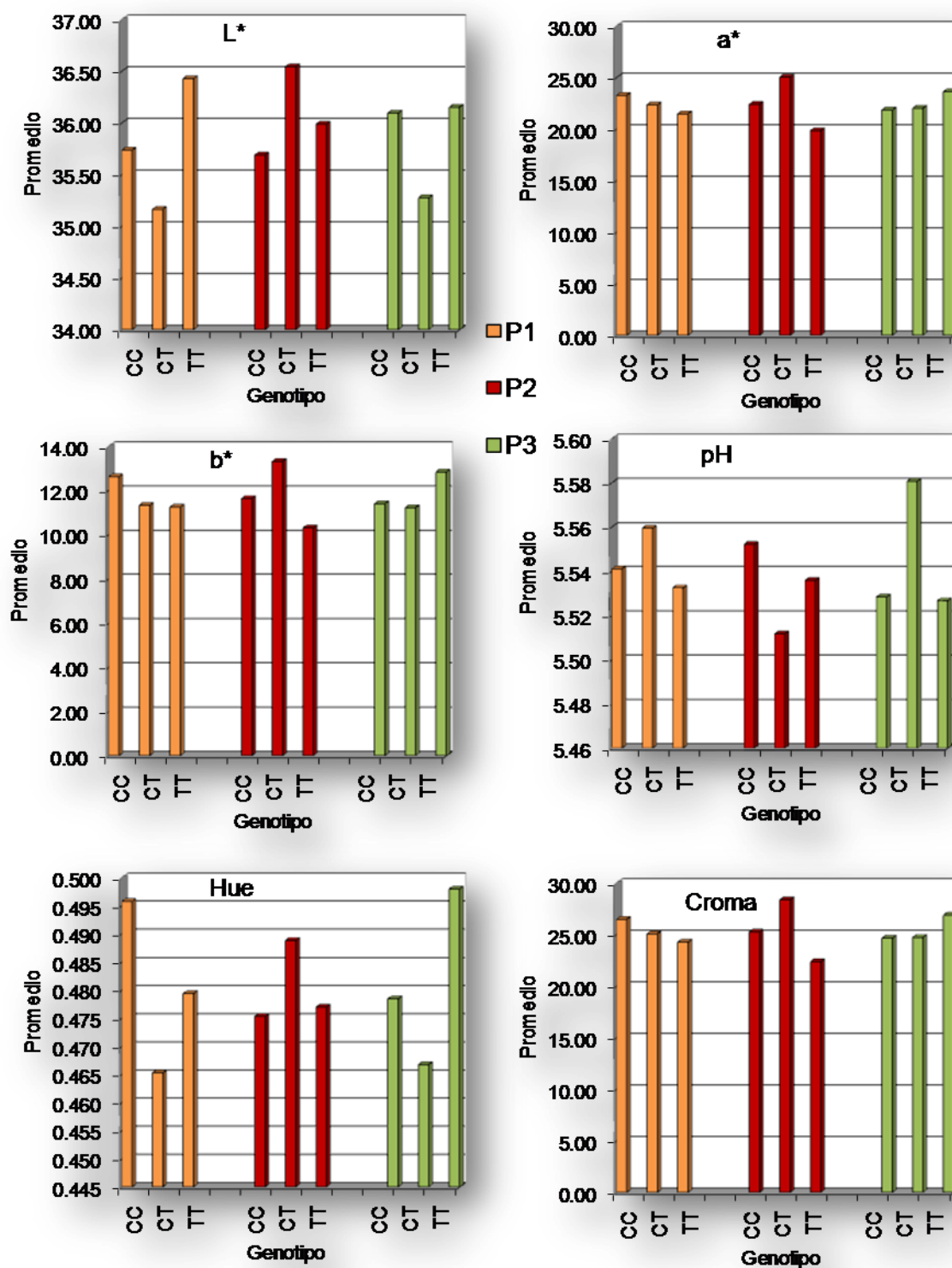
**Tabla 3.22:** Resultados significativos en el análisis de asociación para el SNP P2 del *GSTP1*. El número de animales utilizados en el análisis para cada genotipo se presenta entre paréntesis. La significancia del genotipo se indica en cada carácter: <sup>x</sup>  $P < 0,1$ , <sup>xx</sup>  $P < 0,05$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

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

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.





# Capítulo 4

## CONCLUSIONES



Para concluir quisiera hacer un resumen de los principales hallazgos realizados a lo largo de esta tesis.

#### ***4.1 CARACTERES DE CRECIMIENTO***

- Prácticamente todos los marcadores resultaron polimórficos en las tres razas analizadas (Angus, Criollo Argentino y Hereford), y presentaron una distribución de frecuencias que permitirían su aplicación en un programa de Selección Asistida por Marcadores.

- El análisis entre poblaciones Hereford demostró diferencias en las frecuencias génicas de los marcadores cercanos a genes candidatos. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la selección aplicada sobre estos rodeos, ya que la divergencia de las mismas, se observó justamente en los alelos que resultaron influyentes en los análisis de asociación.

- Se demostró una tendencia en las frecuencias génicas, de casi todos los marcadores analizados, en los grupos generacionales dentro de un rodeo cerrado. Los alelos más afectados resultaron ser aquellos asociados a diferencias en el peso al nacer y en el peso al destete, mediciones incluidas en el índice de selección aplicado sobre este rodeo.

- La inferencia de genotipos resultó muy útil para ampliar el número de animales con genotipo en rodeos que se cuenta con un pedigrí. Esta estrategia permitió obtener 44,3% más de genotipos de los que se pudieron tipificar, y se adicionaron 346 animales a los estudios de asociación.

- Los análisis de asociación demostraron que todos los marcadores y/o las regiones cromosómicas, a excepción de GHRc (BTA20), presentaban alguna asociación con los caracteres de crecimiento testeados. Estas asociaciones, a pesar de tener antecedentes en bibliografía, ya sea como asociación de estos mismos polimorfismos o como QTLs, presentan la singularidad de haber sido obtenidas en rodeos alimentados bajo un sistema pastoril. En este tipo de sistemas, las condiciones de alimentación no siempre permiten que se exprese el mayor potencial genético del individuo, hecho que en muchos casos disminuye la varianza.

- En particular se demostraron varias asociaciones de los marcadores con los diferentes caracteres de crecimiento. BP1 resultó asociado con PDd, PDm y AOB dando

en general el alelo 322, valores mayores a los alelos 312 y 310. Por su parte, IGF1 se asoció con PNd, PDd y P600, con el alelo 231 favoreciendo el crecimiento. Además, ETH10 fue asociado con PNd y PDd, y los alelos 216 y 222 estarían produciendo un peso promedio menor que los alelos 214 y 218. El marcador RM029 mostró asociación con PDd, siendo el alelo 82 beneficioso para el crecimiento sobre el 84. Finalmente el SNP L217V de GH se asoció con las mediciones PDd, P400 y P600, siendo el alelo A beneficioso sobre B.

- El estudio de segmentos cromosómicos del BTA5, utilizando los marcadores de a pares mostró asociación del par ETH10-IGF1 con todos los valores de peso directo y del par IGF1-RM029 únicamente con PNd. Estos datos junto a los de los análisis individuales sugieren la presencia de más de un gen en el entorno del IGF1 influenciando el crecimiento. Más aún, probablemente exista algún/os gen/es influyendo el PNd cercano/s al IGF1 y un segundo gen o grupo de genes influyendo el crecimiento posterior en el segmento ETH10-IGF1 (60 – 70 cM aproximadamente).

- Dos asociaciones se destacan por su relación con funciones bioquímicas de los genes ligados a los marcadores. En primer lugar, la asociación del BP1 con el AOB, ya que el marcador está cercano a dos genes que codifican para factores de crecimiento de miocitos (Myf5 y Myf6), que determinan la diferenciación y el desarrollo de los mismos, mientras el AOB es una medida de la muscularidad. La asociación del SNP L217V del GH con los caracteres de crecimiento en etapas de gran anabolismo (PDd, P400 y P600) es coincidente con el rol central de esta hormona en el desarrollo óseo, muscular y adiposo.

## **4.2 CARACTERES DE COLOR**

- Se encontraron cuatro nuevas mutaciones entre los dos genes estudiados. En el gen de la mioglobina se encontró una transición sinónima A por G en el exón 2 del gen. Por su parte en el gen de la glutatión S-transferasa pi 1, los 3 SNPs se encontraron en la zona intrónica y fueron transiciones C por T.

- Se realizó un estudio exploratorio sobre región del BTA5 que contiene a la mioglobina a través de 3 microsatélites (ETH10, IGF1 y RM029). Las muestras estudiadas (n = 50) no presentaron asociación con ninguno de los parámetros CIELAB (L\*, a\* y b\*) medidos y los parámetros calculados (Hue y Croma). Solamente se



detectó una tendencia ( $P < 0,1$ ) entre IGF1 y pH, dando el genotipo 229/229 un mayor promedio en los valores finales de pH.

- Con los SNPs del gen GSTP1 también se realizó un análisis de asociación exploratorio con los mismos parámetros colorimétricos. Si bien el número de muestras fue reducido ( $n = 17$ ), el modelo detectó una asociación entre el P2 con  $a^*$  ( $P < 0,01$ ) y Croma ( $P < 0,05$ ), y una tendencia ( $P < 0,1$ ) con  $b^*$ , que deberán corroborarse con un mayor número de muestras. De confirmarse, el genotipo TT daría carne menos roja y más marrón (valores menores de  $a^*$  y Croma).





# Capítulo 5

## BIBLIOGRAFÍA



Agaba M, Kemp SJ. 1994. PCR-RFLP typing of the bovine myoglobin gene. *Anim Genet* 25: 187-9.

Alin P, Danielson UH, Mannervik B. 1985. 4-hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase. *FEBS Lett* 179: 267-270.

Allais S, Levéziel H, Payet-Duprat N, Hocquette JF, Lepetit J, Rousset S, Denoyelle C, Bernard-Capel C, Journaus L, Bonnot A, Renard G. 2010. The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds. *J Anim Sci* 88: 446-54.

Anderson PT, Bergen WG, Merkel RA, Enright WJ, Zinn SA, Refsal KR, Hawkins DR. 1988. The relationship between composition of gain and circulating hormones in growing beef bulls fed three dietary crude protein levels. *J Anim Sci* 66: 3059-3067.

Andersson - Eklund L, Danell B, Rendel I. 1991. Association between blood group blood protein polymorphisms and breeding values for production traits in Swedish Red and White Dary Bulls. *Anim Genet* 24: 361-376.

Andrade PC, Grossi DA, Paz CCP, Alencar MM, Regitano LCA and Munari DP. 2008. Association of an insulin-like growth factor 1 gene microsatellite with phenotypic variation and estimated breeding values of growth traits in Canchim cattle. *Anim Genet* 39: 480-485

Andrés S, Silva A, Soares-Pereira AL, Martins C, Bruno-Soares AM, Murray I. 2008. The use of visible and near infrared reflectance spectroscopy to predict beef M. longissimus thoracis et lumborum quality attributes. *Meat Sci* 78: 217-224.

Armstrong E, Postiglioni A, Martínez A, Rincón G, Vega-Pla JL. 2006. Microsatellite analysis of a sample of Uruguayan Creole bulls (*Bos taurus*). *Genet Mol Biol* 29: 267-272.

Barendse W, Armitage SM, Kossarek LM, Shalom A, Kirkpatrick BW, Ryan AM, Clayton D, Li L, Neibergs HL, Zhang N, Grosse WM, Weiss J, Creighton P, McCarthy F, Ron M, Teale AJ, Fries R, McGraw RA, Moore SS, Georges M, Soller M, Womack JE, Hetzel DJS. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat Genet* 6: 227-35.

Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Ann Biochem* 19: 680-683.

Bauman DE. Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. 1999. *Domest Anim Endocrinol* 17: 101–116.

Beauchemin VR, Thomas MG, Franke DE, Silver GA. 2006. Evaluation of DNA polymorphisms involving growth hormone relative to growth and carcass characteristics in Brahman steers. *Genet Mol Res* 5: 438-447.

Behrends JM, Mikel WB, Armstrong CL, Newman MC. 2003. Color stability of semitendinosus, semimembranosus, and biceps femoris steaks packaged in a high-oxygen modified atmosphere. *J Anim Sci* 8: 2230-8.

Bekhit Ael-D, Geesink GH, Ilian MA, Morton JD, Bickerstaffe R. 2003. The effects of natural antioxidants on oxidative processes and metmyoglobin reducing activity in beef patties. *Food Chem* 81: 175–187.

Bines JA, Hart IC. 1978. Hormonal regulation of the partition of energy between milk and body tissue in adult cattle. *Proc Nutr Soc* 37: 281-7.

Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SL, Hawkins GA, Toldo SS, Fries R, Grosz MD, Yoo J, Beattie CW. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136: 619–39.

Blott S, Kim JJ, Moisisio S, Schmidt-Küntzel A, Cornet A, Berzi P, Cambisano N, Ford C, Grisart B, Johnson D, Karim L, Simon P, Snell R, Spelman R, Wong J, Vilkkij, Georges M, Farnir F, Coppieters W. 2003. Molecular Dissection of a Quantitative Trait Locus: A Phenylalanine-to-Tyrosine Substitution in the Transmembrane Domain of the Bovine Growth Hormone Receptor Is Associated With a Major Effect on Milk Yield and Composition. *Genetics* 163: 253–266.

Boles JA, Bowman JG, Surber LM, Boss DL. 2004. Effects of barley variety fed to steers on carcass characteristics and color of meat. *J Anim Sci*: 82: 2087-91.

Brameld JM, Buttery PJ, Dawson JM and Harper JMM. 1998. Nutritional and hormonal control of skeletal-muscle cell growth and differentiation. *Proc Nutr Soc* 57: 207-217.

Casas E, Shackelford SD, Keele JW, Stone RT, Kappes SM, Koohmaraie M. 2000. Quantitative Trait Loci Affecting Growth and Carcass Composition of Cattle Segregating Alternate Forms of Myostatin. *J Anim Sci* 78: 560-569.

Casas E, Keele JW, Shackelford SD, Koohmaraie M, Stone RT. 2003.

Identification of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle.

Anim Genet 35: 2-6.

Ceelen HJ. 1995. Bovine somatotropin and cow health--what are the facts? Can Vet J 36:25-7.

Chan WK, Faustman C, Velasquez-Pereira J, McDowell LR, Batra TR. 1998. Effects of alpha-tocopherol on metmyoglobin formation and reduction in beef from cattle fed soybean or cottonseed meal diets. J Anim Sci 76: 1421-6.

Chan WKM, Faustman C, Decker EA. 1997. Oxymyoglobin oxidation as affected by oxidation products of phosphatidylcholine liposomes. J Food Sci 62: 709-712.

Chen C. 2000. Growth hormone secretagogue actions on the pituitary gland: multiple receptors for multiple ligands? Clin Exp Pharmacol Physiol 27: 323-9.

Chen J, Anderson JB, DeWeese-Scott C, Fedorova ND, Geer LY, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Jacobs AR, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Madej T, Marchler-Bauer A, Marchler GH, Mazumder R, Nikolskaya AN, Rao BS, Panchenko AR, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Vasudevan S, Wang Y, Yamashita RA, Yin JJ, Bryant SH. 2003. MMDB: Entrez's 3D-structure database. Nucl Ac Res 31: 474-477.

Chikuni K, Fukumoto Y, Tanabe R, Muroya S, Ozawa S. 1997. A simple method for genotyping the bovine growth hormone gene. Anim Genet 28: 230-232.

Chillard Y. 1989. Long-term effects of recombinant bovine somatotropin (rBST) on dairy cow performances: a review. En: Use of Somatotropin in Livestock Production. Editores: Sejrsen K, Vestergaard M, Neimann-Sorensen A. Editorial: Elsevier Applied Science (New York) 61-87.

CIE (Commission International de l'Eclairage) 1986. Colorimetry 2 ed. Vienna. s.p.

Cogan JD, Phillips JA. 2001. III Inherited Defects in Growth Hormone Synthesis and Action (Capítulo 162). En: The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease 8TH ED. Editor: Scriver CR. Editorial: McGraw-Hill.

Cowan CM, Dentine MR, Ax RL, Schuler LA. 1989. Restriction fragment length polymorphisms associated with growth hormone and prolactin genes in Holstein bulls: evidence for a novel growth hormone allele. *Anim Genet* 20:157-65.

Curi RA, Oliveira HN, Silveira AC, Lopes CR. 2005. Effects of polymorphic microsatellites in the regulatory region of IGF1 and GHR on growth and carcass traits in beef cattle. *Anim Genet* 36: 58-62.

Curi RA, Palmieri DA, Sugisawa L, Oliveira HN, Silveira AC, Lopes CR. 2006. Growth and carcass traits associated with GH1/Alu I and POU1F1/Hinf I gene polymorphisms in Zebu and crossbred beef cattle. *Genet Mol Biol* 29: 56-61.

De Donato M, Gallagher Jr DS, Lehn C, Gill C, Taylor JF. 2003. Molecular cytogenetic assignment of genes to bovine chromosome 5. *Genet Mol Res* 2: 260-70.

Dekkers JC. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J Anim Sci* 82: E313-328.

Di Stasio L, Destefanis G, Brugiapaglia A, Albera A, Rolando A. 2005. Polymorphism of the GHR gene in cattle and relationships with meat production and quality. *Anim Genet* 36: 138–140.

Di Stasio L, Sartore S, Albera A. 2002. Lack of association of GH1 and POU1F1 gene variants with meat production traits in Piemontese cattle. *Anim Genet* 33: 61-64.

Dolf G, Glowatzki ML, Gaillard C. 1991. Searching for genetic markers for hereditary diseases in cattle by means of DNA fingerprinting. *Electrophoresis* 12:109-12.

Dunne PG, O'Mara FP, Monahan FJ, Moloney AP. 2006. Changes in colour characteristics and pigmentation of subcutaneous adipose tissue and M. longissimus dorsi of heifers fed grass, grass silage or concentrate-based diets. *Meat Sci* 74: 231–241.

Erlich HA. 1989. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. Editorial: Stockton Press (Nueva York) 246 pp.

Etherton TD. 2004. Somatotropic function: the somatomedin hypothesis revisited. *J Anim Sci* 82: E239-244.

Etherton TD, Bauman DE. 1998. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev* 78: 745-61.

Faustman C, Cassens RG. 1990. The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review. *J Muscle Foods* 1: 217– 243.



Faustman C, Cassens RG. 1991. The effect of cattle breed and muscle type on discoloration and various biochemical parameters in fresh beef. *J Anim Sci* 69:184-93.

Faustman C, Chan WK, Schaefer DM, Havens A. 1998. Beef Color Update: The Role for Vitamin E. *J Anim Sci* 76:1019-26.

Florini JR, Ewton DZ, Roof SL. 1991. Insulin-like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression. *Mol Endocrinol* 5: 718-724.

Fontanesi L, Scotti E, Tazzoli M, Beretti F, Dall'Olio S, Davoli R, Russo V. 2007. Investigation of allele frequencies of the growth hormone receptor (GHR) F279Y mutation in dairy and dual purpose cattle breeds. *Ital J Anim Sci* 6: 415-420.

Ge W, Davis ME, Hines HC, Irvin KM, Simmen RC. 2001. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *J Anim Sci* 79: 1757–1762.

Ge W, Davis ME, Hines HC, Irvin KM, Simmen RCM. 2003. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. *J Anim Sci* 81: 641–648.

Gelfi C, De Palma S, Ripamonti M, Eberini I, Wait R, Bajracharya A, Marconi C, Schneider A, Hoppeler H, Cerretelli P. 2004. New aspects of altitude adaptation in Tibetans: A proteomic approach. *FASEB J* 18: 612–614.

Georges M, Larthorp M, Dietz AB, Lefort A, Libert F, Mishra A, Nielsen D, Sargeant LS, Steele MR, Zhao X, Leipold H, Womack E. 1993. Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated QTL. *Proc Nat Ac Sci USA* 90: 1058-1062.

Giovambattista G, Ripoli MV, Peral García P, Bouzat, JL. 2001. Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: The Argentine Creole Cattle. *Anim Genet* 32: 240-247.

Gordon DF, Quick DP, Erwin CR, Donelson JE, Maurer RA. 1983. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. *Mol Cell Endocrinol* 33: 81-95.

Graml R, Olbrich-Bludau A, Schwab M, Schallenberger E, Schams D, Pirchner F. 1994. Relationship between plasma hormone and metabolite levels and breeding values of bulls. *J Anim Breed Genet* 112: 313–326.

Grochowska R, Sørensen P, Zwierzchowski L, Snochowski M, Løvendahl P. 2001. Genetic variation in stimulated GH release and in IGF-I of young dairy cattle and their associations with the leucine/valine polymorphism in the GH gene. *J Anim Sci* 79: 450–476.

Hale CS, Herring WO, Shibuya H, Lucy MC, Lubahn DB, Keisler DH, Johnson GS. 2000. Decreased growth in Angus steers with a short TG-microsatellite allele in the P1 promoter of growth hormone receptor gene. *J Anim Sci* 78: 2099–104.

Hallerman EM, Nave A, Kashi Y, Holzer Z, Soller, Beckmann JS. 1987. Restriction fragment length polymorphisms in dairy and beef cattle at the growth hormone and prolactin loci. *Anim Genet* 18: 213–22.

Heaton MP, Harhay GP, Bennett GL, Stone RT, Grosse WM, Casas E, Keele JW, Smith TP, Chitko-McKown CG, Laegreid WW. 2002. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mamm Genome* 13:272-81.

Hediger R, Johnson SE, Barendse W, Drinkwater RD, Moore SS, Hetzel J. 1990. Assignment of the growth hormone gene locus to 19q26-qter in cattle and 11q25-qter in sheep by in situ hybridization. *Genomics* 8: 171–4.

Henderson CR, Quaas RL. 1976. Multiple trait evaluation using relatives' records. *J Anim Sci* 43: 1188-1197.

Høj S, Fredholm M, Larsen NJ, Nielsen VH. 1993. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. *Anim Genet* 24: 91–6.

Hunter RS, Harold RW. 1987. The measurement of appearance (2nd ed.). Editorial: Wiley (New York).

Ihara N, Takasuga A, Mizoshita K, Takeda H, Sugimoto M, Mizoguchi Y, Hirano T, Itoh T, Watanabe T, Reed KM, Snelling WM, Kappes SM, Beattie CW, Bennett GL, Sugimoto Y. 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res* 14: 1987-98.

Ishikawa T, Esterbauer H, Sies H. 1986. Role of cardiac glutathione transferase and of the glutathione S-conjugate export system in biotransformation of 4-hydroxynonenal in the heart. *J Biol Chem* 261: 1576-1581.

Katoh K, Kouno S, Okazaki A, Suzuki K, Obara Y. 2008. Interaction of GH polymorphism with body weight and endocrine functions in Japanese black calves. *Domestic Anim Endoc* 34: 25–30

Kawano K, Uda K, Otsuki R, Suzuki T. 2004. Preparation of artificial 2-, 3-, 4- and 8-domain myoglobins and comparison of their autoxidation rates. *FEBS Letters* 574: 203–207.

Kemenes PA, Correia de Almeida Regitano L, Jordão de Magalhães Rosa A, Packer IU, Razook AG, Andrade de Figueiredo L, Silva NA, Etchegaray MAL, Lehmann Coutinho L. 1999. k-casein, b-lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzerá, Caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis cattle. *Genet Mol Biol* 22, 4, 539-541.

Kirkpatrick M, Heckman N. 1989. A quantitative genetic model for growth, shape, reaction norms, and other infinite-dimensional characters. *J Math Biol* 27: 429-450.

Kitagawa H, Kitoh K, Ito T, Ohba Y, Nishii N, Katoh K, Obara Y, Motoi Y, Sasaki Y. 2001. Serum Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-1 Concentrations in Japanese Black Cattle with Growth Retardation. *J Vet Med Sci* 63: 167-70.

Koshkoi AE, Pitchford WS, Kruk ZA, Morris CA, Cullen NG, Crawford AM, Bottema CDK. 2005. QTL for meat colour and pH in *Bos Taurus* cattle. *Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet.* 16: 111-114

Kossarek LM, Finlay O, Grosse WM, Su X, McGraw R. 1994. Five bovine dinucleotide repeat polymorphisms: RM026, RM029, RM032, RM033 and RM038. *Anim Genet* 25: 296-97.

Kuimelis RG, Livak KJ, Mullah B, Andrus A. 1997. Structural analogues of TaqMan probes for real-time quantitative PCR. *Nucleic Acids Symp Ser* 37:255-6.

Ledward DA. 1985. Post-slaughter influences on the formation of metmyoglobin in beef muscles. *Meat Sci* 15: 149.

Li C, Basarab J, Snelling WM, Benkel B, Murdoch B, Hansen C, Moore SS. 2004. Assessment of Positional Candidate Genes *myf5* and *igf1* for Growth on Bovine Chromosome 5 in Commercial Lines of *Bos Taurus*. *J Anim Sci* 82: 1-7.

Li C, Basarab J, Snelling WM, Benkel B, Murdoch B, Moore SS. 2002. The identification of common haplotypes on bovine chromosome 5 within commercial lines of *Bos taurus* and their associations with growth traits. *J Anim Sci* 80: 1187-94.

Li MH, Adamowicz T, Switonski M, Ammosov I, Ivanova Z, Kiselyova T, Popov R, Kantanen J. 2006. Analysis of population differentiation in North Eurasian cattle (*Bos taurus*) using single nucleotide polymorphisms in three genes associated with production traits. *Anim Genet* 37: 390–392.

Li N, Stephens M. 2003. Modelling linkage disequilibrium, and identifying recombination hotspots using snp data. *Genetics* 165: 2213-2233.

Lirón JP. 2004. Tesis de Doctorado: "Estudio de la Variabilidad Genética de Razas Bovinas Criollas, Europeas e Indicas de Argentina y Bolivia. Su aplicación en la Identificación Individual, Paternidades y Trazabilidad". Fac Cs Veterinarias, UNLP, La Plata – Argentina.

Lo Bello M, Nuccetelli M, Caccuri AM, Stella L, Parker MW, Rossjohn J, McKinstry WJ, Mozzi AF, Federici G, Polizio F, Pedersen JZ, Ricci G. 2001. Human glutathione transferase P1-1 and nitric oxide carriers; a new role for an old enzyme. *J Biol Chem* 276: 42138–42145.

Machado MBB, Alencar MM, Pereira AP, Oliveira HN. 2003. QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. *Genet Mol Biol* 3: 259-265.

Mancini RA, Hunt MC. 2005. Current research in meat color. *Meat Sci* 71: 100–121.

Mangiacapra FJ, Roof SL, Ewton DZ, Florini JR. 1992. Paradoxical decrease in Myf-5 messenger RNA levels during induction of myogenic differentiation by insulin-like growth factors. *Mol Endocrinol* 6: 2038-2044.

McClure MC, Morsci NS, Schnabel RD, Kim JW, Yao P, Rolf MM, McKay SD, Gregg SJ, Chapple RH, Northcutt SL, Taylor JF. 2010. A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. *Anim Genet* (On line).

Melucci LM, Birchmeier AN, Cappa EP, Cantet RJC. 2009. Bayesian analysis of selection for higher weaning weight while maintaining birth weight in beef cattle. *J Anim Sci* 87: 3089-96.

Melucci LM, Miquel MC, Molinuevo HA. 1983. Índices de selección para crecimiento en bovinos para carne. *Producción Animal* 10:417-426.

Melucci LM. 1995. Estimación de un índice genético restringido para crecimiento predestete en bovinos para carne. Resúmenes 1º Jornada Argentino-Chilena de Genética. XXVI Congreso Argentino de Genética y XXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile. Bariloche (Argentina).

Meyer K. 1997. Estimates of genetic parameters for weaning weight of beef cattle accounting for direct-maternal environmental covariances. *Livest Prod Sci* 52: 187- 199.

Miquel MC, Villarreal E, Mezzadra C, Melucci L, Soria L, Corva P, Schor A. 2009. The association of CAPN1 316 marker genotypes with growth and meat quality traits of steers finished on pasture. *Genet Mol Biol* 32:491-496.

Mizoshita K, Takano A, Watanabe T, Takasuga A, Sugimoto Y. 2005. Identification of a 1.1-Mb region for a carcass weight QTL on bovine Chromosome 14. *Mamm Genome* 16: 532-7.

Montoya AE, Cerón-Muñoz MF, Moreno MA, Martínez E, Corrales JD, Tirado JF, Calvo SJ. 2010. Genetic characterization of the Hartón del Valle, Angus, Brangus, Holstein, and Senepol cattle breeds in Colombia, using ten microsatellite markers. *Rev Colomb Cienc Pecu* 23: 283-291.

Moody DE, Pomp D, Barendse W, Womack JE. 1995. Short communication: assignment of the growth hormone receptor gene to bovine chromosome 20 using linkage analysis and somatic cell mapping. *Anim Genet* 26:341– 4.

Moody DE, Pomp D, Newman S, MacNeil MD. 1996. Characterization of DNA polymorphisms in three populations of Hereford cattle and their associations with growth and maternal EPD in line 1 Herefords. *J Anim Sci* 74: 1784-1793.

Mrode RA. 2005. Linear Models for the Prediction of Animal Breeding Values. 2nd edn. Editorial: CABI Publishing Company (Cambridge).

Navarro I, Leibush B, Moon TW, Plisetskaya EM, Banos N, Mendez E, Planas JV, Gutierrez J. 1999. Insulin, insulin-like growth factor- I (IGF-I), and glucagon: the evolution of their receptors. *Comp Biochem Physiol B* 122: 137–153.

Nelson DL, Cox MM. 2000. Glycolysis and the catabolism of hexoses. En: *Lehninger Principle of Biochemistry* 3a edición. Editorial: Worth Publishers (New York): 560.

Novoa MA, Usaqué W. 2010. Population genetic analysis of the Brahman cattle (*Bos indicus*) in Colombia with microsatellite markers. *J Anim Breed Genet* 127: 161–168.

O'Keefe M, Hood DE. 1982. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef from muscles of differing colour stability. *Meat Sci* 7: 209–228.

Orita M, Suzuki Y, Sekiya K, Hayashi. 1989b. A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphism using polymorphism chain reaction. *Genomics* 5: 874–879.

Orita MH, Wahana I, Kanazawa H, Sekna T. 1989a. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766–2770.

Otto G, Roehe R, Looft H, Thoelking L, Knap PW, Rothschild MF, Plastow GS, Kalm E. 2007. Associations of DNA markers with meat quality traits in pigs with emphasis on drip loss. *Meat Sci* 75: 185–195

Ouali A, Herrera-Mendez CH, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Aubry L, Sentandreu MA. 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci* 74: 44–58.

Papaleo Mazzucco J, Melucci LM, Villarreal EL, Mezzadra CA, Soria L, Corva P, Motter MM, Schor A, Miquel MC. 2010. Effect of ageing and  $\mu$ -calpain markers on meat quality from Brangus steers finished on pasture. *Meat Sci* 86: 878–882.

Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 333: 19–39.

Pereira AP, Alencar MM, Oliveira HN, Regitano LCA. 2005. Association of GH and IGF-I polymorphism with growth traits in a synthetic beef cattle breed. *Genet Mol Biol* 28: 230–236.

Priolo A, Micol D, Agabriel J. 2001. Effects of grass feeding systems on ruminant meat colour and flavour. A review. *Anim Res* 50: 185–200.

Radko A, Zyga A, Zabek T, Slota E. 2005. Genetic variability among Polish Red, Hereford and Holstein-Friesian cattle raised in Poland based on analysis of microsatellite DNA sequences. *J Appl Genet* 46: 89–91.

Reardon W, Mullen AM, Sweeney T, Hamill RM. 2010. Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and

composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. *Meat Sci* 86: 270-5.

Regitano LCA, Azevedo JL, Vencovsky R, Packer IU, Barbosa PF, Rosa AJM, Silva NA, Etchegaray MAL, Coutinho LL. 1999. Selection for breed-specific growth hormone and IGF-I alleles in synthetic beef cattle cross, Canchim. *Genet Mol Biol* 22: 531-537.

Reis C, Navas D, Pereira M, Cravador A. 2001. Growth hormone *AluI* polymorphism analysis in eight portuguese bovine breeds. *Arch Zoot* 50: 189-190.

Renaville R, Hammadi M, Portetelle D. 2002. Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol* 23: 351-60.

Renerre M, Mazuel JP. 1985. Relations entre méthodes de mesures instrumentales et sensorielles de la couleur de la viande. *Sci Aliments* 5: 541-557.

Ripoli MV, Rogberg-Muñoz A, Francisco EI, Villegas-Castagnasso EE, Lirón JP, Peral-García P, Giovambattista G. 2010. History and selection imprinting on genetic relationships among bovine breeds analyzed through five genes related with marbling. *Res Vete Sci*, *in press*.

Rogberg Muñoz A, Ripoli MV, Villegas-Castagnasso EE, Kienast ME, Furnus CC, Peral-García P, Giovambattista G. 2006. Genetic Variability Study in 19 Bovine Breeds of Five Candidate Genes Related with Marbling (*DGAT1*, *TG*, *GH*, *LP* AND *SCD*). *Proceedings of the 30th International Conference on Animal Genetics ISAG 2006* (ISBN 85-85584-02-5).

Ronaghi M, Uhlen M, Nyrén P. 1998. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281: 363-5.

Ronaghi M. 2001. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 11: 3-11.

Rousset F. 2008. GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Res* 8: 103-6.

Rudnicki MA, Schnegelsberg PNJ, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. 1993. *MyoD* or *Myf-5* is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75: 1351-1359.

Schulman NF, Sahana G, Lund MS, Viitala SM, Vilkki JH. 2008. Quantitative trait loci for fertility traits in Finnish Ayrshire cattle. *Genet Sel Evol* 40: 195-214.



Scollan N, Hocquette JF, Nuernberg K, Dannenberger D, Richardson I, Moloney A. 2006. Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Sci* 74: 17-33. International Congress 52nd ICoMST, Dublin, Ireland.

Seyfert M, Mancini RA, Hunt MC, Tang J, Faustman C, Garcia M. 2006. Color stability, reducing activity, and cytochrome c oxidase activity of five bovine muscles. *J Agric Food Chem* 54: 8919-25.

Sherman EL, Nkrumah JD, Murdoch BM, Li C, Wang Z, Fu A, Moore SS. 2007. Polymorphisms and haplotypes in the bovine NPY, GHR, GHRL, IGF2, UCP2, and UCP3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency and carcass merit in beef cattle. *J Anim Sci* (On line).

Sherman GB, Kachman SD, Hungerford LL, Rupp GP, Fox CP, Brown MD, Feuz BM, Holm TR. 2004. Impact of candidate sire number and sire relatedness on DNA polymorphism-based measures of exclusion probability and probability of unambiguous parentage. *Anim Genet* 35: 220–226.

Smith GC, Belk KE, Sofos JN, Tatum JD, Williams SN. 2000. Economic implications of improved color stability in beef. En: *Antioxidants in muscle foods: Nutritional strategies to improve quality*. Editores: Decker EA, Faustman C, Lopez-Bote CJ. Editorial: Wiley Interscience (New York): 397–426.

Sobrino B, Brion M, Carracedo A. 2005. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int* 154: 181 – 194.

Steffen P, Eggen A, Dietz Ab, Womack Je, Stranzinger G, Fries R. 1993. Isolation and mapping of polymorphic microsattellites in cattle. *Anim Genet* 24: 1221-1224.

Stevanović J, Stanimirović Z, Dimitrijević V, Stojić V, Fratrić N, Lazarević M. 2009. Microsatellite DNA polymorphism and its usefulness for pedigree verification in Simmental cattle from Serbia. *Acta Vet (Beogr)* 59: 621-631.

Stone RT, Casas E, Smith TP, Keele JW, Harhay G, Bennett GL, Koohmaraie M, Wheeler TL, Shackelford SD, Snelling WM. 2005. Identification of genetic markers for fat deposition and meat tenderness on bovine chromosome 5: development of a low-density single nucleotide polymorphism map. *J Anim Sci* 83: 2280-8.



Suman SP, Faustman C, Stamer SL, Liebler DC. 2007. Proteomics of lipid oxidation-induced oxidation of porcine and bovine oxymyoglobins. *Proteomics* 7: 628–640.

Suzuki R, Kemp SJ, Teale AJ. 1993. Polymerase chain reaction analysis of mitochondrial DNA polymorphism in N'Dama and Zebu cattle. *Anim Genet* 24: 339–343.

Tang J, Faustman C, Hoagland TA. 2004. Krzywicki Revisited: Equations for Spectrophotometric Determination of Myoglobin Redox Forms in Aqueous Meat Extracts *J Food Sci* 69:717–720.

Tang J, Faustman C, Lee S, Hoagland TA. 2003. Effect of Glutathione on Oxymyoglobin Oxidation. *J Agric Food Chem* 51: 1691–1695.

Taylor J, Coutinho L, Herring K, Gallagher Jr D, Brenneman R, Burney N, Sanders J, Turner J, Smith S, Miller R, Savell J, Davis S. 1998. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. *Anim Genet* 29: 194–201.

Thallman RM, Bennett GL, Keele JW, Kappes SM. 2001a. Efficient computation of genotype probabilities for loci with many alleles: I. Allelic peeling. *J Anim Sci* 79: 26–33.

Thallman RM, Bennett GL, Keele JW, Kappes SM. 2001b. Efficient computation of genotype probabilities for loci with many alleles: II. Iterative method for large, complex pedigrees. *J Anim Sci* 79: 34–44.

Theilmann JL, Skow LC, Baker JF, Womack JE. 1989. Restriction fragment length polymorphisms for growth hormone, prolactine, osteonectin, cristallin, fibronectin and 21-steroid hydroxylase in cattle. *Anim Genet* 20: 257 - 266.

Thomas MG, Enns RM, Shirley KL, Garcia MD, Garrett AJ, Silver GA. 2007. Associations of DNA polymorphisms in growth hormone and its transcriptional regulators with growth and carcass traits in two populations of Brangus bulls. *Genet Mol Res* 6: 222–37.

Tollefsen SE, Lajara R, McCusker RH, Clemmons DR, Rotwein P. 1989. Insulin-like Growth Factors (IGF) in Muscle Development. *J Biol Chem* 264: 13810–13817.

Unanian MM, Chaves Barreto C, Ribeiro de Freitas A, Torres Cordeiro CM, Josahkian LA. 2000. Associação do Polimorfismo do Gene do Hormônio de

Crescimento com a Caraterística Peso em Bovinos da Raça Nelore. *Rev Bras Zootec* 29: 1380-1386.

Van de Goor LHP, Koskinen MT, van Haeringen WA. 2009. Population studies of 16 bovine STR loci for forensic purposes. *Int J Legal Med* (On line).

Varvio SL, Iso-Touru T, Kantanen J, Viitala S, Tapio I, Mäki-Tanila A, Zerabruk M, Vilkki J. 2008. Molecular anatomy of the cytoplasmic domain of bovine growth hormone receptor, a quantitative trait locus. *Proc R Soc B* 275: 1525-1534.

Vasconcellos LP, Tambasco-Talhari D, Pereira AP, Coutinho LL, Regitano LC. 2003. Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. *Genet Mol Biol* 26: 133-137.

Vestergaard M, Oksberg N, Henckel P. 2000. Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on muscle fibre characteristics and meat colour of semitendinosus, longissimus dorsi and supraspinatus muscles of young bulls. *Meat Sci* 54: 177-185.

Viitala S, Szyda J, Blott S, Schulman N, Lidauer M, Mäki-Tanila A, Georges M, Vilkki J. 2006. The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire dairy cattle. *Genetics* 173: 2151-64.

Villegas-Castagnasso EE, Kienast M, Ripoli MV, Prando AJ, Francisco EI, Rogberg Muñoz A, Sorarrain N, Baldo A, Peral-García P, Giovambattista G. 2006. Comparación de la Variabilidad Genética de los Genes DGTA1, TG, LP, SCD y GH en Diferentes Tipos de Bovinos de la Raza Aberdeen Angus de Argentina. XXXV Congreso Argentino de Genética, San Luís. BAG XVIII (supplement): 161.

Walshe BE, Sheehan EM, Delahunty CM, Morrissey PA, Kerry JP. 2006. Composition, sensory and shelf life stability analyses of Longissimus dorsi muscle from steers reared under organic and conventional production systems. *Meat Sci* 73: 319-325.

Wang L, Marincola FM. 2003. Applying Pyrosequencing<sup>TM</sup> to HLA-Typing. Vendor Forum (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics). 27: 16-18. Pagina visitada el 15 de mayo de 2010. [http://www.ashi-hla.org/docs/newsletter/ASHI\\_Quarterly/27\\_1\\_2003/Pyrosequencing-Vendor\\_Web.pdf](http://www.ashi-hla.org/docs/newsletter/ASHI_Quarterly/27_1_2003/Pyrosequencing-Vendor_Web.pdf)

Wang YD, Wood WI. 1995. Amino acids of the human growth hormone receptor that are required for proliferation and Jak-Stat signaling. *Mol Endocrinol* 9: 303–11.

Waters SM, McCabe MS, Howard DJ, Giblin L, Magee DA, Machugh DE, Berry DP. 2010. Associations between newly discovered polymorphisms in the *Bos taurus* growth hormone receptor gene and performance traits in Holstein-Friesian dairy cattle. *Anim Genet* (On line).

Weller JI. 2007. Current and future developments in patents for quantitative trait loci in dairy cattle. *Recent Pat DNA Gene Seq* 1: 69-76.

White SN, Casas E, Allan MF, Keele JW, Snelling WM, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Smith TP. 2007. Evaluation in beef cattle of six deoxyribonucleic acid markers developed for dairy traits reveals an osteopontin polymorphism associated with postweaning growth. *J Anim Sci* 85: 1-10.

Yan Z, Serrano AL, Schiaffino S, Bassel-Duby S, Williams Rs. 2001. Regulatory Elements Governing Transcription in Specialized Myofiber Subtypes. *J Biol Chem* 276: 17361–17366.

Yao J, Aggrey SE, Zadworny D, Hayes JF, Kühnlein U. 1996. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. *Genetics* 144: 1809-1816.

Yuan ZR, Xu SZ. 2010. Novel SNPs of the bovine *CACNA2D1* gene and their association with carcass and meat quality traits. *Mol Biol Rep* (On line).





# ANEXOS



**ANEXO 1:** Secuencias de la Mioglobina bovina: gen (NC 007303), el ARNm (NM 173881) y la proteína (NP 776303.1), tomadas de GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En cada caso, en amarillo se resalta la zona amplificada. En la secuencia del gen, el resto del ARNm en azul y los primers en rojo. En la secuencia de mRNA, el resto de la zona transcripta en azul.

**Nombre:** myoglobina [*Bos taurus*]

**Cromosoma:** 5

**GenID:** 280695

**Locus:** NC\_007303

```

1  cagctgtcgg agacaggaca cccagtcagt ccgcccttgt tctttttctc ttcttcagac
61  tgcgccatgg ggctcagcga cggggaatgg cagttgggtg tgaatgcctg ggggaagggtg
121 gaggctgatg tcgcaggcca tgggcaggag gtccctcatca ggtaaaagga agaaatccca
181 ctgccccgtg cacctccttc ctcaagggtc agaatgcttg cctgcaagggt ggaacgtttg
241 ccccggggtt gaccagttgg ctgctgtgtt aattaacttt gttaaaccctt ctacttggtt
301 ctctgtgtgt tttatgtatc agaggttgga atcaggaaag cagatccattt tcacacttgt
361 gctagcagct gggaggagct ttgatgatca aatccttgat gcttagagcc caccagaagg
421 aatcctaaaa ttatagctag aattaacaag aaaggtctga gaggtctttc tcacctcacc
481 taatggatga ggacacaaag gacctaagaa gggaaggatg accccagagt cacaagttca
541 ttaaagtctg taaaatgcc aaggattaaga cacggccttc aagatgagat atgtggttct
601 acacctggct ctgccaccga gctgttgtgt gacctttggg aaagcacata acttctctga
661 gcctcagttt cttctcctat aaaatgggag gggggggggg aatcctaata tctacattat
721 acagtagaag taagaattaa ataaaatgct gcagccaagg ggcccagcat aattcctggc
781 atagagttag ttccaaaaga tgtcagtaac tcttgagatg gaagcttaga attgggacct
841 ttaaagtata ataataataa tagtaattat tattatttta gctgtgttgg gtctttgttg
901 ctttctctag ttttggtgag caggggtcgc tcttcattgc catgcattgg cttctcattg
961 ccgtgggttc tcttgctggg gaacacaggc tccaggtgca ggaacgcagg ctcctgagtt
1021 gcggctctag ggctctagag cgtgggctca gtagttgcgg ggcattgggt tagttgctcg
1081 gcggtatatg gaatctttcc agatcaggga tccaacccat gtctcctgca ttggctggca
1141 gattcttatc cattgtgcca ccacagaagt ccctaactct gacttttgat gttgggtatg
1201 tcttttgaag gctcagaata atctccacgc acatcttgcc ttcttttagc agggattcct
1261 gaataaagaa acaccctccc cgccccccac ccccaaaat tctaagtttt gtaagcagag
1321 ggtggctgtg gttcagaaat agaacctcat gttctcattg cttctctcgc caagtgggtga
1381 tagactcccc tctcctcctg gtcctttctc atgctctggg cagcgtgagt caaaagcgta
1441 catcgacatt tctgcgcctg gtaggaggtg ggccctgggt gccatgagtg aatggattgt
1501 cttttacact ttatagatga atttctcctt ctttatgagt cagagcaggt tttcctctcc
1561 catttagaca ccctttcagc ctcccccagg cttcacccat ttccagctcc catgtctggg
1621 agaatgaccc agacataaagc tataagctct attatctgga gtttcagcct tagtgccca
1681 tgccaaaaaac acatgagaaa ggatggtcaa gttccctgtt gaatctaact ggcattcttg
1741 ggttttcctt tgtgtctttt tctcttatag cctctgtcag ttggctactg gcactgcaag
1801 aggtcccatt tgggttgaca gaagactctc caaagtggac atcaactcct cagctctccc
1861 tttgctgtgt gaccttgga c aagtcactaa tcctctctgg gtcccatttc cctatttgtt
1921 gaatggaggg attaccttca tggctcttga gatccctgcc caccctcatg ccttggcatt
1981 ctttgagttc tggatcctgc cttgcttttg gagaggaggc agggtagctg agtgggagac
2041 cagtttgcca aaaagcagtc tttcccaggt gatctggggg ctgtcagccc taagtcagtg
2101 acttgagggt ctggaaggag acttggggta tcgtatcatg ggagaaacag cccctccctt
2161 cccagtggat cagagaaaac tgccaggggc aggagccagg ggcaagacgt gatgctggag
2221 actgccgacc cctggcaggc cccagacagc ctgatcccc atcacatctt aagctgaaga
2281 catgcagaaa ccacgccgac ggcttctgcc ctcttggtat ttgggggcca gggacaggga
2341 gaaggggatg ctgacttcca ggggtgccctg tgagaaatga ccttgtgatt ctgttccaga
2401 tgccgaacct gggttttctt actcttcttg aaaaggctcat ttctccact cctctggtta
2461 tgacagatag caaattctgt tcgggtctgtt aataaaactc tgagggtctt actgcaagca
2521 tgtgatcatt atgtcctaga acataatagc tggaagggtc gttgcagagt ctggctccag
2581 gaaacggggg tttttaggag ggcgagggca gctgaagagg gctttgggcc cctgcctttc
2641 cttcttttcc cccagatcctt tcctgcttta tttatttttg catttgaaca aaggatttcg
2701 aggctatgga aaattgggaa gtcactgctg gtggccagta tgtctcatgt caccgggagg
2761 aaacatggct caagagtcct agtcaaccaa tggcagctac agacagaacc caagattccc
2821 aatcctagtg atgacgatgg tgggtgtgag gatggtgatg atggagctgg tgaggatgat

```

```

2881 gggggtgatg gtggtgatgg tgatcgtggc ctagagcttt tgatgaggac agcaaacatg
2941 taaatatgtt acacactgat tgctaggccc tgtgttacgt gttcatgtat attaactcat
3001 ttcagcctca cagtaacctc atgaggtgga cgttattata atccccacgt ttaacagaga
3061 agttaagtga cttgcctgaa gtcccaaagc tggagttcaa gtccagcagc ctggatcagc
3121 gttgccactc ctgaacccta taccacgtcg tcccgcagtc ttagcataca agagatgcgt
3181 tcccaccctc gtctggttct tcggttctag agcagagaag aatttatgca ggcctgggag
3241 cgccttctat ctttcatgtg ggtgtctggg tgggtctcag ctcagagcac agctgggaac
3301 tggcctcctt tcccgtgac ctgtaataaa ctaggcaggt tgacgatagg attgaagatg
3361 aaagcacaag gcaagcgcgt gcttctgaaa ccctggaaga aaagccccac ccaccatgt
3421 ctacagggtg agggccttcc agctgctcat tttctgagtt gccactgtca caagttccca
3481 ggtaggacct tctgtggctt cccagggact cccagctgcc ggcttggggg cagtggaggg
3541 aggcagctgt agaaaggaag atctgatggg cattcagaag ccaggttttt ctgcagtgtt
3601 aaagtaaata cggggttccc tctctggctg acaagtgcta agagtgtagg gtgaggtccg
3661 ggttggaggg gtcaagcctt agaacttggg agctgagaaa tcaacttttt ggtttaagat
3721 agttgatcca agaccagag gagctgagtg actttttcaa catcacagca gaggcagaac
3781 tggggccaga actcagcttt catgattctc agtgcttagt ctcttcccca gacatccggg
3841 ggtctcccaa gatgtctcag acccctgggt gccttggatc ccaggtcctc ggtcctcttc
3901 ttccccagag agtctccctc cagtgtcccg accttcacct gtgggttctg ggtcttgcac
3961 ctgtcaggca ggagttcaag gatcattgtc gccagataat aatagtcagg atctcaggga
4021 ccctgaggtg aaaagtgtc gagatgagct gtcatgatg tagaagggtt ggccggggcc
4081 ccagatgagg tagtgacatt gagcatggct gtgggcagca ctgggtgttc tgggaaggca
4141 ggagggacat gcccttgggg gaagggggcg ctccctgtct gtgctatgcc cgtgtgtgtg
4201 tgtgtgtgtg tgcattgagc tacgtgtgat tatgggtatg tgccgtgaga cactgtgtga
4261 cactctggca tgtctgcagt taggtttaag ggtgttctag agccaggaaa tcacaaaaga
4321 gaaagctttc aaggaaactga agccatcaga caagaggagg gaaagtccag cagacagggt
4381 cactctggca gaggtttccg ggtgcaacac aaaagagaga gcatgagtta tggaccattt
4441 tgtgtgggtt cgtgtctggg ctctgctact gaccagacat gtgacctggg aaaagtcacc
4501 tacctctgtg gtcttccctt tgcccatgag tgaatggga aaaatctctc cctcctcccc
4561 gtggcaggta tgactccctt taacgatccc cacttttctg cagaatgaaa gactgaagtc
4621 tgaggcaaca ggtgactcct tggatcactg cggccagctc actgggtccc tggcaagagt
4681 gggggcctgg tctttggcag atggctccca ttagagattc tcaccgtcag tactgggaaa
4741 aacagggagg cagagcaaaa taagcaagcg ctttctgagc ctgagagctg ttcagactag
4801 aaaagctgtc acatggagta gtgagcctcc tgaagctgga agtattttaag cggccaaagg
4861 atgatcctcg ggcaggaaagc tgcagagatg gtcccctgca tggactacat tttgagtcac
4921 tcagacctga tttcagctcg gctcatctgc agcccagcta tgtgatattg agctaggacc
4981 tcatactcct tagcctctgt tccctcatat ataaaatggg gataatacat caccaaaggg
5041 aagtgcgaag ggagagccta gcgtgggcct ggccacagc acatactcca caaatccttt
5101 agccccctg ctcctccctg ctccacgggt acacgtctag tcacttttgc tcccaacagc
5161 ttagagcaaa tggggggcag gccaggtacc atgcagatgt ttttcccttc agcctttcac
5221 agtaacaatg aagcagatga tgatgctaaa aatagtaata gcaagctttt ataggacact
5281 tcctgtgtga ccctcagcct ataccatctc attcaattta atcctcacac ttctataggg
5341 agggactcgt tatccctatt ccttggatgg ggagactgaa gcacagagag gtgaagcgaa
5401 ttgccacagt cacacagcta gcaactggga ggggtgtgat ttgaacttga gtctggccac
5461 ctcttgaccc ctgtgtctaa ctcaagccct cctgttacc ctcaggtctt tcacaggtca
5521 tcccagagacc ctggagaaat ttgacaagtt caagcacctg aagacagagg ctgagatgaa
5581 ggctcccgag gacctgaaga agcatggcaa caggtgtctc acggccctgg ggggtatcct
5641 gaagaaaaag ggtcaccatg aggcagagt gaagcacctg gccgagtcac atgccaacaa
5701 gcacaagatc cctgtcaagt acctggag gtgagtggcggg tcccgggtgg ctgggaggat
5761 ggaaggggag gcctcgaaga cctgagattt gggttcaagt cccagctcag ttataacttg
5821 ctgagtgacc tatgtgttct ctctttatcc cccagttttc tcactgttaa agtgggctgc
5881 taccacttg gccttccctc tgggtcattg agagtaaaca tatttttccc ccaaagagt
5941 atcttattac caagagagaa gtgactgtga agtacacagc ttgccttctg tctacgggta
6001 ggcaccacta tcccaccctc tcgacagatg aggaaactga ggcacagaga ggttaagcag
6061 cttgcccctg gtcacagagg caccaagtag cagaaccagg attcagacta ggtctctatt
6121 cctccagaaa cccagctcct agtctctgtg ccaactgcaag ttggacatac acaggactca
6181 tgtggcagga gttcagtagc tggggcttaa ttctgggtgg gaattattag ttccagcatc
6241 tttacggatg aagagagggc gcctcaggtg tccaaggcat aagcaattgg cttgaatctc
6301 ctgtgatgga ctgagaagtt ggggtggctg gggagagtct gagtttcaag tcctgtgtct
6361 agaccagtg ggtggaggga tatggcaaga aggagaacta ggaaactggg ggataaaagg
6421 ccctgaggct atcacccccg aggatggggc cacaggcagt ttggtgcagc agtgaaggta

```



```

6481 aggttagtca tgaaaacttc tggtaggat gggctatgag aagcagtttg catgggtcac
6541 tgcattggaac tttcacgatt acccccatga gcttaggaac tgcattcagt gttgtctttt
6601 tctcttaca aagaagttca gaggtcagga gccagagct ggtgtgggag ccccataggt
6661 accggggatg caggctcttt ctgtgttggc atccttggca taaatatggg gtctaccctc
6721 aaagttgact cgtggtccaa gatagctgct ggagctccag ccttctggtc catattccaa
6781 acagagagca ggaggaagag acaaaggctg tcttttgaga aaccccaggc atctcaccta
6841 acagtgttat ttacatctca ctgtccaaaa gttagtcatg agatcatgtc tatctgtgtg
6901 gaaagctggg aaatgtagtc tattgccact ccaaatacaa actagtgttc tcttacaagg
6961 aagaaggtga aaatggccat tgggcaggta aacagcattc tcttcccag gcagggactc
7021 ttctcatccc cactttactg atttggaac tgaaggctca gagagggtga gtagcttgct
7081 cccagtcaca cagcatataa gccaggaggg acagtctgat ctatgttatt ctggaacttg
7141 cgctcttaat tcctcatggt gcaacgtctc ctgtgaacaa ccaccatcac cattgtcttc
7201 agccccacca tccagctccc ctgcttgccc tcccaaaggt tactgtgaaa ctgttagcta
7261 ctcagttgtg tctgactctt tgtgaccctc tggactgtag cctgtcagtc cagcctcctc
7321 tgtctatgga attctccagg caagaatact ggagtgggtt gccatgccct cctccagggg
7381 atctcgaacc caggtctcct gcattgtaag cagattcttt accctctgaa ctaccggaga
7441 agccccacct gctctccgc atcacacaca aacaattctg cctgccatc tcagcatcac
7501 agacatgagg aacagttcct gcccctggga ttctgcacaa atggtgcttt cgctcccca
7561 tcttctctcg gcaaatccct gttcattctc caaggccag cgcagaagcc acctcttcag
7621 ttctggccca cgaggcagtc agctgtctca cctgccagcc ctcccagca aaggcattta
7681 tttcagccct gccgtggcgc ctgccggctg tattgtaatt tatctcttta cccagctgtc
7741 tcttggtgg gacaggagct cctcaaggct agaccctggc ttctccata tttgaacccc
7801 agtgacaggg agggggctca caaacagctc tgaatgatgg atcccatctc cagggaggag
7861 cagacaggct tagagagaaa ccagtgcggt ctagaaatag gactgccagc tagcagacta
7921 gaaccgggtc tacttaaaac aagtttgaaa agaaagtgga agtgaagtca ctcagtcgtg
7981 tccaattctt tgcgacccca tggactgtag cccatcaggc ttctccatct atggaatttt
8041 ccaggcaaga gtactggagt ggttgccatt tcttctcca ggggatcttc ctgaccagg
8101 gatcaaacc aggtctcccg cattgcaggt agacgttta ccatctgagc tactgcaaaa
8161 aattaagaca gcgccccgcg tctgtgttcc ctttactgt ggaacctttg tctatgttct
8221 tcatgagaaa ttgtctcttc tcatccatta gcaagggggc cccagagggt gctgggtgct
8281 gaagtctttt ctcagtcttc tagctgcccc agcccacaat tttcctagta ttagtgactc
8341 agaagttgac tcaggaaaagg ctgaattgag ggacccaaag gagtccagat ctctgtctta
8401 catgtgaggt catccgtgga ggtcaggggt gaactgggcc tggaacctgg gtctccaagt
8461 tctcgctagg tcagcccatc cctcacttg gctttgttac gtttatgaca ttaaaagga
8521 attaaacaca tgtccccccc gatgccagc agtgggtgtc tgtggcgctg tcttggttc
8581 tggccaagcg gggtttacta ggtgtgaca tttgtgtctc tgaggctgcc ctgcacgtgc
8641 tcccctcacc cccacccatc agcttttggc cacttgtagc ctggatgccg gagaatatga
8701 acaaaccac cagtgtgggc ctctgtctcc ctggtctgg ctgttgtttg tccacagtcc
8761 cctgggtgca gattccagct ctcccacca ctgcaacat gacctcagtc tggcctctgt
8821 aaaatgacac ccctgtcca caggccaggg ctgaaattgg catcaaatct tctgaactg
8881 ttgaaaaagc aagtagcttc ttactatata aggttgctca gtcccttaaa gcagccctgt
8941 gctgtggaga tgtttgcacc catctttctg ggcagacaa tgtggatggt agagccaaca
9001 gtgatggtga ggctgtgta acatatgatc agtcttgggc ccaagcatag ggctgggtcc
9061 tttctcttcc ctctctctcc ttctcttcca ccaatgcttc tgaggaccag ctccgtgctt
9121 ggcgagaaaa ataagatgtt ctgatcccc tcccgccact atccctccaa aaggctactg
9181 aaagagatca ccatcctaag ccattaaatg caaaaattaa atccacacac atggaagtat
9241 tttctagact ttctgattgc aaaatcctgg attagaacca tgtaataggt tgggtcctca
9301 tctgagctg aacctccaat acctgggcta tctgatgtgg agagccaact catgggaaaa
9361 gatcttgatg ctgggaaaga ttgagggcag gagaaggggc aacagaggat gaaatggtta
9421 gatggcatca ttgactcaat ggacaggagt ttgagcacat acagggagat agtgaaggac
9481 agggaaagcct tgcgtgctgc cgtccatggg gttgcaaaga gtctgacagg actgagtgac
9541 tgaacaataa aacatcctga acatagtaga ggggggtagc gtgtatgcat gctaagtcgc
9601 ttcagtcatg tccaattctg tgaccctagg gactgtagcc catctctgtc catgggattc
9661 tccaagcaag aatcctggag tgggttgcca tgctctctc caggggattt tcccaacca
9721 gcgactgaac ccatgtcttc tgcactctca gcactgcagg tggattcttt actctgagcc
9781 acctgggaag cccctgggtg ggggtggggg tagccaaccc accaagccat gtgactgtga
9841 ccacaagccc aaggcctgac ctttctctct ctgtattaag atgggcctct attatcccat
9901 ctgtacttat ctcatgggtt gtggggatta gaggagttaa tccatggagg ccgctcagaa
9961 gtgtgcctga tatataataa atactcagta aatggccctg caataaagca aagctggggc
10021 tgggggtgat tcccatctgg cccctggctt gtccctgccag tgaccagcac ccctctgctc

```

```

10081 ctgtccctgc agttcatctc ggacgccatc atccatgttc tacatgcaa gcacccctca
10141 gacttcggtg ctgatgccca ggctgccatg agcaaggccc tggaaactgtt ccggaatgac
10201 atggctgccc agtacaaggt gctgggcttc catggc taag cccaccctt gtgcccctca
10261 cccacccac ctgggcaggg tgggcgggga ctgaatcca agtagttata gggtttgctt
10321 ctgagtgtgt gctttgttta ggagagggtg gtggaagagg tggatgggtt aggggtggag
10381 ggagccttg gagaggcctg gggaccaggc ttccagtga gggtcatcaa cttgggaacc
10441 atgagaagct tgactgtggc tggctgagtc tgggtcaaac tcaactttcc ttccacctca
10501 atgccaaccc aattcctacc aacctctaaa ctgacctgca cctttaccct caccttaaat
10561 cccaatccg agctgtcaac ataaactcca gcctaattct ctgaccccat caccagccc
10621 cttgaagaca gcagagtgtc ttgcttgccc tgagaaggaa gtgtgggccc ggtgggacgg
10681 ccacaccag ccctagggag gcatggaggc atgggtgtctg caacataaat gtcccttctc
10741 aggtagggga gtgacacctg gtttaataaa ggatttctca catc

```

#### Locus: NM\_173881

```

1 cagctgtcgg agacagacac ccagtcagtc ccgcccttgt tctttttctc ttcttcagac
61 tgcgccatg ggctcagcga cggggaatgg cagttgggtc tgaatgcctg ggggaagggtg
121 gaggtgatg tcgcaggcca tgggcaggag gtccctcatca ggctcttcac aggtcatccc
181 gagaccctgg agaaaatttga caagttcaag cacctgaaga cagaggctga gatgaaggcc
241 tccgaggacc tgaagaagca tggcaacacg gtgtcacgg ccctgggggg tatcctgaag
301 aaaaagggtc accatgaggc gaggtgaag cacctggccg agtcacatgc caacaagcac
361 aagatccctg tcaagtacct gga gttcatc tcggacgcca tcatccatgt tctacatgcc
421 aagcatcctt cagacttcgg tgctgatgcc caggctgcca tgagcaaggc cctggaactg
481 ttccggaatg acatggctgc ccagtacaag gtgctgggct tccatggcta agccccaccc
541 ctgtgcccct cccccaccc acctgggcag ggtgggcggg gactgaatcc caagtagtta
601 tagggtttgc ttctgagtgt gtgctttgtt taggagaggt gggtggaaga ggtggatggg
661 ttaggggtgg agggagcctt gggagaggcc tggggaccag gctttcagtg gaggtgcat
721 caacttgga accatgagaa gcttgactgt ggctggctga gtctgggtca aactcaactt
781 tcctttcacc tcaatgcaa cccaattcct accaacctct aaactgacct gcacctttac
841 cctcacctta aatccccaat ccgagctgtc aacataaact ccagccta at tctctgacct
901 catcaccag ccccttgaag acagcagagt gtcttgcttg ccctgagaag gaagtgtggg
961 ccgggtggga cggccacacc cagccctagg gagcatgga ggcattgtgt ctgcaacata
1021 aatgtccctt ctcaggtagg ggagtgcac ctggtttaat aaaggatttc tcacatc

```

#### Locus: NP\_776306.1

```

1 mglsgewql vlnawgkvea dvaghgqevl i rlfthpet lekfdkfkhl kteaemkase
61 dlkkhgntvl talggilkkk ghheaevkhl aeshankhki pvkylefisd aihvlhakh
121 psdfgadaqa amskalelfr ndmaaaykvl gfhg

```

**ANEXO 2:** Secuencias del gen Glutation S-Transferasa Pi 1 (GSTP1) bovina (NC 007330), tomada de GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En amarillo se resalta la zona amplificada, el ARNm en azul y los SNPs encontrados en verde.

**Nombre:** Glutation S-Transferasa Pi 1 (GSTP1) [*Bos taurus*]

**Cromosoma:** 29

**GenID:** 280695

**Locus:** NC\_007330

1	gggtcaggcc	gccgcccagc	gcgctggagc	tttgetgccc	ccgccacctt	taccgacttc
61	cccgaactcca	gga	gtgagtt	ccccgttgcc	tggggctccc	agggattccg
121	ccagggtggt	tgggggggca	ggtgggggtc	tcgagggggc	gggctagagc	gccagagacc
181	ggggatggga	cccccgggga	ggacggggca	gtgtcgtctc	ccccggaaca	ggcctctccc
241	g	ccgctaact	ggcttctttg	tgcattcctgc	agtgcctccc	tacaccatcg
301	gggtcaaggt	agggacctgg	gacggggggg	gtggggcggg	aggggagcca	gaagttgagg
361	gctgcagccc	acacccccgt	tttttccct	ggcatcacgt	ggctactaac	tcgagctccc
421	ttcctggggc	ccggagctgc	ccgggctagc	gtacttctag	cctcccggcc	ttggcccggc
481	cctccgccgt	gtgctgtgag	gtcttccgag	cagt	ccccag	cccccttggc
541	ggcactgccc	accctcattg	ccccgtcctc	ccctccctca	gggcgtcgcc	agggcatgcy
601	catgtgtgctg	gccgaccagg	gccagagctc	gaaggaggag	gtcgtatgcc	tgcagagctg
661	gctgcagggc	ccactcaagg	cctcctgctg	gagtactttt	gtcccgtccc	cggctcaggg
721	gctggacctt	gtggggggcg	gtgggaggcg	caacactggg	gtgaggggca	cccagactca
781	gcgtctctga	cagagctgtg	cgtcccccca	gctgtacggg	cagctcccca	agttccagga
841	cggagacctc	acgctgtacc	agtccaatgc	catcctgcgg	cacctggggc	gcacctcggg
901	tgagtccctg	cactacaagt	ggctcagccc	aggctggggc	ggcaggcatc	agccagcctt
961	cctgagcacc	tgctgagcct	cctccatgtc	aatcaaactc	cccagccacc	ctgtggaatg
1021	gaggcgtgtg	gaggttatct	agggcttgcc	tggtagctca	gttggtaaag	aatctacctg
1081	caatgcagga	gaccccggtt	ccattcctgg	gtcaggaaga	taccctggcg	aagggatagg
1141	ctaccactc	tagtattctt	gggcttcctt	tgtggctcag	ctggtaaaga	atccacctgc
1201	agtgtcggag	acctgggttc	gatccctgag	ttgggaagat	ccctgcctta	gagtggggcc
1261	acctgccctg	aattccgggc	gcgactcag	cccctttctt	cctgcgcata	ctcctccctc
1321	ctgcctggcc	cagggggcacg	ggcagccaca	tggcctggct	gcagggcgct	ggggggcat
1381	gttgccgtgg	ctttcaggct	cccactcatg	ccctctgctc	tcccgccacc	ccagggtgt
1441	atgggaagga	ccagcaggag	gcggccctgg	tggacatggt	gaatgacggt	gtagaggacc
1501	ttcgtgcaa	atacgtctcc	ctcatttaca	ccaactacgt	aagcgcaggc	gtcgggggtg
1561	acacggagga	caaagaaaaga	aaggggcttt	ttccttctca	ccctatactg	ccccctctt
1621	gtggctctgg	ctgatccccg	cctgggggtc	cttctgggtc	tgggtggggg	ggtgggaatc
1681	aagagccact	gtagaccaga	cacaccttcc	tgcctccctg	cctgggggag	ggactgggtc
1741	ggtagcagtg	cactgcagaa	cgggtgctag	acaggagacg	accagcagag	ggtggttccc
1801	tgatcctcag	cccggggagg	tcaggagggc	ttcctggagc	aggtgcagaa	ggaggagctt
1861	ctggaaggga	tgctggtact	ttcggatgca	cgaagtgtgc	aggcgcaggg	cacatctggg
1921	cacttgggag	cagtttccga	gaggcagggg	gtgcctctgt	gtgcgagcaa	atgagagtgt
1981	caggagatga	atggagctgg	agggacagca	ggcccgtctc	tgaaggcctc	ggccagctgg
2041	cttgagatg	cgctttgggg	ggtctaagca	gggcgggtgc	tgtgcgatct	ggaaagatcc
2101	tgtgaggctt	ttgcaaggct	ggggagcgat	catgacaaga	ctggacaaga	ggagactcag
2161	cctctgaaat	ggacaggatg	tggcaatagc	ctggggggag	gtgaggagag	cagggcaggg
2221	ctgggcgagt	ggccatcctc	tcacccccgg	gggcggggac	gggacgcgac	gggatggcag
2281	catgccaggg	ccaggaggat	gatacccagc	ggcctctctc	tggcaggagg	caggcaagga
2341	ggactatgtg	aaggcgctgc	cccagcacct	gaagcctttc	gagaccctgc	tgtcccagaa
2401	caagggtggc	caggccttca	tctgtgggca	ccaggtgagc	tggccccacc	ccgccccttc
2461	tgcaccccg	tctgtccaga	tggcacagcc	gtgcagagac	agcacgggag	tcatgggttc
2521	agcaaagctg	gggactgcct	tgggcgcctt	gccccccaac	tcccacgccc	cctgagtcct
2581	atcctgtctt	gccctgcaga	tctcctttgc	ggactacaac	ctgctggacc	tgcttcggat
2641	tcaccaggtc	ctggccccca	gctgtctgga	ctccttcccc	ctgctctcag	cctacgtggc
2701	ccgtctcaac	tcccggcccc	agctcaaggc	cttcttggcc	tcccggggac	acatgaaccg
2761	gcccataaac	ggcaatggga	aacagtga	gcttgtggca	ctctctgcgc	gaggcagggg
2821	gctgcctggt	cttcctttcc	ccaggaccaa	taaaacttcc	aagagagaa	

## Ovino

Query	1	GGCTCTTCACAGGTCATCCCGAGACCCTGGAGAAATTTGACAAGTTCAAGCACCTGAAGA	60
Sbjct	95	GGCTCTTCACAGGTCATCCCGAGACCCTGGAGAAATTTGACAAGTTCAAGCACCTGAAGA	154
Query	61	CAGAGGCTGAGATGAAGGCCTCCGAGGACCTGAAGAAGCATGGCAACACGGTGCTCACGG	120
Sbjct	155	CAGAGGCTGAGATGAAGGCCTCCGAGGACCTGAAGAAGCATGGCAACACCGTGCTCACGG	214
Query	121	CCCTGGGGGGTATCCTGAAGAAA-AAGGGTCACCATGAGGCAGAGGTGAAGCACCTGGCC	179
Sbjct	215	CCCTAGGGGGTATCCTGGA-AAAGAAGGGTCACCACGAGGCAGAGGTGAAGCACCTGGCC	273
Query	180	GAGTCACATGCCAACAAGCACAAGATCCCTGTCAAGTACCTGGAG	224
Sbjct	274	GAGTCACACGCCAACAAGCACAAGATCCCTGTCAAGTACCTGGAG	318

Query	1	GGCTCTTTCACAGGTCATCCCGAGACCCTGGAGAAATTTGACAAGTTCAAGCACCTGAAG	59
Sbjct	154	GGCTCTTTAAGGGTCACCCCGAGACCCTGGAGAAATTTGACAAGTTTAAGCACCTGAAG	212
Query	60	ACAGAGGCTGAGATGAAGGCCTCCGAGGACCTGAAGAAGCATGGCAACACGGTGCTCAGC	119
Sbjct	213	TCAGAGGATGAGATGAAGGCCTCTGAGGACCTGAAGAAGCACGGCAACACGGTGCTGACT	272
Query	120	GCCCTGGGGGGTATCCTGAAGAAAAGGGTCACCATGAGGCAGAGGTGAAGCACCTGGCC	179
Sbjct	273	GCCCTGGGGGGCATCCTTAAGAAGAAGGGGCATCATGAGGCAGAGCTGACGCCCTGGCC	332
Query	180	GAGTCACATGCCAACAAGCACAAGATCCCTGTCAAGTACCTGGAG	224
Sbjct	333	CAATCGCATGCCACCAAGCACAAGATCCCTGTCAAGTACCTGGAG	377

**Humano**

ref|NM\_005368.2| Homo sapiens myoglobin (MB), transcript variant 1, mRNA  
 Length=1078  
 Score = 251 bits (278), Expect = 2e-64  
 Identities = 190/224 (84%), Gaps = 0/224 (0%)  
 Strand=Plus/Plus

```

Query   1      GGCTCTTCACAGGTCATCCCAGAGACCCTGGAGAAATTTGACAAGTTCAAGCACCTGAAGA   60
          ||||| | | |||| | | |||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| |
Sbjct   175     GGCTCTTTAAGGGTCACCCAGAGACTCTGGAGAAGTTTGAACAAGTTCAAGCACCTGAAGT   234

Query   61      CAGAGGCTGAGATGAAGGCCTCCGAGGACCTGAAGAAGCATGGCAACACGGTGCTCACGG   120
          ||||| | ||||| | |||| | | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| |
Sbjct   235     CAGAGGACGAGATGAAGGCGTCTGAGGACTTAAAGAAGCATGGTGCCACCGTGCTCACCG   294

Query   121     CCCTGGGGGGTATCCTGAAGAAAAAGGGTCACCATGAGGCAGAGGTGAAGCACCTGGCCG   180
          ||||| | | |||| | |||| | |||| | ||||| | ||||| | |||| | |||||
Sbjct   295     CCCTGGGTGGCATCCTTAAGAAGAAGGGGCATCATGAGGCAGAGATTAAGCCCCTGGCAC   354

Query   181     AGTCACATGCCAACAAGCACAAAGATCCCTGTCAAGTACCTGGAG   224
          ||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| |
Sbjct   355     AGTCGCATGCCACCAAGCACAAAGATCCCCGTGAAGTACCTGGAG   398

```

**Ratón**

>ref|NM\_013593.2| Mus musculus myoglobin (Mb), mRNA  
 Length=1100  
 Score = 210 bits (232), Expect = 4e-52  
 Identities = 173/211 (81%), Gaps = 0/211 (0%)  
 Strand=Plus/Plus

```

Query   14      TCATCCCGAGACCCTGGAGAAATTTGACAAGTTCAAGCACCTGAAGACAGAGGCTGAGAT   73
          ||| | | ||||| | |||| | ||||| | |||| | |||| | |||| | |||| |
Sbjct   272     TCACCCTGAGACCCTGGATAAGTTTGACAAGTTCAAGAACTTGAAGTCAGAGGAAGATAT   331

Query   74      GAAGGCCTCCGAGGACCTGAAGAAGCATGGCAACACGGTGCTCACGGCCCTGGGGGGTAT   133
          ||||| | | ||||| | |||| | |||| | |||| | |||| | |||| | |||| |
Sbjct   332     GAAGGGCTCAGAGGACCTGAAGAAGCATGGTTGCACCGTGCTCACAGCCCTGGGTACCAT   391

Query   134     CCTGAAGAAAAAGGGTCACCATGAGGCAGAGGTGAAGCACCTGGCCGAGTCACATGCCAA   193
          ||||| | | |||| | |||| | |||| | |||| | |||| | |||| | |||| |
Sbjct   392     CCTGAAGAAGAAGGGACAACATGCTGCGAGATCCAGCCTCTAGCCCAATCACACGCCAC   451

Query   194     CAAGCACAAAGATCCCTGTCAAGTACCTGGAG   224
          ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| |
Sbjct   452     CAAGCACAAAGATCCCGGTCAAGTACCTGGAG   482

```

**ANEXO 4:** Alineamiento de la secuencia proteica de la mioglobina bovina con los de otras especies (BLAST), en amarillo se marca la sección de la proteína codificada por el segmento amplificado.

### Búfalo

[sp|P84997.2|MYG\\_BUBBU](#) RecName: Full=Myoglobin Length=154  
Score = 303 bits (777), Expect = 3e-81, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 151/154 (99%), Positives = 152/154 (99%), Gaps = 0/154 (0%)

```
Query 1 MGLSDGEWQLVLNAWGKVEADVAGHGQEVLRIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASE 60
      MGLSDGEWQLVLNAWGKVE DVAGHGQEVLRIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASE
Sbjct 1 MGLSDGEWQLVLNAWGKVETDVAGHGQEVLRIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASE 60

Query 61 DLKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAEVKHLAESHANKHKIPVKYLEFISDAIIHVLHAKH 120
      DLKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAEVKHLAESHANKHKIPVKYLEFISDAIIHVLH KH
Sbjct 61 DLKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAEVKHLAESHANKHKIPVKYLEFISDAIIHVLHDKH 120

Query 121 PSDFGADAQAAMSKALELFRNDMAAQYKVLGFHG 154
      PSDFGADAQAAMSKALELFRN+MAAQYKVLGFHG
Sbjct 121 PSDFGADAQAAMSKALELFRNEMAAQYKVLGFHG 154
```

### Ovino

[ref|NP\\_001072126.1|](#) myoglobin [Ovis aries]  
[gb|ABJ97274.1|](#) myoglobin [Ovis aries] Length=154  
[GENE ID: 780509 LOC780509](#) | myoglobin [Ovis aries] (10 or fewer PubMed links)  
Score = 301 bits (771), Expect = 1e-80, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 150/154 (98%), Positives = 151/154 (99%), Gaps = 0/154 (0%)

```
Query 1 MGLSDGEWQLVLNAWGKVEADVAGHGQEVLRIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASE 60
      MGLSDGEWQLVLNAWGKVEA VAGHGQEVLRIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASE
Sbjct 1 MGLSDGEWQLVLNAWGKVEAGVAGHGQEVLRIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASE 60

Query 61 DLKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAEVKHLAESHANKHKIPVKYLEFISDAIIHVLHAKH 120
      DLKKHGNTVLTALGGIL+KKKGHHEAEVKHLAESHANKHKIPVKYLEFISDAIIHVLHAKH
Sbjct 61 DLKKHGNTVLTALGGILEKKKGHHEAEVKHLAESHANKHKIPVKYLEFISDAIIHVLHAKH 120

Query 121 PSDFGADAQAAMSKALELFRNDMAAQYKVLGFHG 154
      PSDFGADAQ AMSKALELFRNDMAAQYKVLGF G
Sbjct 121 PSDFGADAQGAMSKALELFRNDMAAQYKVLGFQG 154
```

### Equino

[ref|NP\\_001157488.1|](#) myoglobin [Equus caballus]  
[sp|P68083.2|MYG\\_EQUBU](#) RecName: Full=Myoglobin  
[sp|P68082.2|MYG\\_HORSE](#) RecName: Full=Myoglobin  
Length=154  
[GENE ID: 100054434 MB](#) | myoglobin [Equus caballus] (10 or fewer PubMed links)  
Score = 279 bits (713), Expect = 9e-74, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 136/154 (89%), Positives = 144/154 (94%), Gaps = 0/154 (0%)

```
Query 1 MGLSDGEWQLVLNAWGKVEADVAGHGQEVLRIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASE 60
      MGLSDGEWQ VLN WGKVEAD+AGHGQEVLRIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASE
Sbjct 1 MGLSDGEWQQVLNVWGKVEADIAGHGQEVLRIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASE 60

Query 61 DLKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAEVKHLAESHANKHKIPVKYLEFISDAIIHVLHAKH 120
```

```

Sbjct 61 DLKKKHG VLTALGGILKKKGHHEAE+K LA+SHA KHKIP+KYLEFISDAIIHVLH+KH 120
          DLKKHGTVLTALGGILKKKGHHEAELKPLAQSHATKHKIPIKYLEFISDAIIHVLHSHK
Query 121 PSDFGADAQAAMSKALELFRNDMAAQYKVLGFHG 154
          P DFGADAQ AM+KALELFRND+AA+YK LGF G
Sbjct 121 PGDFGADAQGAMTKALELFRNDIAAKYKELGFQG 154

```

## Porcino

[ref|NP\\_999401.1|](#) myoglobin [Sus scrofa]  
[sp|P02189.2|MYG\\_PIG](#) RecName: Full=Myoglobin  
[gb|AAA31073.1|](#) myoglobin [Sus scrofa]  
 Length=154  
[GENE ID: 397467 MB](#) | myoglobin [Sus scrofa] (10 or fewer PubMed links)  
 Score = 276 bits (705), Expect = 7e-73, Method: Compositional matrix adjust.  
 Identities = 136/154 (89%), Positives = 142/154 (93%), Gaps = 0/154 (0%)

```

Query 1 MGLSDGEWQLVLNNAWGKVEADVAGHGQEVLI RLF GHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASE 60
          MGLSDGEWQLVLN WGKVEADVAGHGQEVLI RLF GHPETLEKFDKFKHLK+E EMKASE
Sbjct 1 MGLSDGEWQLVLNVWGKVEADVAGHGQEVLI RLF KGHHPETLEKFDKFKHLKSEDEMASE 60

Query 61 DLKKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAEVKHLAESHANKHKIPVKYLEFISDAIIHVLHAKH 120
          DLKKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAE+ LA+SHA KHKIPVKYLEFIS+AII VL +KH
Sbjct 61 DLKKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAELTPLAQSHATKHKIPVKYLEFISEAIIQVLQSKH 120

Query 121 PSDFGADAQAAMSKALELFRNDMAAQYKVLGFHG 154
          P DFGADAQ AMSKALELFRNDMAA+YK LGF G
Sbjct 121 PGDFGADAQGAMSKALELFRNDMAAKYKELGFQG 154

```

## Conejo

[sp|P02170.2|MYG\\_RABIT](#) RecName: Full=Myoglobin  
 Length=154  
 Score = 275 bits (703), Expect = 1e-72, Method: Compositional matrix adjust.  
 Identities = 136/154 (89%), Positives = 143/154 (93%), Gaps = 0/154 (0%)

```

Query 1 MGLSDGEWQLVLNNAWGKVEADVAGHGQEVLI RLF HPETLEKFDKFKHLK+E EMKASE 60
          MGLSD EWQLVLN WGKVEAD+AGHGQEVLI RLF HPETLEKFDKFKHLK+E EMKASE
Sbjct 1 MGLSDAEWQLVLNVWGKVEADLAGHGQEVLI RLF HTHPETLEKFDKFKHLKSEDEMASE 60

Query 61 DLKKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAEVKHLAESHANKHKIPVKYLEFISDAIIHVLHAKH 120
          DLKKKHGNTVLTALG ILKKKGHHEAE+K LA+SHA KHKIPVKYLEFIS+AIIHVLH+KH
Sbjct 61 DLKKKHGNTVLTALGAILKKKGHHEAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLEFISEAIIHVLHSHK 120

Query 121 PSDFGADAQAAMSKALELFRNDMAAQYKVLGFHG 154
          P DFGADAQAAMSKALELFRND+AAQYK LGF G
Sbjct 121 PGDFGADAQAAMSKALELFRNDIAAQYKELGFQG 154

```

**ANEXO 5:** Alineamiento de la secuencia proteica de la Glutation S-Transferasa Pi 1 (GSTP1) bovina con los de otras especies (BLAST), en amarillo se marca la sección de la proteína codificada por el segmento amplificado.

### Equino

ref|XP\_001498156.1| PREDICTED: similar to glutathione S-transferase, class-pi [Equus caballus]  
Length=210

GENE ID: 100053249 LOC100053249 | similar to glutathione S-transferase, class-pi [Equus caballus]

Score = 404 bits (1037), Expect = 4e-111, Method: Compositional matrix adjust.

Identities = 192/210 (92%), Positives = 204/210 (98%), Gaps = 0/210 (0%)

Query	1	MPPYTIVYFPVQGRCEAMRMLLADQGQSWKEEVVAMQSWLQGPKLASCCLYGQLPKFQDGD	60
		MPPYTIVYF V+GRCEAMRMLLADQGQSWKEEVV + +W+QGPKLASCCLYGQLPKFQDGD	
Sbjct	1	MPPYTIVYFSVRGRCEAMRMLLADQGQSWKEEVVTVDTWMQGPLKASCCLYGQLPKFQDGD	60
Query	61	LTLYQSNAILRHLGRSLGLYGKDDQEAALVDMVNDGVEDLRCKYVSLIYTNYEAGKEDYV	120
		LTLYQSNAILRHLGR+LGLYGKDDQEAALVDMVNDGVEDLRCKYV+LIYTNYEAGKEDYV	
Sbjct	61	LTLYQSNAILRHLGRSLGLYGKDDQEAALVDMVNDGVEDLRCKYVTLIYTNYEAGKEDYV	120
Query	121	KALPQHLKPFETLLSQNKGGQAFIVGDQISFADYNLLDLLRIHQVLAPSCCLDSFPLLSAY	180
		KALP HLKPFETLLSQN+GGQAFIVG+QISFADYNLLDLL IHQVLAPSCCLDSFPLLSAY	
Sbjct	121	KALPGHLKPFETLLSQNQGGQAFIVGNQISFADYNLLDLLLIHQVLAPSCCLDSFPLLSAY	180
Query	181	VARLNSRPKLKAFLASPEHMRNPINGNGKQ	210
		VARL++RPKLKAFLASPEH+N PINGNGKQ	
Sbjct	181	VARLSARPKLKAFLASPEHVNLPINGNGKQ	210

### Perro

ref|XP\_537961.2| PREDICTED: similar to Glutathione S-transferase P (GST 7-7) (Chain 7) (GST class-pi) [Canis familiaris]  
Length=231

GENE ID: 480844 LOC480844 | similar to Glutathione S-transferase P (GST 7-7) (Chain 7) (GST class-pi) [Canis lupus familiaris]

Score = 397 bits (1021), Expect = 3e-109, Method: Compositional matrix adjust.

Identities = 187/210 (90%), Positives = 203/210 (97%), Gaps = 0/210 (0%)

Query	1	MPPYTIVYFPVQGRCEAMRMLLADQGQSWKEEVVAMQSWLQGPKLASCCLYGQLPKFQDGD	60
		MPPYTI YFPV+GRCEAMRMLLADQGQSWKEEVV M++W++G LKASCCLYGQLPKFQDGD	
Sbjct	22	MPPYTITYFPVRGRCEAMRMLLADQGQSWKEEVVMTMETWMKGSCLKASCCLYGQLPKFQDGD	81
Query	61	LTLYQSNAILRHLGRSLGLYGKDDQEAALVDMVNDGVEDLRCKYVSLIYTNYEAGKEDYV	120
		LTLYQSNAILRHLGR+LGLYGKDDQEAAL+D+VNDGVEDLRCKY LIYTNYEAGKE+YV	
Sbjct	82	LTLYQSNAILRHLGRSLGLYGKDDQEAALLDVNDGVEDLRCKYALLIYTNYEAGKEEYV	141
Query	121	KALPQHLKPFETLLSQNKGGQAFIVGDQISFADYNLLDLLRIHQVLAPSCCLDSFPLLSAY	180
		KALP +LKPFETLLSQN+GGQAFIVG+QISFADYNLLDLL IHQVLAPSCCLDSFPLLSAY	
Sbjct	142	KALPGYLKPFETLLSQNEGGQAFIVGNQISFADYNLLDLLLIHQVLAPSCCLDSFPLLSAY	201



Query 181 VARLNSRPKLKAFSLASPEHMNRPINGNGKQ 210  
 VARL++RPKLKAFSL+SPEH+NRPINGNGKQ  
 Sbjct 202 VARLSARPKLKAFSLSSPEHVNRPINGNGKQ 231

### Humano

[gb|AAH10915.1|](#) Glutathione S-transferase pi 1 [Homo sapiens]  
 Length=210  
 Score = 386 bits (992), Expect = 8e-106, Method: Compositional matrix  
 adjust.  
 Identities = 182/210 (87%), Positives = 198/210 (95%), Gaps = 0/210 (0%)

Query 1 MPPYTIVYFPVQGRCEAMRMLLADQGQSWKEEVVAMQSWLQGPKLKASCLYGQLPKFQDGD 60  
 MPPYT+VYFPV+GRC A+RMLLADQGQSWKEEVV +++W +G LKASCLYGQLPKFQDGD  
 Sbjct 1 MPPYTVVYFPVRGRCAALRMLLADQGQSWKEEVVTVETWQEGSLKASCLYGQLPKFQDGD 60

Query 61 LTLYQSNAILRHLGRTLGLYGKDDQEEAALVDMVNDGVEDLRCKYVSLIYTNYEAGKEDYV 120  
 LTLYQSN ILRHLGRTLGLYGKDDQEEAALVDMVNDGVEDLRCKYVSLIYTNYEAGK+DYV  
 Sbjct 61 LTLYQSNAILRHLGRTLGLYGKDDQEEAALVDMVNDGVEDLRCKYVSLIYTNYEAGKDDYV 120

Query 121 KALPQHLKPFETLLSQNKGGQAFIVGDQISFADYNLLDLLRIHQVLAPSCLDSPFLLSAY 180  
 KALP LKPFETLLSQN+GG+ FIVGDQISFADYNLLDLL IH+VLAP CLD+FPLLSAY  
 Sbjct 121 KALPGQLKPFETLLSQNQGGKTFIVGDQISFADYNLLDLLLIHEVLAPGCLDAFPLLSAY 180

Query 181 VARLNSRPKLKAFSLASPEHMNRPINGNGKQ 210  
 V RL++RPKLKAFSLASPE++N PINGNGKQ  
 Sbjct 181 VGRLSARPKLKAFSLASPEYVNLPINGNGKQ 210

### Rata

[ref|NP\\_036709.1|](#) glutathione S-transferase P [Rattus norvegicus]  
 Length=210  
[GENE ID: 24426 Gstp1](#) | glutathione S-transferase pi 1 [Rattus norvegicus]  
 (Over 10 PubMed links)

Score = 387 bits (993), Expect = 6e-106, Method: Compositional matrix  
 adjust.  
 Identities = 180/210 (86%), Positives = 200/210 (96%), Gaps = 0/210 (0%)

Query 1 MPPYTIVYFPVQGRCEAMRMLLADQGQSWKEEVVAMQSWLQGPKLKASCLYGQLPKFQDGD 60  
 MPPYTIVYFPV+GRCEA RMLLADQGQSWKEEVV + WLQG LK++CLYGQLPKF+DGD  
 Sbjct 1 MPPYTVVYFPVRGRCEATRMLLADQGQSWKEEVVTIDVWLQGSCLKSTCLYGQLPKFEDGD 60

Query 61 LTLYQSNAILRHLGRTLGLYGKDDQEEAALVDMVNDGVEDLRCKYVSLIYTNYEAGKEDYV 120  
 LTLYQSNAILRHLGR+LGLYGKDDQ+EAALVDMVNDGVEDLRCKY +LIYTNYE GK+DYV  
 Sbjct 61 LTLYQSNAILRHLGRSLGLYGKDDQEEAALVDMVNDGVEDLRCKYGTLIYTNYENGKDDYV 120

Query 121 KALPQHLKPFETLLSQNKGGQAFIVGDQISFADYNLLDLLRIHQVLAPSCLDSPFLLSAY 180  
 KALP HLKPFETLLSQN+GG+AFIVG+QISFADYNLLDLL +HQVLAP CLD+FPLLSAY  
 Sbjct 121 KALPGHLKPFETLLSQNQGGKAFIVGNQISFADYNLLDLLLVHQVLAPGCLDNFPLLSAY 180

Query 181 VARLNSRPKLKAFSLASPEHMNRPINGNGKQ 210  
 VARL++RPK+KAFSL+SP+H+NRPINGNGKQ  
 Sbjct 181 VARLSARPKIKAFSLSPDHLNRPINGNGKQ 210





# PUBLICACIONES

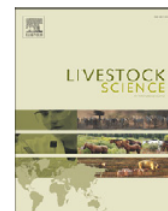
(relacionadas a esta tesis)





Contents lists available at ScienceDirect

Livestock Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/livsci](http://www.elsevier.com/locate/livsci)

Short communication

## Possible association of bovine chromosome 5 markers with growth and fat traits in Hereford cattle raised under extensive conditions

A. Rogberg-Muñoz<sup>a,\*</sup>, A. Prando<sup>b</sup>, L. Melucci<sup>c</sup>, E.E. Villegas-Castagnaso<sup>a</sup>, M.V. Ripoli<sup>a</sup>, P. Peral-García<sup>a</sup>, A. Baldo<sup>b</sup>, M.C. Añon<sup>d</sup>, G. Givambattista<sup>a</sup><sup>a</sup> Instituto de Genética Veterinaria (IGEVEV) CCT La Plata — Facultad Cs Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata — CONICET, Argentina<sup>b</sup> Cátedra de Zootecnia Especial (II Parte), Facultad Cs Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina<sup>c</sup> Unidad Integrada Balcarce (UIB) Facultad de Ciencias Agrarias (UNMDP) — EEA (INTA) Balcarce, Argentina<sup>d</sup> Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) CCT La Plata — Facultad Cs Exactas, Universidad Nacional de La Plata — CIC — CONICET, Argentina

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 March 2010

Received in revised form 31 May 2010

Accepted 1 June 2010

## Keywords:

Cattle

DNA markers

Fat

Growth

Pasture

## ABSTRACT

Bovine chromosome 5 has been widely studied because several QTLs have been detected there, in particular for growth and fat traits. Even though most of the beef is produced under pasture based conditions, only little research has focused on this kind of systems. Two QTL regions, neighboring the Myogenic factor 5 gene, and Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) gene, were selected. Within them, four BTA5 microsatellites (BP1, ETH10, IGF1 and RM029) were used to establish their association with growth and fat traits in a pasture based feeding system. The Estimated Breeding Values tested were: 400 (W400) and 600 Days Weight (W600), Rib Eye Area (REA), Rib Fat, Rump Fat, and Intra Muscular Fat. For growth traits significant associations ( $p \leq 0.05$ ) between BP1 and REA, and between IGF1 and W600, were detected. For fat traits significant association ( $p \leq 0.05$ ) between ETH10 and Rib Fat and Rump Fat was detected. When considering a pair of closer marker genotypes, IGF1/ETH10 was significantly associated ( $p \leq 0.05$ ) with W400 and W600. These results show that QTL for growth and fat traits that were previously reported in two regions of BTA5, are also expressed in a commercial pasture based system, where animals are not always fed to express their maximum genetic potential.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Different cattle management systems were recently tested searching for QTL (Hagen et al., 2005; Morris et al., 2009), and differences between post-weaning environments were found in the significance of some QTL. However, most research on DNA markers is done under conditions of intensive production; therefore, there is a need to establish the association of these markers in pasture based production systems.

Bovine chromosome 5 (BTA5) has been widely studied because several QTLs have been detected there (Allan et al., 2009; Casas et al., 2000; Li et al., 2004a; Stone et al., 2005). In

particular, three chromosomal regions (0 to 30 cM, 55 to 70 cM, and 70 to 80 cM) were identified as having significant associations with the growth traits, while the region between 62 and 82 cM seems to be important for fat traits (Casas et al., 2000; Li et al., 2004a). Within them, two genes were reported as candidates for growth and fat traits: Myogenic factor 5 (Myf5), between 0 and 30 cM, and Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1), between 55 and 80 cM.

The objective of the present work was to test for a possible association between BTA5 markers in previously reported QTL for growth and fat, in a pasture based system. In order to do this, four microsatellites, mapped to two BTA5 chromosomal regions that include Myf5 and IGF1, were genotyped. Genotypic data was tested against Estimated Breeding Values (EBVs) for traits related with growth: 400 Days Weight (W400), 600 Days Weight (W600), Rib Eye Area (REA); and traits related with fat: Rib Fat (Rib), Rump Fat (Rump) and Intra Muscular Fat (IMF).

\* Corresponding author. IGEVEV — Fac. Cs Veterinarias — UNLP. Calle 60 y 118 s/n, PC: 1900, La Plata, Prov de Buenos Aires, Argentina.

E-mail address: [arogberg@yahoo.com.ar](mailto:arogberg@yahoo.com.ar) (A. Rogberg-Muñoz).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

Samples were taken from a commercial Hereford type herd that includes approximately 400 dams, and produces 160 bulls every year to be sold. The herd had been selected using BreedPlan® Genetic evaluation for almost 15 years, with the objectives of low birth weight and a moderate 600 days weight (personal communication). The animals are bred in an extensive pasture system, with *ad libitum* access to cultivated grass. Pastures available include *Lolium* spp., *Bromus* spp., *Festuca* spp., *Trifolium* spp. and natural species, with higher productivity on autumn and spring. DNA was extracted from samples collected from 56 calves and 16 dams (blood), and from 18 sires (stored semen).

### 2.2. Genotyping

Four BTA5 microsatellites were genotyped (PCR protocols as supplementary): BP1 (14,382,552 bp), close to the Myf5 gene, and ETH10 (60,836,475 bp), IGF1 (71,198,741 bp) and RM029 (80,417,234 bp) near the IGF1 gene ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview)). Fragments were resolved in a MegaBACE1000 sequencer and the data analyzed with Fragment Profiler Software (GE healthcare, USA).

### 2.3. Pedigree, trait data and genotype inferring

Pedigree data included 1754 animals, born between 1980 and 2007. The sampling included animals belonging to a single family, from the 1st to the 8th generation of one of the founder sires, HHH ENF 972. The herd was evaluated for 400 (W400) and 600 (W600) Days Weight, Rib Eye Area (REA), Rib Fat, Rump Fat and Intra Muscular Fat. 2008 database BreedPlan Estimated Breeding Values (EBVs) were provided by the herd owner. Genoprob 2.0 (Thallman et al., 2001) was used to infer genotypes following the rule that a genotype was accepted if  $pG_{max} > 0.95$ .

### 2.4. Genetic and statistical analysis

Allele frequencies, expected heterozygosity ( $H_e$ ) and Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) were calculated using Genepop 4 (Rousset, 2008), considering only the genotyped animals. Association between EBVs and genotypes (including inferred genotypes) was performed using SAS 9.0 GLM with

the following model:  $Y_{ij} = G_i + e_{ij}$ , where  $Y_{ij}$  =  $i$  analyzed trait of  $j$  animal,  $G_i$  = genotype effect (considering one or two genes) and  $e_{ij}$  = random error.

## 3. Results and discussion

Allele frequencies and  $H_e$ , for the genotyped animals are presented as Supplementary Table S1. After the Genoprob run, 91 new inferred genotypes were accepted (21% more genotypes) belonging to 73 not sampled animals (82% more animals). Those animals were also included in the association tests. Table 1 resumes all tests between traits and markers.

Previous studies (Li et al., 2004a) have detected three BTA5 regions associated with growth traits (0 to 30 cM, 55 to 70 and 70 to 80 cM). Myf5 gene and BP1 microsatellite are located between 0 and 30 cM region; IGF1 gene (and microsatellite), ETH10 and RM029 microsatellites are mapped between 60 and 82 cM. Our study detected significant association of all markers with different growth traits. In particular, BP1 was associated ( $p \leq 0.05$ ) with REA and explains 1.5 points in REA EBV and 18.5% of the whole variability (see Supplementary Tables S2 and S3). BP1 is close to the Myf5 gene, whose product is an intramuscular factor that enhances myocyte development and muscularity, whereas REA is an ultrasound measurement of the amount of muscle in the carcass. These results are related to those that associate an SNP of Myf5 with Pre-weaning Average Daily Gain and Average Daily Gain on Feed in *Bos taurus* (Li et al., 2004b). Furthermore, we also found an association ( $p \leq 0.1$ ) of BP1 with W400 and W600 EBVs. In BTA5 region between 60 and 82 cM, IGF1 ( $P \leq 0.05$ ) and RM029 ( $P \leq 0.1$ ) microsatellites were associated with W600. When considering two genotypes, IGF1-ETH10 shows a strong association with W400 and W600 EBVs. Moreover, HWE deviation for these three markers (Table 1), suggests that this region could be influenced by selection. Multiple QTL in 50 to 82 cM BTA5 region were detected for yearling weight (Li et al., 2004a), and near IGF1 for growth traits (Machado et al., 2003). In addition, IGF1/SnaBI polymorphism was associated with weight gain after weaning (Ge et al., 2001).

For fat traits, prior data suggest that the region between 62 and 82 cM would be important. A QTL was found near 60 cM for fat depth (Casas et al., 2000), and other for dressing percentage between 30 and 80 cM (Stone et al., 2005). Li et al., 2004a found a haplotype between 65.4 and 70.0 cM associated with backfat. In this study, ETH10 was associated with Rib and Rump fat, explaining 1.18 and 1.67 points of the

**Table 1**

Results for Hardy–Weinberg Equilibrium estimated by  $F_{IS}$  statistic (Weir and Cockerham, 1984) and its P-values are presented. Also are presented association studies between genotypes (considering 1 or 2 markers) and the Estimated Breeding Values related with growth traits: 400(W400) and 600 (W600) days weight, Rib Eye Area (REA); and with fat traits: Rib Fat, Rump Fat and Intra Muscular Fat (IMF). Bold: Significant association ( $P \leq 0.05$ ); Normal: suggestive association ( $P \leq 0.1$ ); ns: not significant association.

Marker	HWE		W400	W600	REA	R I B FAT	RUMPFAT	IMF
	$F_{IS}$ (W&C)	P-val						
BP1	– 0.057	0.474	0.065	0.082	<b>0.031</b>	ns	ns	ns
ETH10	– 0.065	<b>0.051</b>	ns	ns	ns	<b>0.031</b>	<b>0.032</b>	ns
IGF1	– 0.273	<b>0.015</b>	ns	<b>0.017</b>	ns	ns	ns	ns
RM029	0.794	<b>0.000</b>	ns	0.074	ns	ns	ns	ns
ETH10-IGF1	–	–	<b>0.035</b>	<b>0.024</b>	ns	ns	ns	ns
IGF1-RM029	–	–	ns	ns	ns	ns	ns	ns



EBVs variation, respectively; in both traits allele 221 appeared to be beneficial (see [Supplementary Table S2](#)).

In conclusion, QTL for growth and fat traits previously reported in two regions of BTA5 are also expressed in a commercial pasture based system, where animals are not always fed to express their maximum genetic potential.

## Acknowledgments

We like to thank Cabaña “Los Angeles” for samples and EBV data; Dr. Miról for her help and comments; Dr. Thallman and Dr. Kuhen for Genoprob usage assistance. We are also grateful to an anonymous reviewer for the useful suggestions. Research was supported by CONICET, CIC, and UNLP.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.livsci.2010.06.001](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.06.001).

## References

- Allan, M.F., Kuehn, L.A., Cushman, R.A., Snelling, W.M., Echternkamp, S.E., Thallman, R.M., 2009. Confirmation of quantitative trait loci using a low-density single nucleotide polymorphism map for twinning and ovulation rate on bovine chromosome 5. *J. Anim. Sci.* 87, 46–56.
- Casas, E., Shackelford, S.D., Keele, J.W., Stone, R.T., Kappes, S.M., Koohmaraie, M., 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.* 78, 560–569.
- Ge, W., Davis, M.E., Hines, H.C., Irvin, K.M., Simmen, R.C., 2001. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 79, 1757–1762.
- Hagen, I.J., Zadissa, A., McEwan, J.C., Veenkvliet, B.A., Hickey, S.M., Cullen, N.G., Morris, C.A., Wilson, T., 2005. Molecular and bioinformatic strategies for gene discovery for meat traits: a reverse genetics approach. *Aust. J. Exp. Agric.* 45, 801–807.
- Li, C., Basarab, J., Snelling, W.M., Benkel, B., Kneeland, J., Murdoch, B., Hansen, C., Moore, S.S., 2004a. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for backfat on bovine chromosomes 2, 5, 6, 19, 21, and 23 in a commercial line of *Bos taurus*. *J. Anim. Sci.* 82, 967–972.
- Li, C., Basarab, J., Snelling, W.M., Benkel, B., Murdoch, B., Hansen, C., Moore, S.S., 2004b. Assessment of positional candidate genes myf5 and igf1 for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. *J. Anim. Sci.* 82, 1–7.
- Machado, M.B.B., Alencar, M.M., Pereira, A.P., Oliveira, H.N., 2003. QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. *Genet. Mol. Biol.* 3, 259–265.
- Morris, C.A., Pitchford, W.S., Cullen, N.G., Esmailzadeh, A.K., Hickey, S.M., Hyndman, D., Dodds, K.G., Afolayan, R.A., Crawford, A.M., Bottema, C.D.K., 2009. Quantitative trait loci for live animal and carcass composition traits in Jersey and Limousin back-cross cattle finished on pasture or feedlot. *Anim. Genet.* 40, 648–654.
- Rousset, F., 2008. GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.* 8, 103–106.
- Stone, R.T., Casas, E., Smith, T.P., Keele, J.W., Harhay, G., Bennett, G.L., Koohmaraie, M., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Snelling, W.M., 2005. Identification of genetic markers for fat deposition and meat tenderness on bovine chromosome 5: development of a low-density single nucleotide polymorphism map. *J. Anim. Sci.* 83, 2280–2288.
- Thallman, R.M., Bennett, G.L., Keele, J.W., Kappes, S.M., 2001. Efficient computation of genotype probabilities for loci with many alleles: II. iterative method for large, complex pedigrees. *J. Anim. Sci.* 79, 34–44.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of populations structure. *Evolution* 38, 1358–1370.







Contents lists available at ScienceDirect

Livestock Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/livsci](http://www.elsevier.com/locate/livsci)

## Association of bovine chromosome 5 markers with birth and weaning weight in Hereford cattle raised under extensive conditions

A. Rogberg-Muñoz<sup>a,\*</sup>, L. Melucci<sup>b</sup>, A. Prando<sup>c</sup>, E.E. Villegas-Castagnasso<sup>a</sup>, M.V. Ripoli<sup>a</sup>, P. Peral-García<sup>a</sup>, A. Baldo<sup>c</sup>, M.C. Añón<sup>d</sup>, G. Giovambattista<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET) CCT La Plata – Facultad Cs Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata – CONICET, Argentina

<sup>b</sup> Unidad Integrada Balcarce (UIB) Facultad de Ciencias Agrarias (UNMDP) – EEA (INTA) Balcarce, Argentina

<sup>c</sup> Cátedra de Zootecnia Especial (II Parte), Facultad Cs Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

<sup>d</sup> Centro de Investigación y Desarrollo en Crioteología de Alimentos (CIDCA) CCT La Plata – Facultad Cs Exactas, Universidad Nacional de La Plata – CIC – CONICET, Argentina

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 April 2010

Received in revised form 16 June 2010

Accepted 28 June 2010

#### Keywords:

Birth weight

Cattle

DNA markers

Hereford

Pasture system

Weaning weight

### ABSTRACT

Genetic markers have been used to assess the association of economically important traits with cattle under intensive feeding conditions; however, there is still the need to ascertain the usefulness of these markers under extensive production systems. Bovine chromosome 5 has been widely studied because several QTLs have been detected. Microsatellite BP1 neighboring the *Myogenic factor 5* gene (*Myf5*), and microsatellites ETH10, IGF1 and RM029 near *Insulin-like Growth Factor 1* gene (*IGF1*), were selected to establish their association with BLUPs (Best Linear Unbiased Predictor) for direct Birth Weight (dBW), direct Weaning Weight (dWW) and maternal Weaning Weight (mWW). Two herds were used for this objective, one commercial and the other experimental. Associations ( $P \leq 0.05$ ) between dWW and all BTA5 loci (BP1, ETH10, IGF1, and RM029) were detected. Additional associations were observed between mWW and BP1. dBW was significantly associated ( $P \leq 0.05$ ) with ETH10 genotypes and with the interaction IGF1\*Herd. In particular region near BP1 could be contributing to the rare positive correlation between dWW and mWW previously found in the INTA Balcarce Station experimental herd. We confirmed marker associations with growth traits in two BTA5 regions close to previously reported QTL obtained in intensive feeding conditions; these regions affect dBW, dWW and mWW in a pasture-based system.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

A limited number of markers are available to be used by producers, and they explain a relatively small proportion of the genetic variation for a limited number of traits (Dekkers, 2004). Recently, Morris et al. (2009) have searched QTL expressed in different cattle management systems. Most marker associations have been evaluated under intensive productive conditions. Therefore, there is a need to establish

the association of these markers in pasture-based production systems.

Bovine chromosome 5 (BTA5) has been widely studied because several QTLs have been detected for many traits, i.e. growth, fat, male and female reproduction (Casas et al., 2000; Li et al., 2002, 2004; Casas et al., 2003; Stone et al., 2005; Allan et al., 2009). In particular three chromosomal regions (0 to 30 cM, 55 to 70 cM, and 70 to 80 cM) were identified as having significant associations with the growth traits. Within those regions at least two genes were reported as candidates. *Myogenic factor 5* (*Myf5*), which maps within the 0 to 30 cM region, is capable to convert non-muscle cells into muscle, thus, is a potential candidate for growth and meat quality related traits (Daubas et al., 2000; Maak et al., 2006). The

\* Corresponding author. IGEVET – Fac. Cs Veterinarias – UNLP. Calle 60 y 118 s/n, PC: 1900, La Plata, Prov de Buenos Aires, Argentina.

E-mail address: [arogberg@yahoo.com.ar](mailto:arogberg@yahoo.com.ar) (A. Rogberg-Muñoz).

*Insulin-like Growth Factor 1* (*IGF1*) gene, between 55 and 80 cM, has a physiological role in growth and development of mammals (Werner et al., 1994). Its polymorphisms have been associated with growth traits (Moody et al., 1996; Andrade et al., 2008).

Because productive systems in developing countries are extensive pasture-based and funds are not always available for sampling and genotyping, it is required to use the available data as much as possible. Quantitative data have been used for genetic improvement since the '50s, and a considerable amount of information is stored. Breeders have kept frozen semen since then, so these reservoirs are a source of DNA. Much more information can be gleaned by calculating genotypic probabilities for individuals with missing marker data, and tracking markers over an extended pedigree in commercial or long-term experimental populations (Thallman et al., 2001a).

Genotypic data from four BTA5 microsatellites were tested against BLUPs (Best Linear Unbiased Predictor) for direct Birth Weight (dBW), direct Weaning Weight (dWW) and maternal Weaning Weight (mWW). This association test was performed to prove if the QTLs previously detected, in the chromosomal regions that include *Myf5* and *IGF1*, are expressed in Hereford populations raised under extensive pasture-based conditions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples and herd description

Two Hereford herds, one experimental (EH) and the other commercial (CH), were sampled, blood was collected from calves and dams and semen from bulls. Additionally, blood samples were collected from 17 unrelated Hereford bulls, born between 2005 and 2007 from 6 different studs, and were only used as reference population (RP) for allele diversity and frequencies. These bulls were INTA Balcarce Experimental Station Performance Test participants ([www.inta.gov.ar/balcarce/index.htm](http://www.inta.gov.ar/balcarce/index.htm)).

EH was previously described by Melucci et al. (2009). Briefly, the herd was established in 1960 and selected between 1986 and 2006 to increase weaning weight without increasing birth weight. It was a closed stable herd of 100 cows and 4 bulls. Two older bulls (3 years-old) were replaced every year with the 2-year old males selected. Samples taken from this herd include 66 calves, born between 2005 and 2007, 83 dams, and 9 bulls. These animals belonged to generations between 2.19 and 8.16; and had an average inbreeding coefficient of 0.047.

The CH was a typical stud that included approximately 400 dams, and produced 160 bulls every year to be sold. The herd was selected using BreedPlan® Genetic evaluation (EVBS) for almost 15 years with an objective of a low birth weight and a moderate 600 day weight (personal communication). All sampled animals presented genetic connection with a founder sire born in 1980, except for 6 bulls that were used to introduce new genetics to the herd. Animals belonging to first to eighth generations from founder sire were included in the sampling. This included 56 calves (born in 2006 and 2007), 17 dams, and 18 bulls. Dams were selected from those that had several progenies in the herd, and the

sires samples included semen stored from bulls used since 1986. This kind of sampling was performed to maximize the genotype inferring.

### 2.2. DNA extraction

Semen was digested using an extraction buffer containing 0.4 mg/ml proteinase K and 25 mM DTT, and DNA was purified by chloroform organic extraction technique. DNA was extracted from blood samples using DNAzol® reagent (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer's instructions.

### 2.3. Genotyping

Four microsatellites markers surrounding the selected genes were genotyped: BP1 (14382552 bp), close to *Myf5* gene, ETH10 (60836475 bp), *IGF1* (71198741 bp) and RM029 (80417234 bp) near *IGF1* gene ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview)). Additionally, BM1824 microsatellite (BTA1, 122 cM) was included to evaluate a random, multiallelic polymorphism, in a different chromosome and not associated with a known structural gene. Microsatellite PCR multiplex was performed in 12.5 µl final volume, including 1.5 pmol, 2.5 pmol, 3.0 pmol, 6.0 pmol and 10 pmol of ETH10, BM1824, RM029, BP1 and *IGF1* fluorescent labeled primers, respectively ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview)); buffer 1× (Invitrogen™), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, 100 mM of each dNTP, 0.04 U/µl Taq Platinum (Invitrogen™), and 2 ng/µl DNA. PCR program was: 2 min 94 °C, 10 cycles of 30 s 94 °C, 45 s 60 °C, 30 s 72 °C, followed by 30 cycles of 30 s 94 °C, 45 s 58 °C, 30 s 72 °C, and final extension of 7 min 72 °C. Fragments were resolved in a MegaBACE 1000 sequencer (GE healthcare, USA) and data analyzed with Fragment Profiler Software (GE healthcare).

### 2.4. Genetic variability

Genepop software (Rousset, 2008) was used to calculate allele number, gene frequencies, and unbiased expected heterozygosity ( $h_e$ ) for each locus and over all loci ( $H_e$ ). Hardy–Weinberg equilibrium (HWE), estimated by  $F_{IS}$  statistic, and linkage disequilibrium, were carried out using the Markov chain method included in the same package. To evaluate a genetic variation in time intervals, the experimental herd was divided into 3 contemporary groups: animals born between 1996 and 1999, 2000 and 2003, 2004 and 2007; this four year distribution was made to avoid animals sired by a particular bull and his son, in the same contemporary group. Genepop 4 exact test was performed to assess group and/or population differentiation based on its genetic data. Phases of linkage disequilibrium were reconstructed with Phase v2.1.1 (Li and Stephens, 2003) using default options; phases were accepted when the probability was higher than 0.95.

### 2.5. Pedigree, trait data and genotype inferring

Pedigree data included 2474 animals from EH, born between 1960 and 2008; and 1754 animals from CH, born between 1980 and 2007. Both herds were evaluated for direct Birth Weight (dBW), direct Weaning Weight (dWW), and



maternal Weaning Weight (mWW), in separate analysis. The EH Best Linear Unbiased Predictor (BLUP) analysis was described by Melucci et al. (2009); while CH BLUPs were provided as EBVs by the herd owner and correspond to 2008 BreedPlan® analysis. Usually molecular association studies use phenotype value, even though some research has been done using Breeding Values (Pereira et al., 2005; Schulman et al., 2008). In this sense, although using phenotypic data, Miquel et al. (2009) envisage the advantages of using Breeding Values in association studies, because they would consider the genetic correlations within different traits.

Genoprob 2.0 (Thallman et al., 2001a,b) was used to infer genotypes, in four microsatellites from chromosome 5, using genotypic and pedigree data. The genotyped animals in each population, 157 for EH and 91 for CH, were used as reference to generate genotypes in the 2474 animals and 1754 animals included in the respective pedigrees. Default meiosis probabilities and errors were set, complete penetrance and no null alleles were considered, and finally 10 iterations were allowed. A genotype was accepted if pGmax (posterior probability that the unordered genotype is correct) was higher than 0.95. Animals with BLUPs and genotypes (detected or inferred) were included in the association analysis.

## 2.6. Association analysis

For the association studies, the traits of interest were analyzed using the General Linear Model (GLM) procedure of the SAS program (Statistical Analysis System, 1999). Single-locus association analysis between markers and BLUPs was performed. Two models were defined depending on the number of alleles founded for each marker. In markers with more than two alleles (considering only CH and EH), the interaction between herd (H) and the genetic marker (GM) couldn't be estimated. That was the case of BM1824 (BTA1), BP1 and ETH10, that were analyzed using a model with the fixed effect of herd (H) and genetic marker (GM) nested in H. For RM029 and IGF1, biallelic markers, the model included fixed effect of H, GM and H\*GM interaction. This same analysis was performed for BP1, excluding animals with 310 allele that were only detected in CH, and allowed the marker to fit in a biallelic analysis. Additive effects were estimated by the difference between the two homozygous genotypes, and dominance effects were estimated by subtracting the average of solutions for homozygous genotypes from that for heterozygous genotype. In addition, both models were used to analyze pairwise genotypes from close genes in chromosome (ETH-IGF1 and IGF1-RM029), as well as reconstructed phases for IGF1-RM029. For statistically significant main effects ( $P < 0.05$ ), least squares means were reported and Bonferroni's means separation test at  $P < 0.05$  was used to determine differences between genotypes.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Allele frequencies and heterozygosity

A total of 1180 genotypes of 5 microsatellites were typed from 266 sampled animals. Allele frequencies are presented

in Fig. 1 and Table S1. The number alleles were 7 for BP1, 6 for ETH10, 3 for RM029, 2 for IGF1, and 5 for BM1824. Unbiased expected heterozygosity values for each locus and the average heterozygosity over all loci are given in Table S2,  $h_e$  ranged from 0.222 to 0.709; and  $H_e$  was 0.579, 0.475 and 0.497 for the reference, commercial, and experimental herd, respectively. This genetic variability let us use most of the genotypes in the association tests (see below).

Differences in gene frequencies during generations can be consequence of genetic drift, migration or selection. Neutral markers close to chromosome regions containing causative genes could be affected by selection (as example see Pereira et al., 2005). To evaluate frequencies variation during the time, the Experimental Herd was divided into three groups. Fig. 1 clearly illustrates differences among herd gene frequencies and evidences a tendency toward increase or decrease some of the allelic frequencies across time. Within this herd, the groups 1996–1999 and 2004–2007 were statistically different ( $P \leq 0.05$ ) for all BTA5 markers except for IGF1 ( $P \leq 0.08$ ); 2000–2003 and 2004–2007 groups were different ( $P \leq 0.08$ ) only for RM029; finally 1996–1999 and 2000–2003 show no significant differences (Table S3). The observed differences could be consequence of genetic drift, especially considering that is a closed herd with a reduced effective size number. Even though, BM1824 (control marker located on BTA1) did not show significant differences between groups. This support the hypothesis that BTA5 marker frequencies could have been affected by selection and that there could be causative genes in the surroundings of these markers (see association discussion).

#### 3.1.1. Hardy–Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium

A total of 10 HWE tests were performed (see Table S2): for the commercial herd, HWE for ETH10, IGF1 and RM029 were rejected ( $P \leq 0.05$ ), and for the experimental herd only RM029 was rejected ( $P \leq 0.05$ ). Reasons for HWE deviations could be methodological (null alleles and sampling bias), or population effects (population structure, consanguinity, and selection). Here the RM029 disequilibrium for the three populations could suggest null allele presence for that marker but, as commercial herd showed disequilibrium for the three loci contained in a 22,000 kbp region that include RM029 (between 60,000 kbp and 82,000 kbp), selection could be the responsible for this.

A total of 60 disequilibrium tests (10 for each population or group) were performed. Two of them showed an important disequilibrium: ETH10/IGF1 ( $P = 0.0043$ ) in the commercial herd, and BP1/RM029 ( $P = 0.0031$ ) in the experimental herd due to group 2004–2007 that presents a  $P = 0.0010$  for this pair of markers. Only 3 out of 60 tests (5%) were in disequilibrium, probably the amount of samples is not enough to detect linkage because distance between markers is higher than 5 cM.

#### 3.1.2. Genotype inferring

To exploit phenotypic stored data from 4288 animals included in both pedigrees, single locus analysis of Genoprob 4.0 was used to infer genotypes. 375 genotypes were inferred (97 BP1, 29 ETH10, 165 RM029, and 84 IGF1) and 262 not sampled animals could be included in the association tests. Even though the used version of Genoprob package didn't

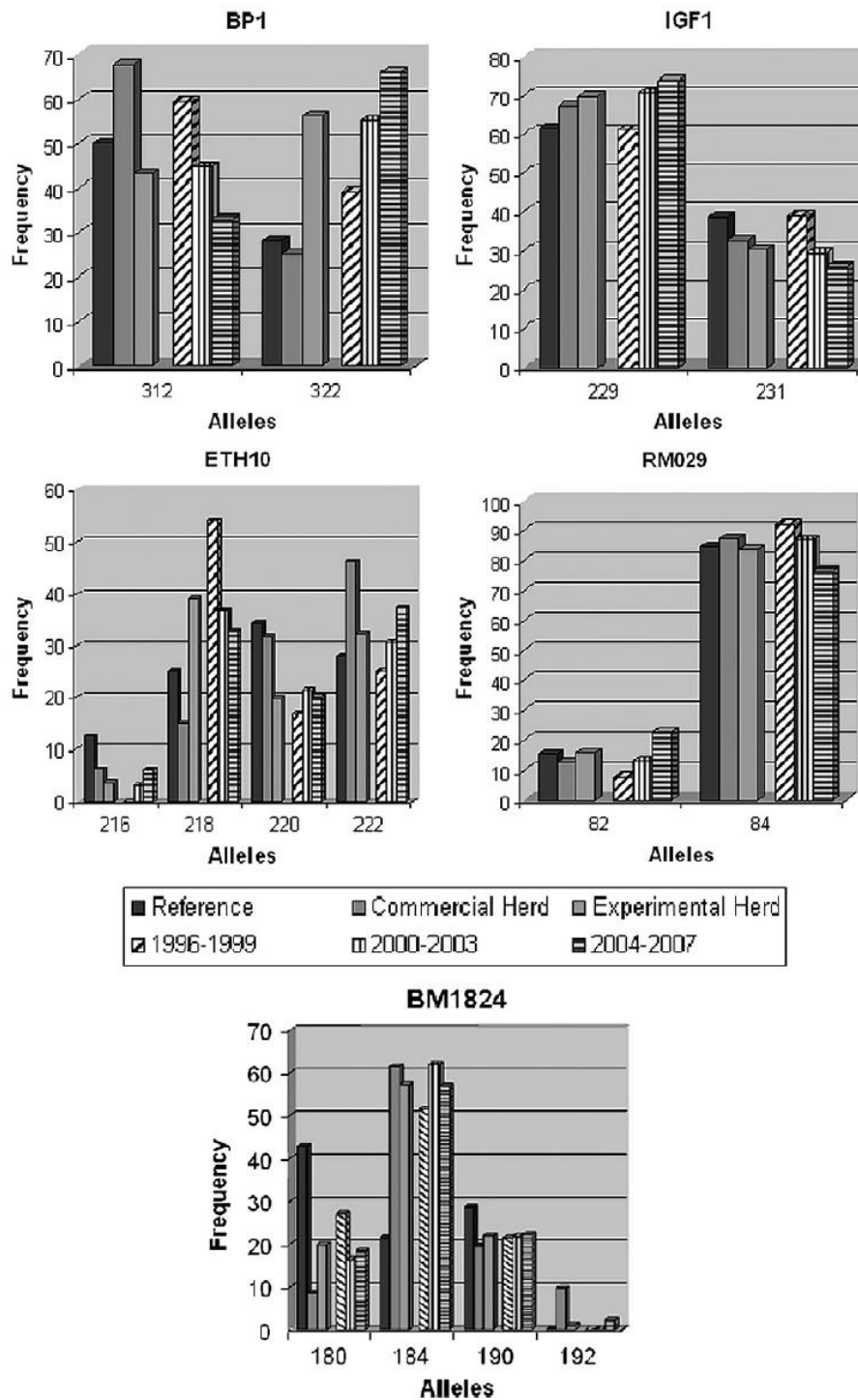


Fig. 1. BTA5 microsatellite allele frequencies for Reference Population (RP), Commercial (CH) and Experimental Herd (EH) are presented; time variation frequencies for the EH groups (each considering 4 year births) are also presented. Alleles with frequency less than 10% were avoided for a clear view (see Table S1 for the complete information).

consider phases in the chromosome, the strategy was successful, as it was reported by Allan et al. (2009); we could obtain 15% more genetic information and 99% more animals were included in the association test. This kind of strategy is important to increase the number of animals included in an association test, especially when BLUP are from older animals for which DNA was not available for genotyping.

### 3.2. Association

Previous data (Li et al., 2004) have detected three chromosomal regions significantly associated with growth traits in BTA5, between 0 and 30 cM, were *Myf5* gene and BP1 microsatellite are located; and between 55 to 70 and 70 to 80 cM were *IGF1* gene and microsatellite, and ETH10 and RM029 microsatellites are mapped. Table 1 summarizes all



**Table 1**

Average BLUPS and its Standard Error (SE) in kilograms for direct Birth Weight (dBW), direct Weaning Weight (dWW) and maternal Weaning Weight (mWW), for each BTA5 marker are presented. Only significant results are presented. BP1, IGF1 and RM029 results correspond to the analysis that include Genetic Marker, Herd, and GM\*H interaction effect. When GM\*H was significant, results are presented separated for each herd. For ETH10 the model includes H effect and GM effect nested in H, only genotypes founded in both herds are shown (see Table S3 for the complete set). Additive and dominance effects for each biallelic analysis are also presented.

Marker	Herd (N)	Trait	Genotype (N)			Additive effect <sup>a</sup>	Dominance <sup>b</sup>
			Average BLUP of genotype $\pm$ SE				
BP1	Both herds (311)	dWW*	312/312 (78)	312/322 (150)	322/322 (83)	2.37 $\pm$ 1.08*	0.08 $\pm$ 0.63 NS
		mWW**	7.68 $\pm$ 0.40	8.95 $\pm$ 0.33	10.05 $\pm$ 1.01	5.06 $\pm$ 1.38**	–0.42 $\pm$ 0.81 NS
			2.88 $\pm$ 0.51	5.01 $\pm$ 0.43	7.96 $\pm$ 1.27		
IGF1	Commercial Herd (93)	dBW	229/229 (38)	229/231 (42)	231/231 (3)	Not estimable	Not estimable
		dWW*	1.70 $\pm$ 0.28	1.43 $\pm$ 0.26	2.60 $\pm$ 0.98	Not estimable	Not estimable
			14.76 $\pm$ 5.06	13.05 $\pm$ 5.88	20.67 $\pm$ 2.52	Not estimable	Not estimable
	Experimental Herd (201)	dBW	229/229 (76)	229/231 (86)	231/231 (39)	Not estimable	Not estimable
		dWW*	–2.33 $\pm$ 0.20	–1.43 $\pm$ 0.18	–1.29 $\pm$ 0.27	Not estimable	Not estimable
			3.16 $\pm$ 1.74	2.81 $\pm$ 2.21	1.59 $\pm$ 2.72	Not estimable	Not estimable
RM029	Commercial Herd (126)	dWW*	82/82 (9)	82/84 (12)	84/84 (105)	Not estimable	Not estimable
			16.78 $\pm$ 1.22	14.17 $\pm$ 1.05	12.62 $\pm$ 0.36	Not estimable	Not estimable
	Experimental Herd (259)	dWW*	82/82 (17)	82/84 (21)	84/84 (220)	Not estimable	Not estimable
			2.80 $\pm$ 0.89	3.14 $\pm$ 0.80	3.12 $\pm$ 0.25	Not estimable	Not estimable
Marker	Herd	Trait	Genotype(N)				
			Average BLUP of genotype $\pm$ SE				
ETH10	Commercial Herd (84)	dBW	216/222 (5)	218/218 (2)	218/222 (6)	218/222 (18)	220/222 (7)
			1.12 $\pm$ 0.73	2.30 $\pm$ 1.15	1.53 $\pm$ 0.66	1.56 $\pm$ 0.38	1.50 $\pm$ 0.31
		dWW	10.80 $\pm$ 1.60	19.00 $\pm$ 2.53	15.33 $\pm$ 1.46	12.47 $\pm$ 0.87	15.14 $\pm$ 1.35
	Experimental Herd (170)	dBW	216/222 (6)	218/218 (23)	218/220 (36)	218/222 (45)	220/220 (6)
			–3.67 $\pm$ 0.66	–1.18 $\pm$ 0.34	–1.60 $\pm$ 0.27	–2.14 $\pm$ 0.24	–1.38 $\pm$ 0.66
		dWW	3.00 $\pm$ 1.46	2.75 $\pm$ 0.75	2.99 $\pm$ 0.60	3.14 $\pm$ 0.53	1.99 $\pm$ 1.46

NS, not significant.

Genotypes are expressed allele1/allele2, in brackets are the total number of observations of each marker analysis, and for each genotype included in the analysis.

<sup>a</sup> Estimated by the difference between the two homozygous genotypes.

<sup>b</sup> Estimated by subtraction of the average solutions for homozygous genotypes from that for heterozygous genotype.

\* Significance <0.05.

\*\* Significance <0.01.

tests between traits and markers: the least square means of BLUPs for each genotype with its standard deviation, the additive and dominance effect are presented. The association tests revealed a significant association ( $P \leq 0.05$ ) between dWW and all BTA5 loci (BP1, ETH10, IGF1, RM029), and between mWW and BP1. Besides, dBW was significant associated ( $P \leq 0.05$ ) with ETH10 genotypes and with the interaction IGF1\*Herd.

In particular, for BP1 microsatellite the first tests performed, that include the entire data set and consider the genotype nested in herd, showed significant association with dWW and mWW. The second analysis, performed excluding genotypes 310/– present only in commercial herd, showed that dWW model was significant for herd ( $p < 0.01$ ) and for genotype ( $P < 0.05$ ), furthermore, a significant additive effect ( $P < 0.05$ ) was detected. Calves with genotype 312/322 had a mean value 16.53% larger ( $P < 0.05$ ) than 312/312, while the additive effect was  $2.37 \pm 1.08$  kg. For mWW, the model was significant for genotype ( $P < 0.001$ ), showing a significant additive effect ( $P < 0.001$ ) too; genotypes 312/322 and 322/322 had a significant mean value 73.96% ( $P < 0.05$ ) and 176.39% ( $P < 0.01$ ) higher than 312/312, respectively, and the additive effect was  $5.06 \pm 1.38$  kg. BP1 marker is close to *Myf5* gene, and the association with dWW and mWW is in concert with the results obtained by Li et al. (2004), that associate an SNP of *Myf5* with Pre-weaning Average Daily

Gain (PADG) in commercial lines of *Bos taurus*. Previous work in this experimental herd (Melucci et al., 2009) described a low value of  $h^2_{dWW}$  (0.05), and a positive correlation between dWW and mWW ( $r_G = 0.37$ ), while Meyer (1997) found more frequent negative estimates of  $\sigma^2_{AdWW|mWW}$  in field data than in those data sets that originated from experimental herds. BP1 322 allele was significantly associated with higher WW (direct and maternal) in both herds, even though experimental herd had undergone intensive selection for increased WW and commercial herd had not. Furthermore, this allele was the most frequent in experimental herd and showed a significant increase ( $P \leq 5 \times 10^{-5}$ ) during generations (Fig. 1). Tanking all this into account, we conclude that a BTA5 locus close to BP1 is affecting WW, and could be contributing to the rare positive correlation between dWW and mWW found in the experimental herd. Moreover, a Marker Assisted Selection using this marker (or other in the region) could help to select animals that “break the curves”. *Myf5*, which product is an intramuscular factor that enhances myocytes development and muscularity, could be candidate gene to explain the observed association with WW. Alternatively, other genes in the surroundings of BP1 marker could be causative gene for that trait differences: i.e. Myogenic factor 6, Inhibitor of growth family 4 and Cell division cycle associated protein 3 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview)).

Within 55 and 80 cM BTA5 region, ETH10 showed significant association ( $P < 0.01$ ) with dBW and dWW. As the microsatellite is multiallelic, the analysis is not powerful and few significant differences ( $P < 0.05$ ) were found only in the experimental herd (Table 1 and Table S4), but for both traits the presence of alleles 216 or 222 produces lower average values and 214 and 218 greater ones. RM029 showed significant association ( $P < 0.05$ ) for dWW, but in this case interaction RM029\*herd was significant too; as a result the 82/82 genotype dWW average value was 33% higher than 84/84 genotype within commercial herd but not in the experimental one. IGF1 microsatellite interaction with herd was significant for dBW ( $P < 0.05$ ) and dWW ( $P < 0.01$ ), while genotype association was significant only for dWW ( $P < 0.01$ ). Even though similar results were found for both herds, in the case of dBW the experimental herd 229/229 genotype was 0.9 kg lower than 229/231 ( $P < 0.05$ ) and 1.04 kg lower than 231/231 ( $P < 0.01$ ), but no significant differences ( $P > 0.05$ ) were found for the commercial herd. In case of dWW significant differences were only found in the commercial herd, 229/229 genotypes were 5.91 kg lower than 231/231 ( $P < 0.01$ ). When considering two marker genotypes together and the phases (only for IGF1/RM029), no significant effects ( $P > 0.05$ ) were detected, this was due to data structure and poor estimability. Other possible candidate genes in this region that could explain the association are: actin-related protein, growth arrest-specific 2 like 3 protein, myosin binding protein C, myosin IA, myosin light chain 6B, integrin, myoglobin and glycosyl-transferase ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview)).

Previous studies have associated IGF1 microsatellite with BW EPD (Expected Progeny Differences) and 180 day gain from birth to weaning in Hereford cattle (Moody et al., 1996), and they found a 15% effect of 229 allele. Andrade et al. (2008) found that BW and 240 day weight were associated with IGF genotypes in Canchim cattle (Charolais-Nelore 5/8). For both traits, IGF1 microsatellite genotypes that included the 231 and 225 alleles were associated with low and high body weights respectively (also found by Pereira et al., 2005); 225 allele is of Cebuine breed origin so it is not surprising that this allele is related with high body weight. In our study, genotypes 229/229 and 231/231 were associated with low and high dBW and dWW, respectively. Andrade et al. (2008) didn't find the homozygote 231 genotype and reported that differences between 229/229 and 229/231 genotypes were not large, furthermore, for dWW 229/229 genotype was lower than 229/231; considering this, their result and ours could be equivalent. Earlier, Machado et al. (2003) had found a QTL for growth traits in the neighborhood of *IGF1* studying Canchim cattle too, even though, they hypothesized that the *IGF1* gene is not directly responsible for variations in growth traits. In addition, Li et al. (2004) detected a dominance effect ( $P < 0.10$ ) of *IGF1* on BW in *B. taurus* cattle, Ge et al. (2001) found *IGF1*/SnaBI polymorphisms associated with weight gain during the first 20 days after weaning in Angus cattle but Curi et al. (2005) suggested that the alleles of the IGF1 microsatellite and those of the *IGF1*/SnaBI polymorphism do not show strong linkage disequilibrium, despite their close location.

Despite this kind of analysis could lead to an over-estimation of the effect of some individual alleles, the results across both herds and previous literature are in agreement. Especial consideration should be done in marker ETH10

(multiallelic), as the number of animals in some genotype classes is quite low (see Table 1 and Table S4); therefore associations and size of effect should be considered as tenuous. BM1824 (BTA1, 122 cM) was included as control. There are not much QTLs for growth traits in that chromosome, only Casas et al. (2003) detected a QTL for BW between 100 and 135 cM. In this work we didn't find any association between BM1824 and the traits tested.

In conclusion, we confirm marker association with growth traits in two BTA5 regions close to previously reported QTLs for growth obtained in intensive feeding conditions. Furthermore, we showed that these regions are affecting dBW, dWW and mWW also in a pasture-based system, where animals are not always able to express their maximum genetic potential. These findings were also tested in a commercial herd, which are the potential candidates for a Marker Assisted Selection, so these findings can be used to support such schemes.

### Acknowledgements

We like to thank Cabaña "Los Angeles" for the samples and the EBV data; Dr. E. Casas for manuscript corrections and suggestion; Dr. R. M. Thallman and Dr. L. Kuehn for the assistance in Genoprob usage. We are also grateful to the anonymous reviewers for the useful suggestions. Research for this paper was supported by the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), Universidad Nacional de La Plata (UNLP) and the Japanese International Cooperation Agency (JICA).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.livsci.2010.06.160.

### References

- Allan, M.F., Kuehn, L.A., Cushman, R.A., Snelling, W.M., Echternkamp, S.E., Thallman, R.M., 2009. Confirmation of quantitative trait loci using a low-density single nucleotide polymorphism map for twinning and ovulation rate on bovine chromosome 5. *J. Anim. Sci.* 87, 46–56.
- Andrade, P.C., Grossi, D.A., Paz, C.C., Alencar, M.M., Regitano, L.C., Munari, D.P., 2008. Association of an insulin-like growth factor 1 gene microsatellite with phenotypic variation and estimated breeding values of growth traits in Canchim cattle. *Anim. Genet.* 39, 480–485.
- Casas, E., Shackelford, S.D., Keele, J.W., Stone, R.T., Kappes, S.M., Koohmaraie, M., 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.* 78, 560–569.
- Casas, E., Keele, J.W., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Stone, R.T., 2003. Identification of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *Anim. Genet.* 35, 2–6.
- Curi, R.A., Oliveira, H.N., Silveira, A.C., Lopes, C.R., 2005. Effects of polymorphic microsatellites in the regulatory region of *IGF1* and *GHR* on growth and carcass traits in beef cattle. *Anim. Genet.* 36, 58–62.
- Daubas, P., Tajbakhsh, S., Hadchouel, J., Primig, M., Buckingham, M., 2000. *Myf5* is a novel early axonal marker in the mouse brain and is subjected to post-transcriptional regulation in neurons. *Development* 127, 319–331.
- Dekkers, J.C.M., 2004. Commercial application of marker- and gene assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 82, 313–328.
- Ge, W., Davis, M.E., Hines, H.C., Irvin, K.M., Simmen, R.C., 2001. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 79, 1757–1762.
- Li, N., Stephens, M., 2003. Modelling linkage disequilibrium, and identifying recombination hotspots using SNP data. *Genetics* 165, 2213–2233.
- Li, C., Basarab, J., Snelling, W.M., Benkel, B., Murdoch, B., Moore, S.S., 2002. The identification of common haplotypes on bovine chromosome 5



- within commercial lines of *Bos taurus* and their associations with growth traits. *J. Anim. Sci.* 80, 1187–1194.
- Li, C., Basarab, J., Snelling, W.M., Benkel, B., Murdoch, B., Hansen, C., Moore, S. S., 2004. Assessment of positional candidate genes *myf5* and *igf1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. *J. Anim. Sci.* 82, 1–7.
- Maak, S., Neumann, K., Swalve, H.H., 2006. Identification and analysis of putative regulatory sequences for the MYF5/MYF6 locus in different vertebrate species. *Gene* 379, 141–147.
- Machado, M.B.B., Alencar, M.M., Pereira, A.P., Oliveira, H.N., 2003. QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. *Genet. Mol. Biol.* 3, 259–265.
- Melucci, L.M., Birchmeier, A.N., Cappa, E.P., Cantet, R.J.C., 2009. Bayesian analysis of selection for higher weaning weight while maintaining birth weight in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 87, 3089–3096.
- Meyer, K., 1997. Estimates of genetic parameters for weaning weight of beef cattle accounting for direct-maternal environmental covariances. *Livest. Prod. Sci.* 52, 187–199.
- Miquel, M.C., Villarreal, E., Mezzadra, C., Melucci, L., Soria, L., Corva, P., Schor, A., 2009. The association of CAPN1 316 marker genotypes with growth and meat quality traits of steers finished on pasture. *Genet. Mol. Biol.* 32, 491–496.
- Moody, D.E., Pomp, D., Newman, S., MacNeil, M.D., 1996. Characterization of DNA polymorphisms in three populations of Hereford cattle and their associations with growth and maternal EPD in line 1 Herefords. *J. Anim. Sci.* 74, 1784–1793.
- Morris, C.A., Pitchford, W.S., Cullen, N.G., Esmailizadeh, A.K., Hickey, S.M., Hyndman, D., Dodds, K.G., Afolayan, R.A., Crawford, A.M., Bottema, C.D.K., 2009. Quantitative trait loci for live animal and carcass composition traits in Jersey and Limousin back-cross cattle finished on pasture or feedlot. *Anim. Genet.* 40, 648–654.
- Pereira, A.P., Alencar, M.M., Oliveira, H.N., Regitano, L.C.A., 2005. Association of GH and IGF-I polymorphism with growth traits in a synthetic beef cattle breed. *Genet. Mol. Biol.* 28, 230–236.
- Rousset, F., 2008. GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.* 8, 103–106.
- Schulman, N.F., Sahana, G., Lund, M.S., Viitala, S.M., Vilkki, J.H., 2008. Quantitative trait loci for fertility traits in Finnish Ayrshire cattle. *Genet. Sel. Evol.* 40, 195–214.
- Stone, R.T., Casas, E., Smith, T.P., Keele, J.W., Harhay, G., Bennett, G.L., Koohmaraie, M., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Snelling, W.M., 2005. Identification of genetic markers for fat deposition and meat tenderness on bovine chromosome 5: development of a low-density single nucleotide polymorphism map. *J. Anim. Sci.* 83, 2280–2288.
- Thallman, R.M., Bennett, G.L., Keele, J.W., Kappes, S.M., 2001a. Efficient computation of genotype probabilities for loci with many alleles: I. Allelic peeling. *J. Anim. Sci.* 79, 26–33.
- Thallman, R.M., Bennett, G.L., Keele, J.W., Kappes, S.M., 2001b. Efficient computation of genotype probabilities for loci with many alleles: II. Iterative method for large, complex pedigrees. *J. Anim. Sci.* 79, 34–44.
- Werner, H., Adamo, M., Roberts Jr., C.T., LeRoith, D., 1994. Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor action. *Vitam. Horm.* 48, 1–58.







Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/rvsc](http://www.elsevier.com/locate/rvsc)



# History and selection imprinting on genetic relationships among bovine breeds analyzed through five genes related with marbling

M.V. Ripoli\*, A. Rogberg-Muñoz, J.P. Lirón, E. Francisco, E.E. Villegas-Castagnasso, P. Peral-Garcia, G. Giovambattista

Instituto de Genética Veterinaria (IGEVEV) CCT La Plata – Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata-CONICET, Argentina

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 3 November 2009

Accepted 14 June 2010

### Keywords:

Bovine

Single nucleotide polymorphism

Genetic diversity

Marbling

Phylogeography

Selection

## ABSTRACT

Many candidate genes have been suggested as responsible for marbling in beef cattle, for instance diacylglycerol O-acyltransferase 1, thyroglobulin, growth hormone, leptin and stearoyl CoA desaturase. The objective of the present work was to evaluate the polymorphisms of five SNPs of these candidate genes in 389 animals of 18 *Bos Taurus* and *Bos indicus* breeds. The obtained results were compared with ones previously obtained with STRs and loci related to milk production in these populations. Moreover we analyzed whether the phylogenies reconstructed using SNPs associated with marbling resulted in the known tree topology. The tree constructed with UPGMA, using genetic distance  $D_A$ , exhibit a topology partially consistent with the historical origin of breeds. The result observed in the Correspondence Analysis coincided with the topology of the UPGMA tree. This work allowed us to evaluate the five SNPs genetic diversity and to demonstrate that the grouping of the breeds may be the result of its history, selection process, or both at once.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Marbling is an important trait for meat quality because confers juiciness, flavor and tenderness to beef hence it contributes directly to the price of beef on international markets. Many candidate genes have been suggested as responsible for marbling in beef cattle, such as diacylglycerol O-acyltransferase1 (DGAT1), thyroglobulin (TG), growth hormone (GH), leptin (LEP) and stearoyl-coenzyme A desaturase (SCD) (Barendse et al., 1999, 2001, 2004, 2006; Buchanan et al., 2002; Thaller et al., 2003; Nkrumah et al., 2004a,b; Taniguchi et al., 2004; Sorensen et al., 2006; Oka et al., 2002; Tatsuda et al., 2008).

The DGAT1 is a microsomal enzyme that catalyzes the final step of triglyceride synthesis. The DGAT1 gene has been mapped to bovine chromosome 14. A lysine/alanine (K232A) substitution on the protein encoded by the bovine DGAT1 gene has been shown to be associated with milk fat content in different breeds such as Holstein–Friesian, Fleckvieh and Jersey (Grisart et al., 2002; Spelman et al., 2002; Winter et al., 2002), and with fat deposition in beef cattle. Thaller et al. (2003) showed that the lysine allele of DGAT1 has also a positive effect on intramuscular fat content in the Charolais and Holstein breeds. Moreover, Sorensen et al. (2006) re-

ported that the DGAT1 activity in *longissimus dorsi* muscle in individuals with K/K genotype was about five fold greater than for either the K/A or A/A genotypes in Holstein and Charolais bulls. In contrast, Moore et al. (2003) detected no association of the SNP in the DGAT1 gene (K232A mutation) with fat thickness in a commercial line of *Bos taurus*. In addition, Casas et al. (2005) reported no significant associations of DGAT1 alleles with carcass composition and meat quality traits in *Bos indicus*.

The T3 and T4 thyroid hormones have an important role in the metabolic regulation, and among other functions, they affect the lipid metabolism. TG is the precursor of T3 and T4 in the thyroid gland and its gene has been mapped to bovine chromosome 14. By this reason, the TG gene has been considered as a candidate gene to explain differences in marbling. Barendse et al. (2001) reported the C to T transition in the thyroglobulin 5' leader sequence to be highly associated with intramuscular fat deposition in long-fed cattle. This transition defines the '2' (C) and '3' (T) alleles. Barendse et al. (1999, 2004) found that the TG '3' allele was more frequent in animals with higher marbling scores. However, this marker appears to be useful in Wagyu cattle specifically. In other beef cattle breeds this marker has not proved to be a good predictor of marbling (Rincker et al., 2006; Barendse et al., 2004; Casas et al., 2005, 2007).

As was mentioned above, DGAT1 and TG genes have been mapped to the centromeric region of chromosome 14. The presence of a quantitative trait locus (QTL) in the centromeric end of chromosome 14 associated with production traits in cattle has

\* Corresponding author. Address: IGEVEV – CCT La Plata – FCV – CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata B1900AVW, CC 296, Argentina. Tel./fax: +54 221 4211799.

E-mail address: [mvrpoli@fcv.unlp.edu.ar](mailto:mvrpoli@fcv.unlp.edu.ar) (M.V. Ripoli).

been supported by many studies (Coppeters et al., 1998; Heyen et al., 1999; Riquet et al., 1999; Looft et al., 2001; Boichard et al., 2003).

GH is a polypeptide hormone secreted by the anterior pituitary gland and it plays a major role in tissue growth, fat metabolism and homeorhesis (Shingu et al., 2004; Beauchemin et al., 2006; Thomas et al., 2007). The GH gene is the regulator of the animal growth and metabolism and it has been mapped to bovine chromosome 19. Different polymorphisms have been identified in the bovine GH gene (Lucy et al., 1991; Zhang et al., 1993; Kirkpatrick et al., 1993). Most of these polymorphisms have been associated with differences in carcass composition, marbling and milk production (Lee et al., 1996; Yao et al., 1996; Lechniak et al., 2002; Di Stasio et al., 2005; Curi et al., 2005; Barendse et al., 2006; Thomas et al., 2007). In the present report the analyzed polymorphism was GH6.1, also known as AluI RFLP (Yao et al., 1996). It is caused by a C to G nucleotide change in the fifth exon of the gene, which gives rise to two alleles that are responsible for alternative forms of bovine GH with a Leucine or Valine amino acid residue at position 127.

LEP is a protein hormone product of the obese gene synthesized and secreted predominantly by white adipocytes (Zhang et al., 1994; Ji et al., 1998). The role of LEP as a lipostatic signal that regulates whole-body energy metabolism makes it one of the best physiological markers of body weight, food intake, energy expenditure (Houseknecht et al., 1998; Woods et al., 1998), reproduction (Cunningham et al., 1999; Garcia et al., 2002), and certain immune system functions (Lord et al., 1998). LEP gene has been mapped to bovine chromosome 4 (Stone et al., 1996). Polymorphisms in the coding regions of the leptin gene in cattle have been associated with serum leptin concentration (Liefers et al., 2003), feed intake (Liefers et al., 2002; Oprzadek et al., 2003), milk yield (Liefers et al., 2002; Buchanan et al., 2003), body fatness (Buchanan et al., 2002; Nkrumah et al., 2004a,b) and with marbling scores ([http://ca.igenity.com/igenity\\_beef1.html](http://ca.igenity.com/igenity_beef1.html)). We analyzed the polymorphism situated in exon 3 of the leptin gene (Liefers et al., 2002) which causes an amino acid change from Alanine to Valine amino acid residue at position 59.

SCD is the enzyme responsible for the conversion of saturated fatty acids to  $\Delta 9$ -monounsaturated fatty acids. Inhibition of desaturase activity leads to an accumulation of stearic acid in bovine adipose tissue, which can cause a substantial increase in fat hardness (Smith et al., 1998; Yang et al., 1999). The fatty acid composition of bovine fat has an impact on the visual manifestation of marbling during processing, the softness of the fat, and the flavour of the meat on the consumers plate (Melton et al., 1982; Smith et al., 1998). Due to its important role in fatty acid oxidation, SCD is a candidate for genetic variation in fatty acid composition. Taniguchi et al. (2004) reported in Japanese Black cattle an aminoacid substitution on the SCD gene that may change the enzymes's catalytic activity. This SNP, observed in the ORF (position 878) of SCD gene, causes an amino acid replacement from Valine (V) to Alanine (A).

On the other hand, several studies have reported geographical clines in polymorphism on genes related with production traits, such as  $\alpha_{s1}$ -cas,  $\kappa$ -cas, GH, serum albumin, several microsatellites and Y-chromosome polymorphisms. These gradients have been shown to be related to different causes, such as domestication centre, population origin, migration route, gene introgression and/or adaptive effects of a particular allele (Baker and Manwell, 1980; Medjugorac et al., 1994; MacHugh et al., 1994, 1997; Lirón et al., 2002; Beja-Pereira et al., 2002, 2003).

The objective of the present work was to evaluate the polymorphisms of five SNPs of candidate genes related with marbling: DGAT1, TG, LEP, GH and SCD in 389 animals of 18 *B. Taurus* (European, Asian and Creole) and *B. indicus* breeds, in order to evaluate the genetic diversity within and among studied populations and

the phylogenetic relationship of the analyzed breeds. The results obtained from the analysis of the SNPs were compared with ones previously obtained with five loci related to milk production (Lirón et al., 2002) and nine microsatellites (Lirón et al., 2006) in the same populations. Moreover we wanted to check whether the phylogenies reconstructed using SNPs associated with marbling resulted in the known tree topology.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection

Blood samples were collected from 389 animals belonging to 18 *B. Taurus*, *B. indicus* (Brahman and Nelore) and synthetic Brangus breeds (Table 1). The *B. Taurus* breeds were grouped according to their geographical origin in European (Hereford, Aberdeen Angus, Galloway, Holstein, Jersey, Charolais and Retinta), Asian (Wagyu) and American Creole breeds (Argentine Creole, Patagonian Creole, Saavedreño Creole, Chaqueño Boliviano, Chusco, Valle Grande Creole, Yacumeño Creole).

### 2.2. DNA extraction

Total DNA was extracted from blood samples using the DNAzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer instructions.

### 2.3. SNPs genotyping

The five SNPs of candidate genes related with marbling were analyzed by PCR-RFLP or PCR-SSCP as detailed in Table 2.

**Table 1**  
Summary of cattle breeds sampled.

Breed	Acronyms	N	Breed origin	Sample origin
Hereford	HE	21	England	Argentina
Aberdeen Angus	AA	59	Scotland	Argentina–Uruguay
Galloway	G	10	Scotland	Argentina
Holstein	HO	20	Netherlands	Argentina
Jersey	J	10	Island of Jersey	Argentina
Charolais	CH	14	France	Uruguay
Retinta	T	26	Spain	Spain
Argentine Creole	AM	20	Argentina	Argentina
Patagonian Creole	CA	20	Argentina	Argentina
Saavedreño Creole	SAA	20	Bolivia	Bolivia
Chaqueño Boliviano	ES	20	Bolivia	Bolivia
Chusco	PA	7	Bolivia	Bolivia
Valle Grande Creole	V	20	Bolivia	Bolivia
Yacumeño Creole	Y	35	Bolivia	Bolivia
Brangus	BR	12	EE.UU	Argentina
Brahman	BZ	20	EE.UU	Bolivia
Nelore	NE	33	Brasil	Argentina–Bolivia
Wagyu	W	22	Japan	Uruguay

**Table 2**  
Genotyped method, analyzed mutation and reference for each studied SNP.

SNP	Method	Analyzed mutation	Author
DGAT1	PCR-SSCP	K232A (eighth exon)	Ripoli et al. (2006)
TG	PCR-RFLP	C → T (5' leader sequence)*	Barendse et al. (2001)
LEP	PCR-RFLP	A59 V (third exon)	Liefers et al. (2002)
GH	PCR-RFLP	L217 V (fifth exon)	Yao et al. (1996)
SCD	PCR-RFLP	Val → Ala (878 ORF position)	Taniguchi et al. (2004)

\* This transition defines the '2' (C) and '3' (T) alleles.



## 2.4. Statistical analysis

### 2.4.1. Measures of genetic variability

GENEPOP 1.2 software (Gou and Thompson, 1992; Raymond and Rousset, 1995) was used for calculation of allele frequencies, for each locus in each studied population. The unbiased expected heterozygosity ( $h_e$ ) for each locus and the average heterozygosity over all loci ( $H_e$ ) were calculated according to Nei (1978), using the ARLEQUIN 2.0 software package (Schneider et al., 2000). Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) for each locus within populations was estimated by  $F_{IS}$  statistics (Weir and Cockerham, 1984), using the exact test included in GENEPOP 1.2 software.

### 2.4.2. Genic differentiation and population's subdivision

Genetic subdivision and genetic differentiation among breeds were studied with Wright's  $F_{ST}$  statistic, using the variance-based method of Weir and Cockerham (1984) and with the exact G test (Goudet et al., 1996). These parameters were calculated using the GENEPOP 1.2 software package (Raymond and Rousset, 1995). A hierarchical analysis of the variance was carried out, after defining groups of breeds based on their historical origin, using the AMOVA software implemented in the ARLEQUIN 2.0 package (Schneider et al., 2000). Structure 2.0 software (Pritchard et al., 2000) was used for inferring population structure from genotype data. To analyze the population structure with this software were considered admixture and no admixture ancestry models, correlated or independent gene frequencies models, and was used a burning period of 100,000 followed by 1,000,000 Markov chain Monte Carlo (MCMC) repeats. In the case of no admixture model, the number of genetic clusters (K) ranged from 1 to 17.

Nei's standard genetic distance ( $D_A$ ) was calculated from allele frequencies. Dendograms were constructed from the distance matrix using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) and the Neighbor-Joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987) algorithms. Distance and tree were computed using Populations 1.2.28 software (Langella, 1999). The tree was visualized using TreeView (Page, 1996). To condense the genetic variation revealed for the five SNPs, principal components analysis (PCA) was performed from all allele frequencies according to Cavalli-Sforza et al. (1994) using PAST software (Paleontological Statistics; Hammer et al., 2001).

## 3. Results

### 3.1. Allele frequencies

Allele frequencies for all breeds are presented in Table 3. As a rule for the loci studied, the same alleles were predominant in most of the cattle breeds. At the SCD and LEP loci variant A was the most abundant in all studied populations. In addition, alleles DGAT1 A, TG 2 and GH L were the most common variants in most of the cattle breeds analyzed. The exceptions were DGAT1 A variant in Argentine Creole, Nelore and Brahman breeds, TG 2 allele in Galloway and Wagyu breeds, and GH L allele in Wagyu.

### 3.2. Hardy–Weinberg equilibrium

From a total of 90 locus–population possible combinations, only 71 HWE tests could be calculated. Sixteen locus–population combinations were excluded because one variant was fixed or almost fixed (frequency higher than 0.975), while three locus–population combinations had not data. A total of 10 locus–population combinations were statistically significant ( $P \leq 0.05$ ) (Table 4). These deviations comprise two loci in Hereford, Valle Grande Creole and Wagyu cattle, and one locus in Jersey, Patagonian Creole,

**Table 3**

Estimated gene frequencies for five analyzed SNPs in Hereford (HE), Holstein (HO), Jersey (J), Charolais (CH), Aberdeen Angus (AA), Retinta (T), Galloway (G), Patagonian Creole (CA), Saavedreño Creole (SAA), Chaqueño Boliviano (ES), Valle Grande Creole (V), Argentine Creole (AM), Chusco (PA), Yacumeño Creole (Y), Wagyu (W), Brangus (BR), Brahman (BZ) and Nelore (NE) cattle breeds.

BREED	DGAT1 A	TG 2	LEP A	GH L	SCD A
HE	0.95	0.98	0.63	0.83	1
HO	0.81	0.78	0.85	0.85	0.95
J	0.65	0.50	0.86	0.78	1
CH	0.89	0.92	0.50	0.75	1
AA	0.90	0.74	0.89	0.57	1
T	0.71	0.71	0.80	0.64	0.71
G	0.85	0.40	0.81	1	0.60
CA	0.79	0.50	0.81	0.91	0.98
SAA	0.75	0.72	0.86	0.74	1
ES	0.55	0.77	0.50	0.87	0.76
V	0.50	0.79	0.83	0.53	1
AM	0.47	0.75	0.83	0.97	0.89
PA	0.64	0.50	0.50	1	0.80
Y	0.60	0.91	0.60	0.72	0.61
W	0.50	0.32	0.58	0.19	0.95
BR	0.62	0.70	0.80	0.82	0.96
BZ	0.20	0.89	0.69	1	0.98
NE	0.31	0.90	0.54	0.90	1

Chaqueño Boliviano and Charolais breeds. Non-significant deviations from HWE were observed for the other ten analyzed breeds.

### 3.3. Heterozygosity

The values of observed ( $h_o$ ) and unbiased expected ( $h_e$ ) heterozygosities for each locus of the 18 breeds, calculated from gene frequencies, are given in Table 4. The  $h_e$  ranged from 0.047 for TG in Hereford, to 0.571 for TG in the Chusco breed. The average heterozygosity ( $H_e$ ) was also estimated for each population, varying from 0.182 in Hereford breed to 0.484 in Chusco Creole cattle.

### 3.4. Genetic distances

The  $F_{ST}$  index and the exact G test for population differentiation were used to analyze the degree of genetic differentiation among the cattle breeds studied. The  $F_{ST}$  parameter showed significant differences across the cattle populations ( $F_{ST} = 0.1593$ ), ranging from 0.070 to 0.2053 for each locus ( $F_{ST} \text{ LEP} = 0.070$ ;  $F_{ST} \text{ TG} = 0.1374$ ;  $F_{ST} \text{ SCD} = 0.1682$ ;  $F_{ST} \text{ DGAT1} = 0.1818$ ;  $F_{ST} \text{ GH} = 0.2053$ ). The exact G test for population differentiation indicated that gene distributions are significantly different among populations (exact  $p$  value for all loci  $p \leq 0.0001$ ).

AMOVA analysis allowed to partitionate genetic variability between different groups of breeds based in their historical origin. At first, this analysis was performed for each locus considering only one group. These results evidence that difference among populations account for 7–21% of genetic diversity, while difference within populations account for 78–92% of genetic variance (Table 5). The highest percentage of variation among populations was for GH gene (21.11%), whereas the biggest percentage within population was for LEP locus (92.93%).

Moreover, AMOVA was calculated grouping the breeds in four groups according to their European, Asiatic, Creole or Zebu origin. Considerable levels of variation among groups were observed (90–95%), while variance among populations within each group only explained between 5% and 10% of the genetic variance. These analyses evidenced that the greatest percentage of variation among groups was for DGAT1 and TG loci (15.47% and 13.42% respectively).

**Table 4**  
Observed ( $h_o$ ) and expected ( $h_e$ ) heterozygosities, and significant Fis index for five SNPs in the eighteen analyzed populations.

Breed	DGAT1			LEP			TG			GH			SCD	
	$h_o$	$h_e$	Fis (P value)	$h_o$	$h_e$	Fis (P value)	$h_o$	$h_e$	Fis (P value)	$h_o$	$h_e$	Fis (P value)	$h_o$	$h_e$
HE	0	0.102	1 (0.026)	0.737	0.478	−0.565 (0.039)	0.048	0.047		0.333	0.285		0	0
AA	0.1	0.185		0.220	0.198		0.317	0.386		0.387	0.494		0	0
HO	0.263	0.309		0.176	0.258		0.444	0.357		0.3	0.261		0.1	0.097
J	0.300	0.479		0	0.264		1	0.526	−1 (0.006)	0.444	0.366		0	0
BZ	0.294	0.337		0.500	0.436		0.214	0.198		0	0		0.048	0.048
AM	0.278	0.513		0.167	0.290		0.500	0.387		0.05	0.050		0.208	0.191
CA	0.176	0.337		0.125	0.325		0.818	0.524		0	0.169	1 (0.002)	0.050	0.050
SAA	0.500	0.384		0.143	0.254		0.437	0.417		0.260	0.394		0	0
ES	0.789	0.508	−0.058 (0.022)	0.538	0.520		0.467	0.370		0.263	0.235		0.474	0.371
PA	0.714	0.494		1	0.513		1	0.571		0	0		0	0.356
V	0.900	0.513	−0.791 (0.001)	0.333	0.290		0.412	0.337		0.118	0.513	0.776 (0.002)	0	0
NE	0.461	0.443		0.267	0.514		0.200	0.189		0.115	0.177		0	0
BR	0.583	0.489		0.200	0.337		0.600	0.442		0.364	0.312		0.083	0.083
CH	0.214	0.198		0.429	0.538		0	0.159	1 (0.043)	0.214	0.389		0	0
W	0.800	0.513	−0.583 (0.023)	0.167	0.500	0.673 (0.010)	0.529	0.451		0.381	0.316		0.091	0.089
T	0.571	0.423		0.400	0.355		0.579	0.422		0.454	0.474		0.579	0.422
Y	–	–		–	–		0.187	0.175		0.5	0.413		0.643	0.495
G	–	–		0.231	0.323		0.200	0.505		0	0		0.609	0.433

**Table 5**  
Percentage of variation obtained by AMOVA test.

Source of variation in% of variation	DGAT1	LEP	TG	GH
Among populations	17.84	7.61	13.26	21.11
Within populations	82.16	92.93	86.74	78.89
Among groups	15.47	0.76	6.02	13.42

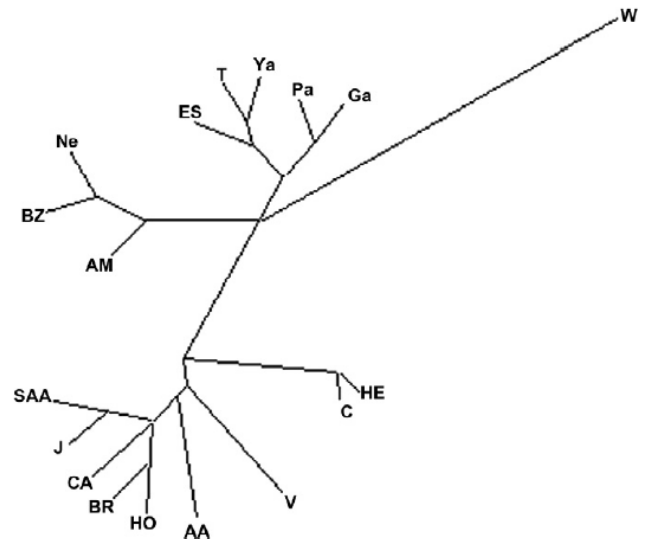
### 3.5. Genetic distances and relationships between populations

Allele frequencies were used to generate the  $D_A$  genetic distances for each pair of 18 cattle populations. Distance matrix was used in order to build phylogenetic trees using UPGMA and the NJ algorithms. Depending on the clustering algorithm used, different topologies were obtained. Only the tree constructed with UPGMA, using genetic distance  $D_A$ , exhibit a topology partially consistent with the historical origin of breeds since the tree illustrates the main divergences observed between the Asiatic Taurine, European Taurine and Zebu clades. The UPGMA tree constructed from a matrix of  $D_A$  distances is shown in Fig. 1. Due to the spatial distortion caused by Wagyu a second UPGMA tree was generated without considering alleles frequencies of this breed. However, in both cases, the outcome of multivariate analysis was similar.

### 3.6. Principal components analysis (PCA)

The PCA was performed from allele frequencies. Fig. 2 illustrates the first and the second PCs for the five SNPs frequency distributions in 16 cattle breeds, since the Galloway and Yacumeño Creole breeds were excluded from the PCA analysis because it distorting the spatial representation. The first two components were selected, accounting cumulatively for 67.45% of the variability in the data. The first PC accounts for 37.29% of the total variance and clearly distinguishes the Wagyu breed and the others groups. The second PC summarizes 29.16% of the variation, and shows a differentiation pattern with the Zebu group in one side and the Taurine breeds in the other. In both cases the differences were explained by the gene frequencies of GH, TG and DGAT1 loci. The third PC, which accounts for 15% of the variance, was not represented in the figure because did not provide any relevant information about relationships between populations.

A second PCA was performed without the Wagyu gene frequencies since this breed position in the first PCA was far away from other races (Fig. 3). In this case the first two components account-



**Fig. 1.** UPGMA tree constructed from a matrix of  $D_A$  distances (W, Wagyu; Ga, Galloway; PA, Chusco Creole; Ya, Yacumeño Creole; T, Retinta; ES, Chaqueño Boliviano Creole; Ne, Nelore; BZ, Brahman; AM, Argentine Creole; SAA, Saavedreño Creole; J, Jersey; CA, Patagonian Creole; BR, Brangus; HO, Holstein; AA, Aberdeen Angus; V, Valle Grande Creole; C, Charolais and HE, Hereford cattle breeds).

ing cumulatively for 67.46% of the variability in the data. The first PC accounts for 44.73% of the total variance and shows a differentiation pattern with the Zebu group in one side and the Taurine breeds in the other. This difference was explained by gene frequencies of DGAT1 locus. The second PC summarizes 22.73% of the variation, and distinguishes Charolais and Hereford of the other breeds. The third PC, which accounts for 15% of the variance, did not provide any relevant information.

The two PCA results obtained largely coincided with the topology of the phylogenetic tree constructed with UPGMA using the classical genetic distance  $D_A$ .

### 4. Discussion and conclusions

In this work we evaluated the polymorphisms of five SNPs related with marbling in *B. taurus* and *B. indicus* breeds, in order to calculate the genetic diversity within and among studied popula-



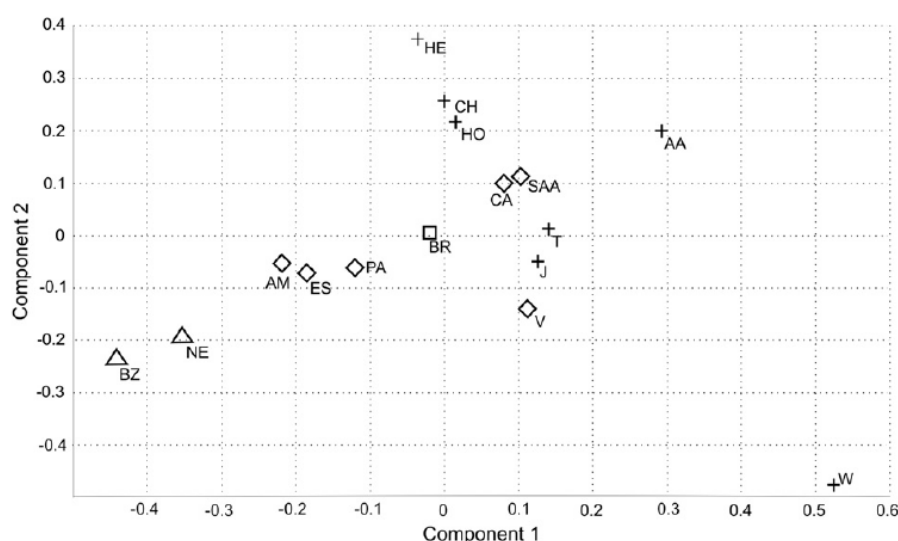


Fig. 2. Principal components analysis (PCA) of allele frequencies from five genotyped SNPs in sixteen analyzed populations (W, Wagyu; PA, Chusco Creole; T, Retinta; ES, Chaqueño Boliviano Creole; NE, Nelore; BZ, Brahman; AM, Argentine Creole; SAA, Saavedreño Creole; J, Jersey; CA, Patagonian Creole; B, Brangus; HO, Holstein; AA, Aberdeen Angus; V, Valle Grande Creole; CH, Charolais and HE, Hereford cattle breeds).

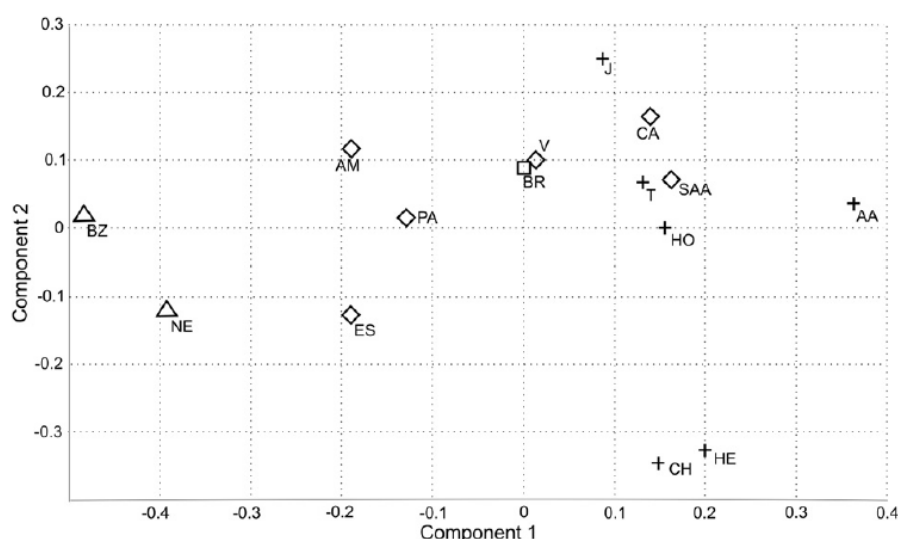


Fig. 3. Principal components analysis (PCA) of allele frequencies from five genotyped SNPs in fifteen analyzed populations (PA, Chusco Creole; T, Retinta; ES, Chaqueño Boliviano Creole; NE, Nelore; BZ, Brahman; AM, Argentine Creole; SAA, Saavedreño Creole; J, Jersey; CA, Patagonian Creole; B, Brangus; HO, Holstein; AA, Aberdeen Angus; V, Valle Grande Creole; CH, Charolais and HE, Hereford cattle breeds).

tions, and the phylogenetic relationship of the analyzed breeds. We also compared the results obtained from the analysis of these SNPs with ones previously obtained with loci related to milk production and STRs in these populations (Lirón et al., 2002, 2006). Lirón et al. (2002), studied the genetic diversity and population structure in Argentine and Bolivian Creole cattle by analysis of five loci related to milk production. Moreover, Lirón et al. (2006) assessed the genetic diversity and relationships of European taurine, Zebuine and American Creole cattle breeds through nine microsatellites.

Our second objective was to assess whether the SNPs reflected the phylogenetic relationship like the microsatellite markers (Lirón et al., 2006), since the SNPs analyzed were subjected to artificial selection processes, and the phylogenetic relationships may be distorted by the effect of selection.

The analysis of observed gene frequencies evidenced that GH and TG loci in Wagyu breed presented values away from those ob-

served in the other breeds. This aspect could be explained by the fact that this breed is selected for marbling and present the highest values of marbling (Zembayashi et al., 1995). The allele frequencies analysis of DGAT1 locus evidenced a geographical cline that was given by high frequencies for the A allele in European breeds (0.95–0.81) followed by Creole and Retinta (0.79–0.47), Wagyu (0.50) and lastly Zebu breeds (0.31–0.20). The similar frequencies in Creole and Retinta may be consequence of the origin of Creole breeds from Iberian cattle. Allele frequencies of Zebu breeds were very different with respect to Taurine breeds due to Cebuine breeds had a low frequency of the A allele, in agreement with previously reported results (Winter et al., 2002; Ripoli et al., 2006). The allele frequencies analysis of TG, LEP, GH and SCD loci did not evidenced a so marked geographical cline.

The HWE tests evidenced that 10 locus-population combinations were statistically significant (two loci in Hereford, Valle

Grande Creole and Wagyu cattle and one locus in Jersey, Patagonian Creole, Chaqueño Boliviano and Charolais breeds), including five combinations with excess of heterozygotes and five combinations with excess of homozygotes. These deviations may be consequence of some possible causes like selection, small number of samples, population stratification and inbreeding.

When we compared the UPGMA unrooted tree with that obtained with microsatellites by Lirón et al. (2006), some differences were observed. While the STRs UPGMA tree showed that all Creole cattle breeds are clustered together, Brahman and Nelore (*B. indicus* breeds) were a separate group and Holstein was clustered with Angus and Hereford (*B. taurus* breeds), the marbling SNPs markers UPGMA tree did not evidence well defined groups. The lack of consistent topology of the phylogenetic trees is commonly explained by several factors. First, the construction of trees using admixture population, such as Creole cattle, contradicts the principles of phylogeny reconstruction (Felsenstein, 1982). The second issue that should be considered is the number of markers analyzed. Based on theoretical studies, Takesaki and Nei (1996) have shown that one of the important factors for analyzing the correct phylogenetic position of populations in a genetic study is the number of loci used. The number of markers genotyped here are probably insufficient for complete resolution. Nevertheless, various taurine phylogenetic analyses performed with a higher number of microsatellites also evidenced a weak topology in Taurine breeds (Moazami-Goudarzi et al., 1997; Martín-Burriel et al., 1999; Cañon et al., 2001). Another way of understanding the lack of structure is assuming that populations have differentiated according to a radiative scheme of divergence (Moazami-Goudarzi and Laloe, 2002). According to this model, it is expected that genetic distances between breeds would be equivalent, and any casual differences among them might be due to random genetic drift. Furthermore, this scheme anticipates discrepancies among topology exhibited by each marker. Increasing the number of loci does not necessarily enhance the reliability of the phylogeny. In contrast to the large divergence between the Taurine and Zebu cattle, the European breeds and American Creole, which originated around four centuries ago, could be considered to be closely related, and the main factor describing their genetic variability is random drift and selection.

However, the UPGMA tree topology was partially consistent with the historical origin of breeds since the tree illustrates the main divergences observed between the Asiatic Taurine, European Taurine and Zebu clades. The Wagyu breed was located at one end of the tree, and the Zebu group (Nelore and Brahman) with Argentine Creole cattle were located in an intermediate position between the two Taurine groups. One of these Taurine clades included Galloway, Retinta and some Creole breeds (Chaqueño Boliviano, Yacumeño Creole and Chusco). This last fact probably can be explained due to Retinta breed was one of the breeds introduced in America by the Spanish conquerors during the first 50 years of colonization. In the other Taurine clade we found Jersey, Brangus, Holstein, Angus with some Creole breeds (Saavedreño Creole, Patagonian Creole, Valle Grande Creole). Hereford and Charolais were grouped together but close to the latter clade. Within Zebu breeds, Brahman and Nelore were more similar to each other than with Brangus. This fact is consistent with the origin of Brahman (obtained crossing Nelore, Guzerat and Gir) and Brangus. This latter breed is 3/8 Brahman and 5/8 Angus and that is why gene frequencies in Brangus are more similar to Taurine breeds than to Zebu breeds.

The grouping of the breeds may be the result of its history, selection process, or both at once, the latter case may be the situation that explains the UPGMA tree topology obtained. Probably the fact that Wagyu was at one end may be the result of selection processes for higher marbling score. Furthermore, the clustering of Hereford with Charolais would be a consequence of their lower level of marbling.

The result observed in terms of the Principal Components Analysis also matched with the topology of the phylogenetic tree and was in concordance with the marbling score of breeds and with the historical origin of the breeds, dividing Wagyu from the others breeds, and Zebu from Taurine breeds. The first principal component (PC) of the PCA performed with all gene frequencies, clearly distinguishes the Wagyu breed and the others groups, and this was explained by the gene frequencies of TG and GH loci, whose values in Wagyu breed were found away from those values observed in the remaining breeds. This aspect could be explained by the fact that this breed is selected for marbling and present the highest values of marbling (Zembayashi et al., 1995). The second PC shows a differentiation pattern with the Taurine breeds in one side and the Zebu group in the other. The DGAT1 frequencies explain this principal component as Cebuine breeds had a low frequency of the A allele, in agreement with previously reported results (Winter et al., 2002; Ripoli et al., 2006). Interestingly, European breeds had the A allele at a very high frequency. It is worth noting that the A allele is considered part of the ancestral haplotype of DGAT1 in European populations (Winter et al., 2002). Native Creole breeds tended to have higher frequencies of the A allele, but always below those of European breeds. The fact that native breeds have allele frequencies intermediate to those of European and Cebuine breeds may be consequence of the introgression process of alleles of Cebuine origin in Creole herds (Lirón et al., 2006; Ripoli et al., 2006).

The first principal component (PC) of the PCA performed without Wagyu gene frequencies, distinguishes the Zebu group in one side and the Taurine breeds in the other and this is explained by the gene frequencies of DGAT1 locus. The second PC distinguishes the Charolais and Hereford from the other breeds. This differentiation was explained by TG gene frequencies and would be a consequence of their lower level of marbling. This result was consistent with that observed in the UPGMA tree.

When the AMOVA analysis was performed for each locus considering only one group the difference among populations account for 7–21% of genetic diversity, while difference within populations account for 78–92% of genetic variance. This result was coincident with the  $F_{ST}$  estimation. This last index indicated that around 16% of the total genetic variation corresponded to differences between breeds while the other 84% corresponded to differences among individuals. Otherwise, the degree of population structure, measured with  $F_{ST}$  index, was higher than the value previously reported for microsatellites (9%) (Lirón et al., 2006) and for loci related to milk production (11%) (Lirón et al., 2002) in some of these populations. In all three cases, the analyzed markers showed significant differences among the populations studied. The STRs showed genetic differentiation among breeds and between the two major types of cattle (Zebu and Taurine groups) (Lirón et al., 2006). These results were a consequence of the presence of some Zebu diagnostic alleles. In the case of loci related to milk production (Lirón et al., 2002), all the variants of the loci analyzed were found in nearly all cattle breeds studied, hence the significant differences observed across Creole cattle populations were consequence of the allelic distribution, rather than diagnostic alleles.

The SNPs associated with marbling distinguished the Wagyu breed from the other groups, and differentiated the Taurine and the Zebu breeds based on the allele frequencies patterns because they are biallelic markers. In the case of DGAT1 locus, similar gradient in gene frequencies were previously reported for other genes such as  $\alpha_{S1}$  casein where variant B were predominant in Taurine while variant C were more abundant in Zebu breeds (Baker and Manwell, 1980; Giovambattista, 1996; Postiglioni et al., 1998; Arranz Santos, 1994; Arranz Santos et al., 1996; Ripoli, 2001). The differences observed for TG and GH allele frequencies would be



consequence of marbling selection process and may be this fact explains the UPGMA tree topology obtained.

In conclusion, the main findings of this study were: (i) the partial confirmation of the phylogeny reconstruction of the studied breeds obtained with STRs, probably due to the effect of selection for marbling reflected in PCA and UPGMA tree analyses; (ii) the interaction of history, selection process and random genetic drift in the determination of grouping of the breeds.

## Acknowledgments

Research for this paper was supported by the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), Universidad Nacional de La Plata (UNLP) and the Japanese International Cooperation Agency (JICA).

## References

- Arranz Santos, J.J., Bayon, Y., San Primitivo, F., 1996. Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. *Animal Genetics* 27, 415–419.
- Arranz Santos, J.J., 1994. Estudio genético en poblaciones bovinas mediante polimorfismos bioquímicos y de DNA (Variaciones puntuales y microsatélites). Tesis Doctoral. Leon, España. Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Departamento de Producción Animal I, 190p.
- Baker, A.C.M., Manwell, C., 1980. Chemical classification of cattle: 1. Breed groups. *Animal Blood Groups Biochemical Genetics* 11, 127–150.
- Barendse, W., Bunch, R.J., Harrison, B.E., 2004. The leptin C73T missense mutation is not associated with marbling and fatness traits in a large gene mapping experiment in Australian cattle. *Animal Genetics* 36 (1), 86–88.
- Barendse, W.J., 1999. Assessing lipid metabolism. Patent, International Publication Number WO 99/23248. World International Property Organization.
- Barendse, W., 2001. DNA markers for meat tenderness. Patent Publication Number WO02064820. Available from: <<http://ep.espacenet.com/>> (accessed 09.02.04).
- Barendse, W., Bunch, R., Thomas, M., Armitage, S., Baud, S., Donaldson, N., 2001. The TG5 DNA marker test for marbling capacity in Australian feedlot cattle. In: *Proceeding of Beef Quality CRC Marbling Symposium*. Coffs Harbour, Australia, pp. 52–57.
- Barendse, W., Bunch, R.J., Harrison, B.E., Thomas, M.B., 2006. The growth hormone 1 GH1:c.457C>G mutation is associated with intramuscular and rump fat distribution in a large sample of Australian feedlot cattle. *Animal Genetics* 37 (3), 1–211.
- Beauchemin, V.R., Thomas, M.G., Franke, D.E., Silver, G.A., 2006. Evaluation of DNA polymorphisms involving growth hormone relative to growth and carcass characteristics in *Brahman steers*. *Genetics and Molecular Research* 5 (3), 438–447.
- Beja-Pereira, A., Alexandrino, P., Bessa, I., Carretero, Y., Dunner, S., Ferrand, N., Jordana, J., Laloe, D., Moazami-Goudarzi, K., Sanchez, A., Cañon, J.J., 2003. Genetic characterization of southwestern European bovine breeds: a historical and biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites. *Heredity* 94 (3), 243–250.
- Beja-Pereira, A., Erhardt, G., Matos, C., Gama, L., Ferrand, N., 2002. Evidence for a geographical cline of casein haplotypes in Portuguese cattle breeds. *Animal Genetics* 33 (4), 295–300.
- Boichard, D., Grohs, C., Bourgeois, F., Cerqueira, F., Faugeras, R., Neau, A., Rupp, R., Amigues, Y., Boscher, M.Y., Levéziel, H., 2003. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy breeds. *Genetic, Selection, Evolution* 1, 77–101.
- Buchanan, F.C., Fitzsimmons, C.J., Van Kessel, A.G., Thue, T.D., Winkelman-Sim, C., Schmutz, S.M., 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetic, Selection, Evolution* 34, 105–116.
- Buchanan, F.C., Van Kessel, A.G., Waldner, C., Christensen, D.A., Laarveld, B., Schmutz, S.M., 2003. An association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. *Journal of Dairy Science* 86, 3164–3166.
- Cañon, J., Alexandrino, P., Bessa, I., Carleos, C., Carretero, Y., Dunner, S., Ferrand, N., Garcia, D., Jordana, J., Laloe, D., Pereira, A., Sanchez, A., Moazami-Goudarzi, K., 2001. Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genetic, Selection, Evolution* 33, 311–332.
- Casas, E., White, S.N., Riley, D.G., Smith, T.P., Breneman, R.A., Olson, T.A., Johnson, D.D., Coleman, S.W., Bennett, G.L., Chase Jr., C.C., 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science* 83 (1), 13–19.
- Casas, E., White, S.N., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., Bennett, G.L., Smith, T.P.L., 2007. Assessing the association of single nucleotide polymorphisms at the thyroglobulin gene with carcass traits in beef cattle. *Journal of Animal Science* 85, 2870–2814.
- Cavalli-Sforza, L.L., Menozzi, P., Piazza, A., 1994. *The History and Geography of Human Genes*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 413p.
- Coppieters, W., Riquet, J., Arranz, J.J., Berzi, P., Cambisano, N., Grisart, B., Karim, L., Marcq, F., Moreau, L., Nezer, C., Riquet, J., Simon, P., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D., Georges, M., 1998. A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. *Mammalian Genome* 9, 540–544.
- Cunningham, M.J., Clifton, D.K., Steuner, R.A., 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspective and mechanisms. *Biology of Reproduction* 60, 216–222.
- Curi, R.A., de Oliveira, H.N., Silveira, A.C., Lopes, C.R., 2005. Association between IGF-I, IGF-IR and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. *Livestock Production Science* 94 (3), 159–167.
- Di Stasio, L., Destefanis, G., Brugiapaglia, A., Albera, A., Rolando, A., 2005. Polymorphism of the GHR gene in cattle and relationships with meat production and quality. *Animal Genetics* 36 (2), 138–140.
- Felsenstein, J., 1982. How can we infer geography and history from gene frequencies? *Journal of Theoretical Biology* 96, 9–20.
- Garcia, M.R., Amstalden, M., Williams, S.W., Stanko, R.L., Morrison, C.D., Keisler, D.H., Nizielski, S.E., Williams, G.L., 2002. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *Journal of Animal Science* 80, 2158–2167.
- Giovambattista, G., 1996. Estudio de la variabilidad (polimorfismos) genética en poblaciones de bovinos (*Bos taurus*) de la raza Criolla. Tesis Doctoral. La Plata, Argentina. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, 165p.
- Gou, S.W., Thompson, E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361–372.
- Goudet, J., Raymond, M., Demeüs, T., Rousset, F., 1996. Testing genetic differentiation in diploid populations. *Genetics* 144, 1933–1940.
- Grisart, B., Coppieters, W., Famir, F., 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Research* 12, 222–231.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electronica* 4. Available from: <[http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)>.
- Heyen, D.W., Weller, J.L., Ron, M., Gand, M., Feldmesser, E., Da, Y., Wiggins, G.R., VanRaden, P.M., Lewin, H.A., 1999. A genome scan for quantitative trait loci influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiological Genomics* 1, 165–175.
- Houseknecht, K.L., Baile, C.A., Matteri, R.L., Spurlock, M.C., 1998. The biology of leptin: a review. *Journal of Animal Science* 76, 1405–1420.
- Ji, S., Willis, G.M., Scott, R.R., Spurlock, M.E., 1998. Partial cloning and expression of the bovine leptin gene. *Animal Biotechnology* 9 (1), 1–14.
- Kirkpatrick, B.W., Huff, B.M., Casas-Carrillo, E., 1993. Double-strand conformation polymorphism as a source of highly polymorphic genetic markers. *Animal Genetics* 24 (3), 155–162.
- Langella, O., 1999. Populations, version 1.2.28. Population genetic software. Available from: <<http://www.pge.cnrs-gif.fr>>.
- Lechniak, D., Adamowicz, T., Stanislawski, D., Kaczmarek, D., 2002. In vitro maturation and fertilisation of bovine oocytes in relation to GH gene polymorphism (Leu/Val). *Reproduction Nutrition Development* 42, 275–280.
- Lee, B.K., Lin, G.F., Crooker, B.A., Murtaugh, M.P., Hansen, L.B., Chester-Jones, H., 1996. Association of somatotropin (BST) gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in Holstein cows. *Domestic Animal Endocrinology* 13 (4), 373–381.
- Liefers, S.C., te Pas, M.F., Veerkamp, R.F., van der Lende, T., 2002. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science* 85, 1633–1638.
- Liefers, S.C., te Pas, M.F., Veerkamp, R.F., Chilliard, Y., Delavaud, C., Gemtzen, R., van der Lende, T., 2003. Association of leptin gene polymorphisms with serum leptin concentration in dairy cows. *Mammalian Genome* 14 (9), 657–663.
- Lirón, J.P., Ripoli, M.V., De Luca, J.C., Peral-García, P., Giovambattista, G., 2002. Analysis of genetic diversity and population structure in Argentine and Bolivian Creole cattle using five loci related to milk production. *Genetics and Molecular Biology* 25 (4), 413–419.
- Lirón, J.P., Peral-García, P., Giovambattista, G., 2006. Genetic characterization of Argentine and Bolivian Creole cattle breeds assessed through with microsatellites. *Journal of Heredity* 97 (4), 331–339.
- Loft, C., Reinsch, N., Karall-Albrecht, C., Paul, S., Brink, M., Thomsen, H., Brockmann, G., Kühn, C., Schwerin, M., Kalm, E., 2001. A mammary gland EST showing linkage disequilibrium to a milk production QTL on bovine chromosome 14. *Mammalian Genome* 12 (8), 646–650.
- Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R., Lechler, R.I., 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394, 897–900.
- Lucy, M.C., Hanser, S.D., Eppard, P.J., Krivi, G.G., Collier, R.J., 1991. Genetic polymorphism within the bovine somatotropin (bST) gene detected by polymerase chain reaction and endonuclease digestion. *Journal of Dairy Science* 74, 284.
- Machugh, D.E., Loftus, R.T., Bradley, D.G., Sharp, P.M., Cunningham, P., 1994. Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proceedings of the Royal Society of London* 256, 25–31.
- Machugh, D.E., Shriver, M.D., Loftus, R.T., Cunningham, P., Bradley, D.G., 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and



- phylogeography of Taurine and Zebu Cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* 146, 1071–1086.
- Martín-Burriel, I., García-Muro, E., Zaragoza, P., 1999. Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites. *Animal Genetics* 30, 177–182.
- Medjugorac, I., Kustermann, W., Lazar, P., Russ, I., Pirchner, F., 1994. Marker-derived phylogeny of European cattle supports demic expansion of agriculture. *Animal Genetics* 25 (1), 19–27.
- Melton, S.L., Amiri, M., Davis, G.W., Backus, R.W., 1982. Flavor and chemical characteristics of ground beef from grass, forage grain and grain finished steers. *Journal of Animal Science* 55, 77.
- Moazami-Goudarzi, K., Laloe, D., Furet, J.P., Grousclaude, F., 1997. Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Animal Genetics* 28, 338–345.
- Moazami-Goudarzi, K., Laloë, D., 2002. Is a multivariate consensus representation of genetic relationships among populations always meaningful? *Genetics* 162 (1), 473–484.
- Moore, S.S., Li, C., Basarab, J., Snelling, W.M., Kneeland, J., Murdoch, B., Hansen, C., Benkel, B., 2003. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos taurus*. *Journal of Animal Science* 81, 1919–1925.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583–590.
- Nkrumah, J.D., Li, C., Basarab, J.A., Guercio, S., Meng, Y., Murdoch, B., Hansen, C., Moore, S.S., 2004a. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, growth, feed efficiency, feeding behaviour and carcass merit. *Journal of Animal Science* 84, 211–219.
- Nkrumah, J.D., Basarab, J.A., Price, M.A., Okine, E.K., Ammoura, A., Guercio, S., Hansen, C., Li, C., Benkel, B., Murdoch, B., Moore, S.S., 2004b. Different measures of energetic efficiency and their phenotypic relationships with growth, feed intake, and ultrasound and carcass merit in hybrid cattle. *Journal of Animal Science* 82, 2451–2459.
- Oka, A., Iwaki, F., Dohgo, T., Ohtagaki, S., Noda, M., Shiozaki, O., 2002. Genetic effects on fatty acid composition of carcass fat of Japanese Black Wagyu steers. *Journal of Animal Science* 80, 1005–1011.
- Oprzadek, J., Flisikowski, K., Zwierzchowski, L., Dymnicki, E., 2003. Polymorphisms at loci of leptin (LEP), Pit1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in black and white bulls. *Animal Science* 21, 135–145.
- Page, R.D.M., 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12, 357–358.
- Postiglioni, A., Rincón, G., Kelly, L., D'Angelo, M., Gagliardi, R., De Andrés Cara, D., 1998. Caracterización genética de los Bovinos Criollos del Uruguay. II. Estudio de su variabilidad genética. *Archivos de Zootecnia* 47, 225–231.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2), 945–959.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995a. GENEPOP (version 1.2): a population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248–249.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995b. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49, 1280–1283.
- Rincker, C.B., Pyatt, N.A., Berger, L.L., Faulkner, D.B., 2006. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. *Journal of Animal Science* 84 (3), 686–693.
- Ripoli, M.V., 2001. Detección de QTLs (Quantitative Traits Loci) para la producción lechera a través del uso de marcadores genéticos en el ganado bovino Criollo Argentino y Criollo Saavedreño. Su aplicación en programas pilotos de selección asistida por marcadores (MAS). Tesis Doctoral. La Plata, Argentina. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, 189p.
- Ripoli, M.V., Corva, P., Giovambattista, G., 2006. Analysis of a polymorphism in the DGAT1 gene in 14 cattle breeds through PCR-SSCP methods. *Research in Veterinary Science* 80, 287–290.
- Riquet, J., Coppieters, W., Cambisano, N., 1999. Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: application to milk production in dairy cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9252–9257.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L., 2000. Arlequin Version 2.000: A Software for Population Genetics Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Shingu, H., Hodate, K., Kushibiki, S., Ueda, Y., Touno, E., Shinoda, M., Ohashi, S., 2004. Hormonal and lactational responses to growth hormone-releasing hormone treatment in lactating Japanese black cows. *Journal of Dairy Science* 87, 1684–1693.
- Smith, S.B., Yang, A., Larsen, T.W., Tume, R.K., 1998. Positional analysis of triacylglycerols from bovine adipose tissue lipids varying in degree of unsaturation. *Lipids* 33, 197–207.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R., 1973. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. Freeman, San Francisco, 573p.
- Sorensen, B., Kühn, C., Teuscher, F., Schneider, F., Weselake, R., Wegner, J., 2006. Diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity in relation to muscle fat content and DGAT1 genotype in two different breeds of *Bos taurus*. *Archiv Tierzucht* 49 (4), 351–356.
- Spelman, R.J., Ford, C.A., McElhinney, P., Gregory, G.C., Snell, R.G., 2002. Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. *Journal of Dairy Science* 85 (12), 3514–3517.
- Stone, R.T., Kappes, S.M., Beattie, C.W., 1996. The bovine homolog of the obese gene maps to chromosome 4. *Mammalian Genome* 7, 399–400.
- Takesaki, N., Nei, M., 1996. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144, 389–399.
- Taniguchi, M., Mannen, H., Oyama, K., Shimakura, Y., Watanabe, H., 2004. Differences in stearoyl-CoA desaturase mRNA levels between Japanese Black and Holstein cattle. *Livestock Production Science* 87, 215–220.
- Tatsuda, K., Oka, A., Iwamoto, E., Kuroda, Y., Takeshita, H., Kataoka, H., Kouno, S., 2008. Relationship of the Bovine growth hormone gene to carcass traits in Japanese Black cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 125 (1), 45–49.
- Thaller, G., Krämer, W., Winter, A., Kaup, B., Erhardt, G., Fries, R., 2003. Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. *Journal of Animal Science* 81, 1911–1918.
- Thomas, M.G., Enns, R.M., Shirley, K.L., García, M.D., Garrett, A.J., Silver, G.A., 2007. Associations of DNA polymorphisms in growth hormone and its transcriptional regulators with growth and carcass traits in two populations of Brangus bulls. *Genetics and Molecular Research* 6, 222–237.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of populations structure. *Evolution* 38, 1358–1370.
- Winter, A., Krämer, W., Werner, F.A.O., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J.E., Thaller, G., Fries, R., 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9300–9305.
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte Jr., D., Schwartz, M.W., 1998. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280, 1378–1383.
- Yang, A., Larsen, T.W., Powell, V.H., Tume, R.K., 1999. A comparison of fat composition of Japanese and long-term grain-fed Australian steers. *Meat Science* 51, 1–9.
- Yao, J., Aggrey, S.E., Zadworny, D., Hayes, J.F., Kühnlein, U., 1996. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. *Genetics* 144 (4), 1809–1816.
- Zembayashi, M., Nishimura, K., Lunt, D.K., Smith, S.B., 1995. Effect of breed type and sex on the fatty acid composition of subcutaneous and intramuscular lipids of finishing steers and heifers. *Journal of Animal Science* 73, 3325–3332.
- Zhang, H.M., Brown, D.R., DeNise, S.K., Ax, R.L., 1993. Rapid communication: polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of the bovine somatotropin gene. *Journal of Animal Science* 71, 2276.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.