

MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS AL VETEADO DE LA CARNE EN BOVINOS CRIOLLOS URUGUAYOS

MOLECULAR MARKERS RELATED TO MARBLING IN URUGUAYAN CREOLE CATTLE

Armstrong, E.^{1*}, Peñagaricano, F.¹, Artigas, R.¹, De Soto, L.¹, Corbi, C.¹, Llambí, S.¹, Rincón, G.² y Postiglioni, A.¹

¹Área Genética. Departamento de Genética y Mejora Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Uruguay. *eileen.armstrong@gmail.com

²Department of Animal Science. University of California. Davis. USA.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Calidad de carne. Genética molecular. Recursos genéticos del Uruguay.

ADDITIONAL KEYWORDS

Meat quality. Molecular genetics. Genetic resources of Uruguay.

RESUMEN

En Uruguay existe una reserva genética de bovinos Criollos ubicada en el Departamento de Rocha. Estudios previos basados en marcadores moleculares altamente polimórficos mostraron que dicha población presenta una alta diversidad genética. En la década del 60 se produjo una migración de bovinos Criollos de la reserva a establecimientos ganaderos del norte del país. Este ganado fue utilizado en cruzamientos comerciales con las razas Aberdeen Angus, Hereford, Caracú y cebuinas, estando sus productos introducidos en el mercado cárnico uruguayo. Se presentan datos de la caracterización genética de la reserva y de dos poblaciones cruce (Rivera y Cerro Largo) para tres marcadores moleculares asociados al veteado de la carne: diacilglicerol acetil-transferasa (DGAT1), tiroglobulina (TG) y leptina (LEP), así como una metodología de genotipado novedosa y eficaz para el polimorfismo del gen LEP mediante TETRA-ARMS PCR. La reserva de Criollos mostró una predominancia de los alelos y genotipos asociados a carne de bajo tenor graso en todos los marcadores. Las dos poblaciones cruce de Criollo con razas comerciales mostraron la misma tendencia para el gen DGAT1, pero mayores frecuencias de los alelos y genotipos que generan un incremento del veteado para TG y LEP. Los índices de diversidad genética resultaron de bajos a moderados (He mínima= 0,000 para DGAT1 en la población cruce de Rivera; He máxima= 0,632 para TG en la población cruce de Cerro Largo). No se observan diferencias significativas de los valores

esperados para los parámetros poblacionales, según índices F_{IS} y prueba de equilibrio Hardy-Weinberg, salvo en un caso (TG en el rodeo de Cerro Largo). Los valores de F_{ST} muestran la similitud genética entre las dos poblaciones cruce y su diferenciación con respecto a la reserva de Criollos Uruguayos puros. La introgresión de razas comerciales y los objetivos de selección en pos de una mayor productividad afectaron las frecuencias de los marcadores analizados en los rodeos cruce. Por otro lado, el aislamiento reproductivo, la ausencia de selección artificial y la incidencia de la deriva y la selección natural han moldeado los parámetros genéticos de la reserva de Criollos Uruguayos.

SUMMARY

The Uruguayan Creole cattle genetic reserve, located in the department of Rocha, has a high level of genetic variation, as previous studies using polymorphic markers showed. Cattle from this reserve were taken to commercial farms in the North of Uruguay during the 60'. These animals were used in crosses with commercial breeds (Aberdeen Angus, Hereford, Caracú) and zebu (*Bos indicus*) cattle for meat production. We analyzed a sample of Creole cattle from Rocha and from two crossbred populations from Northern Uruguay (Rivera and Cerro Largo) using three molecular markers associated with marbling: diacylglycerol acyl transferase (DGAT1),

Recibido: 15-4-09. Aceptado: 29-3-10.

Arch. Zootec. 60 (231): 707-716. 2011.

thyroglobulin (TG) and leptin (LEP). We describe a novel and cost-effective genotyping method based on TETRA-ARMS PCR for LEP polymorphism. The Creole cattle reserve showed higher frequencies of alleles and genotypes associated with low marbling scores in all markers. Both crossbred populations showed the same trend for DGAT1, but higher frequencies for alleles and genotypes associated with higher marbling in TG and LEP. Genetic diversity indexes were low to moderate (minimum $H_e = 0.000$ for DGAT1 in Rivera crossbred population; maximum $H_e = 0.632$ for TG in Cerro Largo crossbred population). No significant departures from the expected values were detected according to F_{IS} and Hardy-Weinberg tests, except for one case (TG in Cerro Largo population). F_{ST} values showed the high genetic similarities between both crossbred populations and their differentiation from the purebred Uruguayan Creole reserve. Genetic introgression of commercial breeds, plus selection objectives tending to increase productivity, had affected the frequencies of the markers analyzed in the crossbred populations. On the other hand, reproductive isolation, absence of artificial selection and the incidence of genetic drift and natural selection had modelled the population parameters of the Uruguayan Creole cattle reserve.

INTRODUCCIÓN

Los bovinos Criollos se encuentran distribuidos por todo el continente americano, estando adaptados a una gran variedad de ecosistemas. Descienden del ganado traído por los conquistadores españoles y portugueses desde el descubrimiento de América (Primo, 1992). En Uruguay existe una reserva genética de bovinos Criollos Uruguayos (*Bos taurus*) en el Parque Nacional de San Miguel, departamento de Rocha. Estos animales se encuentran aislados reproductivamente de otras poblaciones bovinas y no están sometidos a una rigurosa selección artificial. Estudios previos con microsatélites revelan una alta diversidad genética y bajo índice de endogamia ($H_e > 0,60$; $F_{IS} = 0,02$; Armstrong *et al.*, 2006), así como gran diversidad alélica en genes relacionados a producción de leche y deri-

vados (Rincón *et al.*, 2006). En la década de 1960 se produjo una migración de algunos de estos animales a establecimientos ganaderos del norte del país de los Departamentos de Cerro Largo y Rivera, en zonas fronterizas con Brasil. Este ganado Criollo fue utilizado en cruzamientos comerciales con las razas Aberdeen Angus, Hereford, Caracú y cebuinas, estando sus productos introducidos en el mercado cárnico uruguayo. Estudios con microsatélites identifican valores similares de diversidad genética e índices de consanguinidad a los hallados en la reserva de Criollos puros (Postiglioni *et al.*, 2007).

El marmolado o veteado de la carne es de gran importancia en la industria cárnica, determinante de la calidad del producto, pero difícil de medir y de seleccionar por los métodos clásicos. Por este motivo la detección de marcadores moleculares asociados a esta característica puede asistir en la selección de reproductores. Grisart *et al.* (2004) identifican un polimorfismo en el gen bovino DGAT1 que genera dos variantes alélicas para la enzima diacil-glicerol acetyl transferasa: alelo A (alanina en ubicación 232 del polipéptido) y alelo K (lisina en la posición 232). El alelo K hace que la enzima sintetice más triglicéridos en menos tiempo que el alelo A, generando más grasa intramuscular. El polimorfismo responsable del cambio aminoácido es la sustitución de dos nucleótidos (AA por GC) en el exón VIII de DGAT1 (n° de acceso AY065621, posiciones 6829-30; Winter *et al.*, 2002; Thaller *et al.*, 2003).

Por otro lado, el gen TG codifica para la tiroglobulina, también asociada con los niveles de deposición de grasa intramuscular. Este gen presenta un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en un elemento repetitivo corriente arriba del promotor que ha sido asociado a variaciones en los niveles del veteado en ganado vacuno y se incluye en pruebas comerciales de ADN. Una sustitución de una citosina por una timina da lugar a dos alelos: C y T (posición

MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A VETEADO EN CRIOLLOS URUGUAYOS

422 del n° de acceso GenBank X05380). Los animales heterocigotas u homocigotas para el alelo T (CT o TT) presentan mayores registros de veteado que los homocigotas para el alelo C (Barendse *et al.*, 2004; Casas *et al.*, 2005; Van Eenennaam *et al.*, 2007).

El gen de la leptina (gen LEP) está involucrado en el metabolismo lipídico, afectando la deposición de grasa en la carne y por tanto asociado también a variaciones del veteado. Existe una sustitución de citosina por timina en el exón 2 del gen que genera un cambio aminoacídico de arginina por cisteína en la proteína resultante, estando el alelo T asociado a un mayor contenido de grasa (n° de acceso del SNP rs29004488; Buchanan *et al.*, 2002; Soria y Corva, 2004; Schenkel *et al.*, 2005). En este trabajo, se presenta además, un protocolo novedoso, sencillo y de bajo costo para el genotipado del SNP mencionado del gen de la leptina.

Con el propósito de analizar el potencial genético para producción de carne con mayor o menor veteado en el Criollo Uruguayo puro y en las poblaciones de bovinos comerciales con introgresión de bovino Criollo, se realizó el genotipado de estos marcadores asociados a esta característica de importancia en la industria cárnica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron muestras de bovinos Criollos Uruguayos puros provenientes de la reserva genética de Rocha (población total: 575 animales) y de dos poblaciones de bovinos comerciales con introgresión de Criollo: Cerro Largo (Establecimiento *San Joaquín*, población total: 661 animales) y Rivera (Establecimiento *Guaviyú*, población total: 98 animales). El número de muestras analizadas por población es variable para cada gen.

Las muestras fueron extraídas al azar y se obtuvo ADN a partir de sangre y folículo piloso con protocolos estándar. Los genes DGAT1 y TG se analizaron mediante PCR-RFLP, utilizando las enzimas de restricción Mwo I (Rincón *et al.*, 2006) y Psu I (Thaller *et al.*, 2003), respectivamente. El protocolo de amplificación utilizado incluye 2,5 µl de buffer de PCR 10X, 1,5 µl de MgCl₂ 25 mM, 1,3 µl de DMSO, 1,0 µl de dNTPs 10 mM, 1,0 µl de cada cebador 10 pmol, 0,2 µl de Taq polimerasa 5 UI, más 10 µl de ADN genómico, en un volumen final de 25 µl. Los cebadores utilizados se presentan en la **tabla I**. El ciclo incluye un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, luego 35 ciclos de amplificación (fase de desnaturalización a

Tabla I. Cebadores utilizados para el genotipado de los SNPs mencionados de los genes DGAT1, TG y LEP. Secuencias y productos de la amplificación. En el caso de LEP se trata de una amplificación alelo específica. (Primers used for genotyping the SNPs mentioned for DGAT1, TG and LEP genes. Sequences and amplification products. In the case of LEP it is an allele-specific amplification).

cebador	secuencia 5' a 3'	producto (pb)
DGAT1 <i>forward</i>	CCTGATGGTCTACACCATCC	285
DGAT1 <i>reverse</i>	CAGGATCCTCACCGCGGTAG	
TG <i>forward</i>	GGGGATGACTACGAGTATGACTG	548
TG <i>reverse</i>	GTGAAAATCTTGTGGAGCTGTA	
LEP <i>forward</i> interno	TGTCTTACGTGGAGGCTGTGCCAGCT	236 (alelo T)
LEP <i>reverse</i> interno	AGGGTTTTGGTGTGCATCCTGGACCTTTTCG	183 (alelo C)
LEP <i>forward</i> externo	GTGGGTGTTCTCGGAGATCGACGATGTG	363 (de los dos
LEP <i>reverse</i> externo	GAGAGGAGCTGTCTTTATGCCAGGGGGG	cebadores externos)

94°C por 30 segundos, fase de hibridación a 60°C por 30 segundos y fase de extensión a 72°C por 30 segundos) y un ciclo final de extensión a 72°C por 30 minutos. Para la posterior digestión con la enzima de restricción se utilizaron 5 µl del producto de PCR, 1,0 µl de buffer 10X, 1,0 µl de enzima de restricción 10 U/µl y 8,0 µl de agua esterilizada. El volumen final de 15 µl fue incubado a 37°C por espacio de 16 horas o toda la noche en el caso de la enzima *Psu I* (gen *TG*) y a 60°C por 2 horas en el caso de *Mwo I* (gen *DGAT1*).

Para el análisis del SNP mencionado del exón 2 del gen *LEP* se utilizó la técnica de *TETRA-ARMS PCR* (*Tetra-primer Amplification Refractory Mutation System PCR*) mediante un protocolo diseñado y puesto a punto en nuestro laboratorio. Este sistema se basa en la utilización de cuatro cebadores, dos externos que circunscriben la amplificación a la región génica donde se encuentra

la mutación y dos internos que generan un segundo amplicón de tamaño variable según con cuál alelo, C o T, haya hibridado su extremo 3'. Para aumentar la especificidad de la reacción se introduce un cambio de base (*mismatch*) entre la primera y la tercera posición previas al extremo 3' de los cebadores internos. Ambos alelos se amplifican simultáneamente y son luego identificados por sus tamaños en electroforesis en gel (Ye *et al.*, 2001). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 2,5 µl de buffer 10X, 3,0 µl de *MgCl₂* 25mM, 1,0 µl de solución de DNTP's 10 mM, 1,3 µl de DMSO, 1,0 µl de solución 10 pmol de cada cebador interno, 0,5 µl de solución 10 pmol de cada cebador externo, 0,2 µl de *Taq* 5U/µl, 1 µl de DNA 50 ng/µl, en un volumen final de 25 µl. El ciclado es un *touchdown* con una temperatura de hibridación de 64°C para el primer ciclo, disminuyendo 1°C cada dos ciclos hasta 60°C, seguidos por 27 ciclos a 60°C. Los cebadores

Tabla II. Frecuencias alélicas y genotípicas de los tres marcadores asociados al veteado en una población genéticamente pura (*Depto. Rocha*) y dos poblaciones cruce de bovinos Criollos Uruguayos (*Cerro Largo* y *Rivera*). Se presentan además las frecuencias promedio de ambas poblaciones cruce (*Prom. cruce*). (Allelic and genotypic frequencies of the three markers associated to marbling in a pure (*Rocha*) and two crossbred (*Cerro Largo* and *Rivera*) populations of Uruguayan Creole cattle. The average frequencies of both crossbred populations are also shown (*Prom. cruce*)).

Marcador	Población	N	Frecuencias alélicas		Frecuencias genotípicas		
DGAT1	Rocha	89	A=0,736	K=0,264	AA=0,528	AK=0,416	KK=0,056
	Cerro Largo	19	A=0,895	K=0,105	AA=0,789	AK=0,211	KK=0,000
	Rivera	20	A=1,000	K=0,000	AA=1,000	AK=0,000	KK=0,000
	Prom. cruce		A=0,948	K=0,053	AA=0,895	AK=0,106	KK=0,000
TG	Rocha	45	C=0,911	T=0,089	CC=0,822	CT=0,178	TT=0,000
	Cerro Largo	38	C=0,658	T=0,342	CC=0,342	CT=0,632	TT=0,026
	Rivera	36	C=0,861	T=0,139	CC=0,722	CT=0,278	TT=0,000
	Prom. cruce		C=0,760	T=0,241	CC=0,532	CT=0,455	TT=0,013
LEP	Rocha	35	C=0,814	T=0,186	CC=0,629	CT=0,371	TT=0,000
	Cerro Largo	28	C=0,536	T=0,463	CC=0,286	CT=0,500	TT=0,214
	Rivera	19	C=0,553	T=0,447	CC=0,316	CT=0,474	TT=0,211
	Prom. cruce		C=0,545	T=0,455	CC=0,301	CT=0,487	TT=0,213

MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A VETEADO EN CRIOLLOS URUGUAYOS

externos e internos utilizados fueron diseñados en base a la secuencia del gen de la leptina bovina (número de acceso Ensembl: ENSBTAG00000014911) y se presentan en la **tabla I**. La exactitud de los genotipos detectados fue confirmada mediante secuenciación automática de tres animales correspondientes a los tres genotipos posibles (CC, CT y TT), que habían sido genotipados previamente con el método que aquí se describe.

Las variantes alélicas fueron identificadas mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio y visualizados mediante luz UV.

Se calcularon frecuencias alélicas y genotípicas, heterocigosidad observada y esperada, estadísticos F (Weir y Cockerham, 1984) y prueba de equilibrio Hardy-Weinberg utilizando los programas Convert (Glaubitz, 2004) y Genepop v4 (Rousset, 2008).

Tabla III. Heterocigosidad observada (*Ho*) y esperada (*He*) para los marcadores analizados en las tres poblaciones. Se presentan también las heterocigosidades promedio de ambas poblaciones cruza (*Prom. cruza*). (Observed (*Ho*) and expected (*He*) heterozygosity for the markers analyzed in the three populations. Average heterozygosity indexes of both crossbred populations are also shown (*Prom. cruza*)).

Marcador	Población	Ho	He
DGAT1	Rocha	0,416	0,391
	Cerro Largo	0,211	0,193
	Rivera	0,000	0,000
	Prom. cruza	0,106	0,097
TG	Rocha	0,178	0,164
	Cerro Largo	0,632	0,454
	Rivera	0,278	0,242
	Prom. cruza	0,455	0,348
LEP	Rocha	0,371	0,306
	Cerro Largo	0,500	0,507
	Rivera	0,474	0,509
	Prom. cruza	0,478	0,508

Tabla IV. Matrices de estadísticos *FIS* y *FST* de las poblaciones analizadas (*FIS* en la diagonal, en negrita) para cada locus y para todos los loci (*global*). (*FIS* and *FST* statistics matrix of the analyzed populations (*FIS* in the diagonal, in bold) for each locus and for all loci (*global*)).

	Rocha	C. Largo	Rivera
DGAT1			
Rocha	-0,064	-	-
C. Largo	0,053	-0,091	-
Rivera	0,169	0,086	-
TG			
Rocha	-0,086	-	-
C. Largo	0,172	-0,392	-
Rivera	0,002	0,098	-0,148
LEP			
Rocha	-0,214	-	-
C. Largo	0,154	0,013	-
Rivera	0,140	-0,023	0,069
Global			
Rocha	-0,098	-	-
C. Largo	0,131	-0,197	-
Rivera	0,117	0,048	-0,034

RESULTADOS

Las muestras analizadas y las frecuencias alélicas y genotípicas detectadas se detallan en la **tabla II**. La heterocigosidad observada y esperada se presentan en la **tabla III**. Los estadísticos F (índices F_{IS} y F_{ST}) se presentan en la **tabla IV**. Los resultados de la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg se detallan en el texto y no se muestran en las tablas.

Para el gen DGAT1, las tres muestras analizadas revelan una frecuencia mucho más elevada del alelo A y del genotipo AA, asociados a una menor proporción de grasa intramuscular. En la población de Rivera el alelo A se encuentra fijado. En el caso de la reserva de Criollos puros de Rocha se observa una mayor paridad de frecuencias de los genotipos AA y AK. Estos resultados determinan bajos índices de heterocigosi-

dad en las poblaciones cruza, y niveles medios en la de Criollos puros. Los índices F_{IS} son bajos y muestran una leve tendencia hacia el exceso de heterocigotas en las poblaciones en las que pudo ser calculado (Rocha y Cerro Largo), sin que eso genere desviaciones de lo esperado para el equilibrio Hardy-Weinberg ($p > 0,05$ en ambos casos). Los índices F_{ST} reflejan la mayor diferencia en las frecuencias alélicas entre las poblaciones de Rivera y de Rocha, siendo para este gen las más distantes entre sí.

En el caso del gen TG se observa predominancia del alelo C, asociado a carne magra, en todos los rodeos y con frecuencias cercanas a la fijación en la población de Criollos puros. En los rodeos cruza, especialmente en el de Cerro Largo, la frecuencia del alelo T es mayor, con una frecuencia más importante de heterocigotas CT. Debido a esto, la heterocigosidad es mayor en Cerro Largo, habiendo una diferencia notoria entre los valores esperados y observados. Dicha diferencia se refleja en el índice F_{IS} para ese rodeo, con un valor alto y negativo, que genera una desviación significativa de lo esperado para el equilibrio Hardy-Weinberg ($p = 0,016$ cuando la hipótesis alternativa es el exceso de heterocigotas y $p = 0,027$ en el test de probabilidad). En las poblaciones de Rocha y Rivera la heterocigosidad es menor, los índices F_{IS} son bajos a medios y no se observan desvíos de lo esperado bajo una situación de equilibrio génico ($p > 0,05$). Las mayores diferencias se observan entre las poblaciones de Rocha y Cerro Largo, lo cual se refleja en un índice F_{ST} más alto entre estos dos rodeos.

En la muestra de Criollos puros identificamos una frecuencia muy elevada del alelo C y del genotipo CC, asociados a carne de bajo tenor graso, para el gen de la leptina. La frecuencia del genotipo CT es importante, pero no se observan individuos homocigotas TT. Debido a esto, los valores observados y esperados de la heterocigosidad, así como del F_{IS} , muestran un exceso de heterocigotas para este polimorfismo. Sin embargo, esta

diferencia no es suficiente para generar desvíos significativos de lo esperado en equilibrio Hardy-Weinberg ($p > 0,05$ en todos los tests). Por otro lado, en las poblaciones cruza de Criollo con razas comerciales de carne observamos una mayor paridad en las frecuencias alélicas y un mayor número de heterocigotas CT para este gen. Los valores de heterocigosidad son medios, más elevados que en el caso del Criollo puro, y los índices F_{IS} son cercanos a cero. No se observan diferencias significativas con lo esperado en el equilibrio génico ($p > 0,05$ en todos los casos). Los valores de F_{ST} reflejan la mayor similitud observada entre las dos poblaciones de Criollos cruza que entre cualquiera de ellas con el rodeo de Criollos puros.

DISCUSIÓN

En este trabajo se presentan las frecuencias génicas, así como otros parámetros poblacionales, de una población de Criollos Uruguayos y dos poblaciones de Criollos con introgresión de razas comerciales, principalmente británicas, para genes relacionados con el metabolismo lipídico. Los genes analizados, DGAT1, TG y LEP, han probado estar asociados a la cantidad de grasa intramuscular en trabajos previos de otros autores (Buchanan *et al.*, 2002; Thaller *et al.*, 2003; Barendse *et al.*, 2004), siendo el veteado una característica fundamental en la determinación de la calidad de la carne vacuna. El análisis poblacional es un paso previo fundamental en caso de que se deseen utilizar polimorfismos genéticos en selección asistida por marcadores.

La técnica desarrollada en nuestro laboratorio para el genotipado del polimorfismo del gen LEP mostró ser altamente efectiva, habiendo coincidido plenamente con los datos obtenidos mediante la secuenciación de esa porción del gen. Al no requerir enzimas de restricción, el genotipado es más sencillo, rápido y de bajo costo.

Los resultados obtenidos para el gen

MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A VETEADO EN CRIOLLOS URUGUAYOS

DGAT1 muestran una clara predominancia del alelo y genotipos asociados con una menor proporción de grasa y coinciden con lo hallado previamente en una muestra menor de Criollos Uruguayos puros (Rincón *et al.*, 2006). Esta tendencia es la usual en razas de *Bos taurus*, a diferencia de lo que ocurre en razas cebuinas y en razas lecheras seleccionadas para un mayor contenido de grasa en la leche, como Jersey, en las cuales se observa una muy alta frecuencia del alelo K (Thaller *et al.*, 2003; Kaupé *et al.*, 2004; Casas *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2009). Las frecuencias halladas en la reserva son muy similares a las reportadas previamente para las razas españolas Toro de Lidia y Asturiana de la Montaña (Kaupé *et al.*, 2004). Otros autores encuentran frecuencias más equilibradas para ambos alelos en poblaciones de bovinos Criollos de Argentina y Bolivia, siendo una de las posibles causas la introgresión de *Bos indicus* (Lirón *et al.*, 2002; Ripoli *et al.*, 2006). Si bien puede existir un bajo nivel de introgresión de razas cebuinas en las poblaciones cruzadas aquí, su influencia en los resultados obtenidos no es evidente. En la reserva de Criollos Uruguayos no se ha detectado introgresión de *Bos indicus* en estudios citogenéticos y moleculares previos (Postiglioni *et al.*, 2002).

En cuanto a los resultados para el polimorfismo del gen TG, las frecuencias detectadas en los tres rodeos son similares a las halladas en razas británicas y europeas continentales (Thaller *et al.*, 2003; Casas *et al.*, 2007; Van Eenennaam *et al.*, 2007). En este caso, la reserva de Criollos de Rocha es la que presenta las frecuencias más extremas, estando el alelo C muy cercano a la fijación. Dado que el tamaño poblacional de la reserva es reducido y ha sufrido cuellos de botella en el pasado, la deriva génica puede haber generado esta tendencia. Por otro lado, el rodeo de Cerro Largo presenta frecuencias más similares de ambos alelos. El exceso de heterocigotas observado en esta población y el desequilibrio generado

puede deberse a eventos recientes de cruzamientos entre razas distintas. La tendencia hacia un mayor porcentaje del alelo T en las dos poblaciones comerciales, favorable a un aumento del veteado, puede ser provocada por los efectos de la selección tendiente a la producción de carne de mejor calidad. Las investigaciones en este marcador y su efecto real sobre los niveles de engrasamiento no son concluyentes, habiendo resultados conflictivos en cuanto a la validez de su uso en selección asistida por marcadores. Rincker *et al.* (2006) no detectan asociación entre este polimorfismo y la cantidad de grasa intramuscular en novillos Simmental; Van Eenennaam *et al.* (2007) tampoco detectan asociación con el nivel de veteado en varias razas, aunque sí con una tendencia al aumento del grado de calidad de la carne; Casas *et al.* (2007) sólo hallan una asociación significativa con el veteado en ganado Wagyu. La tendencia a la fijación del alelo C en casi todas las razas estudiadas no contribuye a dilucidar este problema y pone en evidencia la necesidad de efectuar estudios poblacionales previos a la posible aplicación de los marcadores moleculares en producción animal.

Para el SNP analizado del gen LEP, las frecuencias alélicas y genotípicas en ambos rodeos del norte del país resultaron semejantes a las descritas para razas comerciales, las cuales presentan porcentajes similares de ambos alelos (Buchanan *et al.*, 2002; Schenkel *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2009). Estos resultados pueden explicarse por la selección indirecta a favor del alelo que genera aumento de los depósitos de grasa (alelo T), y por ende mayor ganancia de peso, lo cual es un objetivo de selección permanente en producción de carne. La reserva de Criollos Uruguayos puros se aparta claramente de esta tendencia, mostrando una frecuencia muy elevada del alelo C. Al igual que ocurre con el polimorfismo del gen TG, los resultados obtenidos en esta población reflejan la ausencia de selección artificial y posibles efectos de la deriva génica. La concordancia

cia de los datos obtenidos en los tres rodeos con los resultados esperados según su evolución y composición racial ratifica la técnica de genotipado utilizada.

Al igual que la heterocigosidad, los índices F_{IS} fueron en general moderados o bajos. Esta situación es usual en los marcadores dialélicos en ausencia de eventos que desvíen las frecuencias observadas de lo esperado bajo la hipótesis de equilibrio Hardy-Weinberg.

Los valores de F_{ST} entre las poblaciones reflejan las tendencias descritas para cada gen. Del análisis global de F_{ST} tomando en cuenta todos los marcadores surge que los rodeos de Criollos cruza son más semejantes entre sí que cualquiera de ellos con la reserva de Criollos puros de Rocha. La relación genética entre las tres poblaciones se reduce a la introgresión de animales de la reserva en estos rodeos comerciales en la década de 1960. La composición genética y los objetivos de selección compartidos por ambas poblaciones comerciales las hacen más semejantes, mientras que la ausencia de selección artificial, el tiempo transcurrido y la deriva génica han aumentado la distancia genética de la reserva con las poblaciones cruza.

Resulta interesante observar qué ocurre con estos marcadores relacionados con características productivas en una población que nunca ha sido sometida a selección artificial, como es el caso de la reserva de Rocha. En el gen DGAT1, el alelo A también se asocia a un bajo contenido de grasa en la leche, lo cual a su vez está relacionado a un aumento en la actividad folicular de los ovarios que redundaría en una mayor fertilidad de la hembra (Lucy *et al.*, 1992; Kaupé *et al.*, 2004). Como la producción de leche con bajo nivel de grasa insume un menor gasto energético, estos dos facto-

res combinados podrían generar una ventaja selectiva natural para los portadores del alelo A, especialmente para poblaciones de ganado que han sobrevivido bajo condiciones naturales sin prácticamente ningún tipo de manejo. La ausencia de selección tendiente a un mayor aumento de peso, sumado a la baja o nula introgresión de razas comerciales, británicas o cebuinas, no ha interferido en las frecuencias de los tres SNP analizados.

Los resultados muestran el potencial genético del Criollo Uruguayo, que puede orientarse hacia la producción de carne de bajo tenor graso, apta para mercados que exigen un producto más saludable. También subrayan la importancia de estudios poblacionales previos a la implementación de selección asistida por marcadores. Estos estudios, junto con el análisis de la validez de los marcadores en los distintos sistemas de producción, son fundamentales para determinar el alcance y eficacia de posibles planes de mejora genética que utilicen marcadores moleculares (Ibeagha-Awemu *et al.*, 2008; Neuner *et al.*, 2009). El análisis fenotípico y de otros marcadores relacionados con la calidad de la carne en estas poblaciones permitirá evaluar el potencial productivo del bovino Criollo Uruguayo y sus cruza, en el marco de la caracterización y conservación de los recursos genéticos animales mundiales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Sra. Iris Hernández por su colaboración técnica en el Laboratorio del Área Genética, al proyecto N° 156 Fondo Clemente Estable-PDT por la financiación y al Área Genética de la Facultad de Veterinaria por su financiación parcial y apoyo en equipamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong, E., Postiglioni, A., Martínez, A., Rincón, G. and Vega-Pla, J.L. 2006. Microsatellite analysis of a sample of Uruguayan Creole bulls (*Bos taurus*). *Genet. Mol. Biol.*, 29: 267-272.
- Barendse, W., Bunch, R., Thomas, M., Armitage, S., Baud, S. and Donaldson, N. 2004. The TG5

MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A VETEADO EN CRIOLLOS URUGUAYOS

- thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Aust. J. Exp. Agr.*, 44: 669-674.
- Buchanan, F.C., Fitzsimmons, C.J., Van Kessel, A.G., Thue, T.D., Winkelman-Sim, D.C. and Schmutz, S.M. 2002. A missense mutation in the bovine leptin gene is correlated with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genet. Sel. Evol.*, 34: 1-12.
- Casas, E., White, S.N., Riley, D.G., Smith, T.P.L., Breneman, R.A., Olson, T.A., Johnson, D.D., Coleman, S.W., Bennett, G.L. and Chase, 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. *J. Anim. Sci.*, 83: 13-19.
- Casas, E., White, S.N., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., Bennett, G.L. and Smith, T.P.L. 2007. Assessing the association of single nucleotide polymorphisms at the thyroglobulin gene with carcass traits in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 85: 2807-2814.
- Gill, J.L., Bishop, S.C., McCorquodale, C., Williams, J.L. and Wiener, P. 2009. Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. *Genet. Sel. Evol.*, 41: 36.
- Glaubitz, J. 2004. Convert: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Mol. Ecol. Notes*, 4: 309-310.
- Grisart, B., Farnir, F., Karim, L., Cambisano, N., Kim, J., Kvasz, A., Mni, M., Simori, P., Frere, J., Coppieters, W. and Georges, M. 2004. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 101: 2308-2403.
- Ibeagha-Awemu, E., Kgwatalala, P. and Zhao, X. 2008. A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep and pig. *Mamm. Gen.*, 19: 591-617.
- Kaupe, B., Winter, A., Fries, R. and Erhardt, G. 2004. DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *J. Dairy Res.*, 71: 182-187.
- Lirón, J.P., Ripoli, M.V., De Luca, J.C., Peral-García, P. and Giovambattista, G. 2002. Analysis of genetic diversity and population structure in Argentine and Bolivian Creole cattle using five loci related to milk production. *Genet. Mol. Biol.*, 25: 413-419.
- Lucy, M.C., Savio, J.D., Badinga, R.L., De la Sota, R.L. and Thatcher, W.W. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.*, 70: 3615-26.
- Neuner, S., Edel, C., Emmerling, R., Thaller, G. and Götz, K. 2009. Precision of genetic parameters and breeding values estimated in marker assisted BLUP genetic evaluation. *Genet. Sel. Evol.*, 41: 26.
- Primo, A.T. 1992. El ganado bovino ibérico en las Américas: 500 años después. *Arch. Zootec.*, 41: 421-432.
- Postiglioni, A., Rincón, G., Kelly, L., Llambí, S., Fernández, G., D'Angelo, M., Gagliardi, R., Trujillo, J., Bethencourt, M. de, Guevara, K., Castellano, A. y Arruga, M.V. 2002. Biodiversidad genética en bovinos Criollos del Uruguay. Análisis con marcadores moleculares. *Arch. Zootec.*, 51: 1-8.
- Postiglioni, A., Armstrong, E., Peñagaricano, F., Caffaro, M.J., Iriarte, A., Artigas, R., Barbieri, G., Camio, G. y Rincón, G. 2007. Caracterización genética de dos poblaciones de bovinos de carne con introgresión de Criollos uruguayos. V Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria. UDELAR. 25 pp.
- Rincker, C., Pyatt, N., Berger, L. and Faulkner, D. 2006. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. *J. Anim. Sci.*, 84: 686-693.
- Rincón, G., Armstrong, E. and Postiglioni, A. 2006. Analysis of population structure in Uruguayan Creole cattle inferred from milk major gene polymorphisms. *Genet. Mol. Biol.*, 29: 491-495.
- Ripoli, M.V., Corva, P. and Giovambattista, G. 2006. Analysis of a polymorphism in the DGAT1 gene in 14 cattle breeds through PCR-SSCP methods. *Res. Vet. Sci.*, 80: 287-290.
- Rousset, F. 2008. Genepop v4: a complete reimplementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.*, 8: 103-106.
- Soria, L.A. y Corva, P.M. 2004. Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la

ARMSTRONG ET AL.

- carne bovina. *Arch. Lat. Prod. Anim.*, 12: 73-88.
- Schenkel, F.S., Miller, S.P., Ye, X., Moore, S.S., Nkrumah, J.D., Yu, C.L., Mandell, I.B., Wilton, J.W. and Williams, J.L. 2005. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 83: 2009-2020.
- Thaller, G., Kühn, C., Winter, A., Ewald, G., Bellmann, O., Wegner, J., Zühlke, H. and Fries, R. 2003. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim. Genet.*, 34: 354-357.
- Van Eenennaam, A.L., Li, J., Thallman, R.M., Quaas, R.L., Dikeman, M.E., Gill, C.A., Franke, D.E. and Thomas, M.G. 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J. Anim. Sci.*, 85: 891.
- Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984. Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Winter, A., Kramer, W., Werner, F.A.O., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J.E., Thaller, G. and 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. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 99: 9300-9305.
- Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A. and Day, I. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucl. Acids Res.*, 29: e88.