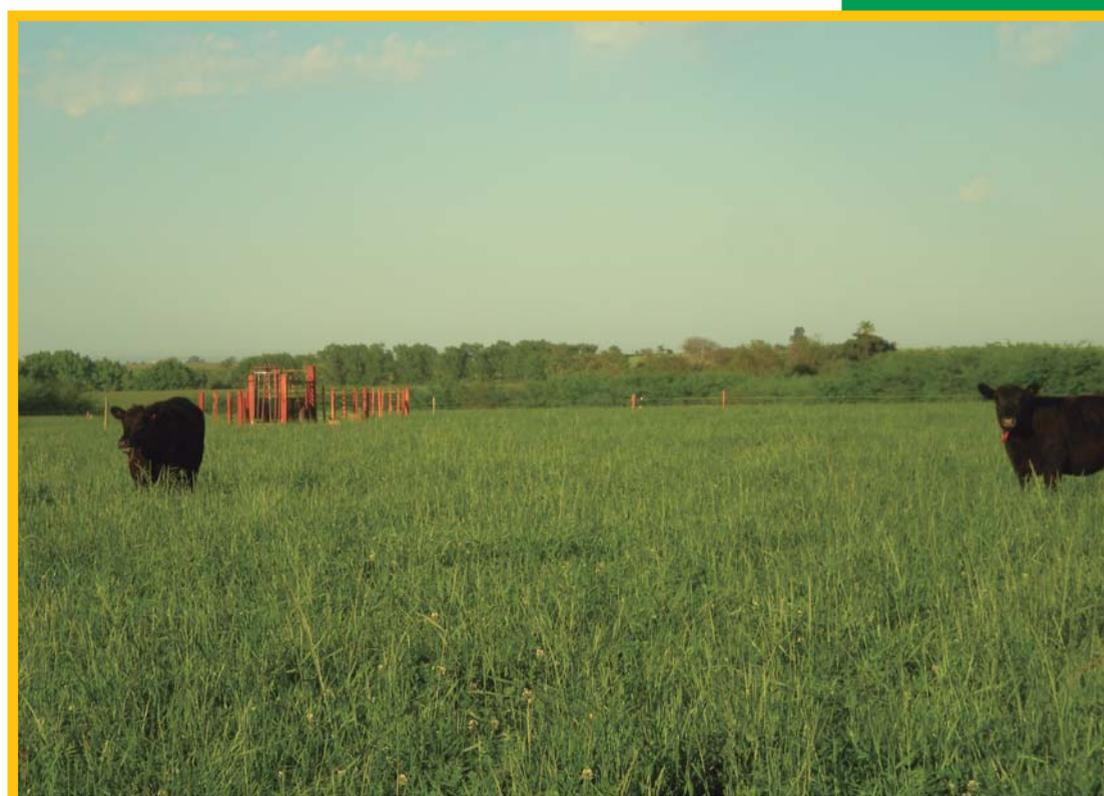




**INSTITUTO
NACIONAL DE
INVESTIGACIÓN
AGROPECUARIA
URUGUAY**



EFICIENCIA ALIMENTICIA EN BOVINOS DE CARNE EN PASTOREO

Octubre, 2015

**SERIE
FPTA-INIA**

59

EFICIENCIA ALIMENTICIA EN BOVINOS DE CARNE EN PASTOREO

Proyecto FPTA-263 Evaluación del consumo residual de alimento como una medida de eficiencia alimenticia en bovinos de carne en pastoreo

Responsable técnica del proyecto: Ana Inés Trujillo Lezama*

Institución ejecutora: Facultad de Agronomía. UdelaR

Equipo técnico de trabajo: Trujillo Ana Inés Ing. Agr. (MSc). Facultad de Agronomía. UdelaR
Carrquiry, Mariana Ing. Agr. (PhD). Facultad de Agronomía. UdelaR
Casal, Alberto DMV. Facultad de Agronomía. UdelaR
Chililbroste, Pablo Ing. Agr. (PhD). Facultad de Agronomía. UdelaR
Espasandín, Ana Carolina Ing. Agr. (PhD). Facultad de Agronomía. UdelaR
Grignola, M. Pía Lic. en Cs Biológicas. Facultad de Agronomía. UdelaR
Peñagaricano, Francisco Lic. en Cs. Biológicas (MSc). Facultad de Agronomía. UdelaR
Urioste, Jorge Ing. Agr. (PhD). Facultad de Agronomía. UdelaR
Meikle, Ana DMV (PhD) y Nicolini, Paula. Lic. en Cs. Biológicas. Facultad de Veterinaria. UdelaR

*Ing. Agr., MSc. Profesora Adjunta Nutrición Animal. Departamento Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía.

Título: EFICIENCIA ALIMENTICIA EN BOVINOS DE CARNE EN PASTOREO

Responsable técnica del Proyecto: Ana Inés Trujillo Lezama

Institución ejecutora: Facultad de Agronomía. UdelaR

Equipo técnico de trabajo: Trujillo Ana Inés, Carriquiry Mariana, Casal Alberto, Chililbroste Pablo, Espasandín Ana Carolina, Meikle Ana, Nicolini Paula, Grignola M. Pía, Peñagaricano Francisco, Urioste, Jorge.

Serie: FPTA N° 59

© 2015, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA
Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

Ing. Agr., MSc., PhD. Álvaro Roel - Presidente

D.M.T. V., PhD. José Luis Repetto - Vicepresidente



Ing. Agr. Jorge Peñaricano

D.M.V., MSc. Pablo Zerbino



Ing. Agr. Joaquín Mangado

Ing. Agr. Pablo Gorriti



FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18º de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 40/00 del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

- a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.
- b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.
- c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos. De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.

CONTENIDO

Página

CAPÍTULO 1. CONSUMO RESIDUAL DE ALIMENTO COMO MEDIDA DE EFICIENCIA ALIMENTICIA 9

CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE SNPs EN GENES QUE CODIFICAN LA SÍNTESIS DE NEUROPEPTIDO Y, LEPTINA E IGF-1 EN GANADO ANGUS

Introducción	17
Algunos conceptos importantes	17
Materiales y métodos	19
Animales.....	19
Colección de muestras de sangre y extracción de ADN.....	19
Optimización de PCR-HRM	19
Cálculos y análisis estadísticos.....	21
Resultados y discusión	21
Metodología de genotipificación por High Resolution Melting	21
Estructura génica de la población.....	23
Conclusiones	24
Bibliografía	24

CAPÍTULO 3. ASOCIACIÓN DE SNPs EN GENES QUE CODIFICAN PARA NPY, LEPTINA Y IGF-1 CON CONSUMO RESIDUAL DE ALIMENTO EN CONDICIONES DE CONFINAMIENTO EN HEMBRAS CRECIMIENTO DE RAZA ANGUS

Resumen	27
Introducción	28
Materiales y Métodos	29
Selección de los animales.....	29
Animales y diseño experimental.....	30
Cálculos de las medidas de eficiencia para los Exp I y II	33
Análisis estadístico	33
Resultados y Discusión.....	33
Experimento I	33
Experimento II	35
Conclusiones	36
Bibliografía	36

CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EL SNP DEL GEN QUE CODIFICA IGF-1 Y CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO EVALUADAS GENÉTICAMENTE (DEPs)

Introducción	41
Materiales y métodos	42

Muestreo de los animales	42
Extracción de ADN y genotipificación	42
Cálculos y análisis estadístico	42
Resultados y discusión	43
Conclusiones	45
Bibliografía	45

Capítulo 1

Consumo residual de alimento como medida de eficiencia alimenticia

Proyecto FPTA 263

Período de Ejecución: Ene. 2009-Ag. 2012

INTRODUCCIÓN

La ganadería vacuna es la principal actividad productiva del país. Ocupa algo más de 13 de los 16 millones de hectáreas y es la que genera más valor agregado, exportaciones, empleo y la que reúne la mayor cantidad de empresas (MGAP-DIEA, 2011).

La competencia de otros sectores sobre el sector ganadero, el incremento del valor de la renta de la tierra y de los costos unitarios de producción se han ido incrementando. Existen otras actividades más rentables como la agricultura, la forestación y la lechería que compiten por el uso del suelo. La ganadería está perdiendo alrededor de 350.000 ha por año, mientras que las hectáreas dedicadas a la agricultura, forestación y lechería siguen creciendo a pasos acelerados, integrándose nuevas empresas al negocio forestal y favoreciéndose la entrada de nuevos modelos de gran escala de operaciones en la lechería (Secco, 2008). Este escenario pone de manifiesto que una de las principales estrategias para competir en el sector está directamente relacionada con la mejora en la eficiencia alimenticia a través del aumento o mantenimiento de la producción y de la reducción de los costos de alimentación. Los costos asociados a la alimentación en los sistemas pastoriles (mano de obra y manejo de ganado, pasturas, maquinaria y vehículo) representan entre el 55-60 % de los costos económicos totales de la empresa ganadera (MGAP-Plan Agropecuario. Monitoreo de empresas ganaderas, 2012).

Desde principios de los años 90 se realizan en Uruguay evaluaciones genéticas para varias características de valor económico relevante en las principales razas de ganado de carne del país. Los valores genéticos (que son expresados en términos de diferencia esperada en la progenie (DEP) proveen de una predicción del potencial genético futuro de la progenie de un individuo. La selección basada en los DEPs ha sido en general exitosa en tanto se ha logrado obtener un importante progreso genético fundamentalmente en características de crecimiento y habilidad materna (732 g/año pesos a los 18 meses, 436 g/año peso al destete, Evaluación Genética de Aberdeen Angus, 2012). Sin embargo, la selección por estas características, que aumentan los «outputs» o salidas en un sistema de producción, está también estrechamente ligada al uso creciente de alimento. Asimismo, la selección de reproductores por crecimiento acelerado y mayores pesos vivos ha generado un incremento en el peso vivo a la madurez. Esto implica un incremento del tamaño adulto promedio de las diferentes razas y de sus requerimientos de mantenimiento, que determina mayores costos de producción, menor eficiencia en uso de los recursos alimenticios, y aumento potencial en problemas ambientales (emisión de gas metano, principalmente).

Además de toda la información aportada por las evaluaciones genéticas que hoy se dispone, existe un creciente interés en contar con estimaciones de valores genéticos en criterios relacionados a eficiencia alimenticia (sin correlaciones

desfavorables con otros rasgos de interés económico) lo cual permitirá visualizar más fácilmente aquellos recursos genéticos más sustentables para nuestros sistemas de producción. La existencia de reproductores generadores de descendencia (vacas y novillos) con menores consumos de alimento (en pastoreo y/o confinamiento) sin desmedro de su performance, conllevará a una disminución en los costos de producción y a posibles incrementos en los ingresos netos de las empresas ganaderas. Paralelamente, utilizando la estrategia de mayor eficiencia por menor consumo, se lograrían considerables reducciones en la producción de poluentes por unidad de producto carne vendido.

CONSUMO RESIDUAL DE ALIMENTO COMO MEDIDA DE EFICIENCIA ALIMENTICIA

El consumo residual de alimento (**CRA** o **RFI**) o consumo neto de alimento como también es llamado, fue definido por primera vez por Koch *et al.*, 1963. Se calcula como la diferencia entre el consumo observado y el consumo estimado para cada individuo, en base a las exigencias de mantenimiento y crecimiento (en ganado de carne) o mantenimiento y producción de leche/kg ternero destetado (en ganado lechero) en un período determinado de tiempo. Es una medida que cuantifica la variación en consumo entre animales que no es explicada por la variación relacionada con el peso y tasa de crecimiento. Esta medida es utilizada para identificar los animales que se desvían de su consumo esperado clasificándolos como de alta eficiencia (CRA negativo) o de baja eficiencia (CRA positivo).

La variación en CRA puede ser explicada por diferencias entre animales a nivel de procesos metabólicos básicos, que explican en definitiva diferencias en producción total de calor (Arthur *et al.*, 2001; Herd *et al.*, 2004; Lancaster *et al.*, 2009). En la Figura 1 se esquematiza la contribución de los procesos biológicos que pueden explicar la variación en CRA.

La investigación en el tema ha mostrado que el CRA presenta variación entre individuos dentro de razas o líneas genéticas y es moderadamente heredable (0,28-0,58, Pitchford, 2004). Se ha

demostrado que existe un potencial de mejora en los valores de CRA y se han identificado genes y polimorfismos que estarían asociados a esta característica (Archer *et al.*, 1999, Nkrumah *et al.*, 2004, Sherman *et al.*, 2008).

El criterio de selección por CRA, a diferencia del criterio de selección por conversión alimenticia (kg de alimento por unidad de ganancia de peso), tiende a elegir animales de menor consumo y menores requerimientos de mantenimiento, sin alterar el peso adulto o las ganancias de peso (Koch *et al.*, 1963, Carstens *et al.*, 2002, Basarab *et al.*, 2003). Varios investigadores (Herd y Bishop, 2000; Arthur *et al.*, 2001, Arthur *et al.*, 2005) han reportado correlaciones, tanto fenotípicas como genéticas, positivas y moderadas entre CRA y consumo de materia seca. Asimismo, la correlación genética entre este nuevo parámetro y el tradicional parámetro de eficiencia, conversión alimenticia, es moderada ($rg = 0,5$, Archer *et al.*, 2001), sugiriendo que diferentes genes estarían ligados a estas características.

Investigadores australianos han estudiado el CRA en ganado de carne desde 1993 y publican periódicamente valoraciones genéticas para CRA (<http://www.angusaustralia.com.au>). Resultados publicados por Arthur *et al.* (2001) han mostrado que el desempeño de la progenie de padres seleccionados por CRA negativos (más eficientes) después de 5 años de selección fue similar en peso al año de edad y en ganancias diarias, pero los consumos fueron menores (11 %) y por tanto, tuvieron menor conversión alimenticia (kg de materia seca/kg de ganancia) comparada con la progenie de los padres seleccionados por CRA positivos (menos eficientes). Adicionalmente, Archer *et al.* (2002) reportaron que el CRA en hembras postdestete estuvo fuertemente correlacionado ($r > 0,90$) con el CRA medido en las mismas hembras convertidas en vacas adultas. Estos resultados sugirieron que los procesos biológicos reguladores del consumo y de la eficiencia son similares en animales en crecimiento y en animales adultos (Archer *et al.*, 2001). Es importante considerar, en la estimación del CRA, además del peso vivo y las ganancias de peso, la composición de esa ganancia. Es decir se deben clasifi-

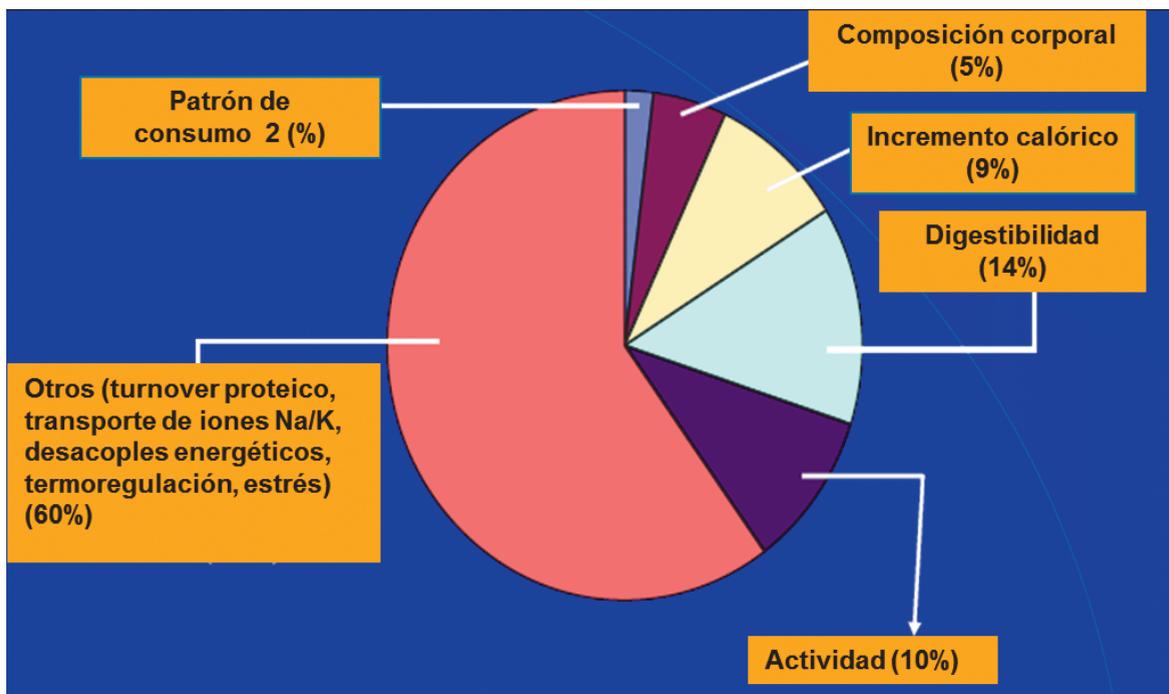


Figura 1. Contribución de los procesos biológicos en el consumo residual de alimento.

Extraído de Richardson E. C and Herd R. M. 2004. Biological basis for variation of RFI in beef cattle. *Australian Journal of Experimental of Agriculture* 44, 431-440.

car los animales en base a un consumo estimado para una misma composición de la ganancia de peso (Basarab *et al.*, 2003).

Adicionalmente, aunque existen resultados contradictorios, algunos estudios han encontrado que los animales más eficientes tenderían a presentar carcasas con menos grasa subcutánea, menos marmoleado y menores depósitos grasos en la cavidad abdominal (Basarab *et al.*, 2003, Fox *et al.*, 2004, Herd and Bishop, 2002).

Para medir CRA se necesitan equipos muy precisos y sofisticados para los registros de consumo individual, así como un elevado número de observaciones para validar los estudios genéticos. Ambos factores hacen que el uso de esta medida de eficiencia sea muy costoso y esto ha sido la principal limitante en la adopción de esta medida de eficiencia como criterio de selección. Los países desarrollados disponen actualmente de sistemas centralizados de alimentación automatizados para alto número de animales que permiten registrar en forma eficiente y precisa el consumo y la performance de cada animal. En estos países se han desarrollado líneas divergentes en la característica de CRA que les ha permitido continuar estudiando este atributo.

Los avances en las técnicas de biología molecular han permitido, a su vez, estudiar el lugar donde se encuentran algunos de los numerosos genes específicos que afectan este atributo en los diferentes cromosomas (mapeo) para luego seleccionar por alelos favorables presentes en las razas estudiadas, usando marcadores genéticos. Un marcador molecular es una variación específica en el ADN entre individuos que ha sido asociado con alguna característica de interés. Los polimorfismos de una sola base (SNPs) son una variación en la secuencia de ADN (por lo tanto son un tipo de marcadores) que afecta a un solo nucleótido del genoma y explica la variación entre individuos, pudiendo afectar la respuesta de los mismos factores de nutrición, manejo y ambiente, entre otros. Es importante resaltar que no es sencillo trabajar con selección asistida por marcadores cuando los marcadores están relacionados con características complejas que involucran muchos genes como la eficiencia alimenticia, ya que la presencia o ausencia de numerosos genes «no marcados» y el medio ambiente/manejo de producción afectará la expresión o no del fenotipo deseado (por ejemplo, menor CRA). Por esta razón, es importante que para la toma de decisio-

nes, la información sobre marcadores moleculares se combine y evalúe conjuntamente con los valores de cría ya que estos últimos estiman la contribución de los genes «no marcados» para el atributo deseado (Van Eenennaam, 2007). Varios estudios han indicado que existe un potencial para el desarrollo de marcadores genéticos y/o fenotípicos para eficiencia alimenticia. Evidencias recientes han demostrado que genes involucrados en la regulación del consumo y en la producción y regulación de la energía pueden afectar la eficiencia alimenticia en ganado de carne (Lagonigro *et al.*, 2003; Nkrumah *et al.*, 2004; Kolath *et al.*, 2006; Sherman *et al.*, 2008). Se han publicado asociaciones entre SNPs en el gen que codifica para la síntesis de leptina (Nkrumah *et al.*, 2004) y en el gen que codifica para NPY (neuropéptido Y) con CRA, mientras que no se han encontrado reportes de asociaciones entre SNPs en el gen que codifica para IGF-1 y CRA en ganado de carne. Así mismo, los valores de CRA en ganado de carne obtenidos con diferentes dietas han mostrado que esta medida de eficiencia depende del tipo de dieta ofrecida (Fan *et al.*, 1995; Goonewardene *et al.*, 2004; Durunna *et al.*, 2010).

A nivel nacional, no se ha generado información sobre esta medida de eficiencia ni se han generado ni validado marcadores en las condiciones pastoriles imperantes de nuestros sistemas de producción de carne.

Es así que, este proyecto tuvo como **objetivo general**:

Realizar una exploración del potencial de mejora genética por eficiencia alimenticia en ganado de carne Angus utilizando herramientas de biología molecular (marcadores).

Y como **objetivo específico**:

Proveer herramientas y/o criterios que ofrezcan la posibilidad de seleccionar bovinos en pastoreo en base al consumo residual de alimento.

El objetivo específico se tradujo en 3 productos:

Producto 1. Determinar las frecuencias alélicas y génicas de variantes alélicas (SNPs) de genes candidatos (NPY, LEPTINA e IGF-1) para consumo residual de alimento en bovinos de la raza Angus.

Producto 2. Determinar las asociaciones entre los SNPs seleccionados y valores de CRA y otras medidas de eficiencia en condiciones de encierro y de pastoreo en bovinos de la raza Angus.

Producto 3. Determinar las asociaciones entre el SNP del gen que codifica IGF-1 y características de crecimiento evaluadas genéticamente (DEPs).

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Para obtener los productos esperados, se llevó a cabo la siguiente estrategia de investigación:

- 1- Estudio de la variabilidad genética de los SNPs de los genes candidatos en la población Aberdeen Angus del Uruguay mediante muestreo de animales nacidos en 2008.
- 2- Selección de los animales experimentales para los estudios de asociación posteriores (Figura 2).
- 3- Estudios de asociación entre los SNPs y el CRA fenotípico medido en dos diferentes condiciones de alimentación: a) experimento en confinamiento con una dieta con alta proporción de concentrado y b) experimento en pastoreo.
- 4- Estudio de asociación entre el SNP del gen que codifica IGF-1 y características de crecimiento evaluadas genéticamente (DEPs).

En la Figura 2 se presenta en forma esquemática la secuencia seguida en la estrategia de investigación (se muestran etapas 1 al 4).

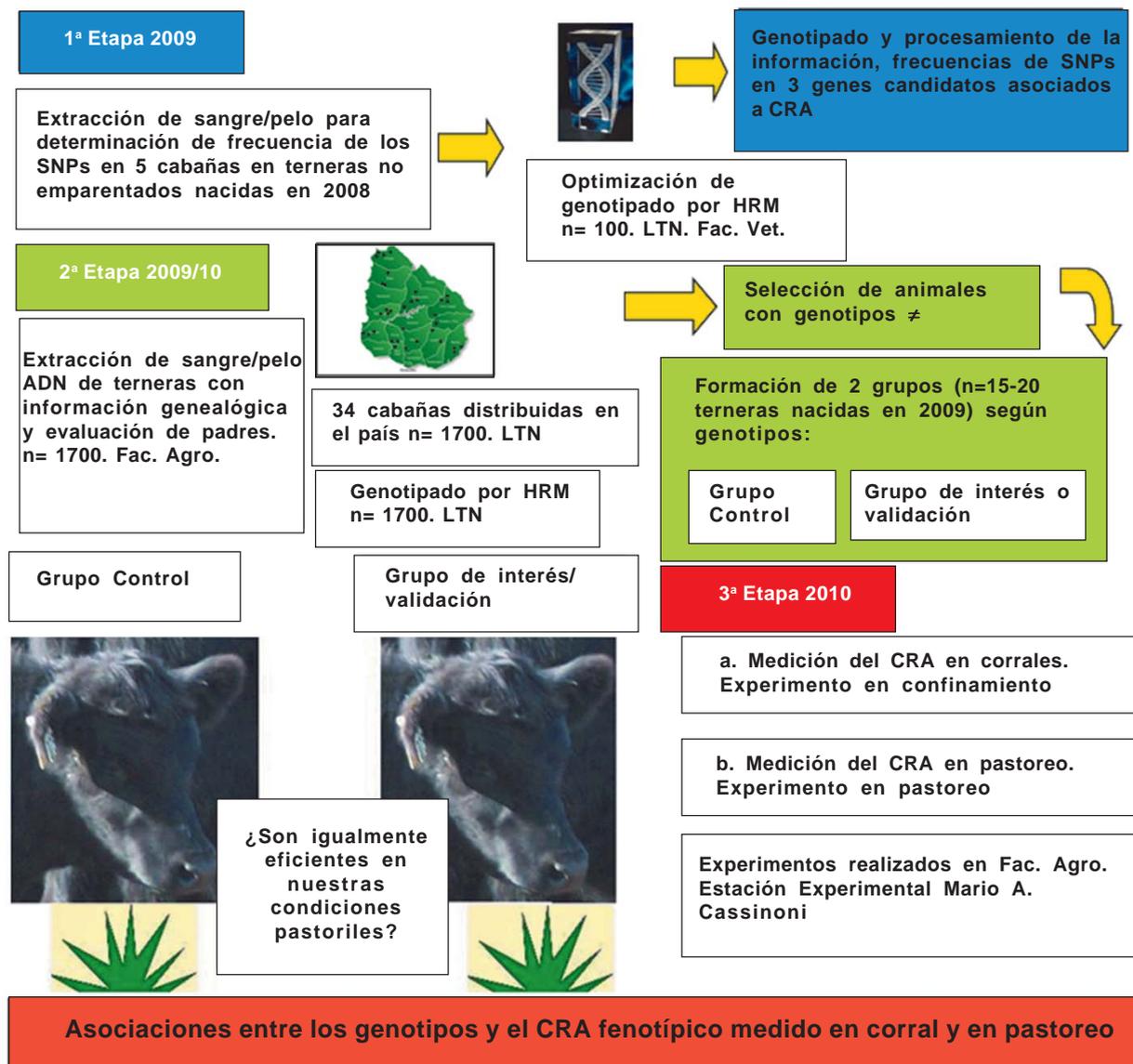


Figura 2.

Esta Serie Técnica comprende los siguientes capítulos que recogen los principales resultados obtenidos:

IDENTIFICACION DE LA VARIABILIDAD GENETICA DE SNPs EN GENES QUE CODIFICAN LA SINTESIS DE NEUROPEPTIDO Y LEPTINA E IGF-1 EN GANADO ANGUS

M. P. Grignola, F. Peñagaricano, P. Nicolini, A. Casal, A.C. Espasandín, M. Carriquiry y A. I. Trujillo

PRODUCTO 2:

ASOCIACION DE SNPs EN GENES NPY, LEPTINA Y IGF-1 CON CONSUMO RESIDUAL DE ALIMENTO MEDIDO EN CONFINAMIENTO Y EN PASTOREO EN GANADO ANGUS

A. I. Trujillo, A. Casal, F. Peñagaricano, M. Carriquiry y P. Chilbroste

PRODUCTO 3:

ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EL SNP DEL GEN QUE CODIFICA IGF-1 Y CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO EVALUADAS GENÉTICAMENTE (DEPs)

A. Casal, A. Kaitazoff, P. Bacigaluz, J. Urioste y A. I. Trujillo

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial va dirigido a la Sociedad de Criadores Aberdeen Angus y a los productores Angus, sin su apoyo no hubiera sido posible realizar la investigación. La hospitalidad que manifestaron y la confianza que los productores Angus depositaron en nosotros permitieron culminar con éxito todos los estudios. Dentro de ellos se encuentra la Escuela Agraria «La Carolina» (UTU) que también nos abrieron sus puertas apoyando nuestro trabajo.

Así mismo, queremos también agradecer a otras instituciones y personas que contribuyeron en este trabajo:

- Instituciones que aportaron materiales y/o apoyo técnico a la investigación desarrollada: Copagran, Laboratorio Santa Elena S. A., Barraca Deambrosis S. A., Caja Bancaria, equipo técnico de INIA Tacuarembó así como al Dr. C. López de Facultad de Agronomía (por su apoyo con las medidas de ultrasonografía) y Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNCPBA en Tandil, Argentina (por su apoyo técnico en las estimaciones del consumo en pastoreo a través de María Bakker). A los Ing. Berretta y Simeone por su apoyo en el protocolo de acostumbramiento de los animales en encierro y en la formulación de la ración de feedlot.

- Estudiantes de grado de la Facultad de Agronomía que colaboraron en algunas o en la mayoría de las etapas de esta investigación: Santiago Gomez de Freitas, Ana Kaitazoff, Dayana Machado Ma. J. Abud, Felipe Lecueder, Matías Franco-Fraguas, Carolina Gaudenti; Isabel García, Mateo Ceriani, Federico Pereira, Valentina Puig, Sebastián Aguirre, D. Gamma y Rodrigo Madruga.

- Victoria Cal por su participación y apoyo en las mediciones de campo de consumo en pastoreo.

- Juan Pablo Marchelli por el apoyo incondicional en la conducción de los experimentos.

BIBLIOGRAFÍA

ARCHER, J. A.; RICHARDSON E. C.; HERD, R. M.; ARTHUR, P. F. 1999. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: A review. *Aust. J. Agric. Res.* 50:147-162.

ARCHER, J.; REVERTER, A.; HERD, R. M.; JOHNSTON, D.; ARTHUR, P. 2002. Genetic variation in feed intake and efficiency of mature beef cows and relationships with postweaning measurements. In: 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montellier, France.

ARTHUR, P. F.; ARCHER, J. A.; JOHNSTON, D.; HERD, R. M.; RICHARDSON E. C.; PARNELL, P. E. 2001. Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency and other post-weaning traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 79:2805-2811.

ARTHUR, P. F.; HERD, R. M.; WILKINS, J. F.; ARCHER, J. A. 2005. Maternal productivity of Angus cows divergently selected for post-weaning residual feed intake. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 45: 985-993.

BASARAB, J. A.; PRICE, M. A.; AALHUS, J. L.; OKINE, E. K.; SNELLING, W. M.; LYLE, K. L. 2003. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 83:189-204.

CARSTENS, G. E., C. M. THEIS, M. B. WHITE, T. H. WELSH JR., B. G. WARRINGTON, R. K. MILLER, R. D. RANDEL, T. D. A. FORBES, H. LIPPKE, L. W. GREENE, AND D. K. LUNT. 2002. Relationships between net feed intake and ultrasound measures of carcass composition in growing beef steers. 2002 Beef Cattle Research in Texas. *Nutrition*. P. 31-34.

DURUNNA, O. N.; MUJIBI, F. D. N.; GOONEWARDENE, L.; OKINE, E. K.; BASARAB, J. A.; WANG, Z.; MOORE, S. S. 2010. Feed efficiency differences and re-ranking in beef steers fed grower and finisher diets. *J. Anim. Sci.* 89, 158-167.

EVALUACIÓN GENÉTICA DE REPRODUCTORES ABERDEEN ANGUS 2012. <http://angusuruguay.com/archivos/texto-catalogo-2012.pdf>

- FAN, L. Q.; BAILEY, D. R. C.; SHANNON, N. H.** 1995. Genetic parameter estimation of postweaning gain, feed intake, and feed efficiency of Hereford and Angus bulls fed two different diets. *J. Anim. Sci.* 73:365-372.
- FOX, J. T.; CARSTENS, G. E.; BROWN, E. G.; WHITE, M. B.; WOODS, S. A.; WELSH, T. H. Jr.; HOLLOWAY, J. W.; WARRINGTON, B. G.; RANDEL, R. D.; FORREST, D. W.; LUNT, D. K.** 2004. Net feed intake of growing bulls and relationships with performance, fertility and ultrasound composition traits. *Beef Cattle Research in Texas*, pp. 117-120.
- GOONEWARDENE, L. A.; OKINE, E.; WANG, Z.; SPANER, D.; MIR, P. S.; MIR, Z.; MARX, T.** 2004. Residual metabolizable energy intake and its association with diet and test duration. *Can. J. Anim. Sci.* 84: 291-295.
- HERD, R. M.; BISHOP, S. C.** 2000. Genetic variation in residual feed intake and its association with other production traits in british Hereford cattle. *Livestock Production Science* 63: 111-119.
- HERD, R. M.; DICKER, R. W.; LEE, G. J.; JOHNSTON, D. J.; HAMMOND, A. J.; ODDY, V. H.** 2004. Steer growth and feed efficiency on pasture are favorable associated with genetic variation in sire net feed intake. *Anim. Prod. Aust.* 25:93-96.
- KOLATH, W. H.; KERLEY, M. S.; GOLDEN, J. W.; KEISLER, D. H.** 2006. The relationship between mitochondrial function and residual feed intake in Angus steers. *J. Anim. Sci.* 84: 861-865.
- KOCH, R. M.; SWIGER, L. A.; CHAMBERS, D.; GREGORY, K. E.** 1963. Efficiency of feed use in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 22:486-494.
- LAGONIGRO, R.; WIENER, P.; PILLA, F.; WOOLLIAMS, J. A.; WILLIAMS, J. L.** 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Animal Genetics* 34: 371-374.
- LANCASTER, P. A.; CARSTENS, G. E.; RIBEIRO, F. R.; TEDESCHI, L. O.; CREWS, D. H.** 2009. Characterization of feed efficiency traits and relationships with feeding behavior and ultrasound carcass traits in growing bulls. *J. Anim. Sci.* 87:1528-1539.
- JOHNSTON, D. J.; HERD, R. M.; REVERTER, A.; ODDY, V. H.** 2001. Heritability of IGF-1 in beef cattle and its association with growth and carcass traits. *Proceedings Association Advancement Animal Breeding Genetics* 14: 135-138.
- MGAP-DIEA**, 2011. <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2011/DIEA-Anuario-2011-web.pdf>.
- MGAP. Plan Agropecuario.** 2012. Presentación de los Resultados del Programa de Monitoreo de Empresas Ganaderas. www.planagropecuario.org.uy/uploads/monitoreos/17_Monitoreo%202011-2012%20presentado%20en%20Montevideo%2016%20de%20octubre%202012.pdf. Accessed 6 March 2013).
- MOORE, S. S.; MUJIBI, F. D.; SHERMAN, E. L.** 2009. Molecular basis for residual feed intake in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 87:E41-E47.
- NKRUMAH, J. D.; OKINE, E. K.; MATHISON, G. W.; SCHMID, K.; LI, C.; BASARAB, J. A.; PRICE, M. A.; WANG, Z.; MOORE, S. S.** 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84:145-153.
- NKRUMAH, J. D.; LI, C.; BASARAB, J. A.; GUERCIO, S.; MENG, Y.; MURDOCH, B.; HANSEN, C.; MOORE, S. S.** 2004. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition. *Can. J. Anim. Sci.* 84:211-219.
- PITCHFORD, W. S.** 2004. Genetic improvement of feed efficiency of beef cattle: what lessons can be learned from other species? *Aust. J. Exp. Agric.* 44:371-382.
- SECCO, J.** 2008. http://www.unfpa.org.uy/userfiles/informacion/items/507_pdf.pdf.
- SHERMAN, E. L.; NKRUMAH, J. D.; MURDOCH, B. M.; LI, C.; WANG, Z.; FU, A.; MOORE, S. S.** 2008. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their

16 Eficiencia alimenticia en bovinos de carne en pastoreo

associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 86:1–16.

VAN EENEENNAAM, A. 2007. DNA Markers: Explanation of Validation and Utilization. [http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech/Outreach/Marker Assisted Selection in Beef Cattle.pdf](http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech/Outreach/MarkerAssistedSelectioninBeefCattle.pdf).

Grignola M. P.¹, Peñagaricano F.¹,
Nicolini, P.², Casal, A.¹, Espasandín,
A. C.¹; Carriquiry M.¹, Trujillo A. I.¹

¹Departamento de Producción Animal y
Pasturas. Facultad de Agronomía. UdelaR.

²Laboratorio de Técnicas Nucleares. Facultad
de Veterinaria. UdelaR.

Capítulo 2

Identificación de la variabilidad genética de SNPs en genes que codifican la síntesis de neuropéptido y, leptina e IGF-1 en ganado Angus



INTRODUCCIÓN

Los recientes avances en el conocimiento del genoma bovino y el desarrollo de métodos moleculares han permitido identificar regiones cromosómicas y genes asociados con características de interés productivo. Particularmente, el uso de marcadores genéticos asociados

a medidas de eficiencia constituye una opción viable para ser empleada en la selección y manejo de la eficiencia alimenticia en la empresa ganadera, siempre que los mismos sean validados en las condiciones de alimentación y de ambiente en que se desarrolla la producción de carne.

ALGUNOS CONCEPTOS IMPORTANTES

Un **marcador genético** es un segmento de ADN con una ubicación física identificable (locus) en un cromosoma que ha sido asociado con alguna característica de interés. Un marcador puede ser un gen, o una secuencia de ADN que puede variar entre individuos. Los **polimorfismos de una sola base (SNPs)** son una variación en la secuencia de ADN (por lo tanto son un tipo de marcadores) que afecta a un solo nucleótido del genoma y explica la variación fenotípica entre individuos. Los polimorfismos explican la variación entre los individuos y pueden estar localizados en el gen de interés (tanto en regiones codificantes, exones o en regiones no codificantes, intrones) o en zonas cercanas al mismo. Sin embargo, es importante recordar que las características de interés productivo y económico en animales de producción están por lo general controladas por varios genes, así como por el ambiente (ubicación geográfica, manejo, nutrición, etc), de manera que la expresión del fenotipo deseado no dependerá exclusivamente del gen «marcado».

A partir de los marcadores moleculares es posible identificar distintos alelos de un gen candidato, por tanto, realizar la caracterización genómica. El **genotipado o genotipificación**, es la determinación del genotipo o contenido genómico, en forma de ADN, específico de un individuo, mediante un procedimiento de laboratorio. Una vez determinado el genotipo más favorable, es posible rastrearlos en la descendencia (McPeake, 2003). La selección asistida por marcadores (Marker Assisted Selection, MAS) nos permite «marcar» variantes génicas asociadas a regiones de ADN específicas que influyen sobre características cuantitativas, cobrando importancia aquellas que son de difícil o costosa medición (como por ejemplo consumo residual de alimento), con baja heredabilidad o aquellas cuya medida sólo puede realizarse una vez sacrificado el animal. También se puede asociar a características no cuantificables como resistencia a enfermedades (Dekkers *et al.*, 2004). En general, la implementación de la selección asistida por marcadores ha permitido

potenciar los programas de mejoramiento genético (Dekkers y Hospital, 2002; Ron y Weller, 2007).

El abordaje de marcadores moleculares por **genes candidatos** toma en cuenta que los genes deben estar ubicados en regiones del genoma que afecten el carácter de interés y que a su vez deben cumplir un rol fisiológico en la determinación del fenotipo.

El neuropéptido Y (NPY), la leptina (LEP) y el factor de crecimiento tipo 1 similar a la insulina (IGF-1) cumplen un rol importante en varios procesos fisiológicos y metabólicos relacionados con el consumo de energía. Debido a esto, estos genes han sido propuestos como posibles genes candidatos para mostrar diferencias entre individuos en la regulación del metabolismo animal (Bahar y Sweeney, 2008; Ge *et al.*, 2001; Nkrumah *et al.*, 2004; Schenkel *et al.*, 2005; Lancaster *et al.*, 2005; Sherman *et al.*, 2008).

El NPY es uno de los neurotransmisores clave a nivel del sistema nervioso central que afecta numerosas funciones biológicas, entre ellas, la regulación del apetito, el comportamiento ingestivo y la homeostasis energética tanto en humanos como en animales (White, 1993). La leptina también juega un papel importante en la regulación del apetito y en el control del peso (Lagonigro *et al.*, 2003), en el nivel de producción, en la composición y peso de la canal así como en la fertilidad y en las funciones del sistema inmune (Chilliard *et al.*, 2005). La IGF-1 es uno de los factores de crecimiento de la hormona de crecimiento que tiene mayor importancia metabólica, se sintetiza principalmente en el hígado, es secretado a la circulación sanguínea y ejerce un importante efecto sistémico endócrino. La IGF-1 cumple un importante rol fisiológico regulatorio que vincula el consumo y la utilización de los nutrientes con el crecimiento de los tejidos (Lucy, 2008).

Los métodos convencionales utilizados para genotipar loci polimórficos de DNA se basan en la siguiente estrategia: (a) amplificar los alelos del locus presentes en una muestra (generalmente por medio de la «Polymerase Chain Reaction»- PCR); (b) identificar los alelos

amplificados (generalmente por medio de electroforesis); y (c) determinar el genotipo de la muestra a partir de los alelos amplificados.

Los SNPs en estudio han sido genotipados por métodos convencionales, tales como polimorfismo de conformación de cadena única o PCR-SSCP por sus siglas en inglés (Ge *et al.*, 2001; Reyna *et al.*, 2010), polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (longitud o tamaño de los fragmentos de ADN resultantes del corte o digestión mediante enzimas de restricción) o PCR-RFLP por sus siglas en inglés (Buchanan *et al.*, 2002). Todos los métodos mencionados incluyen un paso posterior a la PCR que requiere la remoción del producto de la PCR con el consiguiente tiempo requerido para ello y con el incremento en el riesgo de contaminación cruzada de los productos de PCR (Abdolmohammadi *et al.*, 2011).

Un método recientemente desarrollado para identificar SNPs o para la genotipificación, es el análisis de alta resolución de la temperatura de melteo del ADN (High Resolution Melting, HRM por sus siglas en inglés) como paso posterior a una amplificación por PCR. El análisis de las curvas de disociación de ADN obtenidas con dispositivo HRM es un método post-PCR simple, rápido y efectivo. Este método se basa en la información fluorescente de alta resolución de ADNs de secuencias ligeramente diferentes. La señal fluorescente esta dada por una sonda con fluorocromos que una vez que se une a la hebra del ADN, y a temperaturas incrementales, emite diferente cantidad de fluorescencia. De esta manera las variantes alélicas homocigotas son discriminadas por sus temperaturas de disociación (T_m) de la hebra de ADN, y las variantes alélicas heterocigotos se diferencian de las homocigotas por la forma de la curva de disociación (Liew *et al.*, 2004).

Actualmente, en Uruguay existe un conocimiento muy limitado sobre las frecuencias de los SNPs en estos tres genes candidatos en ganado de carne. A su vez, es crucial como primer paso, caracterizar la existencia de niveles de variabilidad de los SNPs así como conocer la estructura genética de la población

en estudio para luego implementar los estudios de asociación. En este sentido, los **objetivos específicos** en este estudio fueron: ajustar la metodología de genotipificación por High Resolution Melting (PCR-HRM) permitiendo una rápida identificación de los SNPs en los genes NPY, LEP y IGF-1 y determinar las frecuencias alélicas de estos genes, con el fin de describir la estructura genética de la población Angus. Este trabajo constituye el primer paso para planificar los estudios de asociación posteriores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Un total de 125 terneras hembras nacidas en 2008 de la raza Aberdeen Angus fueron seleccionadas en forma dirigida a partir de 5 cabañas comerciales con importante contribución génica a la población nacional. Las cabañas integran el Sistema de Evaluación de Reproductores de Aberdeen Angus. Entre 25 y 30 terneras por cabaña fueron seleccionadas usando archivos de pedigree de 5 generaciones completas. Las mismas fueron hijas de padres con mayor número de descendencia en los últimos 10 años en la población nacional y el coeficiente de inbreeding calculado fue menor a 0,01 (programa ENDOG, Gutierrez y Goyache, 2005). Las terneras seleccionadas constituyeron una muestra representativa de la población de A. Angus nacional, y las terneras de cada cabaña constituyeron un grupo contemporáneo o subpoblación.

Colección de muestras de sangre y extracción de ADN

Se colectaron muestras de sangre (6-10 ml) de la vena caudal de los animales en tubos vacutainers conteniendo anticoagulante formado por solución balanceada de sales sódicas y potásicas de EDTA (pH 7,2). El protocolo experimental seguido para la extracción fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), Universidad de la República.

El ADN genómico fue extraído de sangre entera según protocolo de extracción «salting out». (Modificado de Miller *et al.*, 1988). La concentración de ADN total se determinó en un NanoDrop™ ND-1000 UV-vis (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer). La calidad e integridad del ADN aislado se evaluó con las relaciones de absorbancia 260/280 y las mismas estuvieron entre 1,8-2,0

Optimización de PCR-HRM

En la Figura 1 se presentan en forma esquemática los pasos I al III que implicaron la optimización. Como punto de partida se contaba con un instrumento calibrado Rotor Gene™6000 (Corbett Research Limited, Sydney, Australia) y con ADN genómico de calidad. El diseño de cebadores específicos se realizó utilizando un programa (Primer 3, v. 0.4.0 Software) conociendo la posición de los SNPs de interés (Sherman *et al.*, 2008, Buchanan *et al.*, 2002 y Ge *et al.*, 2001) en la secuencia nucleotídica. Se eligieron los cebadores que cumplían con ca-

racterísticas necesarias para la discriminación de las variantes alélicas por PCR-HRM real time (corProtocol TM 6000). Por tanto, para el diseño se tomó en cuenta que los amplicones tuvieran un tamaño entre 75-150 pb y los cebadores tuvieran un tamaño de 20 nucleótidos con un contenido de G+C de aproximadamente 55 %, para asegurarse la especificidad. A su vez, los cebadores no debían ser complementarios consigo mismos, evitando la formación de dímeros. Los detalles de cada uno de los SNPs se presentan en el Cuadro 1.

La obtención de los genotipos controles (Paso II en la Figura 1) se realizó con ADN genómico escogido al azar de todo el ADN muestreado mediante la técnica PCR- RFLP. Las muestras con genotipos homocigotas y heterocigotas (3 patrones de bandas diferentes) obtenidas por PCR-RFLP, se confirmaron luego también por secuenciación (Sequencing service of Macrogen Inc.). Dicho procedimiento se realizó para los tres genes. Dichos genotipos fueron los que se utilizaron como controles en PCR-HRM. En

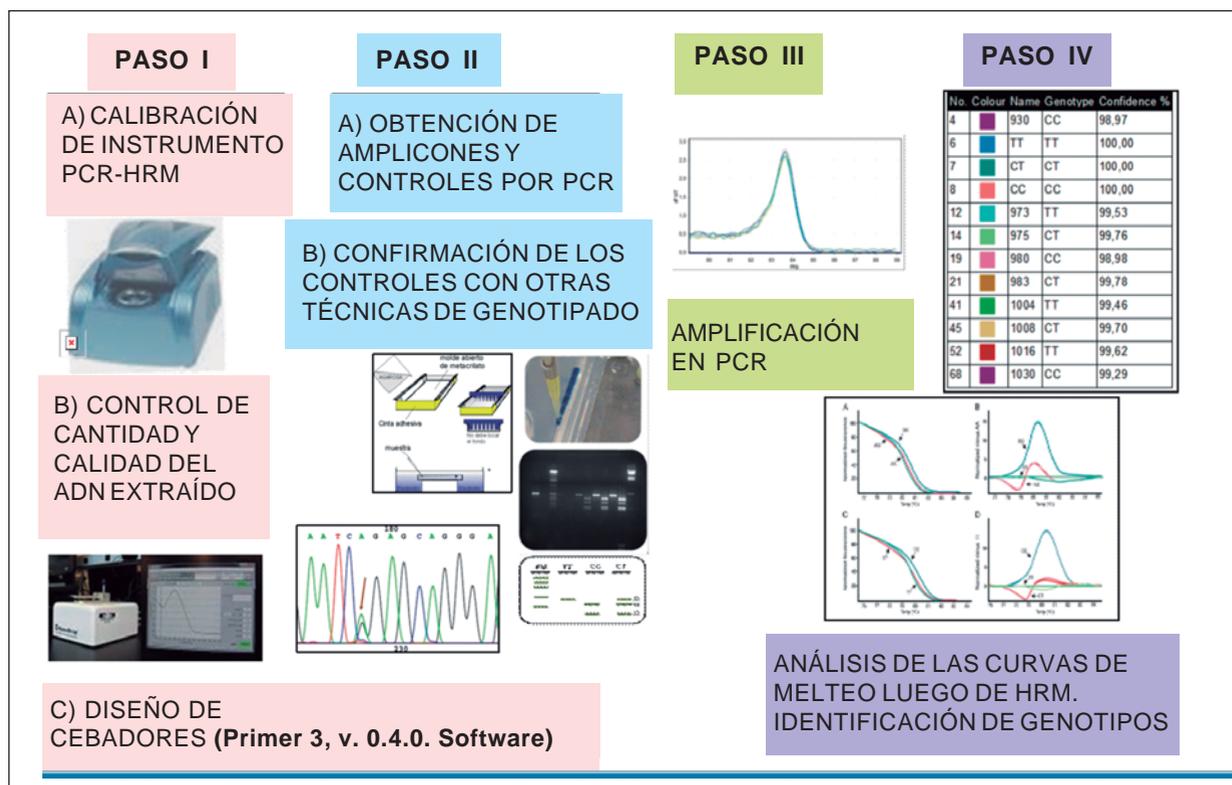


Figura 1. Esquemización de protocolo de optimización y genotipificación de la técnica PCR-HRM para las variantes alélicas de interés en el proyecto.

Cuadro 1. Detalles de los SNPs en los genes NPY, LEP y IGF-1, incluye la localización, el número de accesión, la secuencia de los cebadores para PCR-HRM y el tamaño del amplicón.

Gen	BTA	N° Accesión	Localización del SNP	Secuencia del primer 5- 3' F:Forward R:Reverse	Tamaño del amplicón (pb)
NPY ^a	4	AY491054 -666	G/A-Intrón 2	F:GCTGGGTACACAAAGACATT	90
				R:AAAACACTGTACGGGGGAAA	
LEP ^b	4	AF120500 -198	C/T-Exón 2	F:GGACCCCTGTATGGATCGATTCC T	142
				R:TCCCTACCGTGTGTGAGATG	
IGF-1 ^c	5	AF017143 -512	T/C-Exón 2	F:AATAAAATTGCTCGCCCATCC	93
				R:TAACTTTCTACCGGGCGTGA	

^aDescrito por Sherman *et al.*, 2008, ^bDescrito por Buchanan *et al.*, 2002, ^cDescrito por Ge *et al.*, 2001.

este estudio se considera, en el gen LEP, el alelo favorable es aquel que en la posición AF120500-198 -Exón 2 contiene una C en vez de una T, mientras que el alelo desfavorable tiene una T (Buchanan *et al.*, 2002); en el gen IGF-1, el alelo favorable es considerado el que en la posición AF017143-512 en el exón 2 (Ge *et al.*, 2001), contiene una C en vez de una T, mientras que en el gen NPY el alelo favorable es el que contiene una G en el Intrón 2 de AY491054-666 y el desfavorable contiene una A (Sherman *et al.*, 2008).

Los animales fueron genotipados por PCR en tiempo real con un dispositivo de alta resolución de melteo (HRM) utilizando Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney) para cada SNP por separado. La amplificación por PCR en tiempo real (paso III de Figura 1) permite verificar la especificidad y luego con el procedimiento HRM (paso IV. De Figura 1) se identifican los genotipos. En cada corrida, además de las muestras problemas, se utilizó una curva estándar de 5 puntos y los 3 controles diferentes en duplicado para la normalización de los resultados. Las reacciones de PCR en tiempo real fueron llevadas a cabo en un volumen final de 20µL conteniendo 50 ng de ADN genómico, 10 µL of SYBR Green master mix (Quantimix Easy SYG Kit™, Biotools B&M Labs, Madrid, Spain), primer

mix (20 µM each) y 7 µL de agua libre de nucleasas (mQ). Las condiciones de PCR en tiempo real fueron: una fase de desnaturalización de 95 °C por 10 minutos; seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 seg, 60 °C por 30 seg y 72 °C por 20 seg que consta de desnaturalización, hibridación y extensión. En este último, se adquiere la fluorescencia en el canal verde (460 nm excitación; 510 nm detección) (Rotor-Gene™ 6000). Se incluyó en el programa un paso extra donde las muestras fueron calentadas a 50 °C por 30 segundos, que fue seguido de la amplificación para asegurar que todos los productos fueran re-asociados y así asegurarse que se formaron los heteroduplex. Luego se programó el HRM incrementos de 0,1 °C por 2 segundos desde 76 a 86 °C (NPY), 79 a 89 °C (LEP) y desde 75 a 85 °C (IGF-1), con un condicionamiento de pre-melteo de 90 s. La señal fluorescente fue adquirida en el canal de HRM (460 nm excitación; 510 nm detección). El análisis de la curva de melteo fue realizado usando el programa del Rotor-Gene™ 6000 (software v.1.7, Build 75) y su algoritmo. La información obtenida por el análisis de HRM fue visualizada como curvas HRM normalizadas y como gráficas normalizadas al genotipo AA en el SNP de NPY y de IGF-1, y normalizada al genotipo TT en el SNP de LEP. Los genotipos de

las muestras problemáticas fueron auto-identificadas por el programa del Rotor-Gene HRM (paso IV de Figura 1). El límite de confianza considerado para aceptar el genotipo asignado por el programa fue > 85 %. Además, un 10 % de las muestras ya genotipadas fueron sometidas a un análisis de HRM por otro operador y un 7 % se mandaron a secuenciar, con el fin de comprobar la asignación de los genotipos.

Cálculos y análisis estadísticos

Las frecuencias alélicas y genotípicas, las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) evaluadas mediante el método exacto y la deficiencia o exceso de heterocigotos, se calcularon utilizando el programa Convert (Glaubitz, 2004) y GENEPOP v4.0 (Rousset, 2008). La deficiencia o exceso de heterocigotos fue calculada para cada locus, en cada subpoblación (cabaña) y para la población total. La estructura genética entre las poblaciones se calculó mediante los estadísticos F de Wright (Weir y Cockerham, 1984).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Metodología de genotipificación por High Resolution Melting (PCR-HRM)

El programa del Rotor-Gene HRM automáticamente asignó los diferentes genotipos para cada SNP basado en la forma de la curva de melteo para diferenciar los heterocigotos de los homocigotos y en las diferencias en las temperaturas de melteo (T_m) para diferenciar entre los homocigotos (Figura 2). Los heterocigotos fueron distinguidos por el patrón bifásico de melteo. Las T_m de los dos homocigotos difirieron en 0,5-0,6 °C.

El monitoreo de los niveles de fluorescencia (generada por el intercalado inespecífico y no saturante de moléculas de SYBR® Green I con los productos de ADN de doble cadena) realizado por el equipo en tiempo real permite visualizar y describir el decrecimiento de la fluorescencia hasta que se llega a la T_m (Herrmann *et al.*, 2006). Una muestra

homocigota comprende un único homoduplex, mientras que los heterocigotos presentan cuatro diferentes moléculas, dos heteroduplex, y dos homoduplex. Cuando se realiza la disociación, cada homoduplex exhibe una curva con diferente temperatura y el heteroduplex exhibe una única curva acorde con la temperatura de la mezcla de los 4 dúplex (Liew *et al.*, 2004).

Las principales ventajas del análisis HRM en comparación con los métodos basados en PCR tradicionales incluyen: a) rapidez y automatización del método, b) no conllevan pasos posteriores como la digestión con enzimas de restricción ni requieren de soportes (geles) evitando así el extenso manipuleo en el laboratorio y el trabajo con sustancias cancerígenas y c) la disminución de los riesgos de contaminación cruzada de los productos de PCR (Tindall *et al.*, 2009, Abdolmohammadi *et al.*, 2011).

En este estudio, describimos un protocolo de optimización del análisis HRM como un método simple, rápido y confiable para el genotipado de SNPs en los genes NPY, LEP y IGF-1 en ganado de carne.

Estructura génica de la población

En el Cuadro 2 se describen las frecuencias alélicas y genotípicas para cada locus en cada subpoblación o cabaña y para la población total.

La frecuencia del alelo G en el SNP del gen NPY fue menor que la frecuencia del alelo A en todas las cabañas y en la población total. Ni las distribuciones génicas ni genotípicas fueron diferentes ($P > 0,23$) en todas las cabañas para este locus. La distribución de los genotipos en la población total y en las cabañas 2 y 3 se apartaron del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) ($P < 0,032$) causada por una deficiencia de los genotipos heterocigotos ($P < 0,032$).

Las frecuencias alélicas del SNP en el gen LEP estuvieron balanceadas para los alelos C y T en todas las cabañas y en la población total (Cuadro 2). Así mismo las distribuciones de las frecuencias alélicas y genotípicas no resulta-

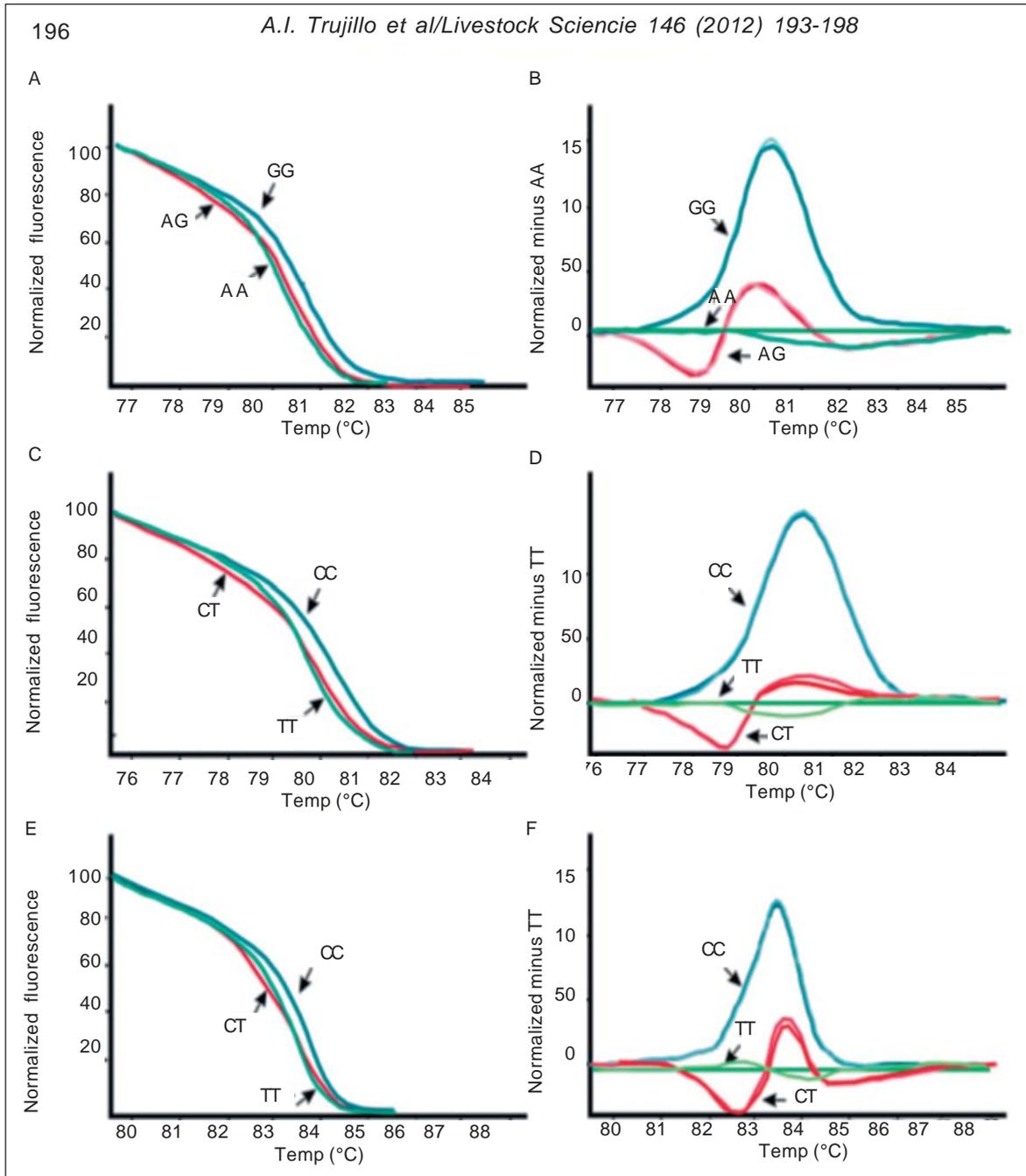


Figura 2. Gráficas normalizadas de los tres SNPs genotipados. Izquierda: curvas normalizadas, Eje Y: fluorescencia normalizada, Eje X: temperatura (°C). Derecha: gráficas diferenciales normalizadas al genotipo AA del SNP del gen que codifica para NPY y al genotipo TT de los SNPs que codifican para IGF-1 y LEPTINA, Eje Y: fluorescencia diferencial normalizada, Eje X: temperatura (°C). (A) and (B), corresponden al SNP de NPY, (C) y (D) al de IGF-1 y (E) y (F) al SNP de LEPTINA. Se presentan 2 réplicas de cada genotipo. (Trujillo *et al.*, 2012).

ron diferentes ($P > 0,57$) entre las cabañas. Tanto la población total y cada una de las cabañas se encontraron en HWE ($P > 0,11$). La frecuencia del alelo C del SNP en el gen IGF-1 fue menor que la del alelo T en todas las cabañas ex-

cepto en la cabaña 1. Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron diferentes en todas las cabañas ($P < 0,01$). Cada cabaña así como la población total mostró HWE ($P = 0,91$).

Cuadro 2. Frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes alélicas de los genes que codifican para NPY, LEPTINA e IGF-1 en cada cabaña (C) y en la población total de terneras Aberdeen Angus (*Trujillo et al., 2012*).

Genotipo/ alelo	Frecuencias alélicas y genotípicas					
	C1	C2	C3	C4	C5	Total
SNPNPY						
AA	0.46 (11)	0.78 (23)	0.73 (22)	0.63 (17)	0.54 (13)	0.64 (86)
AG	0.46 (11)	0.13 (4)	0.17 (5)	0.30 (8)	0.29 (7)	0.26 (35)
GG	0.08 (2)	0.12 (3)	0.10 (3)	0.07 (2)	0.17 (4)	0.10 (14)
A	0.69	0.83	0.82	0.78	0.69	0.77
G	0.31	0.17	0.18	0.22	0.31	0.23
SNPLEP						
CC	0.15(4)	0.25 (7)	0.28 (8)	0.26 (17)	0.17 (4)	0.23 (30)
CT	0.50 (13)	0.57 (16)	0.48(14)	0.33 (9)	0.65 (15)	0.50 (67)
TT	0.35 (9)	0.18 (5)	0.24 (7)	0.41 (11)	0.17 (4)	0.27 (36)
C	0.40	0.54	0.52	0.43	0.50	0.48
T	0.60	0.46	0.48	0.57	0.50	0.52
SNPIGF-1						
CC	0.26 (7)	0.03 (1)	0.13 (4)	0.15 (4)	0.08 (2)	0.13 (18)
CT	0.63 (17)	0.41 (12)	0.50 (15)	0.50 (13)	0.58 (14)	0.52 (71)
TT	0.11 (3)	0.52 (16)	0.37 (11)	0.35(9)	0.33 (8)	0.35 (47)
C	0.57	0.24	0.38	0.40	0.38	0.39
T	0.43	0.76	0.62	0.60	0.62	0.61

El número de animales por genotipo se encuentra entre paréntesis.

La frecuencia del alelo G (considerado como favorable) en el gen NPY fue significativamente menor que la frecuencia reportada para el mismo alelo por Sherman *et al.* (2008). Los animales del estudio de Sherman pertenecían a razas compuestas mientras que en nuestro trabajo la población era ganado Aberdeen Angus puro. Esto podría explicar parte de las diferencias encontradas en las frecuencias alélicas. Por otro lado, la frecuencia del alelo C del gen LEP (considerado favorable en este estudio) fue consistente con las frecuencias reportadas por otros autores en ganado Angus (Buchanan *et al.*, 2002) así como en ganado cruza con alta proporción de Angus (Schenkel *et al.*, 2005). Con respecto al SNP en el IGF-1, la frecuencia del alelo C en la población total (0,39) encontrada en este estudio se encuentra cercana a los valores de frecuencias reportada por Ge *et al.* (2001) en ganado Angus (0,36). Estos autores encontraron además una asociación entre el alelo C y una menor concentración de esta hormo-

na en suero sanguíneo, mientras que Moore *et al.* (2005) encontraron una correlación genética positiva entre las concentraciones de IGF-1 y el consumo residual de alimento, sugiriendo que la selección de animales con menores concentraciones de IGF-1 podrían resultar más eficientes (Moore *et al.*, 2005).

Los estadísticos F propuestos por Wright (1969) se utilizan para describir la estructura genético poblacional en organismos diploides. El F_{ST} es usado comúnmente como una medida de subdivisión poblacional ya que provee una vía para estimar niveles de flujo génico entre subpoblaciones. La estructura genética del análisis poblacional, considerando los tres SNPs juntos, mostró una muy baja diferenciación genética entre las cabañas. Otros estudios han reportado valores mayores de diferenciación genética entre cabañas (8 %; Sifuentes-Rincón *et al.*, 2007) y entre rodeos (7 %; Moiola *et al.*, 2004; Jordana *et al.*, 2003). En nuestro estudio, la homogeneidad genética de la población de ganado Angus

observada podría ser explicada por el alto flujo génico entre las cabañas.

CONCLUSIONES

La técnica de genotipificación por PCR-HRM descrita en este estudio se presenta como una técnica alternativa para el genotipado de SNPs en ganado de carne. La aplicación de esta técnica podría facilitar la genotipificación de un gran número de animales manteniendo una relación costo-beneficio y una precisión muy adecuadas.

La menor frecuencia de los alelos considerados favorables frente a los otros y la baja diferenciación genética entre las cabañas observada en la población Angus en Uruguay se presentan alentadoras para realizar estudios posteriores de asociaciones entre los SNPs estudiados y medidas de eficiencia alimenticia.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDOLMOHAMMADI, A.; ATASHI, H.; ZAMANI, C.; BOTTEMA, C.** 2011. High resolution melting as an alternative method to genotype diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1) K232A polymorphism in cattle. *Czech J. Anim. Sci.* 56: 370-376.
- BAHAR, B.; SWEENEY, T.** 2008. Mapping of the transcription start site (TSS) and identification of SNPs in the bovine neuropeptide Y (NPY) gene. *BMB Genet.* 9: 91.
- BUCHANAN, F.; FITZSIMMONS, C.; VAN KESSEL, A.; THUE, T.; WINKELMAN-SIM, D.; SCHMUTZ, S.** 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.
- CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, C.; BONNET, M.** 2005. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29: 3-22.
- CORBETT PROTOCOL TM 6000.** HRM Assay Design and Analysis, pp. 24. <http://www.gene-quantification.de/hrm-protocol-cls.pdf>.
- DEKKERS, J. C.; HOSPITAL F.** 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nat Rev Genet* 3(1):22-32.
- DEKKERS, J.C.** 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 82 (sup): 313-328.
- GE, W.; DAVIS, M.; HINES, H.; IRVIN, K.; SIMMEN, R.,** 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.
- GLAUBITZ, J.C.** 2004. Convert: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Mol. Ecol. Notes* 4, 309-310.
- GUTIERREZ, J.P., GOYACHE, F.** 2005. A note on ENDOG: a computer program for analyzing pedigree information. *J. Anim. Breed. Genet.* 122: 172-176.
- HERRMANN, M.G.; DURTSCHI, J.D.; BROMLEY, L.K.; WITWER, C.T.; VOELKERDING, V.** 2006. Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping: Cross-Platform Comparison of Instruments and Dyes. *Clinical Chemistry*, 52: 494-503.
- JORDANA, J.; ALEXANDRINO, P.; BEJA-PEREIRA, A.; BESSA, I.; CANNÓN, J.; CARRETERO, Y.; DUNNER, D.; LALOE, D.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; SANCHEZ, A.; FERRAND, N.,** 2003. Genetic structure of eighteen local south European beef cattle breeds by comparative F-statistics analysis. *J. Anim. Breed. Genet.* 120: 73-87.
- LAGONIGRO, R.; WIENER, P.; PILLA, F.; WOOLLIAMS, J.A.; WILLIAMS, J.L.** 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Anim. Genet.* 34: 371-374.
- LANCASTER, P. A. G. E.; CARSTENS, D. H.; CREWS, JR.; WOODS, S. A.** 2005. Evaluation of feed efficiency traits in growing bulls and relationships with feeding behavior and ultrasound carcass estimates. *Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science.* 56: 461-464.
- LIEW, M.; PRYOR, R.; PALAIS, R.; MEADOWS, C.; ERALI, M.; LYON, E.; WITWER, C.** 2004. Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by

- High-Resolution Melting of Small Amplicons. *Clinical Chemistry*, 50: 1156-1164.
- LUCY, M.C.** 2008. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reprod. Domest. Anim.* 43 (Suppl. 2), 31-39.
- McPEAKE, A.** 2003. Marker assisted selection for beef palatability characteristics. Beef Improvement Federation Meetings.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F.** 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. Volume 16 Number 3.
- MOIOLI, B., NAPOLITANI, F., CASTILLO, G.** 2004. Genetic diversity between Piedmontese, Maremmana and Podolica cattle breeds. *J. Hered.* 95: 250-256.
- MOORE, K.L.; JOHNSTON, D.J.; GRASER, H.-U.; HERD, R.M.** 2005. Genetic and phenotypic relationships between insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and net feed intake, fat, and growth traits in Angus beef cattle. *Aust. J. Agric. Res.* 56: 211-218.
- NKRUMAH, J. D.; LI, C.; BASARAB, J. B., GUERCIO, S.** 2004. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition. *Can. J. Anim. Sci.* 84: 211-219.
- Reyna, X.; Montoya, H.; Castellón, V.; Rincón, A.; Bracamonte, M.; Vera, W.** 2010. Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. *Genet. Mol. Res.* 9:875-883.
- RON, M.; WELLER, J. I.** 2007. From QTL to QTN identification in livestock – winning by points rather than knock-out: a review. *Animal Genet.* 38:429-439.
- ROUSSET, F.** 2008. Genepop v4: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.* 8: 103-106.
- ROUSSET, F.; RAYMOND, M.** 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetic* 140: 1413-1419.
- SCHENKEL, F.S.; MILLER, S.P.; YE, X.; MOORE, S.S.; NKRUMAH, J.D.; LI, C.; YU, J.; MANDELL, I.B.; WILTON, J.W.; 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.
- SHERMAN, E.L.; NKRUMAH, J. D.; MURDOCH, B.M.; LI, C.; WANG, Z.; FU, A.; MOORE, S. S.** 2008. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 86: 1-16.
- SIFUENTES-RINCÓN, A.; PUENTES-MONTILE, H.; PARRA-BRACAMONTE, G.M.** 2007. Assessment of genetic structure in Mexican charolais herds using microsatellite markers. *Electron. J. Biotechnol.* 10 (4). (issue of October 15, 2007).
- TINDALL, E.; PETERSEN, D.; WOODBRIDGE, P.; SCHIPANY, K.; HAYES, V.** 2009. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. *Hum. Mutat.* 30: 876–883.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C.** 1984. Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- WHITE, J.D.** 1993. Neuropeptide Y: a central regulator of energy homeostasis. *Regul. Peptides* 49: 93-107.
- WRIGHT, S.** 1969. The theory of gene frequencies. In: *Evolution and the genetics of populations*. (Vol. 2). Chicago: University of Chicago.

Trujillo A. I.¹, Casal A¹,
Peñagaricano F.¹, Carriquiry M.¹
Chilibroste P.¹

¹Departamento de Producción Animal y
Pasturas. Facultad de Agronomía. UdelaR.

Capítulo 3

Asociación de SNPs en genes que codifican para NPY, leptina e IGF-1 con consumo residual de alimento en condiciones de confinamiento en hembras crecimiento de raza Angus

RESUMEN

Se estudió la variación en consumo residual de alimento (RFI) en 2 grupos de hembras Angus puras (hembras que presentaban simultáneamente variantes alélicas favorables (SNP) en genes NPY, leptina e IGF-1 (V) y hembras que no presentaban dichos alelos (C)) bajo 2 condiciones de alimentación consecutivas. El RFI se evaluó en 38 terneras (PV:186 kg (SD = 33,2) y edad: 247 días (SD = 15), respectivamente) consumiendo una dieta TMR (60:40 concentrado: heno alfalfa) durante 57 días en confinamiento (Exp 1). El consumo (CMS) fue estimado como diferencia entre alimento ofrecido y rechazado y el PV registrado cada 2 semanas. Durante 60 días, se evaluó RFI en 24 vaquillonas bajo pastoreo continuo de pastura de alta disponibilidad y calidad (Exp 2). El CMS de pastura fue determinado usando la técnica de alcanos. Las medias de mínimos cuadrados (lsmeans) de V y C de CMS (kg/d), GDP (kg), RFI (kg MS/d) y eficiencia de conversión (FCR, kg CMS/kg GDP) fueron: 6,65 vs 6,89 (0,49), 1,24 vs 1,24 (0,03), -0,11 vs 0,11 (0,09) y 5,8 vs 5,8 (0,14), respectivamente en Exp 1. En Exp. 2 los valores de lsmeans de V y C de CMS (kg/d), GDP (kg), RFI y FCR fueron: 8,76 vs 10,93 (0,71), 1,4 vs 1,37 (0,05), -1,02 vs 1,02 (0,42) y 6,41 vs 6,96 (0,46), respectivamente. Los grupos genotípicos tendieron a diferir en CMS ($P = 0,10$) y en RFI ($P = 0,10$) en Exp. 1 mientras que en Exp. 2, difirieron en CMS ($P = 0,005$) y en RFI ($P = 0,002$). Nuestros resultados demuestran una fuerte asociación entre los 3 SNPs considerados simultáneamente y RFI cuando los animales se evaluaron pastoreando una pastura de alta disponibilidad y calidad, mientras que una asociación menor fue observada cuando los animales consumieron una dieta concentrada en condiciones de confinamiento.

Keywords: ganado de carne, eficiencia alimenticia, SNP en genes NPY, LEPTINA e IGF-1.



INTRODUCCIÓN

El alimento es, en términos económicos, el elemento más importante de la producción animal, ya que el costo de alimentación puede constituir hasta el 70 % del costo total de la producción. La alimentación afecta la productividad, la salud y el bienestar animal, la calidad del producto así como el uso del suelo, la estabilidad de los ecosistemas pastoriles, las emisiones al medio ambiente y la contaminación del agua.

Aunque el costo de alimentación de los animales en pastoreo es de difícil cuantificación, constituye un costo muy

importante en los sistemas de producción de carne. En Uruguay se estima que los costos asociados a la alimentación en pastoreo representan más del 60 % de los costos económicos totales de un empresa ganadera (MGAP, Plan Agropecuario, 2012). Por lo tanto, es fundamental considerar estrategias para aumentar o mantener la producción y/o reducir los costos de alimentación con el objetivo de mejorar la eficiencia de producción e incrementar los beneficios. Una de las vías para la mejora genética de la eficiencia de los sistemas de producción de carne es la selección (Herd *et al.*, 2003). En general el mejoramiento genético ha

hecho hincapié en la selección por características de crecimiento y habilidad materna y el Uruguay no escapa a esta tendencia (651g/año de tasa anual en el peso a los 18 meses y 432 g/año de tasa anual en el peso al destete, Evaluación Genética Nacional de Aberdeen Angus, 2011). Sin embargo, la selección por crecimiento acelerado y mayores pesos vivos ha generado un incremento en el peso vivo a la madurez de las diferentes razas y de sus requerimientos de mantenimiento, que determina mayores costos de producción, menor eficiencia en uso de los recursos alimenticios a nivel global del sistema y, no menos importante, un aumento potencial en problemas ambientales (principalmente en emisión de gas metano).

La investigación ha mostrado que existe considerable variación individual en consumo por encima y por debajo de un consumo esperado o predicho en base al tamaño corporal y a la tasa de crecimiento en varias especies (Archer *et al.*, 1999). Esta diferencia en consumo llamada «Consumo de alimento residual» (RFI, sigla tomada del inglés Residual Feed Intake) fue definida por primera vez por Koch *et al.*, 1963 y es actualmente reconocida como una medida de selección por eficiencia precisa, ya que, a diferencia del criterio de selección por conversión alimenticia (unidad de alimento consumido por unidad de ganancia de peso), tiende a elegir animales de menores consumos y/o menores requerimientos de mantenimiento, sin alterar el peso adulto o las ganancias de peso (Koch *et al.*, 1963; Basarab *et al.*, 2003). El RFI, además de ser fenotípicamente independiente del tamaño y del crecimiento (por su definición), presenta características interesantes para ser usado en selección: es moderadamente heredable, 0,28 a 0,58 (Crews *et al.*, 2003), presenta variación genética dentro de poblaciones y entre diferentes rodeos (Archer y Bergh, 2000; Herd y Bishop, 2000; Basarab *et al.*, 2003), se mantiene a lo largo de la vida del animal (alta correlación entre RFI medido en hembras pos-destete y en las mismas hembras adultas, Archer *et al.*, 2002) y presenta mínimos antagonismos con otras características de importancia económica (Richardson *et al.*, 2001; Basarab *et al.*, 2003). Sin embar-

go, una de las principales limitaciones para la adopción de esta medida como criterio de selección fenotípica es el alto costo (en tiempo y dinero) que insume su medición. Una alternativa que se ha venido investigando es el uso de marcadores genéticos relacionados con eficiencia alimenticia. Estos, una vez validados y realizando selección asistida por marcadores, podrían contribuir a la mejora genética, generándose estimaciones de valores genéticos en criterios relacionados a eficiencia alimenticia (sin correlaciones desfavorables con otros rasgos de interés económico).

El RFI es una característica poligénica en la que intervienen numerosos genes. Estudios previos han sugerido que genes involucrados en la regulación del consumo, y por ende en la regulación de la energía pueden afectar el RFI en ganado de carne. En este sentido, se han reportado algunas asociaciones entre eficiencia alimenticia y SNPs (polimorfismos de una sola base nucleotídica) en genes que intervienen en la producción de energía (relacionados con la actividad mitocondrial) así como en la regulación del consumo y de la energía (Nkrumah *et al.*, 2004; Kolath *et al.*, 2006; Sherman *et al.*, 2008). Estos antecedentes han sido generados, en general, con razas sintéticas y bajo condiciones de confinamiento con dietas muy concentradas en energía. Además, se ha demostrado que los valores de RFI varían de acuerdo al tipo de dieta ofrecida (Durunna *et al.*, 2011), a la etapa fisiológica del animal y a la composición de su ganancia corporal (Basarab *et al.*, 2003). A nivel internacional se han publicado escasos antecedentes que evalúan el RFI en condiciones de confinamiento seguido de evaluaciones en condiciones de pastoreo, mientras que en Uruguay no existen antecedentes sobre esta medida de eficiencia en ganado.

En este trabajo, se plantea la hipótesis que una combinación de SNPs en genes candidatos relacionados a la regulación del consumo, de la energía y del crecimiento (NPY, leptina e IGF-1) podría estar asociada con RFI en hembras Angus en crecimiento. El objetivo fue cuantificar y comparar los valores fenotípicos de RFI de dos grupos de hembras

Angus: un grupo de animales que presentaban variantes alélicas supuestamente favorables (llamado grupo de interés o validación, V) y el otro grupo que no las presentaba (llamado grupo control, C) evaluados en condiciones de confinamiento (dieta concentrada en energía) y en condiciones de pastoreo (pastura de alta disponibilidad y calidad).

MATERIALES Y MÉTODOS

El uso de los animales y los procedimientos de manejo y de mediciones realizadas estuvieron aprobados por el Comité Honorario de Ética de Experimentación Animal (CHEA) de la UdelaR.

Selección de los animales

El primer paso de la estrategia de investigación fue la selección de los animales experimentales. Para ello se realizaron extracciones de ADN genómico de más de 1700 animales distribuidos en cabañas Angus de todo el país. Se muestrearon hembras nacidas en el 2009 que tuvieran registros de pedigree. La extracción de ADN genómico y el genotipado masivo se realizó en los laboratorios de Biotecnología de la Facultad de Agronomía y de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, respectivamente. Los protocolos seguidos en los procedimientos de extracción y genotipado de las muestras se encuentran detallados en Trujillo *et al.* (2012). Se genotiparon aproximadamente 1700 terneras de al menos uno de los tres SNPs (SNPNPY, SNPLEP e SNPIGF-1, bi-alélicos). Las terneras se clasificaron en dos grupos de acuerdo a su genotipo: 1) grupo de interés o validación (V) que incluía a los animales: homocigotas para el alelo «favorable» SNPLEP, homocigotas para el alelo «favorable» SNPIGF-1, y heterocigotas para el alelo favorable SNPNPY y 2) grupo control (C) que incluía a los animales que no contenían ninguno de los alelos favorables de los 3 SNPs. En este estudio no fue posible seleccionar homocigotas para el SNPNPY debido a la baja frecuencia del homocigota favorable (Trujillo *et al.*, 2012). Una vez finalizado el genotipado se seleccionaron 38 hembras puras (19 del grupo V y 19 del grupo C) nacidas entre setiembre y no-

viembre del 2009 provenientes de 18 cabañas.

Animales y diseño experimental

Los experimentos (I y II) fueron realizados en la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía Dr. Mario A. Cassinoni en Paysandú durante 2010.

Experimento I. Evaluación de RFI en animales en confinamiento consumiendo dietas concentradas en energía.

El peso vivo (PV) promedio y la edad promedio de las terneras al inicio del experimento fueron 186 kg (SD = 32,8) y 262 días (SD = 26,6), respectivamente. La duración del experimento fue de 57 días.

Las terneras fueron manejadas de acuerdo a las prácticas usuales en cada cabaña desde el nacimiento hasta el destete. A la llegada a la Estación Experimental, todos los animales fueron pesados y vacunados contra Aftosa, Carbunco bacteriano, Clostridiosis y Quera-toconjuntivitis. Las terneras fueron tratadas con ivermectina más closantel y se les aplicó un parasiticida (pour-on) cada 21 días para el control de ecto y endoparásitos intestinales. Los animales fueron clínicamente examinados cada 15 días.

Las terneras fueron asignadas a corrales abiertos (8-10 terneras/corral, 15 * 20 m) con disponibilidad de heno de alfalfa y agua *ad libitum* por dos semanas y luego a corrales individuales parcialmente cubierto (1 ternera/corral; 2,5 x 10 m). Los animales tuvieron un período total de acostumbramiento de 42 días. Se les ofreció una dieta totalmente mezclada (TMR, 60:40 concentrado: forraje, tal cual ofrecida) *ad libitum*, dos veces al día; la cantidad de alimento ofrecido a cada animal se fue ajustando cada semana para lograr aproximadamente un 10 % de rechazo individual.

La dieta experimental fue formulada para cubrir los requerimientos de mantenimiento y una ganancia diaria de aproximadamente 1 kg por animal según recomendaciones del NRC de Bovinos de Carne (2000). El concentrado fue formulado con grano de sorgo (79 %), expeller de girasol (17 %), urea (1,4 %), CaCO₃ (1,9 %), pre-mezcla de vitaminas y minerales (0,2 %), Rumensin (0,05 %) y leva-

dura (0,1 %) (base tal cual ofrecido) (Copagran, Cooperativa Agraria Nacional, Uruguay). El heno de alfalfa utilizado fue un heno de calidad media (85,8 % DM, 9,2 % cenizas, 13,7 % PC, 76,9 % FDN y 59 % FDA en base seca). En la Figura 1 se presenta esquemáticamente el protocolo seguido en el Experimento I así como las características químicas más importantes de la dieta experimental.

Se obtuvieron muestras compuesta del alimento ofrecido y del alimento rechazado por cada ternera. Se tomaron sub-muestras (400 g aproximadamente) para la realización de los análisis químicos. Se determinó MS analítica (AOAC Official Method 967.03, 2007), cenizas (AOAC Official Method 942.05, para calcular la materia orgánica- MO) y proteína cruda (PC) (AOAC Official Method 984.13, 2007). La fibra detergente neutra (FDN), detergente ácido (FDA) y la lignina determinada por ácido sulfúrico (LIGsa) fueron medidas usando ANKOM 220 Fiber Analyzer (Ankom Technology Corporation, Fairport, NY) siguiendo el método descrito por Van Soest *et al.* (1991) usando alfa amilasa en la solución detergente neutra. La energía bruta (EB) fue determinada usando una bomba calorimétrica (Record Calorimeter, Julius Peters 10823, Berlin, Germany). La di-

gestibilidad *in vitro* verdadera de la MO (DIVMO) fue determinada en un incubador DAISY^{II} (AnkomTechnology, Corporation, Fairport, NY) luego de 48 h de incubación en inóculo ruminal de ovinos con solución buffer de Goering-Van Soest siguiendo protocolo de Ankom (Ankom-Procedure 173). Todos los análisis fueron realizados por duplicado. El consumo de materia seca (CMS) individual fue promediado de los datos de MS ofrecida menos MS rechazada de cada día. La energía digestible (ED) se estimó a partir de los valores de EB y de los valores de DIVMO de los ofrecidos. El valor de energía metabolizable (EM) se estimó a partir de los valores de ED utilizando el factor de conversión 0,82. Los valores de energía neta de mantenimiento (ENm) y de ganancia (ENg) se estimaron a partir de la EM de la dieta usando las ecuaciones de Lofgreen y Garrett (1968). A partir de los datos de energía se estimaron los consumos individuales de EM (CEM) como la diferencia entre la EM de la dieta ofrecida y la EM del rechazo.

Las terneras fueron pesadas en los días -1, 14, 28, 42 y 57, siendo el día 0 el del inicio del experimento. Los animales se pesaron sin ayuno previo antes de la distribución del alimento de la mañana.

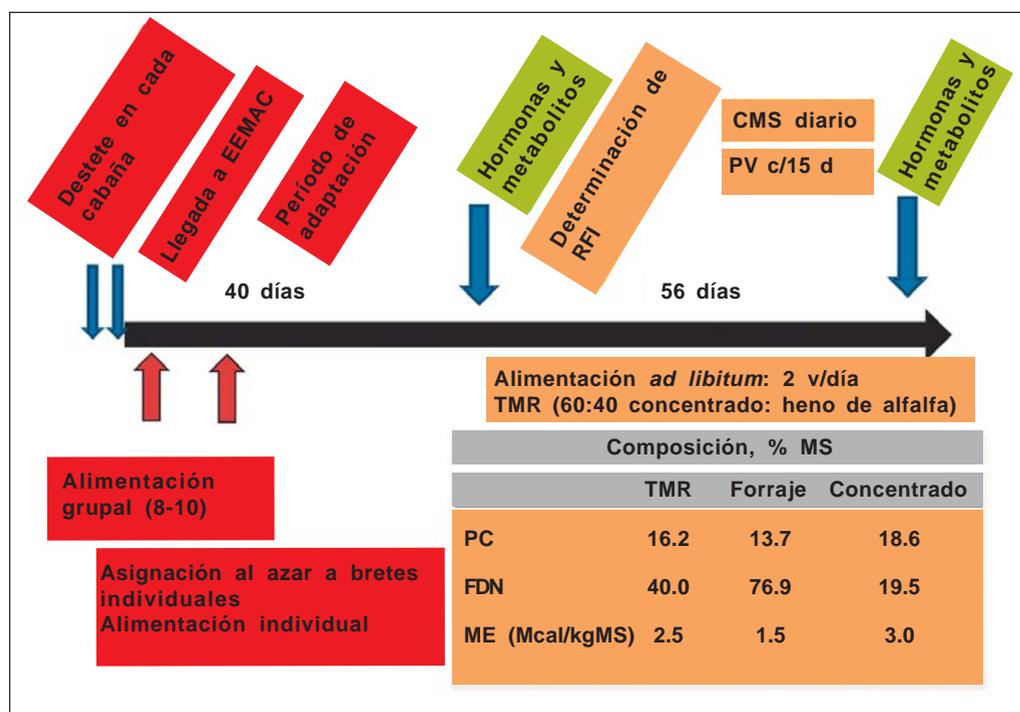


Figura 1. Protocolo experimental simplificado del Experimento I.

Experimento II. Evaluación de RFI en animales en pastoreo de pastura mezcla (gramíneas:leguminosas) de alta disponibilidad y calidad.

Veinticuatro terneras Angus previamente evaluadas en el experimento en confinamiento fueron evaluadas para RFI en pastoreo. Los animales presentaban al inicio del experimento un PV de 294 kg (SD = 37,4) y una edad promedio de 369 días (SD = 27,6). Previo a la evaluación en pastoreo, los animales tuvieron una adaptación de 42 días sobre una pastura de avena. Doce vaquillonas de cada grupo fueron bloqueadas según PV y RFI y aleatoriamente asignadas a 4 parcelas experimentales. Se mantuvo el mismo esquema sanitario seguido en el Exp I.

El experimento fue realizado sobre una pastura mezcla de festuca, lotus y trébol blanco (*Festuca arundinacea*, cv. La Sorpresa; 15 kg; *Lotus corniculatus*, cv. San Gabriel; 10 kg y *Trifolium repens*, cv. Zapican; 2kg) sembrada el 5 de mayo 2010 y fertilizada con 100 kg de 18-46-0 (N-P-K). Los animales estuvieron en pastoreo continuo y tuvieron acceso a sombra, agua limpia mezclada con un antiespumante para prevenir el meteorismo

(Blokler, Biotay, Bs. As. Argentina) y a un suplemento mineral (Cobalfosal 19/20, Ca max: 15 %, P max: 10 % humedad max: 2 %, minerales totales: 90 %, Na-Clmax: 42 %, Zn, Mn, Cu, Co y Se; Barraca Deambrosi, S. A, Montevideo, Uruguay) distribuido dos veces por semana. Para mantener una asignación de forraje similar entre las parcelas, se creó un área buffer que permitió modificar el área de pastoreo según la necesidad.

Se caracterizó la composición botánica y se midió la disponibilidad de forraje (utilizando la técnica de BOTANAL- Mannelje y Jones, 2001) al inicio y al final del periodo de pastoreo. Una descripción general de la pastura utilizada en el experimento se presenta cuando se describe esquemáticamente el protocolo experimental seguido en este experimento (Figura 2). La biomasa de la pastura fue medida semanalmente usando un plato para medir altura comprimida (Ashgrove Plate Meter, Hamilton, New Zealand). Se tomaron muestras de forraje al inicio y al final del periodo de pastoreo así como muestras de «hand-plucked». En las mismas se determinó MS analítica, cenizas, PC,

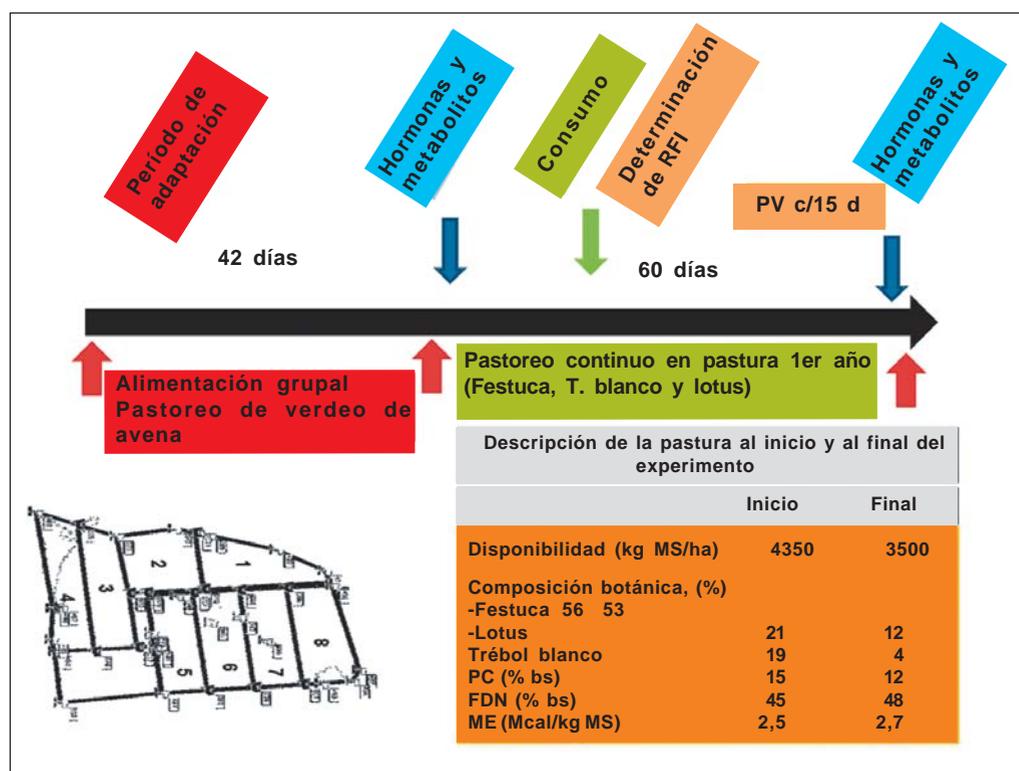


Figura 2. Protocolo experimental simplificado del Experimento II.

FDNmo, FDAmo y LIGsa. Los contenidos de EB y DIVMO fueron utilizadas para determinar la concentración de EM usando la conversión ED x 0,82. Todas las determinaciones se realizaron utilizando los mismos procedimientos que se usaron en el Exp. I.

El consumo de pastura individual fue realizado a la mitad del período de evaluación usando la técnica de doble alcanos, determinando los alcanos de cadena impar (C23 a C35) y C32 (dotricontano) (mg/kg MS) siguiendo el protocolo de Dove y Mayes (2006) con modificaciones de Bakker y Alvarado (2006) en el Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNPCBA, Tandil, Argentina.

Las vaquillonas fueron pesadas cada 2 semanas sin ayuno previo en las primeras horas de la mañana. El experimento tuvo una duración de 60 días.

Cálculos de las medidas de eficiencia para los Exp I y II

Las ganancias diarias de peso (GDP) fueron estimadas por regresión lineal incluyendo el PV inicial usando el procedimiento REG del SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). El peso metabólico a la mitad del período (PMM) fue calculado como $PV \cdot 0.75$ a los 28 y 30 días en los Exp I y II, respectivamente.

El RFI fue calculado para cada animal como la diferencia entre el CMS observado y el CMS esperado (CMSE) o como la diferencia entre el CEM y el consumo de EM esperado (CEME). El CMSE fue estimado para cada animal usando 2 diferentes modelos: (1) RFI fenotípicos, según definición de Koch *et al.* (1963) - RFI_K , y su correspondiente valor de RFI expresado en términos de EM (RFI_{KEM}) en el cual los CMSE/CEME fueron obtenidos de la regresión de los CMS o CEM observados con las GDP y PMM y (2) RFI estimados según estándares de alimentación: RFI_F , a partir del CMS observado y el CMSE basado en las ecuaciones desarrolladas para predecir los requerimientos de ganado de carne según NRC (2000) descrito por Fan *et al.* (1995) y RFI_{SCA} a partir del CMSE derivado de las ecuaciones del SCA Australiano (1990). La conversión de alimento (CMS: GDP) fue calculada como la relación entre el

CMS promedio y la GDP obtenida de la regresión para cada animal.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados en un diseño completamente al azar considerando el animal como la unidad experimental. Los modelos de estimación de CMS incluyeron la edad al inicio del experimento y el grupo genotípico como efectos fijos y la cabaña de origen como efecto aleatorio. En el experimento II además de los efectos mencionados se consideró la parcela también como efecto aleatorio. El efecto del grupo genotípico (V y C) sobre el CMS, GDP, RFI (RFI_K , RFI_{KEM} , RFI_F , RFI_{SCA}) y eficiencia de conversión fueron analizados por procedimientos de mínimos cuadrados usando el PROC MIXED del SAS. Se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables de performance y entre los modelos de RFI usando el PROC CORR del SAS. Se calculó el coeficiente de correlación rankeado de Spearman para determinar el grado de correlación entre las dos evaluaciones de RFI. Las medias fueron comparadas por el test de comparación de medias de Tukey. Se reportó como efecto significativo cuando $P < 0,05$ y como tendencia cuando $0,05 < P \leq 0,1$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento I

Los resultados de la evaluación de eficiencia a través del RFI de las terneras en confinamiento consumiendo una dieta con alta concentración de energía se presentan en el Cuadro 1. Los animales que pertenecían al grupo V fueron más eficientes utilizando el modelo RFI_F . Utilizando los otros modelos de estimación de RFI, los animales del grupo V mostraron tendencias en el mismo sentido. Los modelos utilizados para calcular los CMSE contienen, en esencia, los mismos parámetros para la estimación de los requerimientos de mantenimiento y producción, salvo que en RFI_F y RFI_{SCA} se utiliza la información de la concentración de EM de las dietas individuales. Los parámetros que demuestran la calidad

Cuadro 1. Efecto de los diferentes genotipos en medidas de performance y de eficiencias en terneras Angus evaluadas en confinamiento.

	¹ Grupos de animales que difieren en sus genotipos			
	V	C	e.s.	Valor- P
N° de animales	19	19		
² Edad, d	261 ± 34	264 ± 17		
PV inicial, kg	187,1 ± 32,9	185,2 ± 33,6		
GDP, kg/d	1,24	1,24	0,03	0,875
CMS, kg/d	6,65	6,89	0,49	0,099
³ CEM, Mcal EM/d	16,72	17,41	1,44	0,063
⁴ RFI _K , kg MS/d	-0,111	0,111	0,092	0,097
⁵ RFI _{KEM} , Mcal EM/d	-0,328	0,328	0,240	0,061
⁶ RFI _F , kg MS/d	-0,192	0,192	0,106	0,015
⁷ RFI _{SCA} , kg MS/d	-0,139	0,139	0,097	0,051
⁸ EF (CMS:GDP)	5,819	5,813	0,140	0,981

¹ V: grupo de interés o validación: animales portando los alelos «favorables» de SNPs NPY, IGF-1 y LEP simultáneamente.

C: grupo control: animales portando los alelos «desfavorables» de SNPs NPY, IGF-1 y LEP simultáneamente.

²Edad al inicio de la evaluación en confinamiento.

³Consumo de energía metabolizable.

⁴Consumo residual de alimento según Koch *et al.* (1963).

⁵Consumo residual de alimento según Koch *et al.* (1963) expresado en energía metabolizable.

⁶Consumo residual de alimento según Fan *et al.* (1995).

⁷Consumo residual de alimento según Standing Committee on Agriculture (1990).

⁸Eficiencia de conversión.

de la información (CMS y GDP) para obtener los valores de RFI fueron adecuados (R^2 de las curvas de crecimiento individual y de los modelos que explicaron la variación en los CMS observados). En condiciones de confinamiento y con dietas de concentración energética entre medianas y altas, otros autores evaluando animales en crecimiento (Basarab *et al.*, 2003; Schenkel *et al.*, 2004; Nkrumah *et al.*, 2004; Lancaster *et al.*, 2009; Kelly *et al.*, 2010), han reportado valores de CMS y GDP comparables a los obtenidos en nuestro trabajo.

La diferencia encontrada en RFI entre el grupo V y el grupo C significa que los animales del grupo V consumieron entre 0,2 y 0,38 kg de MS menos por animal y por día (dependiendo del modelo utilizado) que los del grupo C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Nkrumah *et al.* (2004) para el alelo C del SNP LEP, estos autores encontraron que los animales homocigotos para el alelo C consumieron 0,36 kg de MS menos que los homocigotos para el alelo T. Con-

siderando el SNP LEP, las diferencias en RFI podrían estar relacionadas con cambios en la acción biológica de la hormona leptina o con sus niveles circulantes, modificando el balance de energía y la composición corporal (Corva *et al.*, 2009). En el trabajo de Sherman *et al.*, (2008) se reporta que los animales homocigotos para el alelo G del SNP NPY consumieron 0,22 kg de MS menos que los homocigotos para el alelo A. Este valor también es concordante con el resultado obtenido en el presente estudio. En lo referido a IGF-1, investigaciones realizadas en toros y vaquillonas demostraron que las concentraciones séricas de IGF-1 estuvieron fenotípicamente (Brown *et al.*, 2004) y genéticamente (Moore *et al.*, 2005) correlacionadas con RFI. Además, Ge *et al.* (2001) reportaron que los animales homocigotos para el alelo C presentaron menor concentración de IGF-1 que los homocigotos para el alelo T (dentro de una línea divergente de alta concentración de IGF-1 en sangre). No hemos encontrado estudios que reporten aso-

ciaciones entre SNPIGF-1 y RFI en ganado de carne. Sin embargo, estudios previos (Ge *et al.*, 2001; Curi *et al.*, 2005) demostraron una asociación entre animales homocigotos para el alelo C y mayor crecimiento tanto en ganado puro Angus como en animales cruzas.

El RFI no estuvo correlacionado ni con la GDP ni con el PMM como era de esperar por su definición. Se observaron correlaciones significativas pero moderadas entre CMS y RFI y entre CMS y eficiencia de conversión ($r = 0,38$, $P = 0,017$; $r = 0,33$, $P = 0,045$, respectivamente), mientras que se encontraron altas correlaciones entre CMS y CEM, GDP, PV inicial y PMM ($r = 0,99$, $P < 0,001$; $r = 0,76$, $P < 0,001$; $r = 0,83$, $P < 0,001$; $r = 0,88$, $P < 0,001$, respectivamente). La eficiencia de conversión estuvo negativamente correlacionada con GDP ($r = -0,36$, $P = 0,025$). Estos resultados fueron también consistentes con estudios previos en donde se observaron correlaciones positivas entre RFI y CMS

en rodeos de razas británicas (Herd y Bishop, 2000; Arthur *et al.*, 2001).

Experimento II

Los valores de RFI obtenidos en las vaquillonas evaluadas en condiciones de pastoreo mostraron que el genotipo estuvo asociado significativamente con el RFI (Cuadro 2). Las terneras pertenecientes al grupo V comieron 2 kg de MS menos por día que las terneras del grupo C, como se observa en el valor medio de RFIK de cada grupo. El valor obtenido de RFIK es equivalente a 21 % del CMS promedio diario. Al usar los modelos alternativos utilizados para estimar RFI se alcanzaron resultados similares. Al igual que sucedió en el Exp. 1 los animales tuvieron un crecimiento adecuado durante el experimento en pastoreo. De la misma manera, los coeficientes de correlación fueron altos y positivos cuando se estudió la relación entre los diferentes modelos para estimar los RFI. Sin

Cuadro 2. Efecto de los diferentes genotipos en medidas de performance y de eficiencias en vaquillonas Angus evaluadas en pastoreo.

	¹ Grupos de animales que difieren en sus genotipos			
	V	C	e.s.	Valor- P
N° de animales	12	12		
² Edad, d	264 ± 34	375 ± 17		
PV inicial, kg	288,2 ± 39	299,8 ± 35		
GDP, kg/d	1,40	1,37	0,05	0,788
CMS, kg/d	8,76	10,93	0,71	0,005
³ CEM, Mcal EM/d	25,52	31,72	2,09	0,006
⁴ RFI _K , kg MS/d	1,021	-1,021	0,42	0,002
⁵ RFI _{KEM} , Mcal EM/d	2,914	-2,914	1,20	0,002
⁶ RFI _F , kg MS/d	1,078	-1,078	0,46	0,003
⁷ RFI _{SCA} , kg MS/d	0,880	-0,880	0,38	0,004
⁸ EF (CMS:GDP)	6,407	6,962	0,46	0,214

¹ V: grupo de interés o validación: animales portando los alelos «favorables» de SNPs NPY, IGF-1 y LEP simultáneamente.

C: grupo control: animales portando los alelos «desfavorables» de SNPs NPY, IGF-1 y LEP simultáneamente.

²Edad al inicio de la evaluación en pastoreo.

³Consumo de energía metabolizable.

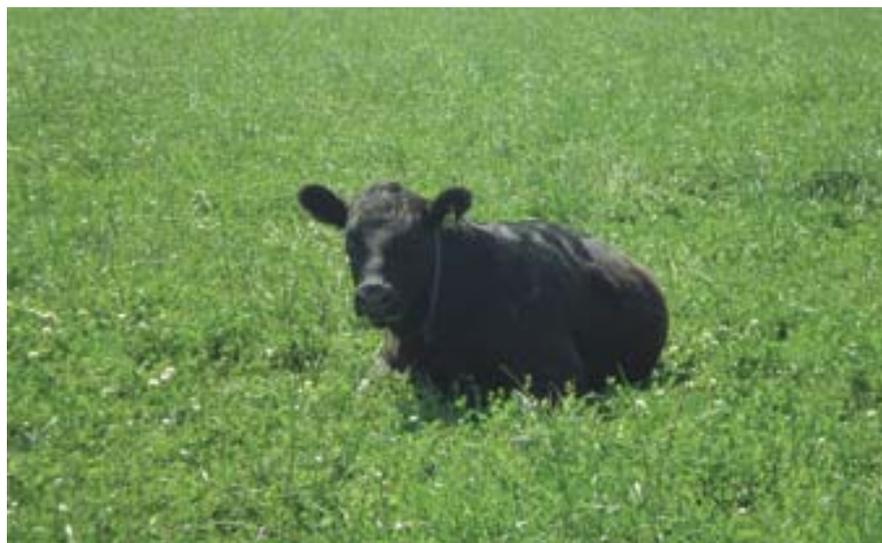
⁴Consumo de alimento residual según Koch *et al.* (1963).

⁵Consumo de alimento residual según Koch *et al.* (1963) expresado en energía metabolizable.

⁶Consumo de alimento residual según Fan *et al.* (1995).

⁷Consumo de alimento residual según Standing Committee on Agriculture (1990).

⁸Eficiencia de conversión.



embargo, la variación en CMS explicada por los distintos modelos fue moderada (R^2 entre 0,55-0,70) siendo menor a la encontrada en el Exp 1. Esta diferencia puede ser parcialmente explicada por el tipo de dieta, por la precisión de las mediciones y por la edad de los animales. Las condiciones de pastoreo implican una mayor variación de nutrientes ofertados y consumidos cuando se compara con dieta totalmente mezcladas (como la ofrecida en el Exp. 1) (Chilibroste *et al.*, 1997; Parsons *et al.*, 1994; Thornley *et al.*, 1994; Decruyenaere *et al.*, 2009). Así mismo, algunos atributos de la pastura, como la altura, estructura, y densidad interaccionan con el comportamiento animal contribuyendo a explicar diferentes patrones de ingestión, digestión y disponibilidad de nutrientes cuando se comparan dietas concentradas en nutrientes con dietas pastoriles (Chilibroste *et al.*, 2005).

La mayoría de la información publicada de RFI en ganado de carne ha sido realizada en condiciones de confinamiento y consumiendo dietas ricas en concentrados. Relativamente pocos trabajos han medido RFI en ganado de carne en condiciones de pastoreo (Herd *et al.*, 1998; Herd *et al.*, 2002; Herd *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2008; Lawrence *et al.*, 2012). Sin embargo, no hemos encontrado trabajos que evaluaran RFI en vaquillonas en crecimiento en condiciones pastoriles de alta calidad y disponibilidad de pasturas templadas, menos aún relacionados con marcadores moleculares para efi-

ciencia. Las condiciones de nuestro experimento (alta asignación de forraje de alta calidad) permitieron a las vaquillonas realizar altos consumos que resultaron en altas ganancias de peso. Nuestros resultados concuerdan con las diferencias numéricas en CMS de forrajes reportadas por Herd *et al.* (2002) y con las diferencias numéricas (aunque no significativas) reportadas por Meyer *et al.* (2008).

Bajo las condiciones de este experimento, las correlaciones entre CMS y RFI y entre CMS y eficiencia de conversión fueron altas y significativas ($r = 0,48$, $P = 0,001$; $r = 0,85$, $P < 0,001$; respectivamente). La correlación rankeada de Spearman entre las dos evaluaciones secuenciales (confinamiento y pastoreo) de RFI fue moderada y significativamente diferente de cero ($r = 0,50$, $P = 0,012$) indicando que algunos animales deben haber cambiado su posición relativa en cada una de las dietas, remarcando la importancia que ejerce el ambiente en esta medida fenotípica. Otros autores también han demostrado diferente ranking en RFI en animales que fueron simultáneamente evaluados con dietas diferentes (Goonewardene *et al.*, 2004; Durunna *et al.*, 2011). Es importante mencionar que en nuestros experimentos, aunque las mediciones de RFI fueron obtenidas durante un corto período dentro de la etapa de crecimiento, el estatus fisiológico de alguno de los animales pudo haber cambiado de una evaluación a otra provocando diferente performance

animal. Así mismo, la composición de la ganancia de ambos grupos de animales podría revelar información que explicara también estos resultados. Investigaciones en eficiencia alimenticia aconsejan incorporar en el cálculo de RFI medidas de la composición corporal tales como la grasa dorsal, área del ojo de bife y porcentaje de grasa intramuscular ya que los requerimientos variarán también de acuerdo a la composición de la ganancia (Basarab *et al.*, 2003; Crew, 2006).

CONCLUSIONES

Los resultados demostraron una asociación significativa entre los SNPs seleccionados y la eficiencia alimenticia medida como RFI. Se observó un efecto mayor cuando los animales se evaluaron bajo condiciones de pastoreo de una pastura de alta calidad y disponibilidad de MS, mientras que bajo condiciones de confinamiento y consumiendo una dieta concentrada en energía la asociación encontrada no fue tan significativa. Este trabajo constituye el primer reporte relativo a la asociación entre la combinación de 3 SNPs localizados en los genes que codifican para NPY, LEP e IGF-1 evaluada en condición de confinamiento y en pastoreo en ganado de carne. Se requiere mayor investigación para validar esta asociación con mayor número de animales y para conocer las razones biológicas que estarían explicando la asociación encontrada.

BIBLIOGRAFÍA

- ANKOM PROCEDURE 173.** Available online 2012, October http://www.ankom.com/media/documents/173_Buffer_Inoculum_SamplePrep.pdf (Disponible Marzo 2013).
- AOAC.** 2007. Official Methods of Analysis, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- ARCHER, J. A.; RICHARDSON, E. C.; HERD, R. M.; ARTHUR, P. F.** 1999. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: a review. *Austr. J. Agric. Res.* 50:147-161.
- ARCHER, J. A.; BERGH, L.** 2000. Duration of performance tests for growth rate, feed intake and feed efficiency in four biological types of beef cattle. *Livestock Production Science* 65:47-55.
- ARCHER, J. A.; REVERTER, A.; HERD, R. M.; JOHNSTON, D. J.; ARTHUR, P. F.** 2002. Genetic variation in feed intake and efficiency of mature beef cows and relationships with postweaning measurements. 7th World Congress on Genetic Applications to Livestock Production, Montpellier, France. p 90-93.
- ARTHUR P F, ARCHER, J. A.; JOHNSTON, D. J.; HERD, R. M.; RICHARDSON E. C.; PARNELL, P. E.** 2001. Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency and other post-weaning traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 79: 2805-2811.
- BAKKER, M.L.; ALVARADO, P.** 2006. Alcanos lineales de la cera cuticular de hojas de *Populus alba*, *Populus deltoides* (salicaceae), *Robinia pseudoacacia* (fabaceae), *ulmuspumila* (ulmaceae) y *Fraxinus americana* (oleaceae) en Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Darwiniana* 44: 58-63.
- BASARAB, J.; PRICE, M. A.; AALHUS, J. L.; OKINE, E. K.; SNELLING, W. M.; LYLE, K. L.** 2003. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 83:189-204.
- BROWN, E. G.; CARSTENS, G. E.; FOX, J. T.; CURLEY K. O. Jr.; BRYAN, T. M.; SLAY, L. J.; WELSH, T. H. Jr.; RANDEL, R. D.; HOLLOWAY, J. W.; KEISLER, D. H.** 2004. Physiological indicators of performance and feed efficiency traits in growing steers and bulls. *J. Anim. Sci.* 82 (Suppl 2):54 (Abstr.).
- CHILIBROSTE, P.; TAMMINGA, S.; BOER, H.** 1997. Effects of length of grazing session, rumen fill and starvation time before grazing on dry-matter intake, ingestive behaviour and dry-matter rumen pool sizes of grazing lactating dairy cows. *Grass and Forage Science* 52: 249-257.
- CHILIBROSTE, P.; GIBB, M. J.; TAMMINGA, S.** 2005. Pasture characteristics and animal performance. In: Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism, 2nd edition/ Dijkstra, Drir J., F J., Forbes, J.M., France, J.-Wallingford, United Kingdom : CAB International, 2005.
- CORVA, P. M.; FERNANDEZ MACEDO, G. V.; SORIA, L. A.; PAPALEO MAZZUCCO, J.; MOTTER, M.; VILLARREAL, E. L.;**

- SCHOR, A.; MEZZADRA, C. A.; MELUCCI L. M.; MIQUEL, M. C.** 2009. Effect of leptin gene polymorphisms on growth, slaughter and meat quality traits of grazing Brangus steers. *Genet Mol Res.* 8: 105-16.
- CREWS, D. H. Jr.; POLLAK, E. J.; WEABER, R. L.; QUAAS, R. L.; LIPSEY, R. J.** 2003. Genetic parameters for carcass traits and their live animal indicators in Simmental cattle. *J. Anim. Sci.* 81:1427-1433.
- CREWS, D. H. Jr.** 2005. Genetics of efficient feed utilization and national cattle evaluation: a review. *Genet. Mol. Res.* 4:152-165.
- CURIR, 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. *Livest. Sci.* 94:159-167.
- DECRUYENAERE, V.; BULGEN, A.; STILMANT, D.** 2009. Factors affecting intake by grazing ruminants and related quantification methods: a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13: 559-573.
- DOVE, H.; MAYES, R. W.** 1991. The use of plant wax alkanes as markers substances in studies of the nutrition of herbivores: A review. *Aust. J. Agric. Res.* 42:913-957.
- DOVE, H.; MAYES, R. W.** 2006. Protocol for the analysis of n-alkanes and other plant-wax compounds and for their use as markers for quantifying the nutrient supply of large mammalian herbivores. *Nat Protoc* 1: 1680-1697.
- DURUNNA, O.N.; MUJIBI, F. D.; GOONEWARDENE, L.; OKINE, E. K.; BASARAB, J. A.; WANG, Z.; MOORE, S. S.** 2011. Feed efficiency differences and reranking in beef steers fed grower and finisher diets. *J. Anim. Sci.* 89: 158-167.
- FAN, L.Q.; BAILEY, D.R.; SHANNON, N. H.** 1995. Genetic parameter estimation of postweaning gain, feed intake, and feed efficiency for Hereford and Angus bulls fed two different diets. *J. Anim. Sci.* 73: 365-372.
- 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.
- GOONEWARDENE, L.A.; OKINE, E. K.; WANG, Z.; SPANER, D.; MIR, P. S.; MIR, Z.; MARX, T.** 2004. Residual metabolizable energy intake and its association with diet and test duration. *Can. J. Anim. Sci.* 84: 291-295.
- HERD, R.M.; RICHARDSON, E. C.; HEGARTY, R. S.; WOODGATE, R.; ARCHER, A.; ARTHUR, P.F.** 1998. Pasture intake by high versus low net feed efficient Angus cows. *Animal Production in Australia* 22:137-140.
- HERD, R. M.; BISHOP, S. C.** 2000. Genetic variation in residual feed intake and its association with other production traits in British Hereford cattle. *Livest. Prod. Sci.* 63: 111-119.
- HERD, R. M.; ARCHER AND, J. A.; ARTHUR, P. F.** 2003. Selection for low post-weaning residual feed intake improves feed efficiency of steers in the feedlot. *Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics* 15, 310-313.
- HERD, R. M.; ARCHER, J. A.; ARTHUR, P. F.** 2003. Reducing the cost of beef production through genetic improvement of feed intake: Opportunity and challenges to application. *J. Anim. Sci.* 81:E9-E17.
- KELLY, A. K.; MCGEE, M.; CREWS, D. H. Jr.; FAHEY, A. G.; WYLIE, A. R.; KENNY, D. A.** 2010. Effect of divergence in residual feed intake on feeding behavior, blood metabolic variables, and body composition traits in growing beef heifers. *J. Anim. Sci.* 88: 109-123.
- KELLY A. K.; MCGEE, M.; CREWS, D. H. Jr.; LYNCH, C. O.; WYLIE, A. R.; EVANS, R. D.; KENNY, D. A.** 2011. Relationship between body measurements, metabolic hormones, metabolites and residual feed intake in performance tested pedigree beef bulls. *Livest. Sci.* 135: 8-16.
- KOCH, R.M.; SWIGER, L. A.; CHAMBERS, D.; GREGORY, K. E.** 1963. Efficiency of Feed Use in Beef Cattle. *J. Anim. Sci.* 22: 486-494.
- KOLATH, W.H.; KERLEY, M. S.; GOLDEN, J. W.; KEISLER, D.H.** 2006. The relationship between mitochondrial function and residual feed intake in Angus steers. *J. Anim. Sci.* 84:861-865.

- LANCASTER, P.A.; CARSTENS, G. E.; RIBEIRO, F. R. B.; TEDESCHI, L. O.; CREWS, D. H.** 2009. Characterization of feed efficiency traits and relationships with feeding behavior and ultrasound carcass traits in growing bulls. *J. Anim. Sci.* 87: 1528-1539.
- LAWRENCE, P.; KENNY, D. A.; EARLEY, B.; MCGEE, M.** 2012. Grazed grass herbage intake and performance of beef heifers with predetermined phenotypic residual feed intake classification. *Animal* 6: 1648-1661.
- LOFGREEN, G.P.; GARRETT, W. N.** 1968. A System for Expressing Net Energy Requirements and Feed Values for Growing and Finishing Beef Cattle. *J. Anim. Sci.* 27: 793-806.
- MANNETJE, L.'T.; JONES, R. M.** 2001. Field and Laboratory Methods for Grassland and Animal Production Research. Wallingford, UK: CABI Publishing, 353-402.
- MEYER, A.M.; KERLEY, M.S.; KALLENBACH, R. L.** 2008. The effect of residual feed intake classification on forage intake by grazing beef cows. *J. Anim. Sci.* 86: 2670-2679.
- MOORE, K.L.; JOHNSTON, D. J.; GRASER, H. U.; HERD, R. M.** 2005. Genetic and phenotypic relationships between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and net feed intake, fat, and growth traits in Angus beef cattle. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 211.
- NKRUMAH, J.D.; LI, C.; BASARAB, J. A.; GUERCIO, S.; MENG, Y.; MURDOCH, B.; HANSEN, C.; MOORE, S. S.** 2004. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition. *Can. J. Anim. Sci.* 84: 211-219.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC).** 2000. Nutrient Requirements of Beef Cattle. National Academy Press, Washington, DC.
- PARSONS, A.J.; THORNLEY, J.H.M.; NEWMAN, J.; PENNING, P.D.** 1994. A Mechanistic Model of Some Physical Determinants of Intake Rate and Diet Selection in a Two-Species Temperate Grassland Sward. *Funct Ecol* 8: 187-204.
- MGAP, PLAN AGROPECUARIO.** 2012. Presentación de los Resultados del Programa de Monitoreo de Empresas Ganaderas. http://www.planagropecuario.org.uy/uploads/monitoreos/17_Monitoreo%2020112012%20presentado%20en%20Montevideo%2016%20de%20octubre%202012.pdf. (Disponible 6 Marzo 2013).
- RICHARDSON, E. C.; HERD, R. M.; ODDY, V. H.; THOMPSON J. M.; ARCHER J. A.; ARTHUR PF.** 2002. Body composition and implications for heat production of Angus steer progeny of parents selected for and against residual feed intake. *Aust. J. Exp. Agric.* 41:1065-1072.
- STANDING COMMITTEE ON AGRICULTURE (SCA).** 1990. Feeding Standards for Australian Livestock. In: Ruminants. CSIRO Publications, East Melbourne, Australia.
- SCHENKEL, F.S.; MILLER, S. P.; WILTON, J. W.** 2003. Genetic parameters and breed differences for feed efficiency, growth, and body composition traits of young beef bulls. *Can. J. Anim. Sci.* 84: 177-185.
- SHERMAN, E.L.; NKRUMAH, J. D.; MURDOCH, B. M.; LI, C.; WANG, Z.; FU, A.; MOORE, S. S.** 2008. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. *J. Anim. Sci* 86, 1-16.
- THORNLEY, J.H.M.; PARSONS, A. J.; NEWMAN, J.; PENNING, P. D.** 1994. A Cost-Benefit Model of Grazing Intake and Diet Selection in a two-species Temperate Grassland Sward. *Funct. Ecol.* 8: 5-16.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A.** 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Trujillo, A.I.; Peñagaricano, F.; Grignola, M. P.; Nicolini, P.; Casal, A.; Espasandín, A. C.; Naya, H.; Carriquiry, M.; Chillbroste, P.** 2012. Using high resolution melting analysis to identify variation of NPY, LEP and IGF-1 genes in Angus cattle. *Livest. Sci.* 146: 193-198.

Casal A.¹, Kaitazoff A.²,
Bacigaluz P.², Urioste J.¹,
Trujillo A. I.¹

¹Departamento de Producción Animal y Pasturas. Facultad de Agronomía. UdelaR.

²Estudiantes que realizaron su trabajo final de tesis de grado de la Facultad de Agronomía, UdelaR.

Capítulo 4

Estudio de asociación entre el SNP del gen que codifica IGF1 y características de crecimiento evaluadas genéticamente (DEPs)

INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos de la aplicación de las técnicas de biología molecular en el mejoramiento genético animal consiste en identificar, mapear y analizar polimorfismos de genes relacionados con características de importancia económica. Entre ellas, el crecimiento (y la diferente distribución de los nutrientes a los diferentes tejidos) constituye una característica de relevada importancia en animales productivos (Schwerin *et al.*, 1995). Uno de los métodos usados para identificar y estudiar las asociaciones es lo que se denomina «estrategia por gen candidato». Esta estrategia comprende el mapeo físico y el análisis de polimorfismos de genes cuyos productos cumplen un rol clave en las vías metabólicas de procesos fisiológicos, es decir polimorfismos que determinan variaciones fenotípicas.

El rol que cumplen las hormonas del eje somatotrófico es esencial en explicar las diferencias en el metabolismo de animales en diferentes fases de su crecimiento (Owens *et al.*, 1993). Dentro del eje somatotrófico, el factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I) con su rol de mediador de la acción de la hormona de crecimiento en varios tejidos (Schoenle *et al.*, 1982, Hossner *et al.*, 1997), interviene en la regulación del crecimiento y del metabolismo celular durante todas las etapas de desarrollo. Ge *et al.* (1997) estudiando líneas divergentes de ganado Angus con distintos

niveles de IGF-I en sangre se reportaron un polimorfismo en la región promotora del gen que codifica para la síntesis de IGF-1 en la región promotora del gen (Gene Bank Accession no. AF017143) (SNP IGF-1) identificado como una transición T/C (alelos A/B). Estos autores encontraron posteriormente que el genotipo BB de animales estuvo asociado con mayores ganancias de peso a los 20 días de destetados. Otros investigadores también han reportado asociaciones entre el genotipo BB y mayores pesos al destete en líneas comerciales de ganado Bos Taurus (Li *et al.*, 2004) y también mayores tasas de crecimiento en toros Holstein-Friesian (Siadkowska *et al.*, 2006). En el mismo sentido, Curi *et al.* (2005) reportaron que animales que presentaban el genotipo BB (de raza Nellore y razas cruzas) presentaron mayores pesos (comparados con el genotipo AB) en distintos momentos del engorde. Ninguna de las asociaciones encontradas en los trabajos mencionados ha sido evaluada en condiciones de pastoreo y no se han encontrado reportes en la literatura donde la hayan investigado. Este trabajo tiene como hipótesis que el SNP IGF-I está asociado con parámetros productivos de crecimiento en ganado Angus en pastoreo.

Los **objetivos** de este trabajo fueron: 1) Estimar las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP de IGF-1 y 2) Estudiar la asociación entre las variantes alélicas (A y B) del gen que codifica para la síntesis de IGF-1 y los efectos genéti-

cos aditivos (DEPs) y fenotípicos de peso al destete (PD) y peso a los 18 meses (P18) en terneras Aberdeen Angus criadas en sistemas de producción de base pastoril en Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de los animales

El muestreo contempló 34 cabañas comerciales de productores asociados a la Sociedad de Criadores de Aberdeen Angus del Uruguay y participantes del Sistema de Evaluación Nacional de Reproductores de Aberdeen Angus (S.E.R.) provenientes de 13 departamentos del país. Se extrajeron muestras de sangre (6-10 ml) por veno-punción de la vena yugular (o vena coccígea como alternativa) y muestras de folículo piloso obtenida por arrancamiento de los pelos de la cola a 941 terneras nacidas en la primavera del 2009. El protocolo experimental seguido para la extracción fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), Universidad de la República. En forma esquemática se presenta en la Figura 1.

Extracción de ADN y genotipificación

El ADN genómico fue extraído a partir de sangre entera usando un procedimiento con alta saturación de sal (Montgomery y Sise, 1990). El genotipado fue realizado usando el procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real y posterior análisis de alta resolución en la descripción de los perfiles de las curvas de disociación (HRM). Los detalles de los procedimientos de extracción y genotipificación se encuentran descritos en Trujillo *et al.* (2012).

CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los genotipos identificados por PCR-HRM fueron registrados en una base de datos de MS-Excel™. Se realizaron los cálculos para la estimación de las frecuencias.

No se incluyeron en el análisis de asociación las cabañas con animales que no tuvieran los 3 genotipos posibles del SNP IGF-1 (AA, AB o BB) ni los animales que carecieran de registros de peso al nacer, peso al destete o peso a los 18 meses. El archivo final incluyó la información de 368 animales (población seleccionada).

De la población seleccionada se conformaron 2 subgrupos de acuerdo a los P18 de los animales y la media poblacional (311,4 kg) \pm 0,5 desvío estándar. El grupo superior (n=99) incluyó a todos aquellos animales que quedaron por encima de 345 kg de peso vivo (PV). El grupo inferior (n=136) quedó compuesto por aquellos animales que presentaban P18 inferiores a 278 kg.

La prueba de equilibrio de Hardy-Weimberg (H-W) fue realizada para la población total y para cada una de los subgrupos. Se realizó un análisis de Test de Chi cuadrado que permitió comparar las frecuencias genotípicas observadas con las que se esperan en situación de equilibrio Hardy-Weinberg. El total de individuos esperados para cada genotipo se calculó como la frecuencia genotípica esperada ponderada en el total de la población.

La hipótesis nula (H_0): afirma que las frecuencias alélicas en una población dada están en equilibrio de H-W, mientras que la hipótesis alterna (H_a): afirma que las frecuencias alélicas no están en equilibrio.

Se estudió el efecto de la sustitución alélica en la variación genética aditivas -DEP del peso al destete ajustado por edad (DEPPDC) y DEP del peso a los 18 meses ajustado por edad (DEPP18C), y el efecto del genotipo (AA, AB o BB) sobre las variables fenotípicas -PD ajustado por edad (PDC) y P18 ajustado por edad (P18C). El efecto de la sustitución alélica en la variación genética-aditiva total se analizó utilizando el siguiente modelo:

$Y_i = \mu + n^{\circ} \text{alelos } B_i + \epsilon$, donde Y_i = DEP (PDC) o DEP (P18C),

Donde: μ = Media de las DEPPDC o DEPP18C y ϵ = Error experimental

El modelo utilizado para el estudio del genotipo sobre las variables fenotípicas

incluyó el genotipo de IGF-1 (AA, AB o BB), la cabaña de origen de los animales (efecto aleatorio), edad de la madre y peso al nacer corregido o ganancia predestete (covariables), según la variable de respuesta, PDC o P18C, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las frecuencias genotípicas encontradas se presentan en el Cuadro 1. Las frecuencias genotípicas esperadas (0,32, 0,48 y 0,20 para AA, AB y BB, respectivamente) indican que existe un equilibrio génico en el total de la población. Los valores esperados no difieren significativamente con los valores observados ($p > 0,05$).

Los valores de frecuencia alélicas encontrados en este trabajo son coincidentes con valores reportados en raza Angus (Ge *et al.*, 2001), mientras que difieren de las frecuencias encontradas

en razas cebuínas (Curi *et al.*, 2005) o cruza con cebuínas (Santos *et al.*, 2003).

La población presentó equilibrio H-W, lo que supone que no ha habido una selección direccionada en función del SNPIGF-1. Sin embargo al analizar los dos grupos diferenciados en P18, se observó que en el grupo inferior de peso, el alelo A se encontró en mayor proporción que el alelo B. (0,62 vs 0,38), indicando que la mayor cantidad de alelos A encontrada estaría relacionada con menores pesos de los animales. Esto concuerda con lo reportado por otros autores en raza Angus (Ge *et al.*, 2001), en raza Nellore (Curi *et al.*, 2005) y en cruza Holstein-Friesian (Siadkowska *et al.*, 2006). En el grupo superior de peso, sin embargo, las frecuencias de los alelos A y B no difirieron significativamente (0,49 vs 0,51).

El análisis de los datos mostró que no hubo efecto de los genotipos en las variables de crecimiento estudiadas (Cuadro 2 y 3).

Cuadro 1. Frecuencias genotípicas y alélicas de la población Angus

Genotipo	N° animales	Frecuencia genotípica	Alelos*	Frecuencia alélica
AA	298	0,32	A	0,558
AB	454	0,48		
BB	189	0,20	B	0,442

*Alelos A y B de SNP IGF-1 (Ge *et al.*, 1997).

Cuadro 2. Efecto de la variabilidad genética en DEPPDC y DEPP18C.

Variable	Genotipo			Media	Estimador ³	P > F
	AA	AB	BB			
DEPPDC ¹	9,5 ± 4,5	9,8 ± 4,0	10,0 ± 3,6	9,8 ± 4,0	0,24	0,42
DEPP18C ²	14,0 ± 6,9	14,3 ± 7,5	15,7 ± 6,5	14,5 ± 7,1	0,79	0,14

¹Diferencia esperada en la progenie para peso al destete ajustado por edad (kg).

²Diferencia esperada en la progenie para peso a los 18 meses ajustado por edad (kg).

³Coefficiente de regresión de la sustitución alélica (A por B).

Cuadro 3. Efecto de los genotipos en las variables de crecimiento: peso al destete y peso a los 18 meses.

Variable	Genotipo			Media	Valor-P
	AA	AB	BB		
PDC (kg) ¹	193 ± 30	202 ± 35	200 ± 37	199,2 ± 40	0,67
P18C (kg) ²	298 ± 65	314 ± 70	325 ± 59	311,4 ± 67	0,69

¹PDC: peso al destete ajustado por edad.

²P18C: peso a los 18 meses ajustado por edad.

Estos resultados no coinciden con lo reportado por otros autores que sí encuentran un efecto significativo del polimorfismo en las variables de crecimiento (Curi *et al.*, 2005; Siadkowska *et al.*, 2006). Es importante señalar que los animales en nuestro estudio no se encontraban bajo condiciones experimentales sino que la información analizada se corresponde con los registros de peso (PD y P18) levantados en cada cabaña. El marcado efecto que tuvo la cabaña de origen o criador en los PDC y en P18C (22,4 y 67,5 % de la variación total, respectivamente; Cuadro 2) probablemente pueda explicar, al menos parcialmente, la falta de efecto de los genotipos en las variables de crecimiento. Hasta el destete, la influencia del criador fue menor ya que existió un fuerte efecto materno y todas las terneras se encontraban consumiendo leche materna. Luego del destete, el efecto materno disminuyó y el efecto criador (ambiente y alimentación) se hizo mayor. Sin embargo, no se cuenta con la información de la producción de leche de las madres, por lo tanto, este factor también puede explicar que no se

haya encontrado efecto. Las madres de las terneras estuvieron bajo condiciones de pastoreo de campo natural pero la oferta y calidad del forraje a la que estuvieron sometidas antes y durante la lactancia fue seguramente diferente entre los distintos criadores. Así mismo, las terneras no estuvieron bajo un mismo manejo durante el período transcurrido entre el destete y los 18 meses de edad, lo cual marca diferencias importantes en el crecimiento y desarrollo de las mismas. Esto presenta como consecuencia que, al estimar las medias de los pesos, en las diferentes etapas bajo estudio se subestimen o sobreestimen dichos datos, obteniendo resultados con un coeficiente de variación muy grande.

Todos los animales luego de ser destetados pastoreaban campo natural, pero el manejo en cada sistema pastoril fue particular en cada cabaña o criador. La validación de los marcadores moleculares en cada sistema de alimentación debe ser considerada debido al efecto de la interacción del genotipo con el ambiente (Corva *et al.*, 2009).



Figura 1. Protocolo experimental.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio el polimorfismo de IGF-1 no afectó la ganancia postdestete de las terneras Angus. Se debería generar nueva información para validar este marcador en condiciones pastoriles evaluando a los animales bajo la misma alimentación y el mismo manejo. Sería interesante también estudiar la relación de este marcador con el contenido de grasa subcutánea en esta raza ya que existen antecedentes (Islam *et al.*, 2009) que han demostrado una asociación de este polimorfismo con el contenido de grasa subcutánea en Angus. De ser validado este polimorfismo, se podría utilizar para complementar el uso de los DEP en las características evaluadas.

BIBLIOGRAFÍA

- CORVA, P.M.; FERNANDEZ MACEDO, G. V.; SORIA, L.A.; PAPALEO MAZZUCCO, J.; MOTTER, M.; VILLARREAL, E. L.; SCHOR, A.; MEZZADRA, C.A.; MELUCCI L. M.; MIQUEL, M.C.** 2009. Effect of leptin gene polymorphisms on growth, slaughter and meat quality traits of grazing Brangus steers. *Genet. Mol. Res.* 8: 105-16.
- CURI, R. A.; OLIVERA, 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. *Livest. Sci.* 94: 159-167.
- GE, W.; DAVIS, M.E.; HINES, H. C.** 1997. Two SSCP alleles detected in the 5'-flanking region of bovine IGF1 gene. *Anim. Genetics* 28:155.
- GE, W.; DAVIS, M.E.; HINES, H.C.; IRVING, K.M.; SIMMEN R.C.M.** 2001). Association of genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *J. Anim. Sc.* 79: 1757-62.
- HOSSNER K.L.; MCCUSKER R.H.; DODSON M.V.** 1997. Insulin-like growth factors and their binding proteins in domestic animals. *Animal Science* 64: 1-15.
- ISLAM, K. K. M.; VINSKY, R. E.; CREWS, E.K.; OKINE, S. S.; MOORE, D. H.; CREWS, Jr.; LI, C.** 2009. Association analyses of a SNP in the promoter of IGF1 with fat deposition and carcass merit traits in Hybrid, Angus and Charolais beef cattle. *Anim. Genet.* 40: 766-769.
- 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.
- MONTGOMERY, G. W.; SISE, A.** 1990. Extraction of DNA from sheep white blood cells. *N. Z. J. Agric. Res.* 33: 437-441.
- OWENS, F.N.; DUBESKI, P.; HANSON, C.F.** 1993. Factors that alter the growth and development of ruminants. *J. Anim. Sci.* 71: 3138-3150.
- SCHWERIN, M.; BROCKMANN, G.; VANSELOW, J.; SEYFERT, H.M.** 1995. Perspectives of molecular genome analysis in livestock improvement-an overview. *Anim. Res. Dev.* 42: 14-26.
- SCHOENLE, E. ZAPF, J.; HUMBEL, R. E.; FROESCH, E. R.** 1982. Insuline like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. *Nature.* 296: 252-253.
- SIADKOWSKA, E.; ZWIERZCHOWSKI, L.; OPRAZADEK, J.; STRZALKOWSKA, N.; BAGNICKA, E.; KRYZYZEWSKI, J.** 2006. Effect of polymorphism in IGF-I gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Anim Sci Pap Rep* 2006. 3:225-236.
- TRUJILLO, A.I.; PEÑAGARICANO, F.; GRIGNOLA, M.P.; NICOLINI, P.; CASAL, A.; ESPASANDÍN, A. C.; NAYA, H.; CARRIQUIRY, M.; CHILIBROSTE, P.** 2012. Using high resolution melting analysis to identify variation of NPY, LEP and IGF-1 genes in Angus cattle. *Livest. Sci.* 146: 193-198.

Impreso en Editorial Hemisferio Sur S.R.L.
Buenos Aires 335
Montevideo - Uruguay

Depósito Legal: 366-660/15

INIA Dirección Nacional
Andes 1365, P. 12
Montevideo
Tel.: 598 2902 0550
Fax: 598 2902 3633
iniadn@dn.inia.org.uy

INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km 11
Colonia
Tel.: 598 4574 8000
Fax: 598 4574 8012
iniale@le.inia.org.uy

INIA Las Brujas
Ruta 48, Km 10
Canelones
Tel.: 598 2367 7641
Fax: 598 2367 7609
inia_lb@lb.inia.org.uy

INIA Salto Grande
Camino al Terrible
Salto
Tel.: 598 4733 5156
Fax: 598 4732 9624
inia_sg@sg.inia.org.uy

INIA Tacuarembó
Ruta 5, Km 386
Tacuarembó
Tel.: 598 4632 2407
Fax: 598 4632 3969
iniatbo@tb.inia.org.uy

INIA Treinta y Tres
Ruta 8, Km 281
Treinta y Tres
Tel.: 598 4452 2023
Fax: 598 4452 5701
iniatt@tyt.inia.org.uy

www.inia.uy