

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**GENES RELACIONADOS A TERNEZA Y MARMOLADO DE LA CARNE EN LA
RAZA ABERDEEN ANGUS EN ENGORDE A PASTO NATURAL Y FEEDLOT**

por

Leticia Amina de SOTO BERNEDA

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Higiene, Inspección-Control
y Tecnología de los Alimentos

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2015

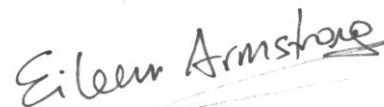
PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:

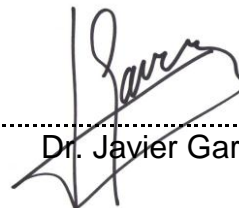
.....
Dra. Rosa Gagliardi

Segundo Miembro (Tutor):



.....
Dra. Eileen Armstrong

Tercer Miembro:



.....
Dr. Javier García

Fecha:

18 de noviembre de 2015

Autor:

.....
Br. Leticia Amina de Soto Berneda

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi tutora y amiga Eileen Armstrong por darme la oportunidad de trabajar en su equipo y por toda la ayuda y dedicación a lo largo de estos años.

A los compañeros de la Cátedra de Genética de la Facultad de Veterinaria por su amistad, horas de laboratorio y trabajos compartidos.

A mis amigas que crecimos juntas en esta carrera y que son como hermanas de la vida. En especial a Tati y su familia que mil veces me hicieron sentir como en casa.

A mi esposo Richard por el compañerismo y amor en cada etapa de mi carrera.

Especialmente quiero dedicar este trabajo a mis padres, por darme las herramientas para llegar más lejos, por su apoyo y amor invaluable de todos estos años.

Muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN	8
SUMMARY	9
1. Introducción.....	10
1.1. Importancia de la producción cárnica en nuestro país	10
1.2. Parámetros estudiados: terneza, marmolado y su importancia en la calidad de la carne bovina	10
1.3. Sistemas de alimentación en nuestro país	12
1.3.1. Tradicional - Pastura natural.....	12
1.3.2. Intensiva o <i>Feedlot</i>	12
1.4. Marcadores moleculares en producción animal	13
2. Hipótesis	16
3. Objetivos	16
3.1. Objetivo General	16
3.2. Objetivos Específicos.....	16
4. Materiales y métodos	17
4.1. Muestra de animales	17
4.2. Parámetros fenotípicos medidos.....	18
4.2.1. Terneza (fuerza de corte).....	18
4.2.2. Marmolado (porcentaje de lípidos)	18
4.3. Genotipado y selección de SNPS	18
4.4. Análisis estadísticos	19
4.4.1. Fenotípico	19
4.4.2. Genotípico-poblacional.....	19
4.4.3. Asociación genotipo-fenotipo	20
5. Resultados y discusión.....	21
5.1. Análisis de fenotipos	21
5.1.1. Terneza	21
5.1.2. Marmolado.....	25
5.1.3. Relación entre parámetros.....	27
5.2. Parámetros poblacionales.....	28

5.3. Análisis de asociación genotipo-fenotipo.....	30
5.3.1. Resultados significativos y cercanos a la significación por gen.....	32
GEN IGF1	32
GEN IGF2.....	32
GEN CAPN1.....	32
GEN PPARD	33
GEN PPARA.....	33
GEN SCD.....	34
GEN ACYL-COA DESATURASA	34
GEN CAST	35
6. CONCLUSIONES.....	37
7. ANEXO.....	38
7.1. Protocolo de extracción de ADN	38
8. BIBLIOGRAFÍA	39

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1 - Descripción de los genes estudiados..	14
Tabla 2 - Descripción del departamento de procedencia, categoría y cantidad de animales de cada tropa.	17
Tabla 3 - Estadística descriptiva de los parámetros: fuerza de corte (FC) (Kg) 24 horas (hs) y 10 días post faena, para toda la muestra analizada.	21
Tabla 4 - Fuerza de corte tomada a las 24 horas. Subgrupos separados según la categoría (solo se incluyen animales alimentados a pasto natural).	22
Tabla 5 - Fuerza de corte tomada a los 10 días. Subgrupos separados según la categoría (solo se incluyen animales alimentados a pasto natural).	22
Tabla 6 - Estadística descriptiva para fuerza de corte tomada a las 24 horas y a los 10 días de maduración en la categoría novillos. Subgrupos separados según el tipo de alimentación usada para la terminación de engorde.	24
Tabla 7 - Estadística descriptiva del parámetro: Porcentaje de lípidos	25
Tabla 8 - Estadística descriptiva para % de lípidos en subgrupos separados según la categoría (solo se incluyen animales alimentados a pasto natural).	25
Tabla 9 - Estadística descriptiva para % de lípidos en la categoría novillos. Subgrupos separados según el tipo de alimentación usada para la terminación de engorde.	26
Tabla 10 - Relación entre FC 24hs y FC 10 días. Niveles de correlación, sus valores y su significación estadística (p valores) para toda la muestra de animales alimentados a pasto natural.	27
Tabla 11 – Relación entre FC 24 hs y % de lípidos para la categoría novillos; se incluyen novillos alimentados a pasto natural y <i>feed/lot</i> . Niveles de correlación, sus valores y su significación estadística (p valores).	27
Tabla 12 - Resumen del análisis poblacional de los 10 SNPs situados en los ocho genes analizados.	28
Tabla 13 - Resultados del análisis de asociación para los distintos SNPs en toda la población.	30
Tabla 14 - Resultados del análisis de asociación para los distintos SNPs en la categoría hembras.	31
Tabla 15 - Resultados del análisis de asociación para los distintos SNPs en la categoría novillos.	31

Figura 1 - Novillos raza Aberdeen Angus de Uruguay. (foto gentileza SCAAU).....	17
Figura 2 - Gráfico de barras, donde se evidencia el promedio de la fuerza de corte (Kg) a las 24 horas y a los 10 días de maduración para las diferentes categorías (vacas, vaquillonas y novillos) de los animales alimentados a pasto natural	23
Figura 3 - Gráfico de Cajas y Bigotes, se evidencia el % de lípidos en la categoría novillos divididos en dos subgrupos: <i>alimentación con pastura natural</i> (1) y <i>alimentación con feedlot</i> (2).....	26

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron 10 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) ubicados en ocho genes candidatos y su posible relación con la terneza y marmolado de la carne de 705 animales de raza Aberdeen Angus criados en diferentes sistemas de alimentación. Se realizó un análisis descriptivo de los caracteres fenotípicos mencionados, un análisis genético poblacional de los SNPs y un análisis de asociación entre los fenotipos y los genotipos de los SNPs. Las mediciones de terneza se realizaron con la cuchilla de Warner-Bratzler a las 24 horas y 10 días de maduración y el marmolado (medido como porcentaje de lípidos) se evaluó mediante la técnica de Folch, Lees y Sloane. Todas las muestras fueron extraídas del músculo *Longissimus dorsi*. El ADN se extrajo de las muestras de carne y el genotipado fue realizado por la empresa GENESEEK® de Estados Unidos. El análisis estadístico de las variables fenotípicas se realizó mediante el programa Statgraphics Centurion y en análisis genético-poblacional mediante el programa GENEPOP. El análisis de asociación se efectuó por regresión lineal múltiple utilizando el lenguaje de programación R; el modelo incluyó genotipo, tropa, planta de faena, edad y alimentación como efectos fijos y se estableció un umbral de significación para cada fenotipo, corrigiendo por los efectos del testeo múltiple mediante 100.000 permutaciones. Del análisis se obtuvo una diferencia en la terneza de la carne según la categoría animal, pero no hubo diferencias entre categorías y el porcentaje de lípidos. Tampoco se encontraron diferencias para terneza en novillos alimentados en distintos sistemas (pastoril vs *feedlot*). Si se obtuvieron diferencias significativas entre el porcentaje de lípidos de novillos alimentados a *feedlot* con respecto a los alimentados con pastura natural. Los parámetros genético-poblacionales fueron similares a los encontrados por otros autores y los índices de diversidad genética fueron medios a bajos por tratarse de una raza comercial fuertemente seleccionada. Se detectaron asociaciones significativas en la categoría hembras entre los parámetros fenotípicos estudiados y tres SNPs: IGF1 3, IGF2 3 y SCD 3. Del mismo modo en la categoría novillos se detectó la asociación significativa entre porcentaje de lípidos y el SNP PPARD4. Se encontraron SNPs cercanos a la significación en el total de la muestra y en ambas categorías, que ameritarían estudios posteriores. El presente estudio reafirma la importancia de estudiar el posible efecto de ciertos genes en características de interés productivo, como lo son las de calidad de carne, en las condiciones ambientales de nuestro país para poder así validar o no su utilización.

SUMMARY

On this assay 10 single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in eight candidate genes and their possible relationship with meat tenderness and marbling on 705 Aberdeen Angus breed animals raised in different feeding systems were studied. A descriptive analysis of the mentioned phenotypic characters; a population genetic analysis of SNPs and an analysis of association between phenotypes and genotypes of SNPs was performed. Tenderness measurements were performed with the Warner-Bratzler meat shear at 24 hours and 10 days of ageing, and marbling (lipid percentage) was measured using the technique of Folch, Lees and Sloane. All samples were taken from the Longissimusdorsi muscle. DNA was taken from the meat samples and genotyping was performed by GENESEEK® an USA Company. Statistical analysis of phenotypic variables was performed using the Statgraphics Centurion program and population genetics analysis with GENEPOP program. The association analysis was performed by a multiple linear regression using R programming language; the model designed included genotype, herd, slaughter house, age and feeding regime as constant effects and was established a significance threshold for each phenotype, correcting for the effects of multiple testing by 100,000 permutations. The analysis showed a difference on meat tenderness related to category, but there were no differences found between categories in lipid percentage, neither was found a difference for tenderness between steers that were on different feeding systems (pastures vs. feedlot). On the other hand there were significant differences between the lipids percentage of steers fed on feedlot and the ones fed by pastures. The population genetics parameters found were similar from those found previously by other authors and diversity indexes were from medium to low considering that animals are from a commercial breed which has been strongly selected. Significant associations were found for the phenotypic parameters studied and three SNPs in females: IGF1 3, IGF2 3 and SCD 3. Similarly, for steers a significant association was found for lipid's percentage and PPARD 4SNP. Also SNPs near significance for the total sample and both categories (male and female) were found, which may lead to further investigation. The present work highlights the importance of studying genes affecting characteristics which are considered of interest, such as meat quality, on Uruguay's environmental conditions so that we can confirm or reject their validation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de la producción cárnica en nuestro país

Uruguay es uno de los principales productores de carne bovina en el mundo. Con un stock de casi 12 millones de bovinos, se encuentra entre los seis principales exportadores dentro del ranking mundial. En el año 2014 se faenaron un total de 2.103.715 cabezas de ganado bovino y se exportaron 249.069 toneladas de carne con un valor de u\$ 1472 millones de dólares (*INAC 2014*).

A su vez, es uno de los pocos países latinoamericanos que tiene la oportunidad de exportar carne de alta calidad hacia diversos países con mercados más exigentes (Unión Europea, NAFTA, Medio Oriente, MERCOSUR, República Popular de China, Federación Rusa y otros, *INAC 2014*). Desde el año 2012 ha habido un avance en las mejoras en los precios de carne diferenciada con determinadas características organolépticas y de composición (Cuota 481, ejecutada para la Unión Europea), teniendo como protagonista la carne bovina con sistema de alimentación a corral. Actualmente nuestro país exporta anualmente 48.200 toneladas de este tipo de carne para el cumplimiento de esta cuota arancelaria (*Reglamento de ejecución (UE) N° 481/2012 de la Comisión Europea "Carne vacuna de calidad superior"*).

Gracias al trabajo interinstitucional, se ha logrado establecer la confianza de nuestros clientes con estándares invariables como son: producir carne con un 100% de trazabilidad por ley en todo el territorio nacional, sin hormonas, sin antibióticos, sin aditivos artificiales y sin proteínas de origen animal en la alimentación. Otro aspecto crucial para la exportación, es cumplir con alimentos que no le causen daño a la salud del consumidor (inocuidad alimentaria), para ello se ha implementado en todos los establecimientos exportadores el sistema HACCP (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control) que se aplica en todo el proceso de producción (Leveau, 2008). Sin embargo, aún no contamos con un programa de "control de calidad de carne" que sea uniforme para todos los establecimientos y que caracterice el producto desde el punto de vista de características de interés para el consumidor tales como terneza, marmolado, etc. (Singh *et al.*, 2015)

La calidad de la carne es un atributo que involucra y hace responsables a todos los actores de la cadena cárnica, desde el productor en el campo hasta el consumidor, quien exige un producto de su satisfacción. Para obtener un producto más competitivo, es preciso que nuestro país conozca en profundidad el potencial genético de su ganado y cuánto influye la genética en las características de calidad de carne. Esto nos permitiría adecuarnos y permanecer en los distintos mercados, con diferentes exigencias de los consumidores.

1.2. Parámetros estudiados: terneza, marmolado y su importancia en la calidad de la carne bovina

La calidad de la carne vacuna puede ser caracterizada por apreciación visual (color de la carne y grasa, cantidad visible de grasa), instrumental (fuerza de corte y textura), panel de degustadores (palatabilidad, terneza, sabor y jugosidad), valor nutritivo (contenido de ácidos grasos, oligoelementos, etc.) e inocuidad alimentaria (ausencia de peligros que potencialmente causen daño al consumidor). Entre todos estos componentes, la terneza ha sido definida por estudios internacionales como una de las características de la carne que más influyen en su aceptación por parte de los consumidores, estando dispuestos a pagar más por ella (Boleman *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2001; Brito, 2010).

La ternera se percibe como un conjunto de sensaciones táctiles resultado de la interacción de los sentidos con las propiedades físicas y químicas de la carne (Luzardo *et al.*, 2010). Es una característica de difícil y costosa medición, de baja heredabilidad y que recién puede ser evaluada luego del sacrificio de los animales, lo que la hace muy difícil de incluir en los sistemas convencionales de selección de reproductores. Desde el punto de vista biológico, la ternera de la carne está dada mayormente por cuatro factores intrínsecos: la degradación de las proteínas miofibrilares, que es el mayor responsable de las variaciones en la ternera de la carne; el estado de contracción del músculo (longitud del sarcómero) observado en las primeras 12 a 24 horas *post-mortem*; el contenido de tejido conectivo de los distintos músculos y el porcentaje de grasa intramuscular (Soria y Corva, 2004). La degradación de las proteínas miofibrilares es un proceso metabólico anaeróbico que comienza en el músculo esquelético inmediatamente después del sacrificio del animal. El debilitamiento de la unión de las proteínas miofibrilares asociado con el proceso de proteólisis de las mismas genera la tiernización. La magnitud de este proceso *post-mortem* es el mayor responsable de la variación de la ternera. Estos procesos están regulados mediante las enzimas Calpaínas (μ -calpaína y m-calpaína) y Calpastatina. La μ -calpaína es una proteasa activada por el calcio intracelular que degrada mediante proteólisis las proteínas de las miofibrillas del músculo esquelético en condiciones *post-mortem*. Por otro lado, la calpastatina inhibe la acción de las calpaínas, regulando este proceso. Presenta variantes más o menos eficaces y cuyos efectos se traducen en una mayor o menor inhibición de la actividad de la μ -calpaína (Soria y Corva, 2004; Schenkel *et al.*, 2006). La maduración de la carne a temperaturas de refrigeración (2 a 4 °C) es un método eficaz para mejorar la ternera de la carne (Franco, 2010). En los bovinos, aproximadamente el 80% de la mejora en la ternera se alcanza transcurridas más de dos semanas, siendo la primeros 10 días donde se hace más evidente (Soria y Corva, 2004). El método más extendido para medir la ternera luego del sacrificio del animal es mediante el uso de la cuchilla de Warner-Bratzler (WB), que mide la fuerza necesaria para cortar la carne (Fuerza de corte, FC) (Feed, 2010). Este método será descrito más adelante.

Otro de los parámetros de calidad de carne más buscados y extendidos es el porcentaje de grasa intramuscular, que puede ser observado a simple vista y se conoce como marmolado, marmoreado o veteado. Como se mencionó anteriormente, es una característica íntimamente relacionada a la ternera y que participa activamente en el sabor percibido por los consumidores (Yamada *et al.*, 2009). Además, a la hora de la elección por parte del consumidor, el porcentaje de grasa intramuscular visible puede afectar la decisión de compra (Van Elswyk y Mc Neill, 2014). Esta característica se refiere a la grasa depositada (células adiposas) entre las fibras musculares, más precisamente en el tejido conjuntivo que rodea las fibras. El proceso de depósito de esta grasa intramuscular implica una serie de eventos metabólicos que le ocurren al adipocito (diferenciación, proliferación, maduración, oxidación, etc.) y su constante interacción con los demás elementos fisiológicos dentro del músculo (Yamada *et al.*, 2009). Las diferencias en los eventos metabólicos serían las que determinan los distintos grados de marmolado (Lee *et al.*, 2008). La acumulación de lípidos en este depósito es un carácter muy deseado en algunos mercados, generando carne más jugosa y con mejor sabor (Smith *et al.* 2009). Sin embargo, hoy día se tiende a la preferencia de carne mas magra y baja en colesterol, por lo que un mayor o menor veteado o marmolado genera calidades diferenciales de la carne, según los consumidores potenciales (Thaller *et al.*, 2003; Soria y Corva 2004). Para

evaluar esta característica debemos considerar que el contenido de grasa intramuscular depende del corte cárnico y del tipo de alimentación a la cual el animal ha sido sometido, especialmente durante la etapa de terminación previa a la faena, donde se ve afectada sensiblemente la cantidad de grasa intramuscular de la carne (Grompone, 2010). La medición de la cantidad de grasa intramuscular se puede realizar a través de métodos objetivos y subjetivos. Dentro de los métodos objetivos se encuentra la técnica de Folch, Lees y Sloane (Folch *et al.*, 1957), que fue utilizada en este trabajo y que se describe más adelante en la sección Materiales y Métodos. El método subjetivo que se utiliza comúnmente es la observación visual del grado de infiltración de grasa en la sección transversal del músculo *Longissimus dorsi* a la altura de la 12va y 13ra costilla, y se le asigna un puntaje de acuerdo a la cantidad de grasa intramuscular observada. Existen diez grados de marmoleo asociados con los tres grados de calidad más comunes en los mercados internacionales, que son Prime, Choice y Select, otorgados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, <http://www.ams.usda.gov/grades-standards/carcass-beef-grades-and-standards>).

La dieta puede afectar la calidad de la carne y la canal. Animales alimentados con concentrados y en sistemas de confinamiento generan una mayor deposición de grasa que animales alimentados a pasturas, debido al mayor componente energético de los cereales y al menor nivel de ejercicio (Van Elswyk y McNeill, 2014).

1.3. Sistemas de alimentación en nuestro país

1.3.1. Tradicional - pastura natural

Los sistemas de producción de carne de nuestro país se basan en el pastoreo extensivo, utilizando directamente el forraje proveniente de pasturas naturales, cultivadas y estacionales. El uso de suplementos es realizado en forma estratégica en momentos precisos y en cantidades controladas para corregir problemas específicos (Franco, 2010).

1.3.2. Intensiva o *feedlot*

El avance de la agricultura y la forestación en nuestro país ha desencadenado una competencia por la tierra con el sector ganadero. Esto determina que se haya intensificado la ganadería mediante esquemas que utilizan la suplementación durante alguna parte del ciclo productivo. Debido a esta coyuntura, es importante estudiar cuánto influye dicha intensificación en las características de calidad de carne (Luzardo *et al.*, 2010).

En referencia al sistema de engorde a corral (*feedlot*) de nuestro país, se consideran establecimientos pecuarios dedicados al engorde de bovinos a corral a aquellos que mantengan sus animales confinados en espacios reducidos, no teniendo acceso a pastoreo directo voluntario, y utilicen una alimentación exclusivamente en base a productos formulados (balanceados, granos, núcleos minerales u otros productos), para su terminación con destino directo a faena (Decreto N° 178/010 MGAP). Un ejemplo de alimentación a corral en nuestro país es la Cuota 481. La misma consta de cortes vacunos procedentes de canales de vaquillonas y novillos con los siguientes requisitos: menos de 30 meses de edad y que en los 100 días previos al sacrificio, como mínimo, únicamente hayan sido alimentados con raciones constituidas por no menos del 62 % de concentrados y/o subproductos de cereales, sobre la materia seca, que tengan o superen un contenido de energía metabolizable superior a 12,26 megajulios por

kilogramo de materia seca. Los animales deberán recibir diariamente un promedio de materia seca igual o superior al 1,4 % del peso vivo. Una vez faenadas las reses, las canales se clasifican por un método homologado por las autoridades nacionales donde se combinan parámetros de madurez de la canal y palatabilidad probable de los cortes. El método debe incluir evaluación de características de madurez, color, textura del músculo *Longissimus dorsi*, de los huesos y de la osificación del cartílago y evaluación de las características probables de palatabilidad basadas en las características específicas de la grasa intramuscular y la firmeza del músculo (*Reglamento de ejecución (UE) N° 481/2012 de la Comisión Europea "Carne vacuna de calidad superior, 2015*).

En la raza Aberdeen Angus en nuestro país, se han hecho aproximaciones a estudios de características fenotípicas de interés como el porcentaje de grasa intramuscular en bovinos terminados en sistemas intensivos para acceder a mercados como la cuota 481 (Carriquiry, 2013). Si bien no deja dudas del potencial de la raza en el país, tal como menciona este autor, no obtuvieron datos estadísticamente significativos al no contar con un diseño experimental adecuado. Esta es una de las razones que han motivado el presente trabajo, obtener datos que aporten a la investigación agropecuaria de nuestro país.

En el presente estudio, se refiere a pastura natural cuando los animales han sido alimentados bajo el sistema tradicional de pastoreo, y a alimentación bajo el régimen *feedlot* cuando han recibido una terminación en la alimentación en base a concentrados en confinamiento durante los 100 días previos a la faena, como se explicó anteriormente.

1.4. Marcadores moleculares en producción animal

El avance de la biología molecular permite que hoy en día podamos detectar genes asociados a características de interés, para luego seleccionar a aquellos animales que porten las variantes alélicas más ventajosas como futuros reproductores. Características complejas que aún no se pueden evaluar en el animal vivo, y que solamente pueden medirse indirectamente a través de pruebas de progenie, se verían muy favorecidas por el uso de la Selección Asistida por Marcadores (MAS). La MAS permite seleccionar en forma precisa animales con determinadas variables genéticas asociadas con un efecto medible de un carácter complejo. No reemplaza los sistemas tradicionales de selección (basados en las Diferencias Esperadas de la Progenie ó DEPs), pero es una nueva herramienta que posibilita una selección más eficiente de reproductores y ambos sistemas se complementan muy bien (Dekkers, 2004; Ron & Weller, 2007; Garrick & Golden, 2009). Los mayores beneficios potenciales de la MAS se verían en características de difícil y costosa medición, en las cuales los caracteres posibles de ser observados en el animal vivo son pobres predictores del valor de cría del animal, y que recién pueden ser evaluadas luego del sacrificio. Las características relacionadas a la calidad de la carne son ejemplos de esto y son las que más podrían beneficiarse en un programa de selección que incluya MAS (Dekkers, 2004; Garrick & Golden, 2009).

Se denomina marcador molecular a mutaciones o variantes de una secuencia de ADN en los individuos que se pueden asociar a determinadas características de interés económico. Los SNPs (Polimorfismos de Nucleótido Simple o *Single Nucleotide Polymorphisms*) son el tipo de marcador más utilizado para la MAS. Se trata de mutaciones puntuales donde cambia una sola base nucleotídica del ADN, generándose dos alelos y tres genotipos posibles en una población. Existe mucha bibliografía sobre asociaciones de SNPs en genes que resultan de interés para características de calidad de carne (por ejemplo: Casas et

al., 2006; Schenkel *et al.*, 2006; Bernard *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Gill *et al.*, 2010). A su vez se han identificado regiones cromosómicas responsables de un cambio fenotípico de interés donde no se ha logrado aún identificar al gen o genes responsables, llamados Loci de Caracteres Cuantitativos (*Quantitative Trait Loci*, o QTL; Ron & Weller, 2007). Estas regiones han sido descritas por varios autores, sobre todo para la característica porcentaje de grasa (Davis *et al.*, 2007; Barendse *et al.*, 2008) pero también para otras características de interés en la producción de carne (por ejemplo: Gutiérrez Gil *et al.*, 2008)

La detección de un SNP relacionado a una característica fenotípica comienza por seleccionar SNPs que se encuentren en genes candidatos. Un gen candidato es aquel que reúne ciertas condiciones que hacen probable que una mutación o variación en dicho gen cause una variación observable o medible en el carácter fenotípico de interés. Estas condiciones pueden ser: por la función que cumple el gen, por su relación con cierta vía metabólica o proceso fisiológico, por sus efectos encontrados en otras especies, como por ejemplo el cerdo, o en otras razas. También por su ubicación dentro o cerca de una región cromosómica previamente asociada a un QTL (Armstrong, 2011).

Para este trabajo se seleccionaron ocho genes: *IGF1*, *IGF2*, *CAPN1*, *CAST*, *PPARD*, *PPARA*, *SCD* y *Acyl-CoA desaturasa*, de los cuales existe evidencia de ser genes candidatos para los parámetros fenotípicos de interés, como se describirá a continuación (Tabla 1).

Tabla 1 - Descripción de los genes estudiados. Se muestra el nombre y abreviación, SNPs seleccionados, número de identificación del gen en NCBI, identificación del SNP en NCBI, las bases nucleotídicas que cambian y la región del gen donde se localiza cada SNP.

Nombre del gen y abreviación	SNPs	ID del GEN en NCBI	ID del SNP en NCBI	Código (región)
Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1)	IGF1 3	281239	rs132665612	G/A (intron)
Factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF2)	IGF2 3	281240	rs42196906	A/G (intron)
Calpaína 1 (CAPN1)	CAPN1 316	281661	rs17872000	G/C (exon)
	CAPN1 4751		rs17872050	C/T (intron)
	CAPN1 530		rs17871051	G/A (exon)
Calpastatina (CAST)	CAST 1	281039	rs110955059	C/G (intron)
Receptor delta activado por peroxisomas (PPARD)	PPARD 4	353106	rs110353030	G/A (splice site)
Receptor alfa activado por peroxisomas (PPARA)	PPARA 4	281992	rs134144389	A/C (3'UTR)
Esteroil-CoA-desaturasa (SCD)	SCD 3	280924	rs43030354	A/G (5'UTR)
Acetil CoA desaturasa (Acyl-CoA)	ACYL-COA	101906058	rs43739828	T/G (intron)

El gen *IGF1* codifica el factor de crecimiento insulínico tipo 1. Se ha demostrado que contribuye a la variación genética en rasgos tales como engrasamiento de la canal, peso de la canal, ganancia diaria de peso, así como tamaño corporal, eficiencia en la conversión de alimentos, producción de leche y deposición de grasa (Ge *et al.*, 2001; Islam *et al.*, 2009; Tizioto *et al.*, 2012). El gen *IGF2* codifica el factor de crecimiento insulínico tipo 2. Han y colaboradores (2008) encontraron polimorfismos en este gen asociados significativamente con terneza, marmolado y pH así como también con otros parámetros de calidad de la canal como peso y largo de carcasa en bovinos.

Otro gen seleccionado para este estudio fue *CAPN1*, situado en el cromosoma 29 del bovino, el cual codifica la enzima u-calpaína relacionada con la terneza de la carne. Esta enzima es activada por la presencia de calcio intramuscular luego de la muerte del animal, degradando las proteínas del sarcómero (tropomiosina y titina) y causando la inestabilidad de la estructura de la miofibrilla, como fue mencionado previamente (Leveau, 2008). Varios autores han descrito la asociación entre la terneza de la carne bovina y polimorfismos en este gen (Page *et al.*, 2004; White *et al.* 2005; Casas *et al.*, 2006; Van Eenennaam *et al.* 2007; Gill *et al.* 2009). El gen *CAST* es otro gen descrito por varios autores relacionado a la terneza. Este gen situado en el cromosoma 7 bovino codifica la enzima calpastatina, cuya función es inhibir la actividad de las calpaínas en el músculo, regulando así el proceso de proteólisis. Se han relacionado SNPs en este gen asociados a una menor actividad de la calpastatina y a una menor fuerza de corte (Schenkel *et al.* 2006; Leveau, 2008; Reardon *et al.* 2010).

El gen *PPARD* codifica un receptor nuclear activado por factores proliferadores de peroxisomas, denominado PPAR δ . Este gen ha sido descrito como un regulador clave en el metabolismo de los lípidos en bovinos y cerdos (Graugnard *et al.*, 2009; Meidtner *et al.*, 2009). Otro gen relacionado a metabolismo de lípidos y a la acción de *PPARD* es el gen *PPARA*, el cual codifica un receptor nuclear importante en la regulación de la homeostasis de lípidos y glucosa, controlando la síntesis, almacenamiento y consumo de lípidos (Bionaz *et al.* 2013).

El gen *SCD* codifica la enzima esteroil-CoA-desaturasa, considerada clave en la variación del perfil de ácidos grasos en la carne bovina (Taniguchi *et al.*, 2003; Orrú *et al.*, 2011). Por último, se estudió el gen de la enzima Acyl-CoA desaturasa, situado en el cromosoma 26 bovino. Es un gen de gran interés, poco estudiado aún. Se encuentra relacionado con el metabolismo de los ácidos grasos, ya que regularía la acción del gen *SCD* según Keating y colaboradores (2005 y 2006).

En el presente trabajo se analizaron datos de animales de la raza Aberdeen Angus, ya que junto con la raza Hereford es una de las principales razas carniceras más extendida en todo el territorio nacional. Se trata de una raza británica con la característica de poseer buenas masas musculares y producir carne de buena calidad (Carne Aberdeen Angus del Uruguay, 2015). Para estos animales, se analizaron los dos parámetros (terneza y marmolado) como se mencionó previamente. Se estudiaron a nivel genético para los diez SNPs mencionados anteriormente y a nivel fenotípico (medidas de las características en la carne), y se analizó el posible efecto de dichos SNPs en la terneza y el porcentaje de lípidos, teniendo en cuenta las características intrínsecas del animal como ser el sexo, el origen de las tropas y las condiciones de alimentación.

2. HIPÓTESIS

Existen polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en los genes *IGF1*, *IGF2*, *CAPN1*, *CAST*, *PPARD*, *PPARA*, *SCD* y *Acyl-CoA desaturasa*, que podrían estar potencialmente asociados a la terneza y el porcentaje de grasa intramuscular de la carne bovina, en animales sometidos a diferentes sistemas de terminación.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

Detectar SNPs asociados a terneza de la carne y porcentaje de grasa intramuscular en bovinos Aberdeen Angus terminados en diferentes sistemas de alimentación mediante análisis estadísticos de asociación genotipo-fenotipo.

3.2. Objetivos específicos:

- Obtener ADN genómico de los animales para los cuales ya existen datos fenotípicos de terneza y % de lípidos.
- Analizar mediante métodos de estadística descriptiva los caracteres fenotípicos de terneza y porcentaje de grasa intramuscular en la población general, en las diferentes categorías de edad y sexo, y en los distintos sistemas de alimentación (pasto natural/*feedlot*).
- Seleccionar SNPs en las bases de datos públicas y en la bibliografía, de los genes candidatos *IGF1*, *IGF2*, *CAPN1*, *PPARD*, *PPARA*, *SCD*, *Acyl-CoA desaturasa* y *CAST*.
- Luego del genotipado de las muestras, analizar los SNPs desde el punto de vista genético poblacional.
- Analizar la probabilidad de asociación genotipo-fenotipo mediante regresión lineal múltiple entre los SNPs genotipados y los caracteres fenotípicos medidos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Muestra de animales

Fueron muestreados para este estudio 705 bovinos de raza Aberdeen Angus (Figura 1) distribuidos en diez tropas provenientes de diferentes puntos de nuestro país (Tabla 2). Dicha población fue dividida en subgrupos o categorías según edad y sexo: 153 vacas, 43 vaquillonas y 509 novillos. Para algunos análisis las vacas y vaquillonas fueron agrupadas en una misma categoría (“hembras”).

La mayor parte de los animales fueron criados y terminados en un régimen de pastura natural extensiva, a excepción de un subgrupo dentro de la categoría novillos (n=281), que fueron terminados en un régimen de *feedlot* para la cuota 481. Las diferentes tropas fueron faenadas en siete plantas frigoríficas, cada una en una fecha diferente.

La presente tesis se llevó a cabo en el marco del proyecto PR_FSA_2009_1383 (Fondo INNOVAGRO-ANII), titulado: “Validación y detección de genes asociados a calidad de la carne y la canal en ganado Aberdeen Angus del Uruguay”, del Área Genética de Facultad de Veterinaria, UdelaR.



Figura 1 - Novillos raza Aberdeen Angus de Uruguay.
(foto gentileza SCAAU)

Tabla 2 - Descripción del departamento de procedencia, categoría y cantidad de animales de cada tropa (n).

<i>Tropa</i>	<i>Depto.</i>	<i>Categoría</i>	<i>n</i>
1	Paysandú	Vacas y vaquillonas	123
2	Florida	Vacas y novillos	51
3	Paysandú	Vacas	68
4	Paysandú	Novillos	37
5	Artigas	Novillos	61
6	Paysandú	Novillos	105
7	Flores	Novillos	59
8	Paysandú	Novillos	105
9	Florida	Novillos	30
10	Paysandú	Novillos	66

4.2. Parámetros fenotípicos medidos

4.2.1. Terneza (Fuerza de Corte)

Para medir la fuerza de corte (FC) se analizaron muestras del músculo *Longissimus dorsi* obtenidas de carcasas enfriadas (maduradas) en las plantas frigoríficas correspondientes.

Se realizó la evaluación instrumental mediante el método definido como “fuerza de corte” mecánica, efectuada a través de la cizalla o cuchilla de Warner-Bratzler (Feed, 2010). Este método mide la fuerza de corte (FC) expresada en kilogramos que realiza la cuchilla a una muestra de músculo de interés. Cuanto mayor sea la FC, menor será la terneza de la muestra, y viceversa. El procedimiento consiste en cocinar la muestra a baño maría, teniendo en cuenta los parámetros temperatura y tiempo para que en el centro térmico de la muestra la temperatura llegue a 70°C. Luego de la cocción, se extrae la muestra y se la deja enfriar a temperatura ambiente. Cuando esta fría, se extrae una submuestra para ser acondicionada en la cuchilla. La técnica de extracción de la submuestra consiste en trocear la muestra de músculo de forma que quede un bife de 2,5 cm de espesor, con las fibras musculares perpendiculares a la superficie del corte, de un tamaño que se puedan extraer al menos 8 a 10 cilindros de 1,27 cm de diámetro con un sacabocado. Las fibras musculares del cilindro deben quedar paralelas al largo del mismo. Una vez obtenido el cilindro, se lo coloca en la cizalla Warner-Bratzler y se toma la medida de la fuerza necesaria para cortarlo en sentido perpendicular a las fibras. Estas medidas son registradas por un *software* (bastidor Instron ®) adaptado a la cizalla.

Las medidas de terneza fueron tomadas a las 24 horas de muestreo (FC 24 hs) y al décimo día de maduración a 4°C (FC 10 días), obteniéndose ocho medidas de fuerza de corte por muestra en ambos días y un promedio por muestra por día. Los análisis de terneza fueron realizados por el personal del Laboratorio de Calidad de Carne de la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC) de la Facultad de Agronomía de Paysandú.

4.2.2. Marmolado (Porcentaje de lípidos)

Para la medición del porcentaje de lípidos (% lípidos) fue utilizado el método de Folch, Lees y Sloane (Folch *et al.*, 1957). La muestra fue extraída del músculo *Longissimus dorsi* 24 horas luego del sacrificio y se procuró sacar toda la grasa de cobertura de cada muestra, dejando expuesta solamente la grasa intramuscular para no interferir en la posterior evaluación de la cantidad de grasa. Las muestras fueron procesadas por el laboratorio de Fisiología y Nutrición de la Facultad de Ciencias-Udelar.

4.3. Genotipado y Selección de SNPs

Para la obtención de datos genotípicos de los 705 bovinos, se extrajo ADN utilizando un protocolo de extracción de músculo. Esta técnica se encuentra detallada en el Anexo 1 y fue realizada en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria. Una vez comprobado el éxito de la extracción mediante la utilización de geles de agarosa y medidas en un espectrofotómetro digital (*Nanodrop Technology INC. ND1000*) se procedió a acondicionar las muestras para el genotipado.

Para el genotipado fueron contratados los servicios de la empresa GENESEEK® de Estados Unidos (www.geneseek.com), y fue efectuado mediante la estrategia “*custom assay genotyping*” utilizando métodos masivos de genotipado basados en espectrometría de masa (<http://www.neogen.com/Agrigenomics/ResearchDevelop.html#bottom>).

Se seleccionaron diez SNPs situados en los ocho genes mencionados anteriormente mediante una minuciosa búsqueda en publicaciones científicas y en las bases de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>). Se eligieron SNPs conocidos por su vinculación con los parámetros estudiados, según amplia bibliografía, o situados en dominios conservados del gen, seleccionados utilizando la herramienta online “*Conserved Domains*” del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

4.4. Análisis estadísticos

4.4.1. Fenotípico

Las variables fenotípicas fueron analizadas mediante estadística descriptiva (cálculos de medias, desvíos, coeficientes de variación, mínimos y máximos, rangos, etc.) para la muestra total y para la muestra dividida en subgrupos según tipo de alimentación y categorías. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA simple) entre diferentes factores (categorías de animales y tipo de alimentación) y los parámetros medidos, para determinar si las diferencias observadas entre las medias eran o no significativas. Se efectuaron además pruebas de Rangos Múltiples para la detección de grupos homogéneos mediante diferencias entre las medias y determinar cuáles medias eran significativamente diferentes de otras, según el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Mediante un análisis multivariado se calcularon las correlaciones de Pearson entre diferentes variables (por ejemplo, % de lípidos y FC a las 24 hs), generando p-valores para probar la significancia estadística de las correlaciones estimadas. En todos los casos, valores de p menores a 0,05 indicaron diferencias significativas o correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95%.

Se utilizaron los programas Excel® y Statgraphics Centurion® XV, versión 15.2.06.

4.4.2. Genotípico-poblacional

Con los datos genotípicos de los 10 SNPs de interés se realizó un análisis genético poblacional mediante el programa GENEPOP V4 ® de acceso libre en internet (<http://kimura.univ-montp2.fr/%7Erousset/Genepop.htm>). Se calcularon frecuencias alélicas y genotípicas. Se obtuvieron índices de diversidad genética tales como heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e). Se realizó la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg, y se obtuvieron datos del índice de fijación de Wright F_{IS} , para detectar posibles efectos de la selección o la endogamia.

4.4.3. Asociación genotipo-fenotipo

Se aplicó un análisis de regresión lineal múltiple para testear asociaciones entre genotipos y fenotipos utilizando el lenguaje de programación R (<http://www.r-project.org>). El paquete estadístico lme4 se utilizó para ajustar el modelo lineal a los datos. En este estudio se asumió que los efectos de los SNPs sobre los caracteres fenotípicos son completamente aditivos y que no hay interacciones entre los efectos fijos considerados. El efecto del SNP para cada carácter fue estimado mediante la inclusión del mismo como covariable en el modelo lineal. El modelo utilizado para el estudio fue:

$$y = \mu + \text{tropa} + \text{planta} + \text{categoría} + \text{alimentación} + g\alpha + e$$

Donde y es el carácter en cuestión, μ es la media de la característica, *tropa* es el efecto combinado de tropa, origen y fecha de faena, *planta* es el efecto de la planta de faena, *categoría* es el efecto de la categoría de edad y sexo de los animales, *alimentación* es el efecto del tipo de alimentación recibida, g es el genotipo del SNP y α es el efecto aditivo del SNP. Se incluyen todos los SNPs en la misma recta, en forma similar a como se procede con los análisis de genoma completo o GWAS. Debido a esto, para corregir por el testeo múltiple (*multiple testing*) en cada grupo, se hizo un análisis de permutaciones para calcular el umbral de significación para cada carácter fenotípico. Luego se estimó el efecto de cada SNP y el estadístico F fue utilizado para calcular la distribución de la hipótesis nula. Un total de 100.000 permutaciones fueron utilizadas para calcular la distribución nula, de la cual fue inferido un umbral de 5% para cada experimento.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Análisis de fenotipos

Si bien fueron muestreados 705 animales, no a todos se les pudo registrar las variables fenotípicas evaluadas. El número de animales estudiados por cada variable se indica en las tablas correspondientes.

5.1.1. Terneza

En las tablas 3 a 6 se muestra un resumen del análisis estadístico de FC 24 hs y FC 10 días. En la tabla 3 se incluye la población total. En las tablas 4 y 5 se divide la muestra por categorías (vacas, vaquillonas y novillos) y se toman únicamente los animales alimentados a pasto natural para comparar las distintas categorías, además se presentan los datos de la Prueba de Rangos Múltiples mediante la visualización de grupos homogéneos. En la tabla 6 se describen los datos obtenidos de los novillos divididos en dos subgrupos según el tipo de alimentación y la Prueba de Rangos Múltiples. La figura 2 corresponde a un gráfico de barras donde se muestra la FC 24 hs y 10 días para las diferentes categorías.

Tabla 3 - Estadística descriptiva de los parámetros: fuerza de corte (FC) (Kg) 24 horas (hs) y 10 días post faena, para toda la muestra analizada. Se muestra: número de animales (n), promedio, desvío estándar (DE), coeficiente de variación (CV), valores mínimos y máximos (mín., máx.), rango y p valor del análisis de varianza (ANOVA simple).

	n	Promedio	DE	CV	Mín.	Máx.	Rango
FC a las 24 hs	421	4,25	1,98	46,64%	1,05	11,44	10,39
FC a los 10 días	247	3,38	1,25	36,99%	0,82	8,48	7,65
<i>p valor 0,0001</i>							

Como se observa en la tabla 3, el carácter fenotípico evaluado a las 24 hs tiene más datos que cuando es evaluado a los 10 días post faena. Esto se explica porque para un alto porcentaje de animales no se pudo obtener la cantidad de carne suficiente para efectuar los dos análisis al momento de la toma de la muestra, especialmente para las tropas pertenecientes a la cuota 481, dado que se trata de animales más valiosos y los frigoríficos son reacios a fraccionar un corte de carne de elevada calidad, que podría generarles elevadas pérdidas económicas. Con respecto a los promedios, es interesante destacar que el promedio de la FC a los 10 días post faena es significativamente más bajo que a las 24 horas. Esto es esperable ya que la maduración de la carne se hace más evidente en los primeros diez días, presentándose el mayor grado de proteólisis en la carne y su máxima tenderización (99,76%) durante la primera semana de maduración. Dicho proceso de maduración de la carne tiene como finalidad permitir el proceso de debilitamiento de la unión de las proteínas miofibrilares y la

proteólisis autógena del músculo tomando como sustrato las miofibrillas. La maduración entonces posibilita el desarrollo de carnes más blandas (Soria y Corva 2004; Leal, 2013).

Tabla 4 - Fuerza de corte tomada a las 24 horas. Subgrupos separados según la categoría (solo se incluyen animales alimentados a pasto natural). Se muestra: número de animales (n), promedio, desvío estándar (DE), coeficiente de variación (CV), valores mínimos y máximos (mín., máx.), rango, prueba de Rangos Múltiples (Método: 95,0 porcentaje LSD) y p valor del análisis de varianza (ANOVA simple).

Categorías	n	Promedio	DE	CV	Mín.	Máx.	Rango	Grupos homogéneos
Vacas	149	5,72	2,13	37,30%	2,76	13,02	10,26	X
Vaquillonas	39	4,73	1,40	29,62%	2,45	8,13	5,68	X
Novillos	183	3,29	1,47	44,84%	1,05	9,21	8,16	X

p valor 0,0000

Tabla 5 - Fuerza de corte tomada a los 10 días. Subgrupos separados según la categoría (solo se incluyen animales alimentados a pasto natural). Se muestra: número de animales (n), promedio, desvío estándar (DE), coeficiente de variación (CV), valores mínimos y máximos (mín., máx.), rango, prueba de Rangos Múltiples (Método: 95,0 porcentaje LSD) y p valor del análisis de varianza (ANOVA simple).

Categorías	n	Promedio	DE	CV	Mín.	Máx.	Rango	Grupos homogéneos
Vacas	112	3,99	1,35	33,86%	1,93	9,28	7,35	X
Vaquillonas	39	3,36	0,81	24,04%	1,86	6,41	4,56	X
Novillos	97	2,74	1,07	39,04%	0,82	5,61	4,79	X

p valor 0,0000

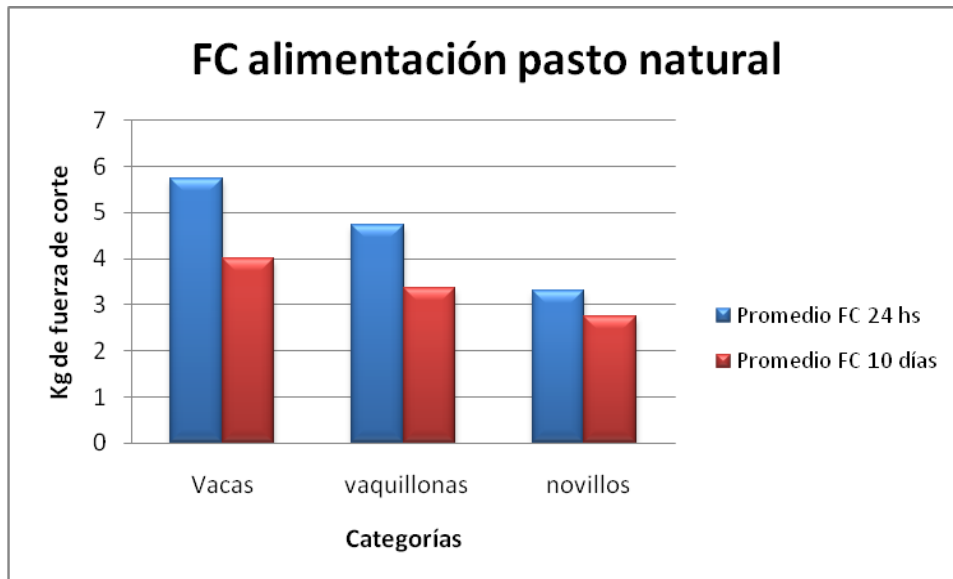


Figura 2 - Gráfico de barras, donde se evidencia el promedio de la fuerza de corte (Kg) a las 24 horas y a los 10 días de maduración para las diferentes categorías (vacas, vaquillonas y novillos) de los animales alimentados a pasto natural.

Se aprecian diferencias significativas según la categoría ($p=0,0000$), como se observa en las tablas 4 y 5 y en la figura 2. Las vacas presentaron carnes de menor terneza que novillos y vaquillonas en los dos tiempos de maduración (FC 24 hs y 10 días). Esto se debe a que el contenido del tejido conectivo es uno de los factores intrínsecos del animal que influyen en la terneza y que puede explicar hasta el 20% de la variación de terneza entre animales (Soria y Corva, 2004). El tipo de colágeno presente a medida que aumenta la edad en los animales es el causante de la variación de terneza en la categoría vacas ya que aumenta el grado de reticulación del mismo y esto provoca un aumento en la FC de la carne. Se ha visto una reducción en el contenido del colágeno reticulado cuando disminuye la edad de faena, aumentando la terneza de la carne (Soria y Corva, 2004; Roy *et al.* 2015). La categoría vaquillonas mostró una mayor fuerza de corte (menor terneza) que la categoría novillos siendo ambas categorías de la misma edad. Según Venkata Reddy y colaboradores (2015) esto puede deberse a que en las vaquillonas se ha detectado una mayor actividad de la enzima calpastatina, la cual es inhibidora de las enzimas responsables de la proteólisis muscular *post-mortem* durante el proceso de maduración de la carne. Además estos autores sugieren que las hembras sin castrar presentan mayores niveles de estrógenos circulantes que las hacen más susceptibles a factores de estrés y por lo tanto dan lugar a carne más dura.

Se puede observar que en la prueba de rangos múltiples no se identificaron grupos homogéneos, lo que significa que son subgrupos significativamente diferentes entre sí. Esta prueba refuerza lo discutido previamente sobre las diferencias de fuerza de corte en las diferentes categorías. Varios estudios a nivel internacional demuestran que los consumidores distinguen y están dispuestos a pagar más cuando la carne presenta una FC menor a 4,5 Kg y los grados de satisfacción del producto aumentan cuando la FC es menor a 3,6 Kg (Boleman *et al.*, 1997; Brito, 2010). En este sentido los datos obtenidos en el presente estudio demuestran que luego de los 10 días de maduración las vaquillonas y los novillos presentan carne con una terneza aceptable para los consumidores y que los novillos presentan la carne más tierna, la cual sería más atractiva para los consumidores y para un potencial pago por calidad.

Tabla 6 - Estadística descriptiva para fuerza de corte tomada a las 24 horas y a los 10 días de maduración en la categoría novillos. Subgrupos separados según el tipo de alimentación usada para la terminación de engorde. Se muestra: número de animales (n), promedio, desvío estándar (DE), coeficiente de variación (CV), valores mínimos y máximos (mín., máx.), rango, prueba de Rangos Múltiples (Método: 95,0 porcentaje LSD) y p valor del análisis de varianza (ANOVA simple).

FC 24 horas	n	Promedio	DE	CV	Mín.	Máx.	Rango	Grupos homogéneos
Pasto natural	183	3,29	1,47	44,84%	1,05	9,21	8,16	X
<i>Feedlot</i>	51	3,18	0,62	19,46%	2,02	4,59	2,57	X
<i>p valor 0,6086</i>								
FC 10 días								
Pasto natural	97	2,74	1,07	39,04%	0,82	5,61	4,79	
<i>Feedlot</i>	0	0	0	0	0	0	0	

En esta tabla se describe la comparación de los resultados obtenidos entre novillos terminados a pasto vs. *feedlot*; se registró una FC de $3,29 \pm 1,47$ kg y $3,18 \pm 0,62$ kg respectivamente ($p = 0,61$) a las 24 horas. No se pudo evaluar la FC a los 10 días en novillos de *feedlot* por no contar con suficiente cantidad de carne como fue mencionado anteriormente. No se encontraron diferencias significativas en la FC para los novillos terminados a *feedlot* en relación a los terminados en régimen pastoril a las 24hrs de la faena. Estos resultados coinciden con los encontrados por Luzardo y colaboradores (2010) en un estudio realizado en nuestro país con novillos alimentados en distintos sistemas (pastoril vs. pastoril + suplementación y pastoril vs. confinamiento), donde los autores no encontraron diferencias significativas para terneza entre novillos alimentados en los distintos regímenes. En otro estudio realizado en nuestro país por Brito (2010) en novillos raza Hereford con dos sistemas de alimentación distintos (pastura vs. encierre a corral), se encontró que los valores iniciales de terneza en los dos sistemas de alimentación no tuvieron diferencias significativas, sin embargo, a los 7 y 14 días se encontró que los animales alimentados a pastura presentaron mayor terneza (menor fuerza de corte) que los alimentados en encierros a corral. Si en el presente estudio hubiese sido posible obtener datos de FC a los 10 días de maduración en novillos alimentados en *feedlot*, tal vez se podrían haber detectado mas diferencias.

En la prueba estadística de rangos múltiples se observó que los dos grupos son homogéneos, no presentando diferencias significativas entre sí. Esta prueba refuerza lo discutido previamente sobre que no se encontraron diferencias significativas de fuerza de corte a las 24 hs para los dos sistemas de terminación.

5.1.2. Marmolado

En las tablas 7 a 9 se muestran los análisis estadísticos del parámetro % de lípidos. En la tabla 7 se presenta un resumen de estadística descriptiva donde se incluye la población total. En la tabla 8 se divide la muestra por categorías (vacas, vaquillonas y novillos) y se toman únicamente los animales alimentados a pasto natural para comparar las distintas categorías; además, se presentan los resultados de la Prueba de Rangos Múltiples mediante la visualización de grupos homogéneos. En la tabla 9 se describen los datos obtenidos de los novillos divididos en dos subgrupos según el tipo de alimentación y la Prueba de Rangos Múltiples. La figura 3 corresponde a un gráfico de cajas y bigotes donde se muestra el % de lípidos en novillos según el sistema de alimentación al que fueron sometidos.

Tabla 7 - Estadística descriptiva del parámetro: Porcentaje de lípidos (% de lípidos). Se muestra: número de animales (n), promedio, desvío estándar (DE), coeficiente de variación (CV), valores mínimos y máximos (mín., máx.), rango.

	n	Promedio	DE	CV	Mín.	Máx.	Rango
% de lípidos	492	4,13	2,55	61,61%	1,05	13,60	12,54

Con respecto al % de lípidos en la población total, puede observarse que existe un rango muy amplio, habiendo animales con apenas 1% de grasa intramuscular y otros con más de 10%. El promedio es un dato que no demuestra con claridad el comportamiento de este parámetro ya que su expresión se ve muy influenciada con factores como el sexo, la categoría y el tipo de alimentación. Es por ello que se separó la muestra en subgrupos por categorías para apreciar si existió o no variación entre las mismas.

Tabla 8 – Estadística descriptiva para % de lípidos en subgrupos separados según la categoría (solo se incluyen animales alimentados a pasto natural). Se muestra: número de animales (n), promedio, desvío estándar (DE), coeficiente de variación (CV), valores mínimos y máximos (mín., máx.), rango, prueba de Rangos Múltiples (Método: 95,0 porcentaje LSD) y p valor del análisis de varianza (ANOVA simple).

Categorías	n	Promedio	DE	CV	Mín.	Máx.	Rango	Grupos homogéneos
Vacas	143	3,43	1,54	45,13%	1,27	8,71	7,44	X
Vaquillonas	36	3,23	1,11	34,50%	1,60	6,15	4,55	X
Novillos	174	3,29	2,14	66,40%	1,05	10,4	9,30	X

p valor 0,6184

Del análisis de las distintas categorías surge que no existen diferencias significativas entre las mismas cuando se incluyen sólo animales alimentados en régimen pastoril ($p=0,6184$) (tabla 8). La prueba de rangos múltiples dejó en evidencia que los grupos son homogéneos para esta característica, no presentaron diferencias significativas entre sí. Venkata Reddy y colaboradores (2015) sostienen que existen diferencias entre las distintas categorías en los parámetros de calidad de carne, y sostienen que el sexo es uno de los factores que más influye a la hora de la deposición de grasa intramuscular. Sin embargo, estos autores sostienen que al igual que el sexo, el tipo de alimentación también es una de las causas que más influye para esta característica, dado que las tres categorías tuvieron la misma alimentación es esperable que esto contribuya a la homogeneidad observada.

Otro aspecto importante es que los machos castrados (novillos en nuestro estudio) presentan un mayor nivel de engrasamiento por la ausencia de la testosterona que los machos enteros (los cuales producen carne mas magra y menos tierna, Franco, 2010), esto podría ser una de las causas por la que los resultados no variaron significativamente entre las tres categorías.

Tabla 9 - Estadística descriptiva para % de lípidos en la categoría novillos. Subgrupos separados según el tipo de alimentación usada para la terminación de engorde. Se muestra: número de animales (n), promedio, desvío estándar (DE), coeficiente de variación (CV), valores mínimos y máximos (mín., máx.), rango, prueba de Rangos Múltiples (Método: 95,0 porcentaje LSD) y p valor del análisis de varianza (ANOVA simple).

% de lípidos	n	Promedio	DE	CV	Mín.	Máx.	Rango	Grupos homogéneos
Pasto natural	179	3,49	2,62	75,24%	1,05	14,70	13,65	X
Feedlot	133	6,06	2,84	46,97%	1,14	15,40	14,28	X

p valor 0,0000

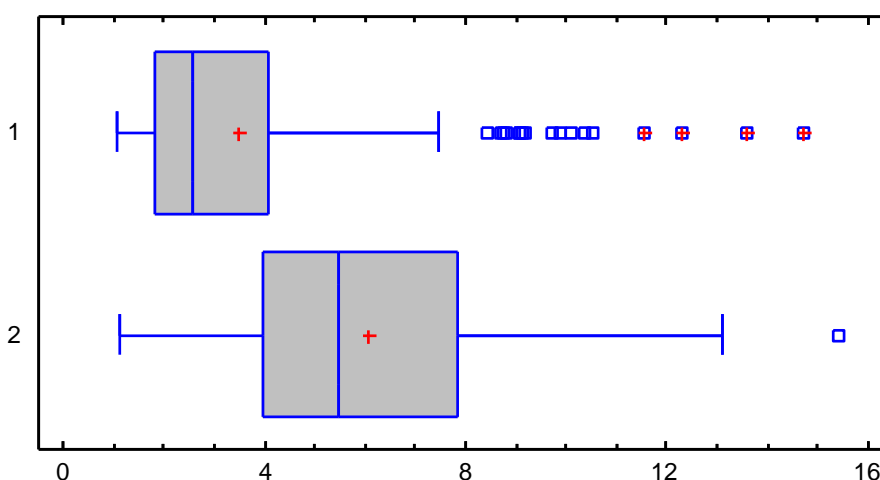


Figura 3 - Gráfico de Cajas y Bigotes, se evidencia el % de lípidos en la categoría novillos divididos en dos subgrupos: alimentación con pastura natural (1) y alimentación con feedlot (2). Mediana: línea vertical; Media: punto rojo.

Se observaron importantes diferencias en % de lípidos entre los novillos según el tipo de alimentación. En novillos alimentados a *feedlot* el promedio fue casi el doble que el detectado en novillos terminados en régimen pastoril ($6,06 \pm 2,84\%$ y $3,49 \pm 2,62\%$, respectivamente, $p=0,0000$, grupos no homogéneos en la prueba de Rangos Múltiples; Tabla 9 y figura 3). Estos resultados coinciden con varios autores que sostienen que animales alimentados en *feedlot* presentan un porcentaje de grasa intramuscular significativamente mayor que aquellos alimentados a pasto natural (Owens y Gardner 2000; Van Elswyk y Mc Neill 2014). Smith y colaboradores (2009) reportaron que existe mayor depósito de grasa intramuscular en animales alimentados con dietas a base de concentrados.

5.1.3. Relación entre parámetros

En las tablas 10 y 11 se presentan las correlaciones entre los parámetros fuerza de corte a las 24 horas y a los 10 días y % de lípidos para toda la muestra alimentada a pasto natural y para la categoría novillos respectivamente.

Tabla 10 - Relación entre FC 24hs y FC 10 días. Niveles de correlación, sus valores y su significación estadística (p valores) para toda la muestra de animales alimentados a pasto natural.

Parámetro 1	Parámetro 2	Nivel de correlación	Valor	P
FC 24 hs	FC 10 días	Positivo	0,79	0,0000
% de lípidos	FC 24 hs	Positivo	0,04	0,5685
% de lípidos	FC 10 días	Positivo	0,08	0,2417

Tabla 11 – Relación entre FC 24 hs y % de lípidos para la categoría novillos; se incluyen novillos alimentados a pasto natural y *feedlot*. Niveles de correlación, sus valores y su significación estadística (p valores).

Parámetro 1	Parámetro 2	Nivel de correlación	Valor	P
FC 24 hs	% de lípidos	Negativo	-0,17	0,0109

Cuando se estudiaron las correlaciones entre las variables, se observa una correlación significativa, muy elevada y positiva, entre las dos medidas de FC, como era esperable (tabla 10). En la muestra de animales alimentados a pasto natural, y seguramente debido al menor nivel de grasa intramuscular en estos animales, no se observan correlaciones significativas entre ambas medidas de FC y el % de lípidos (tabla 10), que sí se observan en la muestra de novillos, que incluye a los de *feedlot* (tabla 11). En esta muestra de novillos, se observa una correlación negativa significativa entre FC y % de lípidos, dada probablemente por el efecto que tiene un mayor nivel de engrasamiento en la terneza de la carne, disminuyendo la FC. Cabe mencionar que el proceso de cocción al cual es sometida la muestra previa a su corte con la cuchilla WB, hace que la grasa de la misma sea más fácil de cortar y por lo tanto disminuya más la FC.

5.2. Parámetros poblacionales

La mayoría de los SNPs fueron genotipados con una eficacia elevada por lo que el recuento de animales para cada SNP es cercano al número total de animales.

Tabla 12 - Resumen del análisis poblacional de los 10 SNPs situados en los ocho genes analizados. Se muestra el número total de animales genotipados (n), frecuencias alélicas, frecuencias genotípicas, heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada (He), estadístico Fis y p-valor de la prueba de equilibrio Hardy Weinberg.

SNP	n	Frecuencias alélicas		Frecuencias genotípicas			Ho	He	Fis	Equilibrio H-W (P-valor)
CAST1	608	C	G	CC	CG	GG	0,396	0,404	0,019	0,691
		0,720	0,280	0,521	0,396	0,082				
PPARD4	642	A	G	AA	AG	GG	0,522	0,488	-0,069	0,095
		0,421	0,579	0,160	0,522	0,318				
PPARA4	640	A	C	AA	AC	CC	0,358	0,381	0,060	0,146
		0,744	0,255	0,566	0,358	0,077				
Acyl-CoA	643	G	T	GG	GT	TT	0,498	0,486	-0,024	0,582
		0,584	0,415	0,335	0,498	0,166				
IGF1 3	640	A	G	AA	AG	GG	0,150	0,160	0,061	0,130
		0,912	0,090	0,837	0,150	0,012				
IGF2 3	644	A	G	AA	AG	GG	0,185	0,195	0,053	0,222
		0,109	0,890	0,017	0,185	0,798				
SCD3	632	A	G	AA	AG	GG	0,407	0,440	0,077	0,058
		0,327	0,673	0,123	0,407	0,470				
CAPN 316	629	C	G	CC	CG	GG	0,364	0,452	0,194	0,000
		0,344	0,656	0,162	0,364	0,474				
CAPN 4751	650	C	T	CC	CT	TT	0,440	0,420	-0,045	0,258
		0,700	0,300	0,480	0,440	0,080				
CAPN 530	643	A	G	AA	AG	GG	0,278	0,262	-0,063	0,126
		0,155	0,845	0,015	0,278	0,706				

En la tabla 12 se muestran los resultados del análisis poblacional realizado mediante el programa GENEPOP. Ningún SNP mostró una frecuencia del alelo minoritario menor a 0,05 (frecuencia mínima aceptable en este tipo de estudios),

por lo que todos pudieron ser utilizados para el análisis de asociación genotipo-fenotipo.

La heterocigosidad observada fluctúa entre 0,150 para el SNP *IGF1 3* y 0,522 para el SNP *PPARD 4*. En el caso de la heterocigosidad esperada, ésta fluctúa entre 0,160 para el SNP *IGF1 3* y 0,488 para el SNP *PPARD 4*. Los bajos valores de diversidad genética de *IGF1 3* se relacionan con la elevada disparidad entre las frecuencias de sus alelos. Los índices de diversidad genética promedio de la población (heterocigosidad observada y esperada promedio) fueron 0,360 y 0,370, respectivamente. Son valores medios, teniendo en cuenta que la muestra comprende animales de diversas procedencias, y que en las razas comerciales la diversidad genética tiende a disminuir por las presiones de selección a las cuales están sujetos los rodeos de estas características.

Se encontró que la mayor parte de los SNPs están en equilibrio Hardy Weinberg en la población, lo que se ve reflejado en el p-valor con valores superiores a 0,05 e índices FIS cercanos a cero. La excepción es *CAPN 1 316* que se encuentra fuera de equilibrio (p valor < 0,05 marcado en color rojo). En este SNP el desequilibrio es provocado mayormente por un exceso de homocigotas (FIS positivo y elevado). El desequilibrio hallado puede ser por efectos indirectos de la selección a favor de alguna característica usualmente evaluada en la selección de reproductores, por ejemplo peso corporal (asociada a polimorfismos del gen de la calpaína en ovinos, Chung *et al.*, 2007), y que pueda generar un aumento de cierto genotipo en detrimento de otro. Se trata de efectos indirectos dado que en nuestro país aún no es utilizada la selección asistida por marcadores. También podría explicarse por el uso de pocos toros o de inseminación artificial, métodos utilizados para aumentar la población en rodeos comerciales que favorecen la endogamia y generan aumento de la homocigosis.

Para el gen *CAPN1*, en el SNP 316 se observó una frecuencia del alelo favorable para terneza (C) de 0,344; este resultado coincide con los encontrados por varios autores que documentan una frecuencia menor del alelo favorable, de 0,22 (White *et al.*, 2005, en Aberdeen Angus) y de 0,27 según Costello y colaboradores (2007, en una raza de carne Irlandesa). La frecuencia del genotipo favorable CC (0,162) y del menos favorable GG (0,474) coinciden con los hallados por Leveau (2008) en Aberdeen Angus: genotipo CC (0,09) y genotipo GG (0,48). Para el SNP 530 la frecuencia del alelo favorable G fue alta (0,845), resultado similar al hallado por White y colaboradores (2005) quienes reportan una frecuencia de 0,86. En el caso del SNP 4751 el alelo favorable C presentó una frecuencia elevada (0,700); resultados similares fueron hallados por otros autores, Leveau (2008) reportó una frecuencia de 0,88 White y colaboradores (2005) también hallaron una frecuencia del alelo C de 0,84 en la raza Aberdeen Angus y de 0,64 para una raza cruce. A su vez, dejan en evidencia que el alelo T se relaciona con una mayor fuerza de corte, por lo tanto con una menor terneza.

Para el SNP *CAST1*, la población analizada reveló una frecuencia más elevada del alelo C (0,720) y del genotipo CC (0,521), asociados a una mayor terneza de la carne, que los resultados encontrados por Schenkel y colaboradores (2006; frecuencia alélica para el alelo C en la raza Aberdeen Angus de 0,62). En esta misma raza, Gill y colaboradores (2009) encontraron para este mismo SNP una frecuencia del alelo favorable de 0,64 y una frecuencia del genotipo favorable de 0,41.

Para los otros SNPs estudiados, no se cuenta con datos bibliográficos de frecuencias alélicas en bovinos de carne.

5.3. Análisis de asociación genotipo-fenotipo

En la tabla 13, 14 y 15 se muestran los resultados del análisis de asociación, listándose los SNPs que se encontraron significativamente relacionados con un parámetro fenotípico y los que se encontraron cercanos a la significación.

Tabla 13 - Resultados del análisis de asociación para los distintos SNPs en toda la población. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto (medido en las unidades de la característica fenotípica). DE: desvío estándar de la regresión. p-valor: valor de p de la regresión; p-valor umbral: p valor umbral de la regresión, y sus respectivos valores expresados en escala logarítmica.

Toda la muestra	Parámetro	SNP	Genotipo	Efecto	DE	p-valor	p-valor umbral	$-\log_{10}$ p-valor	$-\log_{10}$ p-valor umbral
SNPs cercanos a significación	FC 24 hs	CAPN1 316	CC	-0,332	0,113	0,003	0,001	2,454	3,38
	FC 10 días	CAPN1 316	CC	-0,341	0,108	0,002	0,000	2,746	3,88
		CAPN1 530	GG	-0,547	0,187	0,004	0,000	2,433	3,88
	% lípidos	PPARD 4	GG	-0,342	0,133	0,103	0,007	1,989	2,18
		PPARA 4	CC	0,368	0,144	0,111	0,007	1,955	2,18

En el análisis de la población total, ninguno de los SNPs seleccionados presentó asociación significativa con las características estudiadas. Sí se encontraron SNPs cercanos a la significación, tales como *CAPN1 316* para FC a las 24 hs y 10 días, y *CAPN1 530* para FC a los 10 días. En el caso de % de lípidos, se observaron cercanos a la significación los SNPs *PPARD 4* y *PPARA 4*. Se prestó importancia a los SNPs cercanos a la significación debido a que nuestro análisis es muy estricto para evitar falsos positivos, por lo que algunas asociaciones pudieron quedar como no significativas pero muy cercanas al umbral de significación. En otro tipo de análisis estadístico menos restrictivo podrían ser asociaciones significativas.

Tabla 14 - Resultados del análisis de asociación para los distintos SNPs en la categoría hembras. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto (medido en las unidades de la característica fenotípica). DE: desvío estándar de la regresión. p valor: valor de p de la regresión. p valor umbral: p valor umbral de la regresión.

Categoría hembras	Parámetro	SNP	Genotipo	Efecto	DE	p valor	p valor umbral	-log ₁₀	-log ₁₀ p-valor umbral
SNPs significativos	FC 24 hs	IGF1 3	GG	-1,097	0,383	0,005	0,016	2,329	1,81
	FC 10 días	IGF2 3	AA	-0,711	0,228	0,002	0,012	2,653	1,92
	% Lípidos	SCD 3	GG	0,556	0,556	0,001	0,004	2,843	2,42
SNPs cercanos a significación	FC 24 hs	CAPN1 4751	CC	-0,563	0,241	0,020	0,016	1,691	1,81
		IGF2 3	AA	-0,681	0,314	0,031	0,016	1,502	1,81
		CAPN1 316	CC	-0,392	0,191	0,042	0,016	1,381	1,81
	FC 10 días	CAPN1 316	CC	-0,336	0,140	0,018	0,012	1,753	1,92
	% Lípidos	Acyl-CoA	TT	0,431	0,162	0,008	0,004	2,083	2,42

Tabla 15 - Resultados del análisis de asociación para los distintos SNPs en la categoría novillos. El efecto es el del genotipo mencionado, con respecto al genotipo opuesto. DE: desvío estándar de la regresión. Pvalor: valor de p de la regresión. Pvalor umbral: P valor umbral de la regresión

Categoría novillos	Parámetro	SNP	Genotipo	Efecto	DE	pvalor	pvalor umbral	-log ₁₀	-log ₁₀ p-valor umbral
SNPs significativos	% Lípidos	PPARD 4	GG	-0,561	0,181	0,002	0,019	2,661	1,73
SNPs cercanos a significación	FC 10 días	CAPN1 316	CC	-0,279	0,132	0,036	0,003	1,446	2,51
	% Lípidos	PPARA 4	CC	0,427	0,206	0,039	0,019	1,407	1,73

Al separar la muestra en subgrupos se evitan algunos efectos fijos que pueden distorsionar el análisis, apareciendo más efectos significativos de los SNPs. Cuando se analizaron las hembras solamente, no se tomó en cuenta en el análisis el factor alimentación ni el factor sexo (tabla 14). En este caso fueron significativos para FC a las 24 hs y a los 10 días los SNPs *IGF1 3* e *IGF2 3* respectivamente, y para % de lípidos fue significativo el SNP *SCD 3*. También se observaron los SNPs *CAPN1 4751*, *IGF2 3* y *CAPN1 316* cercanos a la significación para FC 24 horas, y *CAPN1 316* para FC 10 días. Para la característica % de lípidos el SNP *Acyl-CoA* también se encontró cercano al umbral de significación (tabla 14).

En el caso del análisis de la categoría novillos separados del resto de la población, se evitó la introducción de los factores sexo y edad en el modelo (tabla 15) y se detectó al SNP *PPARD 4* asociado significativamente para % de lípidos. Los SNPs *CAPN1 316* y *PPARA4* se hallaron cercanos a la significación para FC 10 días y % lípidos, respectivamente.

5.3.1. Resultados significativos y cercanos a la significación por gen

De los ocho genes que se estudiaron en este trabajo, solo en el gen *CAST* no se encontró ninguna asociación con los parámetros fenotípicos estudiados. Para los otros siete genes se encontró al menos una asociación, significativa o cercana a la significación, entre un SNP y un carácter fenotípico.

Gen *IGF1*

El SNP *IGF1* 3 situado en el gen que codifica el factor de crecimiento insulínico tipo 1 presentó un efecto significativo sobre la característica FC a las 24 hs en la categoría hembras (tabla 14). Los animales de genotipo GG presentaron una menor fuerza de corte que los de genotipo AA, es decir, una mayor terneza, resultando el alelo G y el genotipo GG favorables para este carácter. Este gen ha sido descrito por otros autores asociado a características de calidad de la canal tales como grado de engrasamiento, peso y espesor de grasa dorsal (Islam *et al.*, 2009; Muellen *et al.*, 2011). Tizioto y colaboradores (2012) analizaron un polimorfismo en el gen *IGF1* y su relación con los parámetros peso al destete, peso al año de edad, espesor de grasa dorsal, área del ojo de bife y fuerza de corte a las 24 horas, 7 y 14 días de maduración en novillos raza Nelore. Si bien estos autores no encontraron relación significativa entre el polimorfismo en el gen y la fuerza de corte en ninguno de los distintos tiempos de maduración, la relación comprobada de este gen con el metabolismo lipídico y el crecimiento podría estar relacionada con la fuerza de corte. Por un lado, un mayor nivel de grasa intramuscular se asocia con un aumento de la terneza de la carne (Leveau, 2008); por otro lado, el efecto de éste y otros genes en el desarrollo muscular y el crecimiento, como se ha mencionado, también podrían afectar la terneza.

Gen *IGF2*

El SNP *IGF2* 3 situado en el gen del factor de crecimiento insulínico tipo 2 presentó un efecto significativo sobre la FC a los 10 días y cercano a la significación para FC 24 horas, cuando se analizó en la población de hembras. El genotipo AA presentó menor fuerza de corte que el genotipo GG (tabla 14). En relación a este gen, Han y colaboradores (2008) encontraron relaciones significativas de este gen con las características de calidad como ser marmolado, terneza y pH a las 24 hs en ganado de 24 meses de edad a la faena. Este gen también ha sido asociado a un mayor desempeño de crecimiento muscular, calidad de carne y deposición de grasa en cerdos (Clark *et al.*, 2014).

Gen *CAPN1*

El gen *CAPN1* se ha hallado asociado significativamente a la terneza de la carne en numerosos estudios, dado que codifica para la u-calpaína, proteasa activada por el calcio intracelular que junto a otras enzimas es responsable del proceso de proteólisis de las miofibrillas que ocurre durante la maduración de la carne, aumentando su terneza (White *et al.*, 2005; Costello *et al.*, 2007; Van Eenennaam *et al.*, 2007; Gill *et al.*, 2009). Estos resultados coinciden parcialmente con nuestro trabajo dado que el gen *CAPN1* fue encontrado cercano a la significación para la fuerza de corte a las 24 hs y 10 días respectivamente.

Para el SNP *CAPN1* 316 los animales con genotipo CC presentarían carne más tierna a las 24 hs y a los 10 días de maduración en toda la población y en la

categoría hembras y novillos; esto es coincidente con los resultados encontrados por otros autores donde también encuentran asociación entre el genotipo CC y una menor fuerza de corte (mayor terneza) al contrario que individuos con genotipo CG y GG donde la fuerza de corte es significativamente mayor (Page *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005; Morris *et al.*; 2006).

El otro SNP dentro de este gen que también ha sido descrito asociado a la terneza por Page y colaboradores (2004) es *CAPN1 530*, el cual se encontró cercano a la significación para FC a los 10 días en toda la población. Animales con genotipo GG tendrían una menor fuerza de corte y por lo tanto una mayor terneza. El último SNP situado en el mismo gen, *CAPN1 4751*, se encontró cercano a la significación para FC 24 hs en la categoría de hembras, en la cual los individuos con genotipo CC presentaron carne más tierna que los del genotipo opuesto. White y colaboradores (2005) y Van Eenennaam y colaboradores (2007) encontraron este SNP relacionado con fuerza de corte en varios momentos de la maduración, al día 7, 14 y al día 21, y definen a este SNP como un marcador muy útil.

El hecho de encontrar varios SNPs dentro de un mismo gen cercanos a la significación para la asociación con un mismo carácter resulta interesante. Como se dijo anteriormente, es un gen que juega un rol fundamental en la fase de tiernización de la carne y que es utilizado como marcador en varios países para predecir la terneza. Si bien nuestros resultados no fueron significativos, quizá con una muestra mayor o más homogénea se podría haber arribado a una mejor conclusión. Además, el análisis estadístico llevado a cabo, al ser muy riguroso en el afán por evitar falsos positivos, puede estar enmascarando resultados significativos.

Gen *PPARD*

Este gen codifica para un receptor nuclear activado por factores proliferadores de peroxisomas, denominado *PPAR δ* . Es un regulador clave en el metabolismo de los lípidos y fue descrito por Meidtner y colaboradores (2009) como un gen candidato para porcentaje de grasa dorsal en porcinos. Según Graugnard y colaboradores (2009), este gen participa específicamente en la beta oxidación de los ácidos grasos participando así activamente en el metabolismo de los lípidos. En nuestro trabajo este fue el único gen asociado significativamente con % de lípidos, sólo en la categoría novillos, y cercano a la significación en la muestra total. Para el SNP *PPARD 4* estudiado en este gen, los novillos con genotipo GG poseen un 0,6 % menos de lípidos que los animales con el genotipo opuesto. Si bien el efecto es menor, como suele ocurrir en caracteres altamente poligénicos como éste, fue significativo en la muestra de novillos, en donde existió una mayor variabilidad de este carácter al incluir animales engordados en forma diferente.

Gen *PPARA*

El gen *PPARA* codifica para un receptor nuclear activado por factores proliferadores de peroxisomas, denominado *PPAR α* , relacionado con *PPAR δ* y otros genes similares. Una de sus funciones más importantes es la regulación de la homeostasis de lípidos y glucosa, controlando la síntesis, almacenamiento y consumo de lípidos. Presenta una alta expresión en diferentes tejidos, mayoritariamente en hígado, riñón y tejido adiposo intramuscular, pero también en tejido muscular y glándula mamaria (Bionaz *et al.*, 2013). En nuestro trabajo no se encontró ninguna asociación significativa entre SNPs en este gen y los caracteres

fenotípicos analizados, pero el SNP *PPARA 4* se encontró cercano a la significación para % de lípidos. El genotipo CC de dicho SNP se relaciona con un mayor porcentaje de grasa intramuscular. Esta asociación se podría esperar dado que otros autores han encontrado este gen relacionado a parámetros de calidad de carne como son espesor de grasa dorsal y jugosidad en bovinos, parámetros que se encuentran relacionados con porcentaje de grasa intramuscular (Gill *et al.*, 2010).

Szczerbal y colaboradores (2007) describen este gen cerca de un QTL (locus de carácter cuantitativo) asociado a grasa dorsal en cerdos, por lo que es de esperar que pueda estar asociado a dicho carácter en otras especies. Además las funciones biológicas del grupo de receptores nucleares activados por factores proliferadores de peroxisomas y sus distintos isotipos, han sido descritas en monogástricos y humanos demostrando su gran importancia en el metabolismo lipídico (Bionaz *et al.*, 2013).

Gen *SCD*

El gen *SCD* es el que codifica para la enzima esteroil-CoA-desaturasa (*SCD*) la cual se encuentra en el retículo endoplásmico y convierte ácidos grasos saturados en monoinsaturados (*MUFA*) mediante la introducción de un doble enlace entre los carbonos 9 y 10. Cataliza la síntesis de ácido oleico afectando la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana y los ésteres y triglicéridos de colesterol (Armstrong, 2011; Orrú *et al.*, 2011).

Varios estudios demuestran que el gen *SCD* se encuentra asociado al perfil de ácidos grasos, al porcentaje de grasa intramuscular y al metabolismo energético (Taniguchi *et al.*, 2004; Graugnard *et al.*, 2009; Jian *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009). Además, se lo ha encontrado asociado con otro parámetro de interés en calidad de carne como lo es el color: se vio que un aumento de grasa intramuscular o en los *MUFA* perfila el color hacia un tono más claro o luminoso (Reardon *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se encontró una relación significativa entre % de lípidos y el SNP *SCD 3* en la categoría hembras únicamente. Es posible que esta relación significativa en este subgrupo de la muestra se deba a que las hembras fueron sometidas al mismo tipo de alimentación, a diferencia de los novillos donde existieron dos tipos de alimentación. Dado que la composición de ácidos grasos es afectada por el tipo de alimentación, es esperable que el grado de expresión de este gen varíe con estos factores (Taniguchi *et al.*, 2004; Graugnard *et al.*, 2009). Al igual que los otros casos, este gen deja en evidencia la importancia de su estudio en las poblaciones locales, previo a su posible utilización para selección de reproductores.

Gen *Acyl-CoA desaturasa*

El gen *Acyl-CoA desaturasa* se ha descrito asociado a la regulación del gen *SCD* ya que se ubica en la región promotora de este último. Polimorfismos en esta región provocarían variaciones en la concentración de ácidos grasos de importancia como son el Ácido Linoléico Conjugado (*CLA*), asociado a beneficios para la salud humana por su acción anti cancerígena y anti mutagénica (Keating *et al.*, 2005).

En nuestro trabajo se encontró una relación cercana a la significación para este SNP y el % de lípidos en la categoría hembras únicamente, al igual que el polimorfismo estudiado del gen *SCD*. Dada su estrecha relación, este hallazgo

reafirma la importancia de estos genes en el % de lípidos y ameritan estudios futuros más profundos.

Cabe mencionar que es un gen que aún no ha sido muy estudiado a nivel internacional y que presenta muy poca bibliografía de referencia. Además, como se ha mencionado, la arquitectura genética del metabolismo de lípidos y su regulación aún continúa siendo motivo de estudio por su intrincada complejidad.

Gen *CAST*

El gen *CAST* codifica para la enzima calpastatina; es un gen que se asocia con la terneza de la carne. La calpastatina es un inhibidor específico de las calpaínas, quienes producen la ternización normal en condiciones *post-mortem*, regulando este proceso (Reardon *et al.*, 2010). El aumento de su actividad está asociado a una disminución de terneza (Schenkel *et al.*, 2006).

A pesar de la existencia de bibliografía a nivel internacional sobre la asociación de este gen con la terneza de la carne (Casas *et al.*, 2006; Schenkel *et al.*, 2006), en el presente trabajo no se encontraron resultados que asocien el SNP *CAST1* con el fenotipo fuerza de corte en ninguna de las dos medidas tomadas. Tampoco se vio asociación de este gen con el % de lípidos. Jian y colaboradores (2009) coinciden con estos resultados ya que tampoco encontraron asociación significativa de este gen con terneza, medida a través de la fuerza de corte de la cizalla Warner-Bratzler y panel de degustadores. Reardon y colaboradores (2010) estudiaron el mismo polimorfismo que se estudió en este trabajo y tampoco encontraron relación entre este SNP y la terneza de la carne. A su vez se ha planteado que existe una gran variación entre razas que incide en el nivel de asociación entre el gen *CAST* y la terneza (Leveau, 2008).

Las causas por las cuales no se encontraron asociaciones significativas entre algunos de los SNPs y las características fenotípicas pueden ser debido a que los SNPs seleccionados no generan ningún cambio en la estructura o función de la proteína o que el cambio que generan sea tan pequeño que no sea detectado. A su vez, no debemos olvidar que hablamos de características fenotípicas que son de tipo poligénicas, asociadas a muchos genes que no fueron tenidos en cuenta en este estudio y que desconocemos su influencia. Esto refleja la complejidad que tienen las características relacionadas a calidad de carne.

Existe hoy en día la posibilidad para los productores de acceder a la compra de un panel de SNPs llamado *GeneSTAR® Molecular Value Predictions (MVP®s)*, el cual contiene marcadores moleculares relacionados entre otras características a terneza y marmolado de la carne. Este producto ofrece la posibilidad de predecir el fenotipo esperado para estas características de interés. Johnston y Graser (2010) estudiaron 12 marcadores moleculares contenidos en los paneles *GeneSTAR* y no encontraron ninguna asociación significativa con el marmolado. En el caso de terneza encontraron algunos marcadores asociados significativamente con la característica fuerza de corte pero vieron una gran variación entre razas demostrando que existen grandes diferencias entre las mismas y que los marcadores moleculares deben ser testeados en distintas poblaciones y en tamaños lo suficientemente grandes como para estimar el efecto real de los mismos. En ese sentido, nuestro estudio pone en evidencia la importancia de la validación previa, en las condiciones de nuestro país, de los genes propuestos como candidatos en la bibliografía internacional antes de que sean utilizados como herramientas de selección. Sobre este punto vale la pena aclarar que la bibliografía científica a la cual accedemos se origina en sistemas

ganaderos muy distintos a los de Uruguay, con mayor confinamiento y con diferentes objetivos de selección.

Los resultados obtenidos nos alientan a seguir estudiando el efecto de ciertos genes en las razas más extendidas de nuestro país para generar información confiable para nuestro sistema ganadero. El uso de marcadores moleculares en la industria podría ayudar a predecir *ante mortem* cómo se comportará el individuo para cierta característica, logrando “estandarizar” los genotipos que entren a planta de faena y poder ofrecer a los distintos mercados carne certificada para determinado genotipo de interés. Esto sería un avance muy importante en una estrategia de diferenciación de las carnes uruguayas.

6. CONCLUSIONES

- El promedio de fuerza de corte a los 10 días post faena fue más bajo que a las 24 hs, debido al mayor grado de proteólisis de las fibras musculares que ocurre en los primeros 10 días de maduración.
- La terneza estuvo influenciada por la categoría animal: las vacas presentaron menor terneza que vaquillonas y novillos en los dos tiempos de maduración.
- No se encontraron diferencias en la terneza medida a las 24 horas, en novillos alimentados en diferentes sistemas (pastoril vs *feedlot*).
- No se observaron diferencias en el % de lípidos de la carne en las 3 categorías animales. Sí se vieron diferencias importantes en novillos terminados en *feedlot* con respecto a los alimentados a pasto.
- De los SNPs estudiados en la población casi todos se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg; la excepción fue el SNP *CAPN1 316* que se encontró fuera del equilibrio debido a un exceso de homocigotas.
- Los índices de diversidad genética (Ho/He) fueron medios a bajos por tratarse de una raza comercial fuertemente seleccionada.
- En la categoría hembras (vacas+vaquillonas) se detectaron asociaciones significativas entre la terneza a las 24 hs y 10 días y los SNPs *IGF1 3* e *IGF2 3* respectivamente y entre el % lípidos y el SNP *SCD 3*.
- En la categoría novillos se detectó la asociación significativa entre %lípidos y el SNP *PPARD4*.
- Del análisis de la población total y ambas categorías (hembras y novillos) surgieron SNPs cercanos a la significación tales como *CAPN1 316 - 530-4751* e *IGF2 3* asociados terneza y los SNPs *Acyl-CoA desaturasa*, *PPARD 4* y *PPARA4* asociados a % de lípidos.
- Se subraya la importancia de la validación previa de marcadores moleculares utilizados comercialmente para predecir características de calidad de carne en nuestras poblaciones ganaderas.

7. ANEXO

7.1. Protocolo de extracción de ADN

Soluciones necesarias: Buffer de lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA ph 8, 1% de SDS y 50 mM de NaCl), Proteinasa K (10 mg/ml), NaCl (5 M), TE 1X ph.8 (autoclavado) y etanol absoluto a -20 °C.

1. Colocar una pequeña muestra de tejido (unos 20 mg) en un Eppendorf de 1.5 y machacar el tejido con tip quemado en la punta.
2. Agregar 500 ul de buffer de lisis y 11 ul de proteinasa K.
3. Incubar a 55°C toda la noche.
4. Centrifugar al máximo por 20 min.
5. Pipetear sobrenadante a un tubo limpio de 1,5 ml y agregar 300 ul de cloruro de sodio.
6. Agitar brevemente y centrifugar al máximo por 40 min.
7. Pipetear 400 ul del sobrenadante a un tubo limpio. (2 por muestra)
8. Agregar el doble volumen de etanol frio (800 ul).
9. Agitar lentamente primero, luego mezclar completamente.
10. Centrifugar al máximo por 40 min. Descartar todo el líquido sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet.
11. Lavar breve y cuidadosamente con 1 ml de etanol 70% y centrifugar 40 min.
12. Descartar el alcohol. Secar en estufa a 37°C.
13. Resuspender en 50 ul 1xTE y guardar en frio.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Armstrong E. (2011) Detección y análisis de genes asociados a la calidad de carne en bovinos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España. 183 p.
- 2) Barendse W, Harrison BE, Bunch RJ, Thomas MB (2008) Variation at the Calpain 3 gene is associated with meat tenderness in zebu and composite breeds of cattle. *BMC Genetics* 9: 41.
- 3) Bernard C, Cassar-Malek I, Le Cunff M, Dubroeuq H, Renand G, Hocquette JF (2007) New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J Agric Food Chem* 55 (13): 5229-5237.
- 4) Bionaz M, Chen S, Khan MJ, Looor JJ (2013) Functional Role of PPARs in Ruminants: Potential Targets for Fine-Tuning Metabolism during Growth and Lactation. *PPAR Res* 2013: 1–28.
- 5) Boleman SJ, Boleman SL, Miller RK, Taylor JF, Cross HR, Wheeler TL, Koochmaraie M, Shackelford SD, Miller MF, West RL, Johnson DD, Savell JW (1997) Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. *J Anim Sci* 75(6):1524.
- 6) Brito G. (2010) La terneza de la carne: ¿Importa comercialmente? *Revista INIA* N°23: 8-11.
- 7) Carne Aberdeen Angus del Uruguay (2015) Disponible en: <http://www.carneangus.com.uy/>. Fecha de consulta: 14/08/2015.
- 8) Carriquiry E. (2013) Angus confirma sus bondades para la Cuota 481. *Anuario Angus*. pp. 118-119.
- 9) Casas E, White SN, Wheeler TL, Shackelford SD, Koochmaraie M, Riley DG, Chase CC, Johnson Jr. DD, Smith TPL (2006) Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J Anim Sci* 84:520-525.
- 10) Chung H, Choi B, Jang G, Lee K, Kim H, Yoon S, Im S, Davis M, Hines H (2007) Effect of variants in the ovine skeletal-muscle-specific calpain gene on body weight. *J Appl Genet*. 48(1):61-8.
- 11) Clark DL, Bohrer BM, Tavárez MA, Boler DD, Beever JE, Dilger AC (2014) Effects of the porcine IGF2 intron 3-G3072A mutation on carcass cutability, meat quality, and bacon processing. *J Anim Sci* 92(12):5778-88.
- 12) Costello S, O'Doherty E, Troy DJ, Ernst CW, Kim KS, Stapleton P, Sweeney T, Mullen AM (2007) Association of polymorphisms in the calpain I, calpain II and growth hormone genes with tenderness in bovine *M. longissimus dorsi*. *Meat Sci* 75: 551–557.
- 13) Davis GP, Moore SS, Drinkwater RD, Shorthose WR, Loxton ID, Barendse W, Hetzel DJS (2007) QTL for meat tenderness in the *M. longissimus lumborum* of cattle. *Anim Genet* 39: 40–45.

- 14) Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Decreto N° 178/010 de 17/06/2010. Disponible en: www.impo.com.uy/bases/decretos/178-2010. Fecha de consulta: 05/08/2015.
- 15) Dekkers JCM (2004). Commercial application of marker and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J Anim Sci* 82: 313-328.
- 16) Feed O. (2010) Metodología para la evaluación de las características cualitativas de la canal y de la carne. En: Bianchi, G., Feed, O. (Eds.). *Introducción a la Ciencia de la Carne*. Montevideo, Hemisferio Sur, pp. 181-214.
- 17) Folch J, Lee M, Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1): 497-509.
- 18) Franco J. (2010) Importancia de los factores productivos, tecnológicos y de manejo en la calidad de la canal y la carne vacuna. En: Bianchi, G., Feed, O. (Eds.). *Introducción a la Ciencia de la Carne*. Montevideo, Hemisferio Sur, pp. 303-352.
- 19) Garrick DJ, Golden BL (2009) Producing and using genetic evaluations in the United States beef industry of today. *J Anim Sci* 87:E11-E18.
- 20) Ge W, Davis ME, Hines HC, Irvin KM, Simmen RC (2001) Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *J Anim Sci* 79:1757-1762.
- 21) Gill JL, Bishop SC, McCorquodale C, Williams JL, Wiener P (2010) Associations between single nucleotide polymorphisms in multiple candidate genes and carcass and meat quality traits in a commercial Angus-cross population. *Meat Sci* 86: 985–993.
- 22) Gill JL, Bishop SC, McCorquodale C, Williams JL, Wiener P (2009) Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. *Genet Sel Evol* 41: 36.
- 23) Graugnard DE, Piantoni P, Bionaz M, Berger LL, Faulkner DB, Looor JJ (2009) Adipogenic and energy metabolism gene networks in longissimus lumborum during rapid post-weaning growth in Angus and Angus x Simmental cattle fed high-starch or low-starch diets. *BMC Genomics* 10: 142.
- 24) Grompone, MA. (2010) Composición química de los tejidos: Lípidos. En: Bianchi, G., Feed, O. (Eds.). *Introducción a la Ciencia de la Carne*. Montevideo, Hemisferio Sur, pp.75-113.
- 25) Gutiérrez-Gil B, Wiener P, Nute GR, Burton D, Gill JL, Wood JD, Williams JL (2008) Detection of quantitative trait loci for meat quality traits in cattle. *Anim Genet* 39(1):51-61.
- 26) Han RH, Zan LS, Yang DP, Hao RC (2008) SNPs detection of IGF2 gene and its relationship with carcass and meat quality traits in Qinchuan cattle. *Yi Chuan* 30(12):1579-84.
- 27) Instituto Nacional de Carnes, 2014. Anuario estadístico 2014. Disponible en: <http://www.inac.gub.uy/>. Fecha de consulta: 30/07/2015.

- 28) Islam KK, Vinsky M, Crews RE, Okine E, Moore SS, Crews DH 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(5):766-9.
- 29) Jiang Z, Michal JJ, Chen J, Daniels TF, Kunej T, Garcia MD, Gaskins CT, Busboom JR, Alexander LJ, Wright RW, Macneil MD (2009) Discovery of novel genetic networks associated with 19 economically important traits in beef cattle. *Int J Biol Sci* 5: 528–42.
- 30) Johnston DJ, Graser HU (2010) Estimated gene frequencies of GeneSTAR markers and their size of effects on meat tenderness, marbling, and feed efficiency in temperate and tropical beef cattle breeds across a range of production systems. *J Anim Sci* 88:1917-1935.
- 31) Keating AF, Stanton C, Murphy JJ, Smith TJ, Ross RP, Cairns MT (2005) Isolation and characterization of the bovine Stearoyl-CoA desaturase promoter and analysis of polymorphisms in the promoter region in dairy cows. *Mamm Genome* 16: 184–193.
- 32) Keating AF, Kennelly JJ, Zhao FQ (2006) Characterization and regulation of the bovine stearoyl-CoA desaturase gene promoter. *Biochem and Biophys Res Comm* 344: 233–240.
- 33) Leal J. (2013) Marcadores moleculares asociados a la Capacidad de Retención de Agua (CRA) en carne de *Bos indicus* y sus cruces. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. 140 p.
- 34) Lee SH, Cho YM, Lee SH, Kim BS, Kim NK, Choy YH, Kim KH, Yoon D, Im SK, Oh SJ, Park EW (2008) Identification of marbling-related candidate genes in *M. longissimus dorsi* of high- and low marbled Hanwoo (Korean Native Cattle) steers. *BMB Rep* 41(12): 846-851.
- 35) Leveau C. (2008) Candidate genes for beef quality –allele frequencies in Swedish beef cattle. Tesis de Maestría. Swedish University of Agricultural Sciences, Upsala, Suecia.
- 36) Luzardo S, Montossi F, Brito G, San Julián R, Silveira C (2010) ¿Podemos incidir en la calidad de la carne vacuna y ovina a través de diferentes estrategias de alimentación? *Revista INIA* N°23 pp.16-19.
- 37) Meidtner K, Schwarzenbacher H, Scharfe M, Severitt S, Blöcker H, Fries R (2009) Haplotypes of the porcine peroxisome proliferator-activated receptor delta gene are associated with backfat thickness. *BMC Genet* 10:76.
- 38) Miller MF, Carr MA, Ramsey CB, Crockett KL, Hoover LC (2001) Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. *J Anim Sci* 79 (12):3062-8.
- 39) Morris CA, Cullen NG, Hickey SM, Dobbie PM, Veenvliet BA, Manley TR, Pitchford WS, Kruk ZA, Bottema CD, Wilson T (2006). Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of cooked *M. longissimus dorsi* steaks from Jersey x Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. *Anim Genet* 37(4): 411-414.

- 40) Mullen MP, Berry DP, Howard DJ, Diskin MG, Lynch CO, Giblin L, Kenny DA, Magee DA, Meade KG, Waters SM (2011) Single nucleotide polymorphisms in the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) gene are associated with performance in Holstein-Friesian dairy cattle. *Front gen* 2:1-9.
- 41) Orrù L, Cifuni G, Piasentier E, Corazzin M, Bovolenta S, Moiola B (2011) Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the LEP and SCD1 genes on the fatty acid profile of muscle fat in Simmental bulls. *Meat Sci* 87: 344–348.
- 42) Owens FN, Gardner BA (2000) A review of the impact of feedlot management and nutrition on carcass measurements of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 77:1-18.
- 43) Page BT, Casas E, Quaas RL, Thallman RM, Wheeler TL, Shackelford SD, Koochmaraie M, White SN, Bennett GL, Keele JW, Dikeman ME, Smith TPL (2004) Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *J Anim Sci* 82: 3474–81.
- 44) Reardon W, Mullen AM, Sweeney T, Hamill RM (2010) Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. *Meat Sci* 86: 270–5.
- 45) Unión Europea. Reglamento de ejecución (UE) N° 481/2012 de 7/6/2012. Diario Oficial de la Unión Europea. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/>. Fecha de consulta: 05/08/2015.
- 46) Ron M, Weller JI (2007). From QTL to QTN identification in livestock – winning by points rather than knock-out: a review. *Anim Genet* 38: 429–439.
- 47) Roy BC, Sedgewick G, Aalhus JL, Basarab JA, Bruce HL (2015) Modification of mature non-reducible collagen cross-link concentrations in bovine *m. gluteus medius* and *semitendinosus* with steer age at slaughter, breed cross and growth promotants. *J Meat Sci* 110:109-117.
- 48) Schenkel FS, Miller SP, Jiang Z, Mandell IB, Ye X, Li H, Wilton JW (2006) Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J Anim Sci* 84: 291–9.
- 49) Singh A, Ahluwalia P, Rafiq A, Sharma S (2015) Biomarkers: Non-destructive Method for Predicting Meat Tenderization. *Crit Rev Food Sci Nutr* 6:0.
- 50) Smith SB, Kawachi H, Choi CB, Choi CW, Wu G, Sawyer JE (2009) Cellular regulation of bovine intramuscular adipose tissue development and composition *J Anim Sci* 87: E72-E82.
- 51) Soria LA, Corva PM (2004) Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne bovina. *Arch Lat Prod Anim* 12(2): 73-88.
- 52) Szczerbal I, Lin L, Stachowiak M, Chmurzynska A, Mackowski M, Winter A, Flisikowski K, Fries R, Switonski M (2007) Cytogenetic mapping of DGAT1, PPARA, ADIPOR1 and CREB genes in the pig. *J Appl Genet* 48(1):73-6.

- 53) Taniguchi M, Utsugi T, Oyama K, Mannen H, Kobayashi M, Tanabe Y, Ogino A, Tsuji S (2003) Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mamm Genome* 14: 142–148.
- 54) Thaller G, Kühn C, Winter A, Ewald G, Bellmann O, Wegner J, Zühlke H, Fries R (2003) DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim Gen* 34: 354-357.
- 55) Tizioto PC, Meirelles SL, Tulio RR, Rosa AN, Alencar MM, Medeiros SR, Siqueira F, Feijó GLD, Silva LOC, Torres RAA Jr and Regitano LCA (2012) Candidate genes for production traits in Nelore beef cattle. *Genet Mol Res* 11 (4): 4138-4144.
- 56) Van Eenennaam AL, Li J, Thallman RM, Quaas RL, Dikeman ME, Gill CA, Franke DE, Thomas ME (2007) Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J Anim Sci* 85: 891–900.
- 57) Van Elswyk MS, Mc Neill SH (2014) Impact of grass/forage feeding versus grain finishing on beef nutrients and sensory quality: The US experience. *Meat Sci* 96: 535-540.
- 58) Venkata Reddy B, Sivakumar AS, Jeong DW, Woo YW, Park SJ, Lee SY, Byun JY, Kim CH, Cho SH, Hwang I (2015) Beef quality traits of heifer in comparison with steer, bull and cow at various feeding environments. *Jap Soc Anim Sci* 86:1-16.
- 59) White SN, Casas E, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Riley DG, Chase CC Jr, Johnson DD, Keele JW, Smith TP (2005) A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *J Anim Sci* 83(9): 2001-2008.
- 60) Yamada T, Itoh M, Nishimura S, Taniguchi Y, Miyake T, Sasaki S, Yoshioka S, Fujita T, Shiga K, Morita M, Sasaki Y (2008) Association of single nucleotide polymorphisms in the endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 gene with marbling in Japanese Black beef cattle. *Animal Genetics* *Anim Genet* 40: 209–216.