

Identificación de la variante Q204X en ganado Charbray en prueba de comportamiento

Identification of the Myostatin Q204X variant in Charbray cattle in Mexico

Williams Arellano Vera^a, Carmen Yazmín Muñoz Mejía^a, Xochitl Fabiola De la Rosa Reyna^a, Luis Arístides López Bustamante^b, Gaspar Manuel Parra Bracamonte^a, Ana María Sifuentes Rincón^a

RESUMEN

Se identificó por medio de discriminación alélica, la variante Q204X del gen de la Miostatina en un grupo de 34 toretes de la raza Charbray del Noroeste de México sometidos a pruebas de comportamiento. Se obtuvo una frecuencia de 9.3 % de portadores heterocigotos, y una frecuencia génica del 5 % en la muestra evaluada. Este es el primer reporte de la presencia de la variante Q204X en ganado Charbray, con el cual se abre la posibilidad de diseñar estrategias de identificación y cuantificación del efecto de la variante segregada para complementar los esquemas de mejoramiento genético basados en características productivas y reproductivas en el ganado Charbray de México.

PALABRAS CLAVE: Charbray, Frecuencias, Q204X, Miostatina.

ABSTRACT

The Q204X myostatin allele was identified by an allelic discrimination assay using DNA from 34 Charbray bulls under performance testing in northwest Mexico. A total of 9.3 % of the bulls were heterozygotic Q204X allele carriers and gene frequency was 5 %. This is the first report of the Q204X allele in Charbray cattle in Mexico. These findings will allow further studies identifying and quantifying the Q204X segregating effect, thus supporting current Charbray productive and reproductive genetic improvement strategies.

KEY WORDS: Charbray, Frequencies, Q204X, Myostatin.

El primer reporte sobre la característica de doble musculatura (mh) en ganado bovino fue realizado por Culley⁽¹⁾ y a partir de éste, se realizaron una serie de trabajos para determinar las causas y consecuencias de esta condición genética. Kieffer y Cartwright⁽²⁾, reportaron alta incidencia de becerros nacidos con órganos sexuales exteriores subdesarrollados; y, Mennisser⁽³⁾ y Arthur⁽⁴⁾, la asociaron a una alta frecuencia de partos asistidos en animales con doble musculatura, así como también susceptibilidad a enfermedades de vías respiratorias⁽⁵⁾. Sin embargo, estudios posteriores⁽⁶⁻¹⁵⁾

Culley⁽¹⁾ was first to report on the double-muscling trait (mh) in cattle, and extensive research has been done since then to identify the causes and consequences of this genetic condition. Kieffer and Cartwright⁽²⁾ reported that this trait is associated with a high incidence of calves born with underdeveloped exterior sexual organs. Mennisser⁽³⁾ and Arthur⁽⁴⁾, associated double-muscling with a high frequency of assisted births and susceptibility to respiratory tract diseases⁽⁵⁾. However, more recent studies⁽⁶⁻¹⁵⁾ have helped to show that it is also associated with high muscle mass production

Recibido el 25 de junio de 2010. Aceptado el 27 de noviembre de 2010.

^a Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. Blvd. Del Maestro esq. Elias Piña. Col. Narciso Mendoza s/n. 88710, Cd. Reynosa Tam. Méx. Tel (899) 924 36 27. asifuentes@ipn.mx. Correspondencia al último autor.

^b Charolais Herd Book de México A.C. Comité Técnico.

ayudaron a reconocer que este fenotipo se asocia también a individuos con gran producción de masa muscular, con menor deposición grasa, pero sin disminución de la suavidad en su carne. Un mejor precio a la venta por kilogramo de peso vivo debido al doble músculo, así como, índices superiores de conversión alimenticia, han sido los principales incentivos para la selección a favor del fenotipo mh⁽⁶⁾. Grobet *et al.*⁽¹⁶⁾, identificaron a una serie de mutaciones en el gen miostatina (MSTN) como las responsables del fenotipo de doble musculatura. Piedmontese, Belga Azul, Limousin, Maine Anjou, Asturiana de los Valles y Charolais, se reconocen como razas portadoras de alelos específicos que predisponen a esta condición genética y su estudio, se ha facilitado por medio del diagnóstico molecular⁽¹⁶⁻²¹⁾. La raza Charolais es portadora de la variante Q204X y aunque la presencia del fenotipo de doble musculatura no es deseada en ganado mexicano por la mayoría de los ganaderos, la prevalencia del alelo Q204X encontrada en poblaciones mexicanas^(22,23), eventualmente podría significar la constitución de individuos homocigotos, o incluso su segregación en las razas híbridas en las que participa, como por ejemplo la Charbray (5/8 Charolais, 1/8 Brahman), cuyo origen data de finales de los años 40s y principios de los 50s, cuando ganaderos de la zona del Valle de Texas introdujeron a sus hatos toros de raza Charolais, provenientes de ganaderías mexicanas con la finalidad de mejorar el ganado Brahman de dicha zona. El ganado Charbray presenta rusticidad en su fenotipo, musculatura desarrollada en sus lomos y piernas, precocidad reproductiva presente entre los 14 y 17 meses de edad, así como una excelente habilidad materna y una alta conversión alimenticia⁽²⁴⁾. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia del alelo Q204X en un grupo de toretes Charbray en prueba de comportamiento y se discuten algunas de sus implicaciones.

Se colectaron muestras de sangre periférica a 43 toretes de raza Charbray sometidos a prueba de comportamiento en una estación del estado de Sonora; a partir de ellas se aisló el ADN siguiendo el protocolo del estuche comercial de purificación de ADN Genómico Wizard[®] (Promega, Inc.). La variante Q204X del gen MSTN fue identificada por medio de la técnica de discriminación alélica,

and less fat deposition without loss of tenderness. A better sale price per kilogram live weight and higher feed conversion indices are two of the main reasons for mh phenotype selection⁽⁶⁾. Grobet *et al.*⁽¹⁶⁾ identified a series of mutations in the myostatin gene (MSTN) as the cause of the double-muscling phenotype. Breeds which carry the specific alleles creating a predisposition to this condition include Piedmontese, Belga Azul, Limousin, Maine Anjou, Asturiana de los Valles and Charolais, all of which have been studied using molecular diagnosis⁽¹⁶⁻²¹⁾. The Charolais breed carries the Q204X variant of the mh phenotype. Double-muscling is not a desired phenotype by most cattle producers in Mexico but the prevalence of Q204X in Mexican cattle populations^(22,23) may eventually lead to homozygotic individuals and perhaps even the segregation of hybrid breeds. The Charbray breed (5/8 Charolais, 1/8 Brahman), originated in the late 1940s and early 1950s when ranchers in the Texas Valley region introduced Charolais bulls from Mexican ranches to improve the Brahman breed in the area. Charbray is a rustic phenotype with developed loin and leg musculature, early reproduction (14 to 17 mo), excellent maternal ability and high feed conversion⁽²⁴⁾. The present study objective was to identify presence of the Q204X allele in Charbray bulls in a performance test and discuss its implications.

Peripheral blood samples were obtained from 43 young Charbray bulls during a performance test at a test center in the State of Sonora, Mexico. DNA was isolated from the samples using the Wizard[®] Genomic Purification Kit (Promega, Inc.). An allelic discrimination assay was used to identification Q204X variant. The assay allows the identification of single nucleotide polymorphisms (SNP) with a fluorogenic 5' nuclease assay. To detect Q204X, the probes were marked with the VIC and FAM fluorophore markers. An increase in the VIC fluorescence signal indicated homozygosity for the normal gene (+), an increase in FAM fluorescence indicated homozygosity for the mutated Q204X allele (mh), and the presence of both (VIC-FAM) indicated heterozygosity (mh/+). Typification analysis of each genotype was done with the ABI Prism 7000 program (Real-Time Sequence Detection Software),

IDENTIFICACIÓN DE LA VARIANTE Q204XEN GANADO CHARBRAY

la cual permite identificar polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) mediante un ensayo fluorogénico de nucleasa 5'. Para la detección de la variante Q204X, las sondas fueron marcadas con fluoróforos diferentes (en este caso VIC y FAM), el incremento en la señal fluorescente VIC, indicó la homocigosis para el alelo normal (+), mientras que la fluorescencia de la sonda FAM indicó la homocigosis para el alelo mutado Q204X (mh); por lo tanto, la presencia de ambas señales (VIC-FAM) indicó heterocigosis (mh/+). El análisis de tipificación de cada genotipo se realizó mediante el programa ABI Prism 7000 (Real-Time Sequence Detection Software). Posteriormente, las frecuencias genotípicas y alélicas se estimaron mediante el programa Cervus 3.0⁽²⁵⁾.

Como se observa en la Cuadro 1, se encontraron portadores heterocigotos del alelo Q204X en el 9.3 % de los animales Charbray estudiados. Este es el primer reporte de la presencia del alelo Q204X en la raza Charbray en México, y puede atribuirse al aporte de la raza Charolais a la conformación genética de la Charbray (62.5 %), ya que aunque la Brahman participa con el 37.5 %, no hay antecedentes que lo respalden como portador natural de esta variante. Aun cuando los animales estudiados provienen de un mismo hato, el análisis de su pedigrí da relevancia al resultado, ya que se trata de animales Charbray de registro nacidos de padres diferentes que provienen al menos de tres líneas genéticas, en cuyos ancestros Charolais se presenta el alelo Q204X, por lo tanto es factible que en las poblaciones de ganado Charbray existan líneas genéticas portadoras de este alelo, las cuales pueden ser fácilmente identificadas con los datos de pedigrí.

La importancia del análisis de la frecuencia alélica para esta variante en la población estudiada, recae en que su prevalencia génica (mh = 6 %), es mayor a las frecuencias reportadas a la fecha en hatos de ganado Charolais de México^(22,23), por lo que conocer su impacto desde el punto de vista productivo y reproductivo, es importante ya que diferentes estudios han demostrado que la presencia de alelos mh no siempre tienen el mismo efecto entre las razas portadoras. En la Charolais, diferentes estudios han demostrado las ventajas y desventajas de la presencia del fenotipo mh.

and then genotype and allele frequencies were estimated with the Cervus 3.0 program⁽²⁵⁾.

In the studied Charbray population, heterozygotic Q204X allele carriers accounted for 9.3 % of the population. This is the first report of the Q204X allele in the Charbray breed in Mexico. Presence of Q204X may be attributed to the high genetic contribution (62.5 %) of the Charolais breed to the Charbray breed; until now there are no evidence to postulate the Brahman breed (37.5 % of the Charbray breed) as a natural Q204X carrier. Although the studied animals were from the same herd, analysis of their pedigree supports the present results. All were registered Charbray born of different parents from at least three different genetic lines with Charolais ancestors who were Q204X carriers. It is therefore probable that Mexican Charbray populations contain genetic lines carrying Q204X which can be easily identified using pedigree data.

Allelic frequency analysis for this variant in the studied population is relevant because the observed gene prevalence (mh = 6 %) is higher than frequencies reported to date in Charolais herds in Mexico^(22,23). It is therefore important to understand its potential productive and reproductive impacts since the presence of mh alleles does not always have the same effect in carrier breeds. The mh phenotype has advantages and disadvantages in the Charolais breed. In selection of Charolais sires for terminal crosses, Dhuyvetter *et al*⁽²⁶⁾ found

Cuadro 1. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante Q204X en animales Charbray en prueba de comportamiento

Table 1. Q204X variant genetic and allelic frequencies in Charbray bulls in a performance test

Genotypic frequencies			Allelic frequencies	
+/+	+/mh	mh/mh	+	mh
0.97	0.093	0.00	0.95	0.05

+/+ = inactive myostatin homozygotic genotype.

+/mh = heterozygotic genotype with an inactive copy of the myostatin Q204X allele.

mh/mh = active myostatin homozygotic genotype.

Dhuyvetter *et al.*⁽²⁶⁾, determinaron que la selección de sementales Charolais para realizar cruces terminales ofrece la ventaja de tener animales más pesados pero también aumenta la incidencia de partos asistidos. Por su parte, recientemente Phocas⁽¹⁵⁾, encontró diferencias significativas en la dificultad al parto explicadas por un incremento de 1.5 Kg en el promedio de peso al nacimiento de becerros con genotipo mh/mh, del cual el alelo mutado explica hasta 45 % de los efectos genéticos directos para peso al nacimiento.

Allais *et al.*⁽²⁷⁾, evaluaron toretes heterocigotos para el alelo Q204X generados a partir de 48 familias de Charolais y demostraron que el efecto del alelo no depende de la estructura familiar si no de la mutación. Los autores encontraron que los portadores tienen canales más musculosas y su carne tiene ligeramente menor sabor que la de los no portadores, pero es más suave y no presenta diferencias en jugosidad. También se ha indicado⁽²⁸⁾ que el manejo de la variante inactiva de la miostatina mediante cruzamientos puede incrementar la rentabilidad en sistemas de producción cárnica sobre todo en aquellos que aprecian la producción de carne magra con menor grasa intramuscular. Adicionalmente, Short *et al.*⁽²⁹⁾ demostraron con un diseño de cruces F2 en razas con mutaciones homólogas de mh, que existe una gran oportunidad de explotar el efecto positivo de la musculatura, teniendo en cuenta el efecto aditivo o pleiotrópico de la variante. La presencia del alelo Q204X en ganado Charolais se ha promovido principalmente para obtener portadores en cruces terminales^(15,23,26), así como en la formación de líneas sintéticas como la europea INRA95, en la cual se encuentran portadores de al menos una copia de mh y constituida con al menos un 50 % de la raza Charolais. En México, el ganado Charbray, se usa principalmente para la producción de becerros de mayor talla y ganancias de peso, que respondan favorablemente a las condiciones adversas de algunas regiones agroecológicas (trópico y subtropical), pero también ofrecen fenotípicamente una ventaja al momento de la venta de becerros con la menor apariencia cebuina⁽³⁰⁾. Dos razas de constitución genética similar (Charolais x Cebu), creadas con el mismo objetivo son la Canchim de Brasil⁽³¹⁾ y la Chacuba de la isla de Cuba⁽³²⁾, las

that mh produced heavier animals but increased the incidence of assisted births. Phocas⁽¹⁵⁾ reported significant differences in difficulty of birth explained by an average 1.5 kg increase in birth weight in calves with the mh/mh genotype, a mutated allele which explained up to 45 % of the direct genetic effects from birth weight. In an evaluation of Q204X heterozygotic calves from 48 Charolais families, Allais *et al.*⁽²⁷⁾ found that the allele effect does not depend on family structure but on the mutation. Carriers had more muscular carcasses, with meat that was slightly less flavorful than that of non-carriers, but tenderer and with no differences in juiciness. Use of the inactive myostatin variant through crosses can increase meat production system profitability, particularly when lean, less marbled meat is desired⁽²⁸⁾. Using an F2 cross design with breeds carrying mh homologue mutations, Short *et al.*⁽²⁹⁾ reported that this variant's additive or pleiotropic effect provides an excellent opportunity to exploit its positive effect on musculature.

In Charolais cattle, the Q204X allele has been promoted mainly to produce terminal cross carriers^(15,23,26), and to create synthetic lines (e.g. INRA95 in Europe) in which carriers have at least one mh copy and are at least 50 % Charolais. The Charbray breed in Mexico is used mainly to produce larger calves with higher weight gain which also respond well to adverse conditions in some agro-ecological regions (tropics and subtropics). At time of sale, however, they have the additional phenotypic advantage of an appearance with fewer Zebu elements⁽³⁰⁾. The Cachim breed in Brazil⁽³¹⁾ and the Chacuba breed in Cuba⁽³²⁾ are genetically similar breeds (Charolais x Zebu) created for the same purpose which have exhibited good performance in beef cattle herds under tropical conditions. No reports exist to date of mh alleles in these hybrids. Characterization of the Charbray breed based on genotype data is a promising alternative for increasing production and improving meat quality.

The potential of breeds with significant muscle expression to improve meat production in developing countries has been known for over thirty years⁽³³⁾. Identification of the specific variants which promote double-muscling in different breeds, and development

IDENTIFICACIÓN DE LA VARIANTE Q204XEN GANADO CHARBRAY

cuales han mostrado buen desempeño en hatos bovinos destinados a la producción de carne en condiciones de trópico. Hasta la fecha no se cuenta con antecedentes de la presencia de alelos mh en estas razas híbridas. En este sentido, la caracterización de la raza Charbray con base en el conocimiento de su genotipo, es una alternativa que podría ofrecer un gran potencial en el sentido de incrementar la producción y las cualidades de calidad de la carne.

Si bien, desde hace más de tres décadas fue reconocido el potencial de las razas con expresión muscular significativa para fomentar el mejoramiento de la producción de carne en países en vías de desarrollo⁽³³⁾, no fue hasta la identificación de las variantes específicas que promueven la doble musculatura en diferentes razas y de las tecnologías para su búsqueda y tipificación, que pudo hacerse extensiva la versatilidad y facilidad para el diseño de esquemas de cruzamiento y aprovechamiento de la segregación de variantes mh. En la actualidad, para el ganado de registro mexicano no se cuenta con programas de tipificación obligatorios para detectar mutaciones asociadas a condiciones genéticas en bovinos. La disponibilidad de pruebas de ADN hace posible que en corto tiempo y de manera precisa se obtenga información que asista el manejo reproductivo, sobre todo en razas en las que de forma natural se espera individuos portadores de mutaciones genéticas.

En el caso particular del alelo Q204X, en México es de gran interés promover el conocimiento sobre su existencia y la aplicación de estas tecnologías para su identificación, de tal manera que se asistan los esquemas reproductivos con la premisa del conocimiento de su segregación gamética, logrando obtener en menor tiempo el avance genético y los beneficios económicos que desea el productor.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo brindado por lo productores de los Centro de Pruebas de comportamiento "El Perú" y "El 17", en Hermosillo, Sonora; así como al proyecto, SIP 2008-0448 y fondos autogenerados por el servicio de tipificación

of the technologies needed to search for and characterize them, have facilitated design of crossing plans and use of mh variant segregation. Obligatory characterization programs to detect mutations associated with genetic conditions do not currently exist in Mexico for pure breed cattle. DNA tests provide quick, accurate data which can facilitate reproductive management, especially in breeds in which mutation-carrying individuals are expected to occur naturally.

Promoting a better understanding of the Q204X allele and the technologies used to identify it will help to improve reproductive strategies through gamete segregation aimed at more rapidly attaining the genetic progress and economic benefits desired by producers.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the producers at the El Perú and El 17 performance test centers in Hermosillo, Sonora. This research was partially funded by project SIP 2008-0448, and income generated by LBA-CBG-IPN characterization for the Asociación Charolais HerdBook de Mexico and Charolais Breeders in Sonora State.

End of english version

del LBA-CBG-IPN realizado a la Asociación Charolais HerdBook de Mexico y a los Criadores de ganado Charolais del estado de Sonora.

LITERATURA CITADA

1. Culley G. Observations in livestock. 4th ed. G. London, UK; Woodfall; 1807.
2. Kieffer KM, Cartwright TC. Double muscling in Cattle. Technical Report No. B-1325. The Texas A&M University System, College Station, TX. 1980.
3. Mennissier, F. Present state of knowledge about the genetic determination of muscular hypertrophy or the double-muscléd

- trait in cattle. In: King JWB, Messinier F. editor. Current topics in veterinary medicine and animal science, Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and Its Use to Improve Beef Production. Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers; 1982(16):387-428.
4. Arthur PF. Double-muscling in cattle: A review. *Aust J Agric Res* 1995;(46):1493-1515.
 5. Bellinge RHS, Liberles DA, Laschi SPA, O'Brien A, Tay GK. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Anim Genetics* 2005;(36):1-6.
 6. Hanset R, Michaux C, Stasse A. Relationships between growth rate, carcass composition feed intake, feed conversion ratio and income in four biological types of cattle. *Genet Sél Evol*1987;(19):225-248.
 7. Cundiff, LV, Gregory KE, Wheeler LT, Shackelford DS, Koohmaraie M, Freetly CH, Lunstra DD. Preliminary results from cycle V of the Cattle Germplasm Evaluation Program at the Roman L. Hruska U.S. Meat Anim Res Ctr. Germplasm Evaluation Program Progress. USDA-ARS, Clay Center, NE. Rep 15. 1966.
 8. Wheeler TL, Cundiff VL, Koch MR, Crouse DJ. Characterization of biological types of cattle (Cycle IV): Carcass traits and longissimus palatability. *J Anim Sci* 1996;(74):1023-1035.
 9. Wheeler TL, Cundiff VL, Koch MR, Dikeman EM, Crouse DJ. Characterization of different biological types of steers (Cycle IV): Wholesale, subprimal, and retail product yields. *J Anim Sci* 1997;(75):2389-2403.
 10. Casas E, Keele WJ, Shackelford DS, Koohmaraie M, Sonstegard ST, Smith PT, Kappes MS, Stone TR. Association of the muscle hypertrophy locus with carcass traits in beef cattle. *J Anim Sci* 1998;(76):468-473.
 11. Casas E, Keele WJ, Fahrenkrug CS, Smith LPT, Cundiff VL, Stone TR. Quantitative analysis of birth, weaning, and yearling weights and calving difficulty in Piedmontese crossbreds segregating in active myostatin allele. *J Anim Sci* 1999;(77):1686-1692.
 12. Wheeler TL, Shackelford DS, Casas E, Cundiff VL, Koohmaraie M. The effects of Piedmontese inheritance and myostatin genotype on the palatability of longissimus thoracis, gluteus medius, semimembranosus, and biceps femoris. *J Anim Sci* 2001;(79):3069-3074.
 13. Dunner SM, Amigues YM, Cañon J. Haplotype diversity of the *myostatin* gene among beef cattle breeds. *J Anim Sci* 2003;(35):103-118.
 14. Phocas F, Laloë D. Evaluation models and genetic parameters for calving difficulty in beef cattle. *J Anim Sci* 2003;(81):933-938.
 15. Phocas F. Genetic analysis of breeding traits in a Charolais cattle population segregating an inactive myostatin allele. *J Anim Sci* 2009;(87):1865-1871.
 16. Grobet L, Poncelet D, Royo JL, Brouwers B, Pirottin D, Michaux C, *et al.* Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome* 1998;(9):210-213.
 17. Grobet L, Royo L, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, *et al.* A deletion in the *myostatin* gene causes double-muscling in cattle. *Nat Genet* 1997;(17):71-74
 18. Kambadur R, Sharma M, Smith LPT, Bass JJ. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscléd Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res* 1997;(7):910-915.
 19. McPherron AC, Lee JS. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Nat Academy Sci USA*. 1997;(94):12457-12461.
 20. Cappucio I, Marchitelli C, Serracchioli A, Nardone A, Filippini F, Ajmone-Marsan Pet. A G-T Transversion Introduces a stop codon at the mh locus in hypertrophic Marchigiana beef subject. [abstract]. *Anim Genetics* 1998;(Suppl L):51.
 21. Marchitelli C, Savarese MC, Crisa A, Nardone A, Marsan PA, Valentini A. Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. *Mamm Genome* 2003;(14):392-395.
 22. Sifuentes RA, Puentes MH, Moreno MV, De la Rosa RX, Rosales Alday J. Frecuencia del alelo Q204X del Gen Miostatina, en hatos de Ganado Charolais de la Región Noreste de México. *Téc Pecu Méx* 2007;(45):85-92.
 23. Parra-Bracamonte GM, Sifuentes-Rincón AM, Arellano-Vera W, Almanza-González A, De la Rosa-Reyna X. F. Tipificación de tres marcadores genéticos de caracteres de importancia comercial en ganado Charolais: implicaciones en la ganadería para carne en México. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2009;(22):257-266.
 24. Charolais Herd Book de México [on line]. http://www.charolais.org.mx/cont.asp?cont_id=10 Accessed Sep 1, 2009.
 25. Kalinowski, ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecol* 2007;(16):1099-1106.
 26. Dhuyvetter MJ, Frahm RR, Marshall MD. Comparison of Charolais and Limousin as terminal cross sire breeds. *J Animal Sci* 1985;(4):935-941.
 27. Allais S, Levéziel H, Payet-Duprat N, Hocquette JF, Lepetit J, Rousset S, *et al.* The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds. *J Anim Sci* 2010; 88:446-454.
 28. Keele JW, Fahrenkrug SC. Optimum mating systems for the myostatin locus in cattle. *J Anim Sci* 2001;(79):2016-2022.
 29. Short RE, MacNeil MD, Grosz MD, Gerrard DE, Grings EE. Pleiotropic effects in Hereford, Limousin, and Piedmontese F2 crossbred calves of genes controlling muscularity including the Piedmontese myostatin allele. *J Anim Sci* 2002;(80):1-11.
 30. Olson AT, Chase CC, Sand SR, Coleman SW. Performance of Charolais-Sired Calves from Brahman x Angus, Senepol x Angus, and Tuli x Angus F₁ Crossbred Cows. *Florida Beef Report*. 2003:27-30.
 31. Perotto D, Moletta JL, Leeskiu C. Desempenho em confinamento de machos bovinos inteiros Canchim, Aberdeen Angus e Cruzamentos Recíprocos. *Ciência Rural* 2002;(4):669-674.
 32. López DSA. Cruzamientos en Cuba: Experiencias y perspectivas. En: Razas bovinas creadas en Latinoamérica y el Caribe. Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Venezuela. 2005:29-35.
 33. Vissac B. Using large muscular breeds to improve world beef production. *Animal Breeding: selected articles form the World Animal Reviews*. 1997. FAO. Rome, Italy. Disponible: <http://www.fao.org/docrep/004/x6500e/X6500E16.htm#ch16> Consultado Septiembre 01, 2009.