

Evaluación de regiones polimórficas del gen de la miostatina en ganado Beefmaster

Evaluation of polymorphic regions of myostatin gene in Beefmaster cattle breed

VR Moreno^{b*}, AM Sifuentes^a, XF De La Rosa^a, B Pereyra^b

^aLaboratorio de Biotecnología Animal I, Centro de Biotecnología Genómica del I.P.N. Reynosa Tamaulipas, México.

^bLaboratorio 4 del Instituto de Biotecnología, F.C.B., U.A.N.L., Monterrey N.L., México.

SUMMARY

Here we analyze GDF8 gene regions which are potential carriers of polymorphisms using both base excision sequence scanning thymine-base (BESS-T) and a fluorescent technique based on temperatures of dissociation (Tm's) technique. The first one permitted us to detect five nucleotide changes located four in the flanking regions of introns 1 and 2 and one in exon II. All the sequence variations were grouped in 11 haplotypes, which were distributed in the population tested. In order to evaluate a highest number of animals, a Tm's technique was optimized to analyze the region harboring most of mutations previously detected with BESS-T. Validation of Tm's technique was achieved comparing both the BESS-T and Tm's technique results. We found a 93.5% of correlation between these techniques.

The GDF8 gene mutations found in Beefmaster, do not suggest any effect on gene expression, however, their high frequency in the studied population makes interesting further studies focused to evaluate their association with productive traits such as weight gain or body conformation. The Tm's technique is proposed as a moderate throughput method which could be used for detection of mutated genotypes.

Palabras clave: miostatina, GDF8, SYBR Green I, bovino.

Key words: myostatin, GDF8, SYBR Green I, bovine.

INTRODUCCION

La mayoría de los genes asociados a una característica fenotípica o cuantitativa presentan variantes alélicas con mutaciones que son específicas de poblaciones e incluso de familias; un ejemplo, es el gen miostatina (GDF8), el cual se expresa primordialmente en el músculo en desarrollo y tejido esquelético adulto (McPherron y col 1977). Funcionalmente, la miostatina actúa como un regulador extracelular negativo y es clave en el crecimiento y desarrollo muscular produciendo según el grado de inhibición de la proteína, hipertrofia e hiperplasia celular (incremento en tamaño de fibras musculares y en el número de fibras musculares, respectivamente) (Masumi y col 2002). Se han identificado mutaciones raza-específicas, que son causa de la doble musculatura, principalmente cuando se presentan en cualquiera de los tres exones que constituyen el gen (Kambadur y col 1997). Las diferentes formas alélicas de GDF8 también se asocian con la eficiencia productiva y calidad de la carne del ganado bovino (Pozzi y col 2004), razón por la cual, GDF8 es uno de los genes más importantes a

caracterizar en las diferentes razas para establecer su potencial uso como marcador de selección (De La Rosa 2003). Determinar en un gran número de muestras la presencia de mutaciones en nucleótidos facilitará el análisis genético de ligamiento y los estudios de asociación con enfermedades específicas (Kojo y col 2001). Actualmente, se han descrito metodologías que permiten la detección de mutaciones y polimorfismos sin la necesidad de recurrir a la secuenciación, de ellas destaca el uso de técnicas de detección basadas en fluorescencia, ya que ofrecen ventajas como son la rapidez y bajo costo de la prueba (Rudi y col 2005).

El análisis de las temperaturas de disociación (Tm's) se utiliza para la detección de mutaciones y tiene como principales aplicaciones el genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) y detección de productos no deseados en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) (Zipper y col 2004).

En México la ganadería bovina basa sus intereses principalmente en la producción de leche, pie de cría y carne. El objetivo de este estudio fue analizar en ganado bovino de la raza Beefmaster, regiones polimórficas del gen GDF8 mediante la técnica de escaneo de secuencias por escisión de la base timina y evaluar un procedimiento de moderado rendimiento basado en el análisis de Tm's, para determinar la frecuencia de variación nucleotídica y capacidad de seleccionar individuos con un genotipo con ventajas productivas.

Aceptado: 12.07.2007.

* Col. Universitaria, Ave. Pedro de Alba y Manuel L. Barragan S/N, c.p. 66450, San Nicolás de los Garza N.L., México; vmorenom@ipn.mx

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLOGICO

Fue empleado ganado de registro de la raza Beefmaster proveniente de un rancho ubicado en el Noreste del estado de Tamaulipas, México. El análisis de escaneo de secuencias por escisión de la base timina (BESS-T) se realizó a partir de muestras de sangre de 96 machos, mientras que la medición de Tm's se realizó con 104 individuos incluyendo 61 machos de los previamente evaluados con la técnica de BESS-T. Se colectaron de 2 a 3 mL de sangre en tubos con EDTA. El ADN genómico fue extraído mediante la técnica de precipitación salina (Sambrook y col 1989).

ANALISIS DE BESS-T

Para la búsqueda de mutaciones en gen GDF8 de la raza Beefmaster se empleo la técnica BESS-T. Esta técnica ha sido reportada para detectar SNP's en genes de mamíferos (Hawkins y Hoffman 1997) y consiste en la incorporación de 2' deoxiuridina 5-trifosfato (dUTP) en los productos obtenidos mediante PCR, para posteriormente digerir el producto con las enzimas: Uracilo N-glicosilasa y Endonucleasa IV (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA). Los iniciadores usados en la amplificación están dirigidos hacia dos regiones de GDF8: exón II y exón III. En ambas regiones los iniciadores abarcan parte del intrón que flanquea a cada uno de los exones. La secuencia de los iniciadores son: MIOIIF 5'-GATTGATATGGAGGTGTTTCG-3' y MIOIIR 5'-ATAAGCACAGGAACTGGTA-3'; para la región del exón 2 y MIOIIIF 5'-TGACATAAGCAAATGATTA-3' y MIOIIIR 5'-ATACTCTAGGCCTATAGCCTGTGGT-3'; para la región del exón III (Karim y col 2000). El tamaño de los productos es de 548 y 578 pb, respectivamente. Para la visualización de los productos de la reacción de escisión, los iniciadores fueron marcados con fluorescencia IRD-800 en el extremo 5' y analizados en geles de poliacrilamida al 6,5%, en el secuenciador Li-COR IR² (LiCOR IR² Inc. Lincon, NE, USA). La comparación de los patrones de bandas obtenidos en relación con una muestra de referencia (Genbank: AB076403.1.) permitió la identificación de mutaciones que implican timina. Los patrones de bandas visualizados fueron traducidos en forma binaria como "0" ausencia y "1" presencia de banda, con el cual se construyó un haplotipo para cada muestra. El número y frecuencia de alelos y haplotipos se estimaron en el programa HaploMAu (González-Paz 2002). Para la verificación de los cambios nucleotídicos detectados se realizó secuenciación en 18 muestras, con el estuche SequiTherm EXCELTM II DNA Sequencing (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA) y el secuenciador (LiCOR IR² Inc. Lincon, NE, USA).

ANALISIS DE MEDICION DE Tm'S

Para determinar la frecuencia de variación nucleotídica y capacidad de seleccionar individuos con genotipo

mutado se diseñó un par de iniciadores que abarcan la región nt 2293 – nt 2404 (exón II) de la secuencia del gen de la miostatina (Genbank: AF_320998.1). A partir del ADN genómico, se amplificó una región de 112 pb con los iniciadores sentido 5'GATTGATATGGAGGTGTTTCG-3' y antisentido 5'CAACATTTGGGTTTTCCTTC-3'. La PCR se realizó en un volumen total de 17,5 µL, utilizando 12,5 µL de mezcla SYBR Green 2X (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), 5 pmoles de cada iniciador y 150 ng de ADN. La PCR se realizó en un termociclador PTC200 (MJ Research, Waltham, Mass. USA), bajo el siguiente programa de temperaturas: un paso de activación enzimática a 95 °C por 10 min, seguido por 30 ciclos de [94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min], y un paso final de 72 °C por 5 min.

Protocolo de disociación. Los productos de PCR se transfirieron a una microplaca de 96 pozos (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) donde se realizó la disociación térmica del colorante SYBR Green I intercalado en la doble cadena de ADN. Para ello se utilizó el Termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) con un gradiente de temperatura de 60 °C a 90 °C. Las gráficas y temperaturas de disociación (Tm's) correspondientes para los diferentes individuos se generaron utilizando el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Análisis estadístico y exactitud de la medición de Tm's. Se utilizaron las temperaturas de disociación (Tm's) para formar el grupo con genotipo mutado indicado por el rango de temperatura menor y el grupo con genotipo normal, indicado por el rango de temperatura mayor. Mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Guzmán y Tirado 1993) se evaluó estadísticamente la capacidad del ensayo de disociación utilizando el programa SPSS versión 10.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago Illinois, USA) para distinguir individuos portadores de cambios nucleotídicos en el fragmento de miostatina. La exactitud de la medición de Tm's se verificó comparando los resultados obtenidos en el análisis de 61 muestras con la técnica de BESS-T, previamente utilizada para la búsqueda de mutaciones.

RESULTADOS Y DISCUSION

Detección de mutaciones. El análisis de dos regiones de GDF8 utilizando la técnica de BESS-T permitió establecer los individuos con genotipo normal, mutado o heterocigoto. Se encontraron cinco cambios, los cuales se corroboraron por secuenciación: en el intrón I se encontraron dos transiciones y una delección, en el exón II se detectó una transición y en el intrón II una delección. Las mutaciones encontradas son del tipo silencioso y reportado en ganado de razas europeas por Grobet y col (1998) y Dunner y col (2003). Las mutaciones en la raza Beefmaster, han sido descritas en las razas Hereford y Shorthorn, dos de las

razas que conforman al Beefmaster. En la raza Hereford las mutaciones nt 414, nt 374-51, nt 374-50, nt 374-16 y nt 748-78 se agruparon para formar el haplotipo 4, mientras que en la Shorthorn, la mutación nt 374-51 se denominó haplotipo 3, el cual fue propuesto por los autores como alelo silvestre de miostatina por presentarse en 24 de las 28 razas estudiadas (Dunner y col 2003). La localización y denominación de las mutaciones se presentan en el cuadro 1 y estos resultados se suman al cada vez mayor número de razas de ganado bovino en las cuales se ha estudiado GDF8 y se ha demostrado su alta variabilidad genética (Miranda y col 2001).

Cuadro 1. Formas alélicas para el gen GDF8 en la raza Beefmaster.

Allelic forms of GDF8 gene in Beefmaster cattle breed.

Alelos identificados en la raza Beefmaster		Frecuencia
AA	Normal o silvestre	0,3385
AB	nt 374-16 (del T)	0,1458
AC	nt 374-16 (del T), nt 374-51 (T > C), nt 374-50 (G > A) y nt 414 (C > T)	0,0469
AD	nt 748-78 (del T)	0,2760
BD	nt 374-16 (del T), nt 748-78 (del T)	0,0573
CD	nt 374-16 (del T), nt 374-51 (T > C), nt 374-50 (G > A), nt 414 (C > T) y nt 748-78 (del T)	0,1354

Secuencia de referencia: Genbank: AB076403.1.

nt = nucleótido, del = delección; nt 374-16 (del T) se refiere al nucleótido timina localizado 16 bases río arriba del exón II; nt 748-78 (del T) se refiere al nucleótido timina localizado 78 bases río arriba del exón III, es decir dentro del intrón II.

Cuadro 2. Frecuencia de los haplotipos de GDF8 en la raza Beefmaster.

Haplotype frequencies of GDF8 in Beefmaster cattle breed.

	Haplotype		Frecuencia	
	Alelo 1	Alelo 2	No. Ind.	%
1	AA	AA	25	26,04
2	AA	AD	10	10,42
3	AD	AD	3	3,13
4	AB	AA	5	5,21
5	AB	AD	23	23,96
6	AD	BD	5	5,21
7	AC	AD	8	8,33
8	BD	BD	3	3,13
9	CD	CD	12	12,50
10	AD	CD	1	1,04
11	AC	CD	1	1,04
			96	100%

Alelos y haplotipos de GDF8. Previamente, se describió como alelo silvestre a una variante de miostatina carente de mutaciones y presente en la raza Holstein (Grobet y col 1998). En Beefmaster, la variante AA se presentó con mayor frecuencia que las otras variantes. Este resultado puede deberse al porcentaje de sangre Brahman en la hibridosis de la Beefmaster (25% Shorthorn, 25% Hereford y 50% Brahman). El alelo AD (delección nt 748-78) fue el segundo más frecuente en la raza Beefmaster y se ha identificado en la raza Hereford dentro del grupo de mutaciones del haplotipo 4 (Dunner y col 2003). En las muestras analizadas se identificaron 6 alelos (cuadro 1). Utilizando la secuencia AB076403.1. depositada en el GenBank como referencia, el alelo más frecuente fue el normal caracterizado por la ausencia de cambios nucleotídicos (AA=0,3385). El segundo alelo con mayor frecuencia presentó la delección nt748-78 (AD = 0,2760). Con las formas alélicas se establecieron 11 haplotipos. El haplotipo normal homocigoto (AA/AA) representó al 26,04% de los animales estudiados y el haplotipo AB/AD, heterocigoto para las dos delecciones identificadas en el análisis, estuvo representado por el 23,96% de los animales (cuadro 2). Los haplotipos AA/AA y AB/AD estuvieron representados con las frecuencias más altas y los haplotipos AD/CD y AC/CD con las frecuencias menores.

Análisis de medición de Tm's. Se seleccionó la región del exón II para evaluar la técnica de medición de temperatura de disociación (Tm's), como un método rápido para la detección de variaciones nucleotídicas. En 104 muestras, incluyendo las previamente evaluadas por BESS-T, se midió la Tm's, la cual se define como la derivada de la variación máxima en fluorescencia con respecto a la temperatura (-dF/dT). En la figura 1 se presentan de forma gráfica la dispersión de los valores de la Tm's y se observa para el grupo de individuos con genotipo normal un rango de Tm's mayor que para el grupo de individuos con genotipo mutado.

La prueba no paramétrica de Mann-Whitney permitió establecer una diferencia estadísticamente significativa entre las temperaturas de disociación (Tm's) del grupo de individuos con genotipo normal y el grupo de individuos con genotipo mutado (cuadro 3), verificando la técnica para ser

Cuadro 3. Prueba estadística no paramétrica de Mann Whitney aplicada a los valores de las mediciones de Tm's.

Non - parametric Mann Whitney statistical test used in the measure of Tm's.

Grupo	N	Rango (medias)	Rango (suma)
1	74	37,5	2775
2	30	89,5	2685
Total	104		

Estadístico: Mann-Whitney U = 0,0.

Nivel de significancia : P < 0,05.

Cuadro 4. Comparación entre la técnica de medición Tm's y BESS-T en la región nt2293 a nt2404 de la secuencia del gen de la GDF8 (Genbank: AF_320998.1).

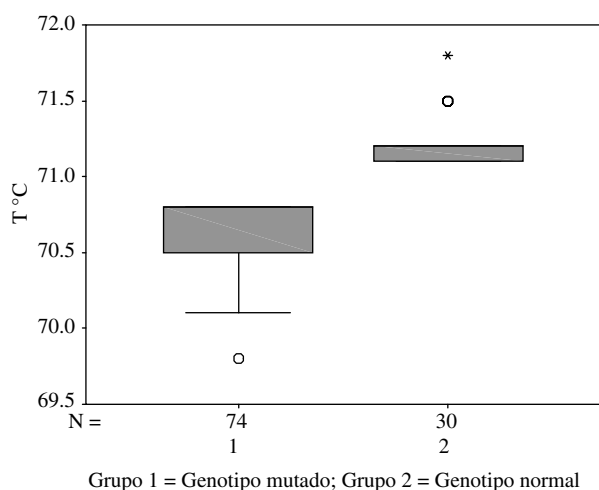
Comparison between the technique of measure Tm's and BESS-T in the region nt2293-nt2404 of the sequence of GDF8 gene (Genbank: AF_320998.1).

Método Tm's		Método BESS-T		Comparación		
^a No	^b Cambio	^a No	^b Cambio	^c Tm's & BESS-T	Discrepancias	Concordancia (%)
104	74	61	31	29	2	93,5%

^a No = Número de muestras analizadas.

^b Cambio = Número de muestras con algún cambio en la secuencia.

^c Tm's & BESS-T= Número de muestras que presentaron por ambos métodos algún cambio en la secuencia.

**Figura 1.** Gráfica de caja donde se observa la distribución de las temperaturas de disociación para los grupos con genotipo mutado (69,8 °C -70,8 °C) y normal (71,1 °C -71,8 °C).

The Box graphic shows the distribution of dissociation temperatures for the groups with mutated genotype (69.8 °C -70.8 °C) and normal genotype (71.1 °C-71.8 °C).

utilizada en la discriminación de genotipos. La comparación de estos resultados con los obtenidos utilizando el método de BESS-T en 61 individuos, permitió determinar una concordancia del 93,5% entre ambos métodos (cuadro 4). La frecuencia de variación del grupo con alelo mutado fue del 71,1% respecto al total de muestras analizadas.

La medición de temperaturas de disociación del gen de miostatina permitió distinguir entre los genotipos normal y mutado sin la necesidad de realizar cambios en el diseño de la PCR, tales como adición de nucleótidos GC en la secuencia de los iniciadores, adición de sustancias químicas como la urea o formamida que afectan la termodinámica de la amplificación (Maruyama y col 2003) o bien el uso de otro compuesto fluorescente como el LCGreen (Wittwer y col 2003). El uso de la Tm's como método de discriminación de variaciones nucleotídicas enfrenta la desventaja de requerir un sistema sensible de detección para medir el cambio de fluorescencia durante el

proceso de disociación (Ahsen y col 2001), sin embargo, es recomendado para llevar a cabo la determinación de frecuencias de genotipos conocidos. El método BESS-T requiere optimizar la amplificación y el proceso de escisión enzimático del fragmento de ADN, aumentando la probabilidad de fallo durante la lectura electroforética, lo cual puede ser una de las causas de las diferencias en la frecuencia encontrada por ambos métodos.

La determinación de la temperatura de disociación (Tm's) de fragmentos de ADN es un método que hace factible el tamizar una población para detectar los individuos con genotipo mutado; adicionalmente, esta metodología puede ser aplicable para el análisis de genes que presentan variantes alélicas conocidas que requieran ser monitoreadas en un gran número de muestras en menor tiempo y menor costo que el requerido por otras metodologías que tienen como base la PCR.

Se ha demostrado que aunque algunas mutaciones de GDF8 causan la disfunción de la proteína, la expresión de la hipertrofia o hiperplasia muscular no puede ser explicada por sólo una mutación disruptiva en un gen. Existe evidencia que el efecto de miostatina es aditivo, es decir, los productos génicos del locus actúan presumiblemente vía autócrina o parácrina para controlar la miogénesis y se asocia con características como peso de la canal, marmoleo, área del músculo longissimus, porcentaje de cortes primarios, entre otros. A este gen se le considera como un QTL asociado con otras regiones génicas con las cuales interacciona para llevar a cabo su función (Stone y col 1999, Casas y col 2000). La influencia de éste en la buena conformación muscular de muchas razas bovinas europeas de carne, además de la alta variabilidad de registros fenotípicos confirma la teoría de loci heterogéneos. En este sentido nuestros resultados muestran que en la raza Beefmaster existen variantes alélicas caracterizadas por mutaciones que teóricamente no causan disfunción del gen; sin embargo, la frecuencia con la que fueron encontrados alelos con mutaciones en una raza destinada a la producción de carne abre la posibilidad de diseñar estudios enfocados a determinar la asociación de los polimorfismos encontrados, con rasgos productivos de la raza Beefmaster.

RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron regiones potencialmente portadoras de mutaciones del gen miostatina, en la raza Beefmaster con la técnica de escaneo de secuencias por escisión de la base timina (BESS-T) y un método fluorescente basado en las temperaturas de disociación (Tm's). Se encontraron cinco cambios nucleotídicos, cuatro en las regiones flanqueantes de los intrones 1 y 2, y uno en el exón II, éstos se agruparon en 11 haplotipos. Se optimizó un método fluorescente basado en la Tm's, para analizar una mayor cantidad de animales en la región con mayor número de mutaciones previamente detectada por BESS-T. La validación de la técnica de Tm's fue realizada utilizando los resultados de las muestras genotipificadas previamente mediante la técnica de BESS-T y se encontró un 93,5% de concordancia entre ambas técnicas. Las mutaciones encontradas mediante la técnica de BESS-T no sugieren un efecto directo sobre la función del gen, sin embargo, su alta frecuencia en la población bajo estudio abre la posibilidad de evaluar su asociación con características productivas, como ganancia de peso o conformación de los individuos portadores. Se propone a la técnica de medición de temperaturas de disociación (Tm's) como un método de tamizaje de moderado rendimiento, para la detección de genotipos mutados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero SEP-CONACYT 39841-Z, CGPI-IPN 20040431, beca CONACYT 33739.

REFERENCIAS

- Ahsen VN, M Oellerich, E Schutz. 2001. Limitations of genotyping based amplicon melting temperature. *Clin Chem* 47, 1331-1332.
- Casas E, S Shackelford, J Keele, R Stone, S Kappes, M Koohmaraie. 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of *myostatin*. *Jl Anim Sci* 78, 560-569.
- De la Rosa RXF. 2003. Evaluación de regiones asociadas a ganancia de peso en el genoma de individuos de la raza Beefmaster. *Tesis de maestría*, Centro de Biotecnología Genómica del IPN Reynosa Tamaulipas, México.
- Dunner S, ME Miranda, Y Amigues, J Cañon, M Georges, R Hanset, J Williams, F Ménissier. 2003. Haplotype diversity of the *myostatin* gene among beef cattle breeds. *Genet Sel Evol* 35, 103-118.
- González-Paz M. 2002. HAPLOMAU (programa de cómputo). Centro de Biotecnología Genómica-IPN. Reynosa, (Tamaulipas) México. [en línea] . URL: http://isis.cbg.ipn.mx/online_tools/.
- Grobet L, D Poncet, LJ Royo, B Brouwers, D Pirottin, C Michaux, F Ménissier, M Zanotti, S Dunner, M Georges. 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the *myostatin* function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome* 9, 210-213.
- Guzmán Ramírez ME, Q Tirado López. 1993. *Métodos estadísticos no paramétricos*. 1ª ed. Universidad Autónoma de Chapingo, México, Pp 97-106.
- Hawkins G, L Hoffman. 1977. Base excision sequence scanning: a new method for rapid sequence scanning and mutation detection. *Nat Biotechnol* 15, 803-804.
- Kambadur R, M Sharma, TPL Smith, JJ Bass. 1997. Mutations in *myostatin* (GDF8) in double muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res* 7, 910-916.
- Karim L, W Coppieters, L Grobet, A Valentini, M Georges. 2000. Convenient genotyping of six *myostatin* mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. *Anim Genet* 31, 396-399.
- Kojo S, EJ Jhonson, DS Bohling. 2001. Solution-based scanning for single base alterations using a double stranded DNA binding dye and fluorescence melting profiles. *Am J Pathol* 3, 845-853.
- Maruyama T, T Takata, H Ichinose. 2003. Simple detection of point mutations in DNA oligonucleotides using SYBR Green. *Biotechnol Lett* 25, 1637-41.
- Masumi N, Y Akihiro, N Shinichirou, N Tsutomu, Y Takashi, I Mitsuo, M Keiji, O Hideyo, N Sumihare. 2002. A missense mutant *myostatin* causes hyperplasic without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 247-251.
- McPherron AC, SJ Lee. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the *myostatin* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12457-12461.
- Miranda M, J Cañon, F Ménissier, R Hanset, J Williams, S Dunner. 2001. Identificación de los distintos haplotipos del gen de la miostatina en razas bovinas europeas. XXXIII-IX Jornadas sobre Producción Animal, ITEA 22,39-41, España.
- Pozzi A, A Galli, G Bongioni. 2004. Real time TaqMan PCR technique: a valid tool for the meat quality certification. XXXIX Simposio Internazionale di Zootecnia Meat Science & Research.
- Rudi K, B Skanseng, SM Dromtorp. 2005. Explorative screening of complex microbial communities by real time 16S rDNA restriction fragment melting curve analyses. *Biotechniques* 39, 116-121.
- Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press. Cold Spring Harbor, NY, USA, Pp 17-20.
- Stone R, J Keele J, S Shackelford, S Kappes, M Koohmaraie. 1999. A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting carcass and growth traits. *J Anim Sci* 77, 1379-1384.
- Wittwer CT, GH Reed, CN Gundry, JG Vandersteen, RJ Pryor. 2003. High resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 6, 853-860.
- Zipper H, H Brunner, J Bernhagen, F Vitzthum. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR green I, its structure determination and methodological implications. *Nucl Acids Res* 32, e103.