

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL GANADO CRIOLLO LIMONERO A TRAVÉS DE GENES DE INTERÉS PRODUCTIVO

GENETIC CHARACTERIZATION IN LIMONERO CREOLE CATTLE THROUGH PRODUCTIVE GENES OF INTEREST

José Atilio Aranguren-Méndez^{1*}, María Gabriela Portillo¹, Luis F. Yáñez¹, Xomaira Rincón¹, Gloria Contreras², Yenen Villasmil-Ontiveros¹

¹Laboratorio de Genética Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. Apdo. 15252. *atilioaranguren@gmail.com
atilio.aranguren@fcv.luz.edu.ve

²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas-Zulia.

Abstract

DNA samples from 163 animals of Limonero cattle breed were analyzed (44 males and 119 females) at several candidates genes for milk and meat production (CSN3, BLG, CAST and CAPN) in. Genotyping was performed by PCR-RFLP technique, the allele, genotype frequencies and EHW were compared using chi-square. The results showed the CSN3 allele frequency of 0.11 for the homozygous AA, 0.56 for the heterozygous AB and 0.33 for the BB homozygote, the BLG frequencies were 0.07, 0.29 and 0.64, for genotypes AA, AB and BB, respectively. The data obtained for meat quality genes were 0.84, 0.03 and 0.13 for genotypes AA, AB and BB, respectively, for the CAST gene. For the CAPN gene the results were AA (0, 1 5), AG (0.56) and GG (0.29). It is noteworthy that the finding of a high frequency of allele B for milk proteins provides useful evidence for the production of cheeses. Besides the presence of genotypes GG for the CAPN gene and AA for the CAST gene, could give a great potencial for meat tenderness and quality selection. These results will be very useful to establish marker-assisted selection plans, and will give an added value to the Creole Limonero cattle in production systems.

Palabras clave:

Kappa-caseína
Betactoglobulina
Calpaina
Calpastatina
PCR-RFLP

Keywords:

Kappa-casein
Betactoglobulin
Calpaine
Calpastatine
PCR-RFLP

Resumen

Con el objeto de caracterizar los genes de interés productivo (CSN3, BLG, CAST y CAPN), en el ganado Criollo Limonero, fueron analizadas muestras de ADN de 163 animales (44 machos y 119 hembras). El genotipado se realizó mediante la técnica PCR-RFLP, siendo comparadas las frecuencias alélicas y genotípicas y el EHW mediante pruebas de ji-cuadrado. Los resultados mostraron frecuencias alélicas de la CSN3 de 0,11 para el homocigoto AA; 0,56 para el heterocigoto AB y 0,33 para los homocigotos BB; para la BLG correspondieron 0,07; 0,29 y 0,64, para los genotipos AA, AB y BB, respectivamente. Y en el caso de los genes de calidad de carne los datos obtenidos fueron 0,84; 0,03 y 0,13 para los genotipos AA, AB y BB, respectivamente de la CAST y en el caso de la CAPN correspondió a AA (0,15); AG (0,56) y GG (0,29). Es importante mencionar que el hallazgo de una alta frecuencia del alelo B para las proteínas lácteas dan indicio que deberían ser utilizada para la producción de quesos artesanales, añadiéndole un valor potencial las presencia de genotipos GG para CAPN y AA de CAST, dada su correlación con la ternera y calidad de la carne. Estos hallazgos resultan de gran utilidad para establecer planes de selección asistida por marcadores, y darle así al Criollo Limonero un valor añadido en los sistemas de producción.

Introducción

El Criollo Limonero es una raza local venezolana originaria de bovinos hispanos traídos a América durante la época colonial, que se caracteriza por su gran resistencia a las condiciones tropicales adversas, su fertilidad y temperamento lechero (Rojas *et al.* 2009). Aunado a ello, esta raza representa una opción para programas de cruzamiento con razas exóticas, que no se adaptan a las condiciones tropicales (Villasmil-Ontiveros *et al.* 2008a).

Esta raza considerada patrimonio nacional, es uno de los recursos genéticos más importantes de Venezuela, y posee su asentamiento principal cerca de la población de Carrasquero al norte del estado Zulia, Venezuela, muy

próximo al río Limón de donde se deriva su nombre (Villasmil-Ontiveros *et al.* 2008b). En la actualidad, el inventario de esta raza no sobrepasa los 600 animales puros, lo que según los indicadores propuestos por la FAO cataloga a esta raza como en peligro de extinción (Scherf, 1997), aunado a este censo reducido, gran parte de los semovientes se encuentran ubicados en una sola explotación por lo que los riesgos de pérdida de la raza por desastres naturales o epidemias se incrementan notablemente (Villasmil-Ontiveros *et al.* 2008a).

Estas poblaciones autóctonas suponen una fuente de información genética interesante, que hoy es desconocida y que podría resultar esencial para los estudios de estas razas y su potencial en la producción animal, ya que podría ser una fuente de variantes génicas únicas y valiosas (Uffo *et al.* 2006).

A pesar de todas las potencialidades indicadas en el Criollo Limonero, su principal amenaza es la poca utilización en los sistemas de producción nacional, ya que ha ido siendo desplazada por razas especializadas. De allí el interés en su caracterización molecular, en la búsqueda de algunas variantes génicas valiosas, que le permita un mayor uso y difusión y evitar así su extinción. Por esta razón, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes kappa-caseína (CSN3), beta-lactoglobulina (BLG), calpastatina (CAST) y calpaina (CAPN).

Material y métodos

El ADN se extrajo de muestras de sangre de 163 individuos (44 machos y 119 hembras), las cuales fueron tomadas de la vena yugular, utilizando la metodología descrita por Aranguren *et al.* (2002). Los fragmentos amplificados y su genotipificación fueron llevadas a cabo mediante la técnica PCR-RFLP, utilizándose para su digestión las enzimas *HaeIII*, *HinfI*, *XmnI* y *Tth111I*, para la BLG, CSN3, CAST y CAPN, respectivamente, según lo descrito por varios autores (Chung *et al.* 2001, Curi *et al.* 2009, Medrano y Aguilar-Cordoba, 1990, Rojas *et al.* 2009).

El cálculo de las frecuencias génicas y alélicas se realizó por conteo directo, y el equilibrio de Hardy Weinberg se determinó mediante la prueba χ -cuadrado (SAS, 2002).

Resultados y discusión

Todos los cuatro genes estudiados (CSN3; BLG, CAST y CAPN30), mostraron tres genotipos en la población de Criollo Limonero (Tabla I). Las frecuencias obtenidas del locus de la CSN3 correspondieron a 0,11 para el homocigoto AA; 0,56 para el heterocigoto AB y 0,33 para los homocigotos BB y frecuencias alélicas de 0,39 para el alelo A y 0,61 para el alelo B, estando dicho gen en equilibrio H-W. Como se puede apreciar, en este estudio, la variante B de la CSN3 fue más predominante, presentando una frecuencia de 0,61 mientras que la del alelo A correspondió a tan sólo 0,39. Estos valores en las frecuencias alélicas resultaron ser bastante similares a lo obtenido en otras razas locales, tales como la Rubia Gallega, Chaqueño Boliviano y al ganado N'Dama Africano (Lirón *et al.* 2002, Viana *et al.* 2002). No obstante, difiere a lo obtenido en otras razas locales del continente americano tales como: Criollo del Perú, Criollo Uruguayo, Criollo Pantaneiro, Criollo Cubano, Criollo Argentino, Saavedreño, y Chusco (Lara *et al.* 2002, Liron *et al.* 2002, Postiglioni *et al.* 2002, Uffo *et al.* 2006, Ripoli *et al.* 2003). Estudios previos indican que, a pesar de la existencia de varios alelos de la CSN3 en razas bovinas, han sido los alelos A y B los más comunes y se encuentran en la mayoría de las razas bovinas en proporciones variables, siendo más frecuente el alelo A en las razas altas productoras de leche y la variante B, en cambio es más frecuente en razas menos productoras o más lecheras-mantequeras (Lirón *et al.* 2002, López y Vásquez, 2004 y Ripoli *et al.* 2003).

Tabla I. Frecuencias génicas y genotípicas para BLG, CSN3, CAST y CAPN en ganado Criollo Limonero (*Allelic and genotypic frequencies of BLG, CSN3, CAST y CAPN gene in Criollo Limonero cattle breed*)

Gen	N	Frecuencia Alélica		Frecuencia Genotípica			EHW
		A	B	AA	AB	BB	P
BLG	163	0,22	0,78	0,07	0,29	0,64	P > 0.05
CSN3	163	0,39	0,61	0,11	0,56	0,33	P > 0.05
CAST	157	0,85	0,15	0,84	0,03	0,13	P < 0.05
		A	G	AA	AG	GG	
CAPN	157	0,43	0,57	0,15	0,56	0,29	P > 0.05

En el caso de la BLG, las frecuencias genotípicas obtenidas fueron 0,07; 0,29 y 0,64 para los genotipos AA, AB y BB, respectivamente, correspondiendo por lo tanto con frecuencias alélicas o génicas de 0,22 y 0,78 para los alelos A y B, respectivamente; encontrándose dicho gen en EHW. Al igual que en la CASN3, el genotipo más frecuente fue el BB, seguido del genotipo AB y menos frecuente el genotipo AA, coincidiendo este comportamiento a lo reportado para el Criollo Saavedreño, Siboney, Cebú Cubano y Guernsey, no obstante, difieren claramente con lo encontrado en los Criollos Patagónico, Chaqueño, Yacumeño, Chusco y Uruguayo, los cuales presentaron menores valores para el genotipo BB (Liron *et al.* 2002, Postiglioni *et al.* 2002, Ripoli *et al.* 2003, Uffo *et al.* 2006, Van Eenennaam y Medrano, 1991).

Para el gen CAPN, los resultados obtenidos fueron A (0,43) y G (0,78) y las frecuencias genotípicas correspondieron a AA (0,15); AG (0,56) y GG (0,29), encontrándose al igual que los anteriores en EHW para este locus. Mientras que, en el caso de CAST las frecuencias observadas fueron A (0,85) y B (0,15), correspondiendo a frecuencias genotípicas de AA (0,84); AB (0,03) y BB (0,13), los resultados arrojaron que este locus no se encuentra en equilibrio, dando indicios de un número mayor de homocigotos que lo esperado ($P < 0.05$), la posible explicación de este desequilibrio, podría deberse a un efecto de arrastre (auto-stop) mediante selección indirecta de algún carácter correlacionado, ya que en ese rebaño no se selecciona por caracteres de carne.

En el caso de estos dos últimos genes, la literatura indica que los alelos favorables para la terneza son el G para CAPN y el A para CAST (Casas *et al.* 2006, Juszczuk-Kubiak *et al.* 2009, Schenkel *et al.* 2006), de ello, se puede inferir que el Criollo Limonero posee potencial para carnes tiernas, debido a la existencia de una alta variabilidad genética. A la luz de los hallazgos obtenidos, en la cual se encontró mayor frecuencia del alelo B para las proteínas lácteas k-CN y BLG en el ganado Criollo Limonero, lo que podría indicar que esta raza tiene alta potencialidad para su utilización en la elaboración de quesos, dado que estas variantes se encuentra vinculada con un incremento en el rendimiento de los quesos, debido a que su leche da un cuajo más firme, con menores tiempos de coagulación, mayor rendimiento y mejor calidad.

Conclusiones

Estos resultados representan un valioso aporte al conocimiento de esta raza local, que hasta ahora había sido seleccionada hacia la explotación láctea mayoritariamente, sin embargo, representa una excelente alternativa también para los sistemas dirigidos a la industria cárnica, lo que podría ayudar a su utilización en los sistemas de ganadería comercial del país y de la región, que se caracteriza por ser de doble propósito (carne y leche).

Las altas frecuencias de los alelos B de la CSN3 y BLG indican una potencialidad hacia dirigir su leche a la producción de quesos, mientras que los genes de carne favoreció a los genes A de la CAST y G de la CAPN, una combinación que le dan un potencial para carnes blandas; estos hallazgos aunado a su alta capacidad de adaptación y resistencia al trópico lo convierte en un animal potencial para cruzamientos o explotación de forma pura bajo programas estrictos de selección y mejora.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento de la presente investigación (CC-0262-10).

Bibliografía

- Aranguren-Méndez, J., J. Jordana, R. Avellanet, M. Torrens. (2002) Estudio de la variabilidad genética en la raza bovina Mallorquina para propósitos de conservación. *Rev. Científ. FCV-LUZ*. XII (5): 358-366
- Casas, E., S.N. White, T.L. Wheeler, S.D., Shackelford, M. Koohmaraie, D.G. Riley, J.C.C. Chase, D.D. Johnson, T.P. Smith. (2006) Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.* 84:520-525.
- Chung, H.Y., M.E Davis, H.C. Hines. (2001) Genetic variants detected by PCR-RFLP in intron 6 of the bovine Calpastatin gene. *Anim. Genet.* 32: 40-53.
- Curi, R., L. Loyola, M. Mason, M. Arrigoni, A. Silveira, H. Nunes. (2009) Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and their crosses with *Bos taurus*. *Anim. Genet.* 40: 456-462.
- Juszczuk-Kubiak, E.; K. Flisikowski, K. Wicinska, J. Poloszynowicz, S. Rosochacki. (2009) Identification of the new polymorphisms in the promoter region of the CAST gene in cattle. *Meat Science.* 82: 278–283.

- Lara, M.; L. Gamma, G. Bufarah, J. Sereno, E. Colegado, U. Abreu. (2002) Genetic polymorphisms at the k-casein locus in Pantaneiro cattle. *Arch. Zoot.* 51: 99-105.
- Liron, J., M. Ripolli, J. Luca, P. Peral, G. Giovambattista. (2002) Analysis of genetic diversity and population structure in Argentine and Bolivian creole cattle using five loci related to milk production. *Genet. Molec. Biol.* 25(4): 413-419.
- López, E., N. Vásquez. (2004) Determinación del sexo y genotipificación del gen de la K-caseína en embriones bovinos. *Rev. Col. Cien. Pec.* 17:231-240.
- Medrano, J., E. Aguilar-Cordova. 1990. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Biotechnol.* 8:144-146.
- Rojas, I.; J. Aranguren-Méndez, M. Portillo, Y. Villasmil-Ontiveros, E. Valbuena, X. Rincón, G. Contreras, L. Yáñez. (2009) Genetic Polymorphism of Kappa-Casein in Creole Limonero Bovine. *Rev. Científ. FCV-LUZ.* XIX(6): 645-649.
- Postiglioni A., G. Rincón, L. Nelly, S. Llambi, G. Fernandez, M. D'angelo, G. Gagliardi, J. Trujillo, M. Bethencourt, K. Guevara, A. Castellano, M. Arruga. (2002). Biodiversidad genética en bovinos criollos del Uruguay. Análisis con marcadores moleculares. *Arch. Zoot.* 51: 195-202.
- Ripoli, M., P. Corva, A. Antonini, J. De Luca, F. Rojas, F. Dulout, G. Giovambattista. (2003) Asociación entre cinco genes candidatos y producción de leche en la raza criolla Saavedreña. *Arch. Zoot.* 52: 89-92.
- Schenkel F.S.; S.P. Miller, Z. Jiang, I.B. Mandell. (2006) Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84:291-299.
- Statistical Analysis System Institute. (2002) The SAS system for windows. Cary. University North of Caroline. USA. Versión 9.2.
- Uffo O., I. Martin, S. Martinez, R. Ronda, R. Osta, C. Rodellar, P. Zaragoza. (2006) Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. *AGRI.* 39: 15-24.
- Scherf, B. (1997) Lista Mundial de Vigilancia para la Diversidad de los Animales Domésticos. (2a Ed.). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 222 pp.
- Van Eenennaam, A., J. Medrano. (1991) Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74: 1730-1742.
- Viana J., A. Fernández, A. Iglesia, L. Sánchez, J. Becerra. (2001) Análisis de los genotipos más frecuentes de la k-caseína en la raza vacuna Rubia Galega mediante PCR/RFLPs. *Arch. Zoot.* 50: 91-96.
- Villasmil-Ontiveros, Y.; R. Román-Bravo, L. Yáñez-Cuellar, G. Contreras, J. Jordana, J. Aranguren-Méndez, J. (2008a). Diversidad genética de la raza criollo limonero utilizando marcadores de ADN microsátélites. *Rev. Científ. FCV-LUZ.* XVIII (4): 415-423.
- Villasmil-Ontiveros, Y.; Aranguren-Méndez, J.; Román-Bravo, R.; Isea, W.; Contreras, G.; Zambrano, S.; Jordana, J. (2008b). Pedigree analysis in Criollo Limonero. *Rev. Científ. FCV-LUZ.* XVIII(3): 284-290.