

# POLIMORFISMOS DE LOS GENES CALPAINA Y CALPASTATINA EN DIEZ RAZAS BOVINAS CRIOLLAS MEDIANTE SIETE MARCADORES DE POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDOS SIMPLE (SNPS)

## POLYMORPHISMS OF CALPAIN AND CALPASTATIN GENES IN TEN CREOLE CATTLE BREEDS USING SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPS)

Cuetia J. A.<sup>1\*</sup>, Posso A. M.<sup>1</sup>, Hernandez D. Y.<sup>1</sup>, Ariza M. F.<sup>2</sup>, Muñoz J. E.<sup>1</sup>, Alvarez L. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Laboratorio de Biología Molecular. \*jacuetial@unal.edu.co

<sup>2</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

### Abstract

Most of the important characteristics in animal production are controlled by several genes and its expression depends on the interaction of several pairs of genes with effects under the characteristic in different proportions. Two of the genes with major importance in production, composition and meat quality are Calpain (CAPN1) and Calpastatin (CAST). The main aim of this study was to estimate allelic and genotypic frequencies of different SNPs for CAPN1 and CAST genes, in order to be compared with commercial breed's frequencies using techniques Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). At moment, 30 DNA samples from each GCC have been used. Fragments of 731bp, 568bp, 144bp, 224bp, 177bp and 269bp have been amplified for CAPN316, CAPN530, CAPN4751, CAPN4753, CAPN5331 and CAST2959 markers. Using PCR-RFLP has been genotyped marker CAPN4751 where the most frequent genotype was the heterozygous (CT) with 67% and marker CAST2959 which showed highest frequency of allele (A) with 67%. The favorable alleles variants for tenderness of the meat (C in CAPN4751 and A in CAST2959) are appreciably segregated in the population sampled

### Palabras clave:

Calidad de la carne  
Ganado  
Caracterización genética

### Keywords:

Meat quality  
Cattle  
Genetic characterization

### Resumen

Las características de importancia económica en las especies de producción animal son en su mayoría cuantitativas, su expresión depende de la interacción de muchos pares de genes que tienen efecto sobre la característica en diferentes proporciones. Dos de los genes de mayor importancia para la producción, composición y/o calidad sanitaria de la carne son Calpaína (CAPN1) y Calpastatina (CAST). El objetivo del presente trabajo es estimar las frecuencias alélicas y genotípicas de los diferentes SNPs en los genes CAPN1 y CAST en el ganado criollo colombiano, para ser comparadas con la frecuencias de los ganados importados, mediante las técnicas Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP). Se está trabajando con 30 muestras de ADN de cada raza bovina criolla. Se han amplificado los marcadores CAPN316, CAPN530, CAPN4751, CAPN4753, CAPN5331 Y CAST2959. Mediante la PCR-RFLP se ha genotificado el marcador CAPN4751 donde el genotipo más frecuente fue el heterocigoto (CT) con 67% y el marcador CAST2959 el cual presento la mayor frecuencia para el alelo (A) con 67%. Las variantes alélicas favorables para suavidad de la carne (C en CAPN4751 y A en CAST2959) son segregados de manera importante en la población

### Introducción

Colombia es considerado uno de los países más diversos en recursos zoogenéticos, posee diez razas bovinas criollas (*Bos taurus*) adaptadas, las cuales han demostrado un alto potencial genético, expresan características adaptativas de gran importancia como tolerancia al calor y humedad, así como resistencia a ciertas enfermedades, mejores rendimientos en canal y una mejor eficiencia alimenticia lo cual incrementa su valor como recurso genético. Martínez (1992) señala que los bovinos criollos se caracterizan por su habilidad para reproducirse, longevidad, rusticidad y por su capacidad para aprovechar forrajes toscos y de escaso valor nutritivo (Casas y Valderrama, 1998; Vásquez, 2005). El desarrollo de programas de mejoramiento genético a principios de los años 90, orientados principalmente sobre criterios de producción: cantidad de producción de leche o rendimiento en canal para la producción de carne, llevó a someter a las razas criollas a constantes

cruzamientos graduales de absorción hacia ganado cebuino o taurino, ocasionando disminución en las poblaciones puras e introgresión con razas foráneas tanto *Bos taurus* como *Bos indicus* (Neira, 2011; Martínez, 1999). En los últimos años estudios a nivel genómico del bovino han hecho posible predecir su valor genético, en particular el potencial para transmitir caracteres deseados en su descendencia, inclusive caracteres difíciles de evaluar o poco heredables, por lo que los marcadores moleculares han ayudado en el estudio de la información, funcionando como señaladores de diferentes regiones del genoma. Los grandes tipos de marcadores utilizados en genómica de especies de interés zootécnico son los microsatélites y los SNP, la principal ventaja de los SNP es el desarrollo actual de herramientas de genotipaje de alta resolución y el relativo bajo costo unitario (Neira, 2011). Las características de importancia económica en las especies de producción animal son en su mayoría cuantitativas, y aunque su herencia no riñe con las leyes descritas por Mendel, su expresión depende de la interacción de muchos pares de genes que tienen efecto sobre la característica en diferentes proporciones. Si bien todas las características cuantitativas dependen de muchos genes, en el ganado bovino no se conoce con exactitud cuántos y cuáles genes están involucrados directamente en cada una de las características de importancia económica (Echeverri *et al.*, 2011). Algunos de los genes de mayor importancia para la producción, composición y/o calidad sanitaria de la carne son Calpaína (CAPN) y Calpastatina (CAST), por presentar variantes alélicas que se asocian con caracteres productivos de calidad de la carne. La Calpaína, es una proteína responsable de la proteólisis *postmortem* en la carne (Koohmaraie, 1996; Koohmaraie *et al.*, 2005), se han identificados varios SNP en el gen de  $\mu$ -CAPN que se asocian con características de importancia económica (Page *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2006). Esta proteasa está involucrada en el desarrollo muscular, pero la mayor importancia económica se le ha otorgado a su efecto en el grado de terneza de la carne (Koohmaraie *et al.*, 1994; Geesink *et al.*, 1999; Geesink *et al.*, 2000; Riley *et al.*, 2003). La calpastatina se localiza en el cromosoma bovino 7 (Bishop *et al.*, 1994), y está organizado en 35 exones y sus respectivos intrones, abarcando aproximadamente 130kb se considera un gen candidato, ya que se sabe que actúa como inhibidor natural de las calpaínas en el sistema de proteólisis de estas en la carne (Koohmaraie, 1996).

Los genes descritos anteriormente han sido ampliamente valorados por la comunidad científica dedicada a la investigación genética, por lo que el objetivo del presente trabajo es estimar las frecuencias alélicas y genotípicas en el ganado criollo Colombiano y compararlas con la frecuencias en los ganados importados.

### Material y métodos

Se utilizaron 30 muestras de cada una de las razas de ganado criollo y colombiano (Blanco Orejinegro, Caqueteño, Chino Santandereano, Costeño con cuernos, Casanareño, San Martinero, Romosimano, Velásquez y Lucerna y Hartón del Valle), pertenecientes al banco de DNA del Laboratorio de Genética de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. El DNA se visualizó en geles de agarosa (0.8%), teñidos con bromuros de etidio. Para las muestras de ganado comercial, se tomaron 20 muestras de sangre: Simental (10), Angús (6) y Cebú (4). Las muestras fueron mantenidas en tubos de ensayo con anticoagulante EDTA, refrigeradas hasta su traslado al Laboratorio de Genética Animal para su procesamiento. El DNA se extrajo mediante el protocolo de *Salting Out*, la calidad y cantidad de DNA se evaluó en geles de agarosa (0.8 %), teñidos con bromuro de etidio. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen de 25  $\mu$ l, usando 10ng de ADN molde, y con las siguientes condiciones: 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2  $\mu$ M de cada dNTP, 0,2  $\mu$ M cada cebador y 0,5 U Taq polimerasa. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 95 °C y 2 min a 72°C, una extensión final de 10 min a 72°C. El volumen de DNA y la temperatura de hibridación variaron de acuerdo a cada marcador. Para la detección de polimorfismos utilizó la técnica PCR-RFLP. Para la digestión de los marcadores CAPN4751 y CAST2959 se tomaron 8  $\mu$ l del producto amplificado, 2 U de las enzimas de restricción BsaJI y DdeI respectivamente, 1X del buffer, a temperaturas de 55°C y 37°C respectivamente, durante 3 horas. Los análisis del RFLP fueron realizados en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio. Las frecuencias alélicas y genotípicas se realizaron mediante el programa Arlequin.

### Resultados y discusión

Actualmente se han estimado las frecuencias alélicas en los genes CAPN y CAST, los cuales han sido previamente reportados por su asociación con la terneza de la carne bovina en razas *B. taurus*, *B. indicus* y sus cruces (Buchanan *et al.*, 2002; Casas *et al.*, 2006; Page *et al.*, 2002; White *et al.*, 2005). Se amplificaron los marcadores CAPN316, CAPN530, CAPN4751, CAPN4751, CAPN5331 y CAST2959 en la población de animales estudiada, obteniéndose fragmentos de 731bp, 568bp, 144bp, 224bp, 177bp y 269bp respectivamente. La tipificación de los genotipos hasta el momento se ha realizado para el marcador CAPN4751 y CAST2959.

El marcador CAPN4751 que se asocia significativamente con FCWB (Fuerza de Corte de Warner Bratzler) es una transición de Citocina por Timina en la posición 6545 del intrón 17 del gen (White *et al.* 2005). La presencia del alelo C (Citocina) en forma homocigótica o heterocigótica para este marcador, ha demostrado que disminuye la FCWB (Casas *et al.*, 2005; Page *et al.*, 2004; Parra-Bracamonte *et al.*, 2009; White *et al.*, 2005).

En el presente estudio el marcador CAPN4751 presentó una frecuencia alélica de 38% para el alelo (C) favorable para este marcador, en donde el 67% de los genotipos fueron heterocigotos (tabla I). White (2005) reportó una frecuencia del 10,8% para el alelo C en una población Brahaman, de un 57,5% para una población *Bos taurus* y de un 63,9% para animales de cruce *Bos taurus* x *Bos indicus*. Parra-Bracamonte (2009) reportó en una población de Brahman, 49% para el alelo C donde el 99% de los genotipos fueron heterocigotos. Proponiendo la necesidad de validar, sobre todo en pruebas controladas, el efecto fenotípico puntual que tiene la segregación de las copias alélicas favorables (asociados positiva y significativamente al rasgo cuantitativo) para estos marcadores y ser utilizados en casos particulares de selección, sobre todo considerando la gran variabilidad dentro y entre razas cárnicas y los diferentes ambientes de manejo en los que se crían, pero sobre todo debido a la naturaleza poligénica de esta característica de naturaleza cuantitativa.

**Tabla I.** Frecuencias genotípicas y alélicas globales de los SNPs CAPN4751 y CAST2959 (*Genotypic and allelic frequencies global of SNPs CAST2959 and CAPN4751*)

Marcador	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas	
	CC	CT	TT	C	T
CAPN4751	0,05	0,67	0,28	0,38	0,62
CAST2959	AA	AG	GG	A	G
	0,45	0,43	0,12	0,67	0,33

Barendse (2002) identificó una sustitución de Guanina por Adenina (G/A) en el extremo 3' no traducido del RNAm de CAST (posición 2959 de la secuencia AF159246 del GenBank), estableciendo que el alelo A se asociaba a carne más tierna. Morris *et al.* (2006) analizó este mismo polimorfismo en novillos de distintas razas *Bos taurus*; hallando una diferencia entre los valores de RC del genotipo favorable (AA) y el heterocigoto, de 0,21 a 0,50 kg dependiendo de la raza y el tiempo de maduración de la carne (Motter *et al.*, 2009). El marcador CAST2959 amplificó un producto de 269bp en la población estudiada. La frecuencia del alelo A, favorable para los rasgos de la carne (Barendse 2002) presentó una frecuencia alélica del 67%, con un 43% de genotipos encontrados para el heterocigoto AG, indicando una alta frecuencia del alelo favorable en las muestras evaluadas de ganado criollo Colombiano.

### Conclusiones

El uso de la técnica de PCR-RFLP, para el genotipado de los genes CAPN, CAST bovina, ha demostrado ser robusto y de bajo costo, lo que facilitará en gran medida el análisis de este polimorfismo a través de equipos de laboratorio y reactivos básicos. Se puede recapitular que las variantes alélicas favorables para suavidad de la carne de los marcadores CAPN4751 y el CAST2959 de los genes  $\mu$ -CAPN y CAST hasta el momento estudiados son segregadas de manera importante en la población de ganado criollo colombiano. Por lo tanto, estos pueden representar una herramienta para evaluaciones futuras y aplicación en la mejora genética asistida por marcadores de la población criolla nacional, incluyendo a los criterios actuales de selección y evaluación genética (ganancia de peso), características como la suavidad de la carne que podrían incentivar un nuevo mercado de consumo nacional e internacional. Finalmente, la caracterización molecular de los recursos genéticos locales puede ser una base para diseñar programas futuros de selección y para validar tecnología previamente desarrollada, con lo que se reducen los costos y tiempo de diseño experimental.

### Bibliografía

- Bishop MD, Kappes SM, Keele W, Stone RT, Sunden SLF, Hawkins GA, Toldo SS, Fries R, Grosz MD, Yoo J, and Beattie C.W.. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics*. 136:619-639.
- Casas, I; Valderrama, M. (1998). El bovino Criollo Hartón del Valle. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. ASOHARTON. Palmira. 54 p.

- Casas E., White S. N., Wheeler T. L., Shackelford S. D., Koohmaraie M., Riley D. G., Chase C. C., Johnson Jr., D. D and Smith T. P. L. (2006). Effects of calpastatin and  $\mu$ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J Anim Sci.* 84:520-525. <http://jas.fass.org/cgi/content/full/84/3/520>
- Echeverri J. J., Lopez H. A., Quijano J. H. (2011). Estimación de valores genéticos de toros lecheros en Colombia, análisis de metodologías y proyección futura. I Congreso Internacional Marcadores Moleculares en Producción Animal. Revista Facultad de Agronomía, Medellín. Colombia
- Geesink, G. H., y M. Koohmaraie. (1999). Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by  $\mu$ -calpain under postmortem conditions. *J. Anim. Sci.* 77:2685.
- Koohmaraie, M. (1996). Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Sci.* 43:S193.
- Martínez, C.G. (1992). El ganado criollo colombiano blanco orejinegro (BON) Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Villavicencio, Meta, COLOMBIA. En animal genetic resources información. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) Y Programa de la Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP).
- Martínez, G. (1999). Censo y caracterización de los sistemas de producción de ganado criollo colombiano. Fondo Nacional del Ganado, ICA, Pronatta, Asobon.
- Montoya A. A., Cerón M. F., Trujillo B. E., Ramirez T. E., Angel M. P. (2009). Frecuencia de los marcadores del gen leptina en razas bovinas criollas y colombianas: I. Romosinuano, chino santandereano, sanmartinero y velásquez. *Rev. Cient. (Maracaibo)* v.19 n.1 Maracaibo.
- Neira J. A. (2011). Las nuevas estrategias de selección animal gracias a la genómica “Modelos comercial actual Holstein”. I Congreso Internacional Marcadores Moleculares en Producción Animal. Revista Facultad de Agronomía, Medellín. Colombia.
- Page B. T., Casas E., Heaton M. P., Cullen N. G., Hyndman D. L., Morris C. A., Crawford A. M., Wheeler T. L., Koohmaraie M., Keele J. W. and Smith T. P. L. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *J Anim Sci.* 80:3077-3085. <http://jas.fass.org/cgi/content/full/80/12/3077>
- Page B. T., Casas E., Quaas R. L., Thallman R. M., Wheeler T. L., Shackelford S. D., Koohmaraie M., White S. N., Bennett G. L., Keele J. W., Dikeman M. E. and Smith T. P. L. (2004). Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires *J Anim Sci.* 82:3474-3481. <http://jas.fass.org/cgi/content/full/82/12/3474>
- Riley D.G., C.C. Chase, Jr., T.D. Pringle, R.L. West, D.D. Johnson, T.A. Olson, A.C. Hammond, y S.W. Coleman. (2003). Effect of sire on  $\mu$ - and m-calpain activity and rate of tenderization as indicated by myofibril fragmentation indices of steaks from Brahman cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 2440.
- Stone, R. T., Kappes, S. M., Beattie, C.W. (1996). The bovine homologue of the obese gene maps to chromosome 4. *Mammal Gen.* 7:399-400.
- Vasquez, A. HJ. (2005). Conservación y utilización de las razas bovinas criollas y colombianas para el desarrollo rural sostenible. *Arch Zootec* 54: (206) 141-144.
- White S. N., Casas E., Wheeler T. L., Shackelford S. D., Koohmaraie M., Riley D. G., Chase C. C., Johnson Jr., D. D., Keele J. W. and Smith T. P. L. (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.* 2005. 83:2001–2008.