

# TIPIFICACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE LOS GENES CALPAINA, CALPASTATINA Y LEPTINA EN BOVINOS CRIOLLOS COLOMBIANOS

## ALLELIC AND GENOTYPIC FREQUENCIES OF CALPAIN, CALPASTATIN AND LEPTIN IN COLOMBIAN CREOLE CATTLE

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

<sup>1</sup>Grupo de Recursos Zoogenéticos, Departamento de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, A.A 237, Colombia. \*jacuetial@unal.edu.co

<sup>2</sup>Grupo Genética Molecular Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá A.A 76948, Colombia.

### Abstract

The Calpain (CAPN1), Calpastatin (CAST) and Leptin (LEP) genes are considered of substantial importance for the production, composition and/or sanitary quality of the meat. In order to assess the allele and genotype frequencies of genes, seven SNPs were evaluated in 300 DNA samples from eight Colombian Creole Cattle breeds, two synthetic breeds and 55 individuals from four commercial breeds. The allele frequencies of genes reported as associated with meat tenderness like Calpain gene were: 21% for the C allele of CAPN1316, 64% for the allele G of CAPN1530, 55% for the allele C of CAPN14751 and 41% for the allele A of CAPN15331. For Calpastatin gene the allele frequencies were: 66% for the allele A of the marker 2959 and 39% for the allele C of the marker CAST/*XmnI*. On the other hand, the proportion of varying T of the gene LEP and reported to be associated with marbling was of 53%. The results indicate that the Colombian Creole Cattle besides being fully adapted to the environmental conditions, resistant to parasites and with docile temperament, they also present alleles of interest associated to meat quality traits that can be useful for programs of animal breeding and conservation.

### Keywords:

Genetic diversity  
Meat quality  
Molecular markers

### Palabras clave:

Calidad de carne  
Diversidad genética  
Marcadores moleculares

### Resumen

Los genes de la Calpaína (CAPN1), la Calpastatina (CAST) y la Leptina (LEP) son de una gran importancia para la producción, composición y/o calidad sanitaria de la carne. Para tipificar las frecuencias, alélicas y genotípicas, de estos genes se evaluaron siete marcadores de tipo SNP en 300 muestras de ADN de ocho razas bovinas criollas, dos razas sintéticas colombianas y 55 muestras de cuatro razas comerciales. Las frecuencias de las variantes alélicas de interés, relacionadas con la terneza de la carne en el gen de la Calpaína fueron: 21% para el alelo C de CAPN1316, 64% para el alelo G de CAPN1530, 55% para el alelo C de CAPN14751 y 41% para el alelo A de CAPN15331. Para el gen de la Calpastatina fueron: 66% para el alelo A de 2959 y 39% para el alelo C de CAST/*XmnI*. La proporción de la variante T del gen LEP, relacionada con el veteado marmóreo de la carne, fue del 53%. Los resultados indican que los bovinos criollos colombianos además de estar plenamente adaptados a las condiciones ambientales, ser resistentes a parásitos y poseer un temperamento dócil, también presentan alelos de interés en cuanto a características de calidad de la carne, que pueden ser de gran utilidad para los programas de mejoramiento y conservación.

### Introducción

La población de las razas bovinas criollas y colombianas, evaluada en el censo del año 1999 fue de 18.231 animales, que corresponde al 0,08% de la población total de bovinos del país (Martínez, 2010). Para que las razas criollas sean valoradas y se asegure su permanencia se deben determinar sus características favorables. Existe un creciente interés por definir la calidad de la carne debido a que el consumidor es más exigente en calidad e inocuidad de los alimentos. El desarrollo de marcadores genéticos relacionados con la terneza y palatabilidad de la carne, está siendo incentivado por el mercado consumidor, debido a la dificultad para

identificar animales con características deseables (Lara *et al.*, 2005). Recientemente, se han reportado SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*) en las proteínas Leptina, Calpaína y Calpastatina, asociados con calidad de la carne; el conocimiento de la frecuencia y del polimorfismo de estos genes es importante porque permite generar una base de información útil para desarrollar programas de conservación y mejoramiento genético. La Calpaína (CAPN1) y la Calpastatina (CAST) tienen gran importancia para la producción, composición y/o calidad sanitaria de la carne, porque poseen variantes alélicas relacionadas con estos caracteres (Koochmarai *et al.*, 2005). Las calpaínas son consideradas como las principales proteínas responsables de los cambios de degradación que ocurren durante la maduración *post mortem* de la carne a bajas temperaturas (Thompson *et al.*, 2006). La calpastatina es el único inhibidor endógeno de las calpaínas (Motter *et al.*, 2009). Las cantidades de veteado marmóreo y deposición de grasa están influenciadas por la hormona leptina, codificada por el gen Leptina (LEP) secretada por el tejido adiposo, que regula el apetito y la composición corporal y es predictor de peso corporal (Houseknecht *et al.*, 1998). Debido a la gran diversidad de ganados criollos de Colombia y la manifiesta importancia de su conservación, el objetivo del presente trabajo se ha centrado en estimar las frecuencias alélicas y genotípicas de siete polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en los genes  $\mu$ -Calpaína (CAPN1), Calpastatina (CAST) y Leptina (LEP), mediante las técnicas moleculares de PCR-RFLP y PCR-SSCP.

### Materiales y métodos

Se utilizaron 300 muestras de ADN, de ganado criollo colombiano (GCC), de las razas Blanco Orejinegro (BON), Casanareño (CAS), Costeño con Cuernos (CCC), Chino Santandereano (ChS), Caqueteño (CQT), Hartón del Valle (HV), Lucerna (LUC), Romosinuano (ROMO), San Martinero (SM) y Velásquez (VEL) y 55 muestras de ganado comercial Brahmán (BR), Angus rojo (AR), Charolais (Ch), Simmental (SMT). Para el gen CAPN1 (Accession GenBank AF248054 y AF252504) se seleccionaron los marcadores CAPN1316 (C/G), CAPN1530 (A/G), CAPN4751 (C/T) y CAPN5331 (A/T), para el gen CAST, los SNPs CAST2959 (A/G) y CAST/Xmn1 (C/T) (Chung *et al.*, 2001) y para el gen LEP el SNP PB (C/T) (Accession GenBank No. AF120500) (Buchanan *et al.*, 2002). Los productos amplificados fueron genotipados mediante PCR-RFLP y PCR-SSCP. Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas, y las Heterocigosis esperada (He) y observada (Ho), con el programa ARLEQUIN versión 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010).

### Resultados y discusión

Para el gen CAPN1 se evaluaron los SNPs CAPN1316, CAPN1530, CAPN14751 y CAPN15331. Los SNPs 316 y 530, (Page *et al.*, 2004), han demostrado tener mérito de predicción de la terneza en *Bos taurus* y la presencia de las variantes alélicas C y G se han asociado con una reducción en la fuerza de corte Warner Bratzler (FCWB). En el presente estudio, la frecuencia del alelo C de CAPN1316 fue del 21%, y la del alelo G de CAPN1530 del 64%, encontrándose en este último un alto porcentaje de heterocigotos (65%). Por otro lado, White *et al.* (2005), asociaron significativamente ( $P < 0.01$ ) el alelo C del marcador CAPN14751 con menor fuerza de corte WBSF al día 14 *post mortem*; en la población GCC se encontró una frecuencia media de la variante alélica C del 55%, siendo CCC, LUC, ROMO y SM las que presentaron mayores frecuencias en comparación con las razas comerciales. Ariza *et al.* (2011) reportaron que el alelo A del marcador 5331 estaba asociado con menor fuerza de corte a los 7 días *post mortem* en cruces *Bos taurus* con *Bos indicus*; en el presente estudio el alelo A se encontró en una frecuencia del 41.9% con un 79% de heterocigotos, en contraste con lo reportado por White *et al.* (2005), que encontraron una frecuencia alélica de A de tan solo el 7.3%, en animales mestizos con *Bos indicus*. El gen CAST fue evaluado mediante los marcadores 2959 y CAST/Xmn1. El SNP 2959 tuvo una frecuencia del alelo A del 66.8% y el genotipo de interés (AA) fue superior al 80% en CCC, SM y AR. El genotipo AA se ha asociado con características de calidad de la carne (Casas *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2006; Curi *et al.*, 2009) y se presenta con mayor frecuencia en animales *Bos taurus* que en *Bos indicus*. Juszczuk *et al.* (2008), en el intrón 12 del gen CAST, demostraron la existencia de asociación de tres polimorfismos (T/C posición 3893+155, T/A posición 3893+223 y A/G posición 3893+428) con la capacidad de retención de agua, la pérdida por goteo, la fuerza de penetración y la fuerza de corte, y observaron que la carne de los animales portadores del genotipo CAG/CAG fue más tierna. Este estudio solo incluyó el polimorfismo T/C (posición 3893+155), donde el alelo C es reportado como informativo. La frecuencia encontrada del alelo C fue del 39%. El alelo T del gen LEP se ha relacionado con consumo de alimento, ganancia de peso, porcentaje de grasa en la canal y mayor peso al año de los animales (Buchanan *et al.*, 2002; Cerón *et al.*, 2009). En el ganado criollo colombiano la frecuencia del alelo T fue del 53%, con un 88% de

genotipos heterocigotos. Cerón *et al.* (2009), en bovinos cruzados de criollo Blanco Orejinegro y Romosinuano con las razas Angus y Cebú, encontraron que el genotipo TT tuvo mayor espesor de grasa de cadera (EGC) y mayor peso corporal al año (PA).

### Conclusiones

La población de ganado criollo colombiano (GCC) presenta elevadas frecuencias de los alelos de interés G y A en los marcadores CAPN1530 y 2959, asociados con la terneza de la carne. Con excepción de CAPN1316, el alelo favorable se halló a mayores frecuencias en las poblaciones criollas que en las razas comerciales; sin embargo, debido al pequeño tamaño de muestra de estos últimos, esta diferencia no se puede generalizar. Los elevados porcentajes de frecuencias encontradas en el GCC pueden representar una valiosa herramienta para evaluaciones futuras, y su aplicación práctica en el mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares en la población bovina nacional.

### Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del trabajo y a los productores de ganado criollo que posibilitaron la formación del banco de ADN.

### Financiación

Este trabajo fue financiado con recursos aportados por la División de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira (DIPAL) y por la Convocatoria nacional de investigación y de creación artística de la Universidad Nacional de Colombia 2010 – 2012. Modalidad 2: Fortalecimiento a grupos de investigación y creación artística con proyección nacional. Alianzas de grupos (código 12658)

### Bibliografía

- Ariza, M. F., Castro, S., Ríos, M., García, N., Bedoya, M. C., Manrique, C., Leal, J., Ortiz, Y., Sierra, M. & Jiménez A. 2011. Asociación de polimorfismos de nucleótido simple de los genes Calpaína (CAPN1) y Calpastatina (CAST) con terneza de la carne en ganado Cebú y sus cruces. Resumen. XI Encuentro nacional de investigadores de las ciencias pecuarias ENICIP. Rev Colombiana ciencias pecuarias. Vol. 24:3. Pag. 436-437.
- Buchanan F.C., Fitzsimmons C.J., Van Kessel, A.G., Thue T.D., Windkelman-Sim D.C. & Schmutz S.M. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. Genetic Science Evol. Vol. 34. Pag. 105-116.
- Casas E., White S. N., Wheeler T. L., Shackelford S. D., Koohmaraie M., Riley D. G., Chase C. C., Johnson Jr., D. D & Smith T. P. L. 2006. Effects of calpastatin and  $\mu$ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. Journal Animal Science. Vol. 84. Pag. 520-525. <http://jas.fass.org/cgi/content/full/84/3/520>
- Cerón M., Montoya A., Trujillo E., Ramírez E. & Monsalve Z. 2009. Marcadores del Gen Leptina en Bovinos Cruzados con Angus, Cebú, Romosinuano y Blanco Orejinegro. Revista Científica, Vol. XIX. Pag.371-381
- Chung, H.Y., Davis, M.E., Hines, H.C. 2001. Genetic variants detected by PCR-RFLP in intron 6 of the bovine calpastatin gene. Animal Genetics, Vol.32, Pag.53.
- Curi R. A., Chardulo L. A. L., Mason M. C., Arrigoni M. D. B., Silveira A. C. & Oliveira H. N. 2009. Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. Animal Genetics. Vol.40. Pag. 456-462
- Excoffier L. & Lischer H. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. 10: 564-567.
- Houseknecht K. L., Baile C. A., Matteri R. L. & Spurlock M. E. 1998. The biology of leptin: A review. Journal of Animal Science, Nebraska. Vol. 76. Pag. 1405-1420.
- Juszczuk-Kubiak E., Wyszynska-Koko J., Wicinska K. & Rosochacki S. 2008. A novel polymorphisms in intron 12 of the bovine calpastatin gene. Molecular Biology Reports. Vol.35. Pag. 29-35.
- Koohmaraie M., Shackelford S.D. & Wheeler T.L. 2005. Biological bases that determine beef tenderness. University of Bristol, British Society of Animal Science, Eight Annual Langford Food Industry Conference: The Science of Beef Quality; 2005. p.21-25

- Lara M.C., Nardon R.F., Bufarah G, Demarchi J.A., Sereno J.R, Santos S.A. & Abreu U.P. 2005. Polimorfismo del gen Calpaína en Razas Vacunas por la técnica PCR-RFLP. Universidad de Córdoba. Archivos de Zootecnia. Vol. 54. Pag. 209-207.
- Martínez G., 2010. Informe final. Plan nacional de acción para la conservación, mejoramiento y utilización sostenible de los recursos genéticos animales de Colombia. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. MADR. <https://coin.fao.org/cms/media/9/13136863487830/pna02.pdf>
- Morris C.A., Cullen N.G., Hickey S.M., Dobbie P.M., Veenvliet B.A., Manley T.R., Pitchford W.S., Kruk Z.A., Bottema C.D. & 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: 411.
- Motter M.M., Corva P., Krause M., Pérez M. & Soria L. 2009. Rol de la calpastatina en la variabilidad de la terneza de la carne bovina. *Journal of Basic & Applied Genetics.* Vol. 20. Pag. 15-24.
- 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. & 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>
- White S. N., Casas E., Wheeler T. L., Shackelford S. D., Koohmaraie M., Riley D. G., Chase C. C., Johnson Jr., 189 D. D., Keele J. W. & Smith T. P. L. 2005. A new single nucleotide polymorphism in *CAPN1* extends 190 the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *J. Anim. Sci.* 2005. 83:2001–2008.