

## DETECCIÓN DE SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS EN GENES RELACIONADOS CON LA TERNEZA DE LA CARNE (CAPN1 Y CAST) EN LAS RAZAS BOVINAS AUTÓCTONAS ESPAÑOLAS

**Avilés C.<sup>1</sup>, Azor P.J.<sup>1</sup>, Membrillo A.<sup>1</sup>, Dorado G.<sup>2</sup>, Álvarez F.<sup>3</sup>,  
Fernández I.<sup>3</sup>, Pérez J.A.<sup>3</sup>, Molina A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Grupo MERAGEM. Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España. E-mail: agr158bovinos@gmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. España.

<sup>3</sup> Asociación Nacional de Criadores de Ganado Vacuno Selecto de Raza Retinta. España.

### INTRODUCCIÓN

Los avances en genética molecular en las últimas décadas han permitido la identificación de gran cantidad de marcadores genéticos asociados con genes que afectan a caracteres de interés en producción ganadera, incluyendo genes simples con efectos importantes en el fenotipo o QTL (regiones genómicas que afectan a caracteres cuantitativos) (Dekkers, 2004).

Estas nuevas tecnologías han proporcionado herramientas con un gran potencial para mejorar la respuesta a la selección, especialmente cuando se trata de caracteres que son difíciles de mejorar a partir de prácticas convencionales por su baja heredabilidad o porque los métodos para cuantificar su expresión son caros, destructivos, poco precoces en la vida del animal o difíciles de llevar a cabo.

El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar a las razas bovinas autóctonas mejoradas para los genes que codifican al enzima  $\mu$ -calpaína y a su inhibidor (calpastatina), genes éstos vinculados al carácter terneza de la carne que es el principal atributo de la calidad de la carne para el consumidor.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la obtención de ADN genómico se tomaron muestras de material biológico (pelo, sangre o músculo) de individuos de las razas *Retinta* (90), *Avileña Negra Ibérica* (25) y *Morucha* (25). Además para hacer el análisis de comparación con otras razas bovinas se tomó material genético de otras razas autóctonas menos seleccionadas como las razas *Cárdena Andaluza* (5), *Berrenda* (5), *Pajuna* (5), y *Toro de Lidia* (5), y de razas especializadas de crecimiento elevado como es el caso de las razas *Limousin* (25) o *Chianina* (5). Finalmente se incluyeron animales de razas de aptitud lechera *Frisona* (5) o *Normanda* (5).

La extracción del ADN genómico se llevó a cabo por las técnicas de salting out (Miller *et al.*, 1998), purificación con *fenol-cloroformo* o a partir de un kit comercial de extracción de Qiagen® en función del tipo de muestra.

**Amplificación y secuenciación de los genes CAPN1 y CAST bovinos.** Una vez obtenido el ADN se amplificaron 2 fragmentos de ADN (subunidades s1 y s2) pertenecientes al gen CAPN1 (*GenBank Accessions AF252504* y *AF248054*) y un fragmento de ADN perteneciente al gen CAST (*GenBank Accession AY008267*). La primera región secuenciada del gen CAPN1 presenta una longitud de 669 pb, conteniendo el exón 8, exón 9 y parte del exón 10 del gen con sus correspondientes intrones intermedios. La segunda secuencia, que cuenta con 765 pb, contiene parte del exón 13, el *intrón* 13 y el *exón* 14 del mismo gen. La secuencia amplificada del gen CAST (BTA7) posee 270 pb y contiene los exones 5 y 6 y el *intrón* 5 de dicho gen. Las amplificaciones se llevaron a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador Eppendorf (Eppendorf® AG, Hamburg, Germany). Los cebadores empleados en la PCR se diseñaron con la aplicación informática Primer3®. Los *amplicones* se purificaron y comprobaron en un gel de agarosa al 2 % con *bromuro de etidio*. La reacción de secuenciación se realizó en un secuenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems®).

**Búsqueda de polimorfismos y tratamiento estadístico.** Las tres secuencias fueron examinadas y alineadas con el programa *Sequencher* v.4.6. (Gene Codes Corporation®, 1991-2006). Una vez alineadas y comparadas con las secuencias publicadas en diversos artículos y en el *GenBank* se detectaron los sitios polimórficos y se determinaron los correspondientes genotipos. La estimación de las frecuencias fue realizada por simple conteo dado el carácter codominante de los marcadores SNPs.

El estudio de asociación entre los diferentes SNPs y las razas se basó en un test de máxima verosimilitud utilizando las frecuencias de cada raza para los diferentes genotipos de cada sitio. Se realizaron diferentes análisis agru-

pando estas razas por su aptitud: **razas maternas mejoradas (razas de la dehesa), razas maternas no mejoradas, razas paternas especializadas y razas especializadas lecheras.** También se analizaron dos grupos de razas de las que existían datos en la bibliografía (Page *et al.*, 2004; Schenkel *et al.*, 2006) para determinados sitios polimórficos (*razas inglesas, y razas europeas de doble aptitud*).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Polimorfismos detectados

Se han detectado mutaciones (SNP) en 6 sitios del primer fragmento del gen CAPN1 (tabla 1). De estas sólo la situada en la posición 5709 ha sido descrita en otras razas.

**Tabla 1. Descripción de los SNPs encontrados en el gen CAPN1 subunidad 1(s1) en las razas analizadas.**

Locus	CAPN1A	CAPN1B	CAPN1D	CAPN1C	CAPN1E	CAPN1F
Posición	intrón 8	intrón 8	5709/exón 9	intrón 8	intrón 9	exón 10
cambio nucleotídico	C/T	C/G	C/G	A/G	C/T	A/C

En el segundo fragmento se han detectado 3 sitios polimórficos, 2 de los cuales no han sido descritos anteriormente (tabla 2).

**Tabla 2. Descripción de los SNPs encontrados en el gen CAPN1 subunidad 2(s2) en las razas analizadas**

Locus	CAPN1G	CAPN1H	CAPN1I
Posición	intrón 13	4558/exón14	intrón 14
cambio nucleotídico	C/G	G/A	C/T

Finalmente en el gen CAST sólo se ha detectado un polimorfismo en la posición 282 en el intrón 5 (transversión C → G), ya descrita anteriormente en otras razas.

En la tabla 3 se muestran las frecuencias alélicas de aparición para los principales sitios del gen CAPN1 y CAST en las razas estudiadas. En principio no presentan grandes diferencias de distribución entre razas exceptuando el SNP situado en la posición 4558 de la subunidad s2 en cuyos porcentajes de aparición existe una mayor variabilidad en función de la raza.

En el caso de los distintos alelos detectados en el gen CAST, observamos que las frecuencias de presentación oscilan entre el 90 y el 50 % con una media del 83% para el alelo C y entre el 10 y el 50% con una media del 17% para el alelo G.

**Tabla 3. Relación de las frecuencias alélicas para los sitios previamente descritos en los genes CAPN1(fragmento 1 y 2) y CAST en las distintas razas analizadas.**

Gen	Posición	Alelos	RET	MOR	AVI	PAJ	TLI	BR	CAR	LIM	CHI	FRI	NOR	Totales
CAPN1D	5709	G	0,72	0,83	0,90	0,88	0,80	1,00	1,00	0,81	1,00	1,00	1,00	0,80
		C	0,28	0,18	0,10	0,13	0,20	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00	0,20
CAPN1H	4558	G	0,72	0,46	0,72	0,30	1,00	0,80	0,38	0,67	0,40	--	--	0,66
		A	0,28	0,54	0,28	0,70	0,00	0,20	0,63	0,33	0,60	--	--	0,34
CAST	282	C	0,89	0,69	0,75	0,88	0,50	0,70	0,83	0,83	0,90	--	--	0,83
		G	0,11	0,31	0,25	0,13	0,50	0,30	0,17	0,17	0,10	--	--	0,17

(RET: Retinta, MOR: Morucha, AVI: Avileña, PAJ: Pajuna, TLI: Toro de lidia, BR: Berrenda, CAR: Cádiz andaluza, LIM: Limousin, CHI: Chianina, FRI: Frisona y NOR: Normanda)

### Comparación de las diferentes razas y tipos productivos

Finalmente se ha realizado una comparación de las diferentes razas analizadas a partir de las frecuencias alélicas obtenidas en cada uno de los 3 sitios analizados.

*La comparación entre las 3 razas maternas de fomento ligadas a la dehesa española* de las frecuencias alélicas muestra un mayor porcentaje de animales con alelos favorables (alelo C) en el caso de la raza Retinta y menor en la Avileña y la Morucha para el sitio CAPN1D siendo éstas estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%. En el sitio 2 de este gen, también existen diferencias estadísticamente significativas, destacando especialmente la raza Morucha que presenta un menor porcentaje de alelos favorables (G en este caso), frente a Avileña y Retinta (46 % la primera y 72 % las dos últimas). El análisis de las frecuencias de los alelos presentes en el gen CAST para estas razas ha determinado un mayor porcentaje de alelos favorables en el caso de la raza Retinta del 89%, Morucha 75% y Avileña 68,7 % sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas. Estas frecuencias determinan de forma global para las 3 razas unas frecuencias alélicas de 0,228 y 0,772 para el alelo C y G respectivamente en el sitio CAPN1D, 0,688 y 0,322 para los alelos G y A del sitio CAPN1H y 0,830 y 0,170 respectivamente para los alelos C y G del gen CAST. A la vista de estas frecuencias génicas, es evidente que el polimorfismo CAPN1D es el principal objetivo de selec-

ción, seguido del CAPN1H. En cambio la situación de estas poblaciones para el gen que codifica a la calpastatina es muy favorable (una frecuencia significativamente superior del alelo vinculado a una carne más tierna).

En lo cuanto a la comparación de las *razas autóctonas de fomento con las autóctonas no seleccionadas* se puede afirmar que genéticamente existe una mejor predisposición para la terneza en el caso de las razas Avileña, Morucha y Retinta que en el resto de razas maternas analizadas aunque prácticamente no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas (probablemente por el pequeño tamaño muestral usado en el caso de las razas maternas en peligro).

La *comparación con algunas de las razas continentales europeas especializadas* en crecimiento (generalmente en crecimiento magro) también determina una situación más favorable para las razas maternas, aunque en este caso las diferencias no son tan acusadas. Esto podría explicar en parte, la mayor dureza atribuida a las razas continentales cuando se explotan en pureza (también la ventaja del cruzamiento industrial con las razas maternas españolas).

A pesar de contar con muy pocos datos se planteó la *comparación de nuestras 3 razas principales con razas de doble propósito europeas* (Simmental y Gelbvieh). En el caso del gen CAPN1 se ha observado que nuestras razas tienen una presentación del alelo más deseable (C del sitio CAPN1D y G del CAPN1H) superior a las razas de doble propósito. En el caso del gen CAST la situación es aún mucho más favorable para nuestras razas siendo las diferencias además altamente significativas.

En último lugar realizamos un *análisis comparativo con razas inglesas* (Angus, Hereford y Red Angus) que se caracterizan por un menor crecimiento y mayor grado de engrasamiento que las nuestras, pero a las que se les atribuye en cambio un elevado nivel de terneza. Los resultados obtenidos muestran que existen diferencias estadísticamente significativas para el sitio CAPN1H entre ambos grupos de razas, con un mayor porcentaje de alelos favorables para la terneza en el caso de las razas inglesas (alelo C del gen CAPN1D y G del gen CAPN1H). En cambio las frecuencias de los alelos para el gen CAST muestran un porcentaje superior para el alelo C (relacionado con la terneza) en el caso de las razas españolas siendo las diferencias estadísticamente significativas al 95%.

## CONCLUSIONES

Se ha detectado un alto polimorfismo en el gen de la  $\mu$ -calpaína y la calpastatina bovina en las razas autóctonas analizadas, localizándose hasta 7 sitios no descritos previamente en otras razas (5 en la subunidad s1 del gen CAPN1 y 2 en la s2 del mismo gen). Aunque es necesario un estudio pobla-

cional más amplio para determinar su efecto, especialmente de los SNPs no descritos previamente, los análisis llevados a cabo por otros organismos norteamericanos (*Meat Research Center, Clay Center*) indican su adecuación para la selección y mejora de la terneza de la carne (*selección asistida por marcadores*).

El análisis comparativo de los 3 sitios previamente descritos, determina una situación de partida muy adecuada para las 3 razas maternas ligadas a la dehesa (Retinta, Avileña y Morucha), las cuales presentan una frecuencia en la mayor parte de los casos significativamente superior en los sitios 5709, 4558 del gen CAPN1 y 282 del gen CAST de los alelos más favorables relacionados con una mayor terneza instrumental en comparación con el resto de razas analizadas. Las razas maternas no seleccionadas y las de doble aptitud europeas poseen unas frecuencias de presentación de los alelos favorables sensiblemente inferior a las de las autóctonas de fomento a diferencia de las razas inglesas cuya situación es superior a la de nuestras razas mejoradas de la dehesa. Con respecto a las razas especializadas continentales nos encontramos con unas frecuencias de presentación alélica similares a las del conjunto de Retinta, Avileña Negra-Ibérica y Morucha.

Finalmente se recomienda la introducción como un criterio de selección añadido, del genotipo del gen CAST, y de forma secundaria el del gen CAPN1D.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo ha sido financiado por la **Dirección General de Ganadería** del MAPA a través del estudio técnico "**Detección de la variabilidad de determinados genes y su relación con parámetros de calidad de la carne en las razas bovinas autóctonas maternas españolas**". Los autores quieren agradecer a la Asociación Española de Criadores de Ganado Vacuno Selecto de Raza Avileña - Negra Ibérica y a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Vacuno de Raza Morucha Selecta su colaboración en el presente estudio.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Dekkers, J. (2004). Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *Journal of Animal Science*, 82 (E. Suppl.), E313–E328.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.

- 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 T.P.L. Smith. (2002). Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness en cattle. *J. Anim. Sci.* 80:3077.
- Schenkel, F. S., Miller, S. P., Jiang, Z., Mandell, I. B., Ye, X., Li, H. and Wilton, J. W. (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.