

## Comunicación breve

## Estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores CAPN1-316 y CAPN1-4751 en el ganado tipo Braford

### Allelic and genotypic frequencies of CAPN1 316 and CAPN1 4751 markers in Braford type cattle

M.S. Castaño Ledesma<sup>1,2</sup>; M.S. Coria<sup>1,2,3\*</sup>; G.A. Palma<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE), Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Belgrano (S) 1912, Santiago del Estero, Argentina. \*E-mail: sumicoria@gmail.com

<sup>2</sup> Instituto de Bionanotecnología del NOA (INBIONATEC), Laboratorio de Producción y Reproducción Animal, RN 9, Km 1125, G4206XCP Villa El Zanjón, Santiago del Estero, Argentina.

<sup>3</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Buenos Aires, C1033AAJ, Argentina.

#### Resumen

La calidad de la carne bovina constituye un importante factor de interés económico. Entre las características de calidad, la ternura es la más apreciada por los consumidores. Se han identificado polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) en la proteasa calpaína 1 asociadas con dicha característica. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia alélica y genotípica de los SNPs CAPN1-316 y CAPN1-4751 en animales de raza Braford. Se realizó la extracción de ADN a partir de 30 muestras y la amplificación de los marcadores utilizando la reacción en cadena de la polimerasa y los resultados fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa. Las frecuencias alélicas para el marcador CAPN1-316 fueron de 0,45 para el alelo C y 0,55 para el alelo G. En el caso del marcador CAPN1-4751 las frecuencias fueron 0,33 para el alelo T y 0,67 para el alelo C. Por otro lado, las frecuencias genotípicas del marcador CAPN1-316 fueron 0,20 (CC), 0,30 (GG) y 0,50 (CG); mientras que para el marcador CAPN1-4751 los valores fueron 0,10 (TT), 0,43 (CC) y 0,47 (CT). Las muestras con menores valores de fuerza de corte presentaron el genotipo GG y TT en los marcadores CAPN1-316 y CAPN1-4751. De acuerdo a la Ley de Hardy-Weinberg, la población estudiada se encuentra en equilibrio. Los resultados indican que esta población no presenta una predisposición genética para la producción de carne con mayor ternura.

**Palabras clave:** Selección asistida por marcadores moleculares; Bovinos; Dureza.

#### Abstract

Meat quality is an important factor of economic interest. Among the quality characteristics, tenderness is the most appreciated by consumers. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified in calpain 1 protease, associated with this characteristic. In this context, the aim of the present work was to determine the allelic and genotypic frequencies of the SNPs CAPN1-316 and CAPN1-4751 in Braford cattle. DNA extraction was carried out from 30 samples. Markers were amplified using the polymerase chain reaction and the results were subsequently visualized by electrophoresis on agarose gels. The CAPN1-316 marker shows allelic frequencies of 0.45 for the C allele and 0.55 for the G allele and CAPN1-4751 frequencies were 0.33 for the T allele and 0.67 for the C allele. On the other hand, the genotypic frequencies of the CAPN1-316 marker were 0.20 (CC), 0.30 (GG) and 0.50 (CG), while for the CAPN1-4751 marker the values they were 0.10 (TT), 0.43 (CC) and 0.47 (CT). Samples with lower shear force values presented GG and TT genotype in CAPN1-316 and CAPN1-4751 markers. Furthermore, results indicate that the population studied is in Hardy-Weinberg Equilibrium. All results indicate that this population does not have a genetic predisposition for meat production with greater tenderness.

**Keywords:** Molecular markers assisted selection; Cattle; Hardness.

Recibido: 13/01/2021; Aceptado: 04/06/2021.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

La ganadería bovina es una actividad relevante para la economía argentina, generando el 22 % del producto bruto agropecuario nacional (FAO y New Zealand Agricultural Greenhouse Gas Research Centre, 2017), lo cual le permite posicionarse entre los primeros países exportadores de carne de alta calidad (IPCVA, 2019). La satisfacción del consumidor de carne bovina depende de un conjunto de propiedades organolépticas, como la jugosidad, el sabor y la terneza, siendo esta última la de mayor importancia para los consumidores (Ruiz de Huidobro *et al.*, 2003).

En los países en desarrollo, la selección asistida por marcadores contribuye a utilizar los recursos genéticos disponibles, así como a seleccionar aquellos portadores de genes asociados a características de importancia económica y a utilizarlos en cruzamientos dirigidos para producir una nueva generación que mejore la calidad de sus productos (Parra-Bracamonte *et al.*, 2011). En este sentido, los marcadores más estudiados en el ganado bovino son los Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP), entre ellos los SNPs CAPN1-316 y CAPN1-4751, los cuales están presentes en la proteasa calpaína-1 y fueron asociados previamente con la terneza de la carne (Page *et al.*, 2002; 2004; White *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2006). El marcador CAPN1-4751 fue descrito por White *et al.* (2005) y se origina por una transición de timina a cisteína (T/C) en el intrón 17 de la calpaína. Por otro lado, el polimorfismo CAPN1-316 se encuentra en el exón 9 que codifica a la región regulatoria de la proteína. Este marcador fue identificado por Page y colaboradores. (2002) y se origina por una transversión de guanina a citidina (G/C), la cual tiene como consecuencia el cambio del aminoácido 316 de alanina por glicina (White *et al.*, 2005). Debido a la importancia del sistema proteolítico calpaína y su relación con la terneza de la carne, el

objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de alelos asociados a la calidad de la carne en el ganado bovino tipo Braford.

El estudio se realizó con muestras obtenidas en un estudio previo, provenientes de un rodeo comercial ubicado en la provincia de Santiago del Estero, Argentina (Coria *et al.*, 2020). Se utilizaron muestras del músculo *longissimus dorsi* de novillos Braford (3/8 Brahman y 5/8 Hereford), criados y faenados siguiendo los protocolos de Bienestar animal del servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) y de la Unión Europea.

Se realizó la extracción de ADN utilizando el Kit AccuPrep® Genomic DNA (Bioneer), según las indicaciones del fabricante. Se evaluó la integridad y pureza del ADN utilizando geles de agarosa y el espectrofotómetro NanoDrop 2000c. Posteriormente se realizaron reacciones de amplificación mediante PCR para analizar las variantes alélicas (alelo G y T) de los marcadores CAPN1-316 y CAPN1-4751 presentes en el gen CAPN1 (NM\_17459.2), utilizando el protocolo y los cebadores descritos por Pereira Rico *et al.* (2013). En la Tabla 1 se presentan las secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR y los tamaños esperados de productos de amplificación para ambos marcadores de terneza de la carne. Una vez obtenidos los productos de amplificación, se prosiguió con su visualización en geles de agarosa al 2 %.

Para el análisis estadístico de la variabilidad genética de los marcadores se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas y el equilibrio Hardy Weinberg con la prueba de  $\chi^2$  con el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2013), usando la ecuación  $p^2 + 2pq + q^2$ , donde:

$p^2$  = alelos en individuos homocigotos con un polimorfismo n

$2pq$  = frecuencia predicha para heterocigotos

**Tabla 1.** Cebadores utilizados para la amplificación de productos.

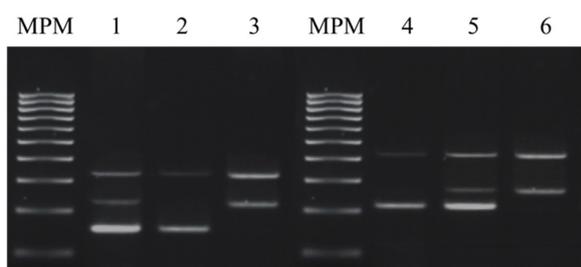
Marcador	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño del producto (pb)
CAPN1 316	F I: TTTCTGCAGCTCCTCGGAGTGGAAGGG	269 (alelo G)
	R I: GCTCCCGCATGTAAGGGTCCAGGG	228 (alelo C)
	F O: GCTGTGCCACCTACCAGCATC	446 (con el par de cebadores externos)
	R O: CAGGTTGCAGATCTCCAGGCGG	
CAPN1 4751	F I: GCATCCTCCCCTTGACTGGGGGAAACCC	158 (alelo C)
	R I: GTCACCTTGACACAGCCCTGCGCCGCA	231 (alelo T)
	F O: CCTGGAGTCCTGCCGAGCATGGTCAAC	334 (con el par de cebadores externos)
	R O: AAGCTGCAGGAGCTGCCCAAAGCCAGGC	

CAPN1-316: marcador calpaína 316. CAPN1-4751: marcador calpaína 4751, FI: Cebador sentido interno, RI: Cebador antisentido interno, FO: Cebador sentido externo, RO: Cebador antisentido externo.

$q^2$  = alelos en individuos homocigotos con un polimorfismo m

Los marcadores fueron visualizados en geles de agarosa. Se observaron los patrones de banda esperados para el marcador CAPN1-4751. Para los animales heterocigotos se observaron las bandas de 334, 231 y 158 pb, para el genotipo CC se observaron amplicones de 334 y 158 pb y para el genotipo TT, además de la banda de 334 pb, se visualizó un producto de 231 pb (Figura 1).

Por otro lado, para el marcador CAPN1-316 se logró identificar en todas las muestras una banda de 446 pb, correspondiente al producto de amplificación originado por los cebadores externos. Para el genotipo CC se observó además una banda de 228 pb; para el genotipo CG se observaron las 3 bandas, y para el genotipo GG se visualizaron las bandas de 446 y 268 pb (Figura 1).



**Figura 1.** Visualización de marcadores CAPN1-4751 (calles 1 a 3) y CAPN1-316 (calles 4 a 6) en gel de agarosa al 2 %. MPM: marcador de peso molecular de 100 pb. Calle 1: individuo heterocigota. Calle 2: individuo homocigota para el alelo T. Calle 3: individuo homocigota para el alelo C. Calle 4: individuo homocigota para el alelo C. Calle 5: individuo heterocigota. Calle 6: individuo homocigota para el alelo G.

Se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores CAPN1-316 y CAPN1-4751 (Tabla 2). Se debe resaltar que, para cada marcador, en la población estuvieron representadas las tres variantes genotípicas posibles. Las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas fueron

comparados con los valores de resistencia a la fuerza de corte con la cuchilla de Warner Bratzler (WBSF) obtenidos previamente (Coria *et al.*, 2020). Brevemente, las muestras de bife de 2,5 cm de espesor se cocinaron en grill eléctrico hasta alcanzar una temperatura interna de 71 °C. Después de la cocción, los bifés se enfriaron a temperatura ambiente durante 30 min y a 4 °C durante 24 h. De cada bife se cortaron 8 cilindros de 1,3 cm de diámetro, de forma paralela a las fibras musculares, cada uno de los cuales fue sometido a la acción del texturómetro TA.XT Plus con el accesorio de Warner-Bratzler, en sentido transversal a las fibras musculares. Los tarugos fueron colocados debajo de una cuchilla que contiene una hendidura en forma de V y el test se realizó con una velocidad de 2,0 mms<sup>-1</sup> (pre-test), 2,0 mms<sup>-1</sup> (test) y 10,0 mms<sup>-1</sup> (post-test). Se consideró la media de 6 lecturas de fuerza de cizalla hechas para cada bife.

Para el marcador CAPN1-316 las frecuencias alélicas obtenidas fueron 0,45 para el alelo C y 0,55 para el alelo G, mientras que las frecuencias genotípicas fueron 0,20 (CC), 0,30 (GG) y 0,50 (CG). En estudios previos, realizados en novillos *Bos Taurus* (Jersey x Limousin, Angus y Hereford) la presencia del alelo C ha sido asociada con menores valores de dureza (Morris *et al.*, 2006, Page *et al.*, 2002 y 2004); sin embargo, se han encontrado en baja proporción en las poblaciones estudiadas. A su vez, en un trabajo realizado con novillos Hereford, los mayores valores de terneza, evaluada mediante panel sensorial, fueron asociados con el genotipo GG, similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo (Melucci *et al.*, 2012). Si bien este marcador ha sido estudiado en el ganado cebuino (Brahman y Nellore), los resultados no han sido previamente validados (Pereira Rico *et al.*, 2013). En este sentido, el análisis realizado en el presente trabajo indica que los animales con

**Tabla 2.** Frecuencias genotípicas para los marcadores CAPN1 316 y CAPN1 4751.

Marcador	Genotipo	FG	FA	WBSF (N)	EHW
CAPN1-316	CC	0,20	G = 0,55	79,48	NS
	GG	0,30	C = 0,45	60,52	
	CG	0,50		69,15	
CAPN1-4751	TT	0,10	C = 0,77	59,30	NS
	CC	0,43	T = 0,33	70,54	
	TC	0,47		67,17	

CAPN1-316: marcador calpaína 316. CAPN1-4751: marcador calpaína 4751. WBSF: fuerza de cizalla de Warner-Bratzler (N). EHW: Equilibrio de Hardy Weinberg. FG: Frecuencia Genotípica. FA: Frecuencia Alélica, NS: No significativo. Fuente: elaboración propia

menores valores de fuerza de corte presentaron el genotipo GG para el marcador CAPN1-316.

Para el marcador CAPN1-4751 las frecuencias fueron 0,33 para el alelo T y 0,67 para el alelo C y las frecuencias genotípicas fueron 0,10 (TT), 0,43 (CC) y 0,47 (CT). El marcador CAPN1-4751 fue estudiado previamente en poblaciones de *Bos taurus*, *Bos indicus* y cruzas de *Bos indicus* x *Bos taurus* (White *et al.*, 2005, Pinto *et al.*, 2010). En este sentido se ha sugerido que aquellos animales con el genotipo CC presentaban menores valores de fuerza de corte que los que heredaban el genotipo TT (Papaleo Mazzucco *et al.*, 2010; White *et al.*, 2005, Melucci *et al.*, 2012). Sin embargo, otros autores encontraron que el genotipo más favorable en *Bos indicus* y sus cruzas con *Bos taurus* fueron los animales con el genotipo TC (Curi *et al.*, 2009). A diferencia de estos resultados, en el presente trabajo el genotipo TT fue asociado a menores valores de fuerza de corte, aunque su presencia fue muy baja (0,10), por lo cual no es posible realizar inferencias al respecto. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y la bibliografía consultada, se sugiere que el genotipo favorable para cada marcador podría ser específico de cada raza.

Por su parte, los valores de  $p$  estimado para la ley de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ) permitieron concluir que la población de animales estudiada se encuentra en equilibrio para los *locus* evaluados. En este sentido, los resultados sugieren que las frecuencias alélicas de la población no cambiaron y que las frecuencias genotípicas lograron estabilizarse luego de la primera generación. A su vez, podemos inferir que el proceso de selección que se efectúa de manera natural no es una fuerza selectiva suficiente para modificar el equilibrio en los *locus* evaluados.

En este trabajo se describen por primera vez las frecuencias de los marcadores CAPN1-316 y CAPN1-4751 y su asociación con la terneza de la carne en una población de ganado Braford. En este sentido, los genotipos favorables para la terneza en el ganado Braford serían GG y TT para los marcadores CAPN1-316 y CAPN1-4751, respectivamente. Sin embargo, es necesario validar estos resultados en una población de mayor tamaño. La información genómica se puede incorporar como complemento de la información genealógica e información fenotípica de los animales, con el objetivo de diseñar estrategias de selección genética y mejorar así las características de importancia

económica tales como el grado de terneza de la carne, para de esta manera ofertar al consumidor un producto de mejor calidad.

### Agradecimientos

Los autores quieren agradecer al Dr. Eduardo Alberto Parellada, la Dra. Gabriela Grigioni, el Dr. Darío Pighin y la Srta. Karina Moreno por su asistencia técnica en las determinaciones realizadas y al Consejo Interuniversitario Nacional (CIN) que permitió la estancia de investigación de la Lic. Castaño Ledesma. El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas [PUE 2018 0035] y la Universidad Nacional de Santiago del Estero [UNSE 23/A262].

### Referencias bibliográficas

- Casas E., White S.N., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Riley D.G., Chase C.C., Johnson D.D., Smith T.P.L. (2006). Effects of calpastatin and u - calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science* 84: 520-525.
- Coria M.S., Reineri P.S., Pighin D., Barrionuevo M.G., Carranza P.G., Grigioni G., Palma G.A. (2020). Feeding strategies alter gene expression of the calpain system and meat quality in the longissimus muscle of Braford steers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 33 (5): 753-762.
- Curi R.A., Chardulo L.A.L., Mason M.C., Arrigoni M.D.B., Silveira A.C., De 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* 40 (4): 456-462.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2013). InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- FAO y New Zealand Agricultural Greenhouse Gas Research Centre. (2017). Low-emissions development of the beef cattle sector in Argentina - Reducing enteric methane for food security and livelihoods. Roma. Italia.
- IPCVA (2019). Faena y producción de carne vacuna. Argentina. Informe de Cuarto trimestre (Dic 2019), en base a datos de SENASA y Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. En: <http://www.ipcva.com.ar/vertext.php?id=2087>, consulta: enero 2020.
- Melucci L.M., Panarace M., Feula P., Villarreal E.L., Grigioni G., Carduza F., Miquel M.C. (2012). Genetic and management factors affecting beef quality in

- grazing Hereford steers. *Meat Science* 92-(4): 768-774.
- Morris C.A., Cullen N.G., Hickey S.M., Dobbie P.M., Veenvliet B.A., Manley T.R., 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. *Animal Genetics* 37-(4): 411-414.
- 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., Smith T.P.L. (2002). Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science* 80: 3077-3085.
- Page B.T., Casas E., Quaas R.L., Thallman R.M., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmarie S.N., Bennett J.W., Keele M.E., Dikeman M.E. (2004). Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal of Animal Science* 82 (12): 3474-3481.
- Papaleo-Mazzucco J., Melucci L.M., Villarreal E.L., Mezzadra C.A., Soria L., Corva P., Miquel M.C. (2010). Effect of ageing and  $\mu$ -calpain markers on meat quality from brangus steers finished on pasture. *Meat Science* 86 (3): 878-882.
- Parra-Bracamonte G.M., Sifuentes Rincón A.M., De la Rosa Reyna X.F., Arellano Vera W. (2011). Avances y perspectivas de la biotecnología genómica aplicada a la ganadería en México. *Tropical and subtropical agroecosystems* 14 (3): 1025-1037.
- Pereira Rico J.A.C., Salazar Zorrilla C., Espinoza P., Bazán Terán Y., Romero Ribera J.S., Jiménez Carreño E., Rojas Toledo P., Giombattista G., Uracoy Cabral M. (2013). *Genética Molecular: Una herramienta para el mejoramiento de la calidad de la carne bovina*. Santa Cruz: Universidad Autónoma Gabriel René Moreno; Embajada del Reino de los Países Bajos; Fundación PIEB. Bolivia.
- Pinto L.F., Ferraz J.B., Meirelles F.V., Eler J.P., Rezendes F.M., Carvalho M.E., Almeida H.B., Silva R.C. (2010). Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research: GMR* 9 (3): 1431-1442.
- Ruiz de Huidobro F., Miguel E., Onega E., Blázquez B. (2003). Changes in meat quality characteristics of bovine meat during the first 6 days post mortem. *Meat Science* 65: 1439-1446.
- White S.N., Casas E., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Riley D.G., 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. *Journal of Animal Science* 83 (9): 2001-2008.