

## Evaluación de marcadores moleculares asociados a diferencias en terneza de la carne de novillos Brangus

### Evaluation of genetic markers for beef tenderness in Brangus steers

Corva, P<sup>3</sup>; Soria<sup>1</sup>, L; Papaleo Mazzuco, J<sup>3</sup>; Villarreal, E<sup>2</sup>; A; Melucci, L<sup>3</sup>; Mezzadra, C<sup>2</sup>; Schor, A<sup>4</sup>, Motter, M<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Área Genética, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Email: [mcmiquel@fvet.uba.ar](mailto:mcmiquel@fvet.uba.ar)

<sup>2</sup>Departamento de Producción Animal, Estación Experimental Balcarce, INTA, Argentina. Email: [evillarreal@balcarce.inta.gov.ar](mailto:evillarreal@balcarce.inta.gov.ar)

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina. Email: [pcorva@balcarce.inta.gov.ar](mailto:pcorva@balcarce.inta.gov.ar)

<sup>4</sup>Laboratorio de Tecnología de Carnes, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Email: [schor@agro.uba.ar](mailto:schor@agro.uba.ar)

#### Resumen

Las razas compuestas con participación de cebú han tenido gran difusión por su adaptación y rusticidad. Sin embargo, el cebú tiene desventajas reconocidas en calidad de carne, particularmente terneza. El conocimiento sobre genes que explican diferencias en terneza permite hacer selección asistida por marcadores a favor de este atributo. El objetivo de este trabajo es la evaluación de marcadores en el gen que codifica la subunidad mayor de la enzima micro-calpaína (CAPN1) sobre la terneza de la carne en 193 novillos Brangus, criados sobre pasturas en la zona templada de Argentina. Se estudió la asociación de dos SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*): CAPN316 (C/G) y CAPN4751 (C/T) con la resistencia al corte de muestras de carne conservadas a 5 °C durante 1, 7 o 14 días. Los SNP se identificaron mediante amplificación con PCR y digestión con enzimas de restricción. La frecuencia de los alelos C fue respectivamente 0,29 en CAPN316 y 0,49 en CAPN4751. El tratamiento de maduración redujo progresivamente la dureza de la carne, llegando hasta 20% a los 14 días en comparación al día 1. CAPN316 mostró diferencias significativas en los tres tratamientos de maduración; a los 14 días GG tuvo una dureza 10,9% mayor a CC. CAPN4751 mostró diferencias sólo hasta los 7 días, en que TT tuvo una dureza 10,1% superior a CC. De acuerdo a estos resultados, podría realizarse una selección favorable a la terneza en Brangus principalmente utilizando el marcador CAPN316.

Palabras clave: bovinos de carne, Brangus, genómica, terneza, calpaína.

#### Abstract

Composite breeds that include Zebu in their genetic background have been widely adopted because of their rusticity and adaptation. However, Zebu cattle produce lower quality (tougher) beef when compared to European breeds. Recent discoveries in the field of cattle genomics allow for the identification of genes related to differences in tenderness that could potentially be used in marker assisted selection. The objective of this work was to validate the effect of markers on the gene coding for the large subunit of  $\mu$ -calpain (CAPN1) on beef tenderness. Two SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*): CAPN316 (C/G) and CAPN4751 (C/T) were evaluated in 193 Brangus steers fattened on pastures in the temperate area of Argentina. Genotypes for these markers were identified with PCR-RFLP methods. Beef tenderness was indirectly estimated as Warner-Bratzler shear force, in samples that received an aging treatment for 1, 7 or 14 days at 5 °C. The frequency of the C allele was 0.29 for CAPN316 and 0.49 for CAPN4751. Beef tenderness was improved by the aging treatment. Shear force decreased progressively and had differences of up to 20% between 1 and 14 days. CAPN316 had significant effect in the three aging periods. At day 14, shear force was 10.9% higher for GG than for CC. CAPN4751 had significant effects at 1 and 7 days only. In the 7-day treatment, shear force was 10.1% higher for TT than for CC. According to these results an effective selection favouring beef tenderness in Brangus cattle could be practiced, with the aid of marker CAPN316.

Key words: beef cattle, Brangus, genomics, tenderness,  $\mu$ -calpain.

## Introducción

Las razas compuestas que incluyen genética cebuina han tenido gran difusión en Argentina. De hecho, razas tales como Brangus y Braford se encuentran entre las cuatro razas para carne de mayor venta de semen congelado (CABIA, 2006).

Sin duda las razas índicas hacen un aporte muy favorable a las compuestas en términos de adaptación y rusticidad; sin embargo, es bien conocida su influencia negativa sobre variables de calidad de la carne, en particular la terneza (Marshall, 1999).

No obstante la relevancia de la terneza como variable de importancia en la producción de carne, la misma no es comúnmente incluida en los programas de mejora, lo que podría atribuirse entre otras razones a la dificultad para evaluarla y obtener información fenotípica confiable para la evaluación genética de reproductores. En estos casos en particular, la tecnología genómica puede hacer un aporte significativo. En la actualidad, ya existe conocimiento sobre los genes que afectan la terneza como para desarrollar marcadores genéticos que permitan realizar una selección asistida para mejorar la calidad de la carne bovina.

El sistema proteolítico de las calpaínas es uno de los principales responsables del proceso de tiernización de la carne a partir del sacrificio (Koochmarai, 1996). En este trabajo se describe la evaluación de marcadores en el gen que codifica la subunidad mayor de la enzima micro-calpaína (gen CAPN1) sobre la terneza de la carne en novillos de la raza Brangus, criados en condiciones representativas de la zona templada de Argentina.

## Materiales y Métodos

Por intermedio de la Asociación Argentina de Brangus, seis establecimientos particulares aportaron 193 novillos (machos castrados) para la evaluación, los cuales se trasladaron a un establecimiento de la Universidad de Buenos Aires en la localidad de Carlos Casares, provincia de Buenos Aires. Los animales llegaron al campo entre mayo y septiembre de 2005 con un peso inicial promedio de aproximadamente 190 kg. Los mismos se mantuvieron en pasturas polifíticas durante toda la etapa de engorde. Mensualmente se registró el peso vivo y por medio de ecografías se midió el área de ojo del bife y el espesor de grasa dorsal. Los novillos fueron enviados progresivamente a frigorífico a medida que alcanzaban un nivel de grasa subcutánea de al menos 6 mm, estimada por ultrasonido. El sacrificio se llevó a cabo en seis tandas en un frigorífico privado de la localidad de Balcarce, provincia de Buenos Aires, entre julio y diciembre de 2006. El peso final y el espesor de grasa subcutánea fueron en promedio 456 kg y 6,8 mm, respectivamente.

Después de 24 h de oreo a 1-5 °C, se removió un block de bifos correspondiente a la 11° a 13° costillas de la media canal izquierda. El mismo fue deshuesado y dividido en tres porciones que se envasaron al vacío y se asignaron respectivamente a tres tratamientos de maduración (1, 7 y 14 días) a 5 °C. Cumplido el plazo de maduración, los cortes se conservaron a -18 °C hasta su envío al laboratorio de carnes en la Universidad de Buenos Aires, donde se realizaron determinaciones de resistencia al corte con cizalla Warner Bratzler (WB) sobre muestras de carne cocidas en baño de agua a 70 °C durante 50 minutos y enfriadas bajo agua corriente durante 40 minutos.

Para los análisis moleculares se obtuvo ADN a partir de muestras de sangre tomadas en marzo de 2006. Por sus antecedentes de variabilidad y efectos sobre la terneza de la carne, se eligieron dos SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) en el gen CAPN1, denominados CAPN316 y CAPN4751 (White et al, 2005). CAPN316 corresponde a una sustitución C/G en el exón 9, mientras que CAPN4751 corresponde a una sustitución C/T en el intrón 17 del gen. Para determinar los genotipos de ambos SNP se diseñaron métodos de PCR-RFLP tomando como referencia las secuencias de GenBank AF252504 y AF248054. En el caso de CAPN316, se amplificó un fragmento de 709 pb con los primers CCAGGGCCAGATGGTGAA (forward) y CGTCGGGTGTCAGGTTGC (reverse) que fue digerido con la enzima *BtgI*. Para CAPN4751 se amplificó un fragmento de 215 pb con los primers GAAGGGCTTGGGTTGGGATGTTCGGCAGAG (forward) y AGGCTGGGAGGGGTGTTCTCTGAGTGCCA (reverse) que fue digerido con la enzima *BsaI*. Los polimorfismos se visualizaron en geles de agarosa al 1,6% teñidos con Bromuro de Etidio.

Los valores de WB fueron analizados con un modelo que incluyó los efectos fijos de tratamiento de maduración, fecha de envío al laboratorio de carnes, fecha de sacrificio dentro de fecha de envío, el genotipo del marcador y su interacción con el tratamiento y el individuo como efecto aleatorio. Se utilizó el procedimiento Mixed de SAS (SAS, 1998).

## Resultados y discusión

Las proporciones genotípicas de CAPN316 fueron 8,6% para CC, 40,6% para CG y 50,8% para GG, respectivamente, mientras que las frecuencias alélicas fueron 0,29 para C y 0,71 para G. Van Eenennaam et al (2007) reportaron una frecuencia de 0,18 para el alelo C en Brangus de Estados Unidos, ligeramente

inferior a la del presente estudio. De hecho, la tendencia a través de diferentes razas carniceras es la de una mayor frecuencia para el alelo G, al que se le asigna un efecto menos favorable sobre la terneza (Page et al., 2004). Esto es consistente con la escasa selección practicada para este atributo.

El marcador CAPN4751 fue desarrollado principalmente para discriminar diferencias en terneza en razas índicas y sus cruzas, ya que aquéllas han prácticamente fijado el alelo G en CAPN316 (Casas et al., 2005). Aún así, la frecuencia del alelo favorable para este nuevo marcador no es elevada en Brahman (0,1 para C según White et al., 2005). La distribución de genotipos de CAPN4751 en este estudio fue 24,6% para CC, 49,2% para CT y 26,2% para TT, con frecuencias alélicas de 0,49 para C y 0,51 para T. Frecuencias de esta magnitud se han reportado para poblaciones de *Bos taurus* (White et al., 2005) y son muy similares a las indicadas para Angus Colorado (C= 0,47) y Brangus (C= 0,51), por Van Eenennaam et al. (2007).

En los 137 individuos que fueron homocigotas para al menos uno de los marcadores, se pudo deducir la organización de alelos sobre cada cromosoma. Las frecuencias de los haplotipos así determinados fueron 50,3% para GT, 28,0% para GC, 20,4% para CC y 0,70% para CT. Existe coincidencia entre estos valores y los reportados para una población experimental que utiliza un gran número de razas paternas (GPE Cycles 7 y 8; White et al., 2005), con la ligera diferencia de que en la presente muestra de Brangus, el haplotipo GT es el más abundante, en lugar de GC como en esa población. En Argentina, la raza Brangus tiende a estabilizarse comercialmente en su variedad 3/8 (62,5% Angus - 37,5% cebú). Sobre la base de los resultados reportados para Brahman, podría deducirse que el aporte del cebú al Brangus sería mayoritariamente de combinaciones GT y en menor medida, GC. No existe información sobre frecuencias de estos haplotipos para Angus de Argentina, por lo que no es posible discriminar si la constitución genética en esta región cromosómica ocurre al azar o hay algún efecto de la intensa selección practicada en la formación de la raza compuesta.

Independientemente de los tratamientos de maduración y los efectos genéticos, se evidenció una marcada influencia de las tandas de sacrificio y de envío de muestras al laboratorio de carnes sobre los valores de WB. Esto confirma que existen muchas fuentes de variación relacionadas a las condiciones de manejo de los animales en el frigorífico y a la manipulación posterior de las canales. A su vez, esto exige un control riguroso de los protocolos experimentales en las evaluaciones de calidad de carne.

El tratamiento de maduración de la carne tuvo un efecto beneficioso sobre la terneza, con una disminución progresiva de WB a través de los tres tratamientos (Cuadro 1). Tomando como referencia el valor de WB de 8,4 kg en el día 1, el mismo se había reducido 13% a los 7 días y 20% a los 14 días.

Se evidenció que el alelo más favorable en términos de una mejora en la terneza sería C para ambos marcadores analizados. Sin embargo, el efecto de CAPN316 fue ligeramente mayor que el de CAPN4751. Ningún marcador tuvo efecto significativo cuando se los incluyó a ambos simultáneamente en el modelo de análisis. A pesar de la significancia estadística de las asociaciones con terneza, no hay evidencias fisiológicas o bioquímicas del efecto de estos polimorfismos sobre el proceso de cambio en terneza. De hecho, CAPN316 origina una sustitución de aminoácidos en la proteína correspondiente, mientras que CAPN4751 se ubica en un intrón. Aún así, este último marcador ha permitido distinguir diferencias en terneza en poblaciones que no segregan CAPN316 (White et al., 2005). Podría hipotetizarse que la mayor o menor relación con diferencias en terneza se deben a la magnitud del desequilibrio de ligamiento con polimorfismos funcionales aún no identificados.

No hubo una interacción significativa entre los marcadores y el tratamiento de maduración, es decir la diferencia entre genotipos se estableció muy rápidamente después del sacrificio y se mantuvo con poca variación durante prácticamente todo el período considerado.

Tal como se había observado al evaluar estos mismos marcadores en una muestra más pequeña de novillos Angus y Brangus criados en condiciones similares a las aquí descritas (Soria et al., 2006), en este caso no hubo una diferencia significativa entre los genotipos CG y GG. En el otro caso citado, además, sólo hubo diferencias significativas entre genotipos de CAPN316 a los 7 días, mientras que CAPN4751 nunca presentó diferencias significativas. La discrepancia entre ambos trabajos no sólo podría atribuirse al efecto de la base genética de la muestra de animales considerada en cada caso, sino también a influencias no genéticas en el manejo de los animales y las canales con posterioridad al sacrificio.

## Conclusiones

El tratamiento de maduración de la carne hasta 14 días hace una contribución importante a la reducción de la dureza –al menos 20%- de la carne de novillos Brangus. Independientemente del efecto de la maduración, hay diferencias significativas en terneza asociadas a los distintos alelos del gen CAPN1. Las frecuencias alélicas y el resultado de la evaluación de WB indican que podría realizarse una selección favorable a la terneza en esta raza principalmente utilizando el marcador CAPN316, ya que existe una combinación favorable de alelos en los haplotipos predominantes.

Cuadro 1: Medias de resistencia al corte (Warner Bratzler, kg) y errores estándar para tres tratamientos de maduración de la carne, según el genotipo para dos marcadores en el gen CAPN1

Marcador	Genotipo	n	Tratamiento					
			1 d		7 d		14 d	
CAPN316	CC	16	8,05 <sup>a</sup>	0,30	7,07 <sup>a</sup>	0,30	6,33 <sup>a</sup>	0,31
	CG	76	8,32 <sup>a</sup>	0,15	7,23 <sup>a</sup>	0,14	6,78 <sup>ab</sup>	0,15
	GG	95	8,86 <sup>b</sup>	0,13	7,70 <sup>b</sup>	0,13	7,02 <sup>b</sup>	0,14
CAPN4751	CC	46	8,17 <sup>a</sup>	0,18	7,11 <sup>a</sup>	0,18	6,58 <sup>a</sup>	0,19
	CT	92	8,56 <sup>ab</sup>	0,14	7,41 <sup>a</sup>	0,13	6,98 <sup>a</sup>	0,15
	TT	49	8,93 <sup>b</sup>	0,18	7,83 <sup>b</sup>	0,18	6,97 <sup>a</sup>	0,19

Medias con letras distintas dentro de marcador y tratamiento difieren significativamente (P<0,05).

### Literatura citada

- CABIA, 2006. Cámara Argentina de Biotecnología de la Reproducción e Inseminación Artificial. Movimiento de Semen y Toros dadores. Disponible On Line: <http://www.cabia.org.ar/>. Acceso en junio de 2007.
- Casas, E., White, S. N., Riley, D. G., Smith, T. P. L., Breneman, R. A., Olson, T. A., Johnson, D. D., Coleman, S. W., Bennett, G. L. and C.C. Chase, Jr. 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *J. Anim. Sci.* 83: 13-19.
- Koohmaraie, M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Sci.* 43:S193.
- Marshall, D. 1999. Genetics of meat quality. En: R. Fries and A. Ruvinsky (Ed.). *The Genetics of Cattle*. CABI. Wallingford, Oxon, UK. pp. 605-636.
- 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 T.P. Smith. 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.
- SAS. 1998. OnlineDoc (TM). SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Soria, L.; Corva, P.M.; Branda Sica, A.; Schor, A.; Melucci, L.M.; Villarreal, E.L.; Mezzadra, C. y M.C. Miquel. 2006. Efecto de tres SNP del gen CAPN1 sobre la terneza de la carne en novillos. 35° Congreso de la Sociedad Argentina de Genética. San Luis, 24 al 27 de septiembre de 2006. *Basic and Applied Genetics* 17(supl. II): 163. (Resumen).
- Van Eenennaam, A. L., Li, J., Thallman, R. M., Quaas, R. L., Dikeman, M. E., Gill, C. A., Franke, D. E. and Thomas, M. G. 2007. Validation of commercial DNA test for quantitative beef quality traits. *J. Anim. Sci.* 85: 891- 900.

White, S.N., Casas, E., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Riley, D.G., Chase, C.C. Jr Johnson, D.D., Keele, J.W., and T.P.L. Smith. 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.* 83:2001.