

Determinación de la frecuencia alélica y genotípica del gen Calpastatina (Cast₂₈₂) asociado a ternera de la carne en cinco biotipos de bovinos Criollos del departamento de Santa Cruz

Pereira Juan; Camacho Naidely; Manrique Issac; Loza Ariel

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno

E-mail de contacto: antonios8@hotmail.com

Resumen. El presente estudio determinó la frecuencia alélica del gen calpastatina (Cast) en 49 bovinos de la raza Criollo que representan a cinco biotipos de este ganado en el departamento de Santa Cruz. El procedimiento consistió en la toma de muestras de sangre de los animales, por vía de extracción en la vena coccígea, y posteriormente el procesamiento en el laboratorio de Genética Molecular "PROVETSUR", perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma Gabriel René Moreno. Se realizó la extracción de ADN genómico, utilizando el kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification* del laboratorio Promega Corporation USA, 2010. Posteriormente se genotipificó el polimorfismo CAST₂₈₂ mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con marcadores de polimorfismos de *longitud de fragmentos de restricción*. El producto amplificado fue sometido a un proceso de electroforesis y los geles resultantes fueron visualizados y analizados por un transiluminador, registrándose con una cámara digital fotográfica. Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron determinadas mediante el software MS-Tools y Genepop 4. Los resultados encontrados para la frecuencia alélica del alelo "C", el cual es el favorable en la raza Criolla, fue de 35%. La frecuencia alélica encontrada para los biotipos fue de 83%, 45%, 31%, 20% y 18% para las poblaciones Criolla del Chaco, Yacumeño, CIAT, Valles y Ceasip, respectivamente. La heterocigocidad observada, esperada y el estadístico FIS (Coeficiente de Endogamia), para la población de ganado Criollo estudiada, fue de 0.35, 0.46 ($p < 0.05$) y de 0.38, respectivamente.

Palabras clave: ADN genómico; Polimorfismos; Genotipificación; Calidad organoléptica

Introducción

El mejoramiento genético bovino en nuestro país, se centró solamente en ganancia de peso vs. fertilidad, sin embargo, debido a que se declaró a Bolivia libre de aftosa con vacunación, se ha comenzado a pensar seriamente en la exportación de carne. Por lo tanto los ganaderos deben enfocarse también en la mejora de la calidad de la misma. La calidad de la carne tiene varios componentes genéticos y no genéticos. Dentro

de los genéticos, se halla en especial la ternera de la carne, el cual es uno de los factores más importantes que lleva a la satisfacción a los consumidores de carne (Miller *et al.* 1995; Juszczuk-Kibiack *et al.* 2008).

La ternera de la carne tiene que ver con procesos de cambios fisiológicos *post mortem* muy complejos. Pero se puede simplificar el proceso, indicando que dos enzimas juegan un papel importante. Estas son denominadas el sistema de la

calpaina y calpastatina, que determinan la proteólisis de las proteínas miofibrilares durante el periodo de refrigeración *post mortem*, de carcasas almacenadas a temperaturas de refrigeración (Koohmaraie *et al.* 1995, Morris *et al.* 2006).

El complejo calpaina y calpastatina, está controlado en gran medida por genes que pueden ser detectados fácilmente, mediante técnicas moleculares y así identificar animales portadores de los mismos.

La Facultad de Ciencias Veterinarias de la UAGRM, ha estudiado tres polimorfismos del gen de la calpaína (Pereira 2015), sin embargo para tener una idea completa del sistema, es necesario tener por lo menos un polimorfismo de la calpastatina, analizado en la población.

Existen varios genes de calpastatina reportados a la fecha **CAST** 198, 2959, 2870 (Corva *et al.* 2007; Allais *et al.* 2011; Cuetia *et al.* 2011; Lee *et al.* 2014). En este trabajo se manejó el gen **CAST** 282, porque además de ser el primer polimorfismo estudiado por Schenkel *et al.*, en el año 2006, varios autores trabajaron con este gen en ganado cebuino y taurino.

El SNP (Polimorfismo de Nucleotido Simple) estudiado es una transversión C → G en la posición 282 en el intron 5 de la secuencia del gen calpastatina, con código de acceso del *Gen Bank* de AY008267.

El objetivo del presente trabajo, fue determinar las frecuencias alélicas y genotípicas y las heterocigosidades esperadas y observadas, así como el equilibrio de Hardy y Weinberg del gen de la calpaína **CAST** 282, en tres poblaciones bovinas del departamento de Santa Cruz.

Materiales y métodos

Se obtuvieron muestras de sangre de 50 bovinos Criollos, 47 bovinos Brahman y 52 Nelore. Las muestras de los animales fueron colectadas de diversos hatos del departamento de Santa Cruz. El tamaño de la muestra se determinó conociendo que un tamaño mínimo de 30 animales, es suficiente para caracterizar genéticamente una población (Nei 1987).

Extracción de ADN

De todas las muestras de sangre se extrajo el ADN genómico, utilizando el kit comercial Wizard® *Genomic DNA Purification* del laboratorio Promega Corporation USA, 2010, siguiendo especificaciones del fabricante www.promega.com.

La calidad y cantidad de ADN extraído, se verificó mediante geles de agarosa al 1% y en un espectrofotómetro marca Eppendorf. de 260 a 280 nm.

Tipificación del polimorfismo

Amplificación y termociclado del ADN. Se utilizó el método de amplificación propuesto por Schenkel, en el año 2014, es decir amplificar la reacción con un volumen final total de 25 µl, que contiene una mezcla de los siguientes reactivos: ADN (2 µl), dNTPs 10 mM (2 µl), Buffer II 10X (2,5 µl), MgCl₂ 25 mM (1,5 µl) y Taqgold 5U/µl (0,1 µl), H₂O-PCR (para un volumen de 13,9 µl), Primer Forward 20pmol/ul (1,5 µl), Primer Reverse 20pmol/ul (1,5 µl).

La condición de ciclo PCR, fue de 95°C (10 min) durante 1 ciclo; luego 94°C (30 seg), de 69°C hasta 62°C (30 seg) y 72°C (30 seg) para 8 ciclos; luego 94°C (30 seg), 61°C (30 seg) y 72°C (30 seg), du-

rante 27 ciclos; y finalmente 72°C (5 min), durante un ciclo y el mantenimiento de 4°C, a partir de entonces.

Digestión del ADN. Se utilizó la enzima de restricción Afa I (2µl), con los diluyentes Buffer I (2 µl) y BSA (2 µl), agua (10 µl) y un amplificado PCR de 10 µl. Posteriormente se incubó en baño María durante 3 horas, a 37°C.

Electroforesis de ADN en gel de agarosa. Los productos digeridos se sometieron a electroforesis en gel horizontal 1,5% de agarosa teñido con CyberSafe (Sigma – Aldrich ®) (0,4 µl/ml) en tampón TEB1X, por un tiempo de 30 minutos a 120 de voltaje. Los resultados fueron analizados por un trans iluminador LED (2020 E) y se registraron los geles con una cámara digital fotográfica.

Análisis estadístico

Se calculó la heterocigocidad génica, genotípica, esperada y observada, mediante el software MS-Tools, además se calculó el equilibrio de Hardy Weinberg mediante el índice FIS (Coeficiente de Endogamia), utilizando el algoritmo implementado en el software Genepop 4.0. (Raymond *et al.* 1997).

Resultados y discusión

El polimorfismo estudiado fue el **CAST₂₈₂**, que posee un alelo favorable y otro desfavorable, en este caso el C es el favorable. El Cuadro 1 presenta las frecuencias genotípicas y alélicas, así como las frecuencias genotípicas del polimorfismo estudiado para las razas Brahman, Nelore y Criollo.

Las frecuencias encontradas en este estudio, en el caso de **ganado Criollo**, llegan

a un valor de 35% para el alelo favorable, esto es considerado moderado. No se encontró trabajos similares en ganado Criollo, ya que autores como Cuetia *et al.* (2011), trabajaron con el polimorfismo **CAST₂₉₅₉**. Sin embargo Schenkel *et al.* (2006) y Avilés *et al.* (2010), que sí trabajaron con el **CAST₂₈₂**, reportaron en ganado europeo y español, frecuencias de 63% y 77%, respectivamente. Las frecuencias alélicas encontradas en este trabajo, son más bajas.

Para el **ganado Nelore**, el presente estudio, determinó una frecuencia alélica de 38% para el gen **CAST₂₈₂**. Comparando estos resultados con los encontrados por Curie *et al.* en el año 2010 (62%), se ve que al igual que el ganado Criollo, las frecuencias encontradas en el presente estudio son más bajas. El mismo autor reporta un porcentaje aún mayor (86% y 73%) cuando analizó cruces de Nelore por Angus y de Nelore por Rubia Gallega.

Para el **ganado Brahman**, la situación es bastante parecida al ganado Nelore. En el presente estudio se encontró una frecuencia alélica de 40% para el alelo C del **CAST₂₈₂** en el ganado Brahman. No fue posible obtener datos de comparación con Brahman puro, pero si se encuentran reportes de cruces o compuestos de Brahman. Así, estudios que trabajaron con animales compuestos por genotipos de Brahman (Curie *et al.* 2010), reportaron una frecuencia de 68% para cruces de Brangus. En esta raza también se observa en el presente estudio, porcentajes menores para este gen.

Las heterocigosis esperadas (H_e), observadas (H_o), el valor de FIS que indica el equilibrio de Hardy y Weinberg (HYW) así como el valor de P se hallan descritas en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Frecuencia genotípica y alélica de marcadores moleculares del gen de la Calpastatina (CAST₂₈₂) en bovinos de la raza Brahman, Nelore y Criollo de Santa Cruz - Bolivia

Raza	Marcador	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica
		CC	CG	GG	
Brahman	CAST – 282	CC	CG	GG	C = 40
		0,16	0,48	0,36	G = 60
Nelore	CAST – 282	CC	CG	GG	C = 38
		0,144	0,471	0,384	G = 62
Criollo	CAST – 282	CC	CG	GG	C = 35
		0,123	0,455	0,423	G = 65

Cuadro 2. Heterocigosis esperada (He) y observada (Ho) del gen Calpastatina (CAST₂₈₂) en bovinos de la raza Brahman, Nelore y Criollo de Santa Cruz - Bolivia

Población	Muestras	Locí	H _e	H _o	DE H _o	FIS	VALOR p
Brahman	47	1	0,48	0,46	0,07	0,03	1,000
Nelore	52	1	0,47	0,50	0,07	-0,04	0,778
Criollo	50	1	0,46	0,30	0,06	0,35	0,026

El estudio muestra que para las razas cebuinas (Nelore y Brahman), no existe diferencia significativa entre la heterocigosis esperada y la observada. Aunque si se observa un valor de FIS muy distinto, positivo (0,03) para el Brahman y negativo para el Nelore (-0,04). En el ganado Criollo se detectó una diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre la H_e y la H_o y un valor FIS positivo (0,35).

Esto indica que las poblaciones cebuinas están en equilibrio de HW, no así el ganado Criollo estudiado; esto puede deberse a que la población de ganado Criollo estudiada (Yacumeña y del CIAT), fue seleccionada por bastante tiempo. Esto en sí no implica algo negativo, simplemente da una idea de la situación actual de la frecuencia genotípica de las poblaciones y puede servir para tomar decisiones de manejo del hato, en lo que se refiere a selección de aquí para adelante.

Conclusiones

- Los resultados obtenidos en el presente estudio, son los primeros a nivel nacional, que han logrado determinar mediante técnicas de biología molecular, la frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo Cast₂₈₂ del gen de la calpastatina, en bovinos que son explotados en el departamento de Santa Cruz, en Bolivia.
- Se ha determinado las frecuencias genotípicas de genes asociados a ternera de la carne del gen Calpastatina (CAST₂₈₂), en los bovinos Criollos del departamento de Santa Cruz, las cuales, en el conjunto de la población estudiada, alcanza valores moderados para este marcador: 35%.
- Se ha determinado la heterocigosis observada y esperada al igual que el estadístico FIS para la población de ganado Criollo estudiada. Los valores

encontrados fueron: esperada 0.46, observada 0.35 ($p < 0.011$) y un indicador FIS de 0.38

- Por último, el presente trabajo ha contribuido conjuntamente a trabajos realizados con anterioridad, a la determinación de tres polimorfismos del gen de la calpaína (CAPN1); para establecer un banco de ADN (de 294 animales) y de datos de genotipificación de los genes que participan, en la terneza de la carne bovina (calpaína - calpastatina), los mismos que pueden ser utilizados para consulta o para realizar una serie de trabajos de investigación, referidos a esta temática o procesar información que puede ser utilizada por los dueños, otros investigadores y la comunidad en general, para su utilización en la mejora de la producción de dichos animales y de otros relacionados a la temática.

Referencias citadas

- Allais S., Journaux L., Leveziel H., Payet-Duprat N., Raynaud P., Hocquette J., Lepetit L., Rousset S., Denoyelle C., Bernard-Capel C., Renand G. 2011. Effects of polymorphisms in the calpastatin and m-calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *J. Anim. Sci.* 89: 1-11.
- Aviles C., Azor J., Alvarez F., Fernandez I., Perez J., Membrillo A., Dorado G., Molina A. 2010. Polimorfismos de los genes de la u-calpaína y la calpastatina bovina em las razas de la dehesa. *Información asociaciones Feagas*. pp. 82-89.
- Corva M., Soria L., Schor A., Villarreal E., Perez Cenci M., Motter M., Mezzadra C., Melucci L., Miquel C., Pavan E., Depetris G., Santini F., Naon G. 2007. Association of CAPN1 and CAST gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle from Argentina. *Genetics and Molecular Biology*. 30: 1064 - 1069.
- Cuetia A., Posso M., Hernandez Y., Ariza F., Muñoz E., Álvarez A. 2011. Polimorfismos de los genes calpaína y calpastatina en diez razas bovinas criollas mediante siete marcadores de polimorfismo de nucleótido simple (SNP). *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal. AICA*. 1: 191-194.
- Curie A., Chardulo L., Giusti J., Silveira C., Martins L., de Oliveira N. 2010. Assessment of GH1, CAPN1 and CAST polymorphism as markers of carcass and meat traits in *Bos indicus* and *Bos Taurus* - *Bos indicus* cross cattle. *Meat Sciences*. 86 (4): 915-920.
- Juszczuk-Kibiack E., Wyszynska-Koko J., Icinska K., Rosochacki S. 2008. A novel polymorphisms in intron 12 of the bovine calpastatin gene. *Molecular Biol. Rep.* Vol 35. pp. 29-35.
- Koohmaraie M., Killefer J., Bishop D., Schackelford D., Wheeler Y., Arborena R. 1995. Calpastatin-based methods for predicting meat tenderness. pp. 395-412. **In:** Expression of muscle proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality. The Netherlands.
- Lee H., Kim C., Chai H., Cho H., Kim C., Lim D., Choi H., Dang G., Sharma A., Gondro C., Yang C., Hong K. 1995. Mutations in calpastatina and u-calpain are associated with meat tenderness, flavor and juiciness in Hanwoo (Korean Cattle): Molecular modeling of the effects of substitutions in the calpastatina/u-calpain complex. *Meat Science* 96: 1501-1508.

- Miller F., Huffman L., Gilbert Y., Hammom L., Ramsey B. 1995. Retail consumer acceptance of beef tenderized with calcium chloride. *Journal of Animal Science*. Vol. 73.
- Morris A., Cullen G., Hickey M., Dobbie M., Veenvliet A., Manley R., Pitchford S., Kruk A., Bottema K., 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. *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics*. Vol. 37. pp. 411-414.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. 512 p.
- Pereira J., Falomir-Lockhart H. Loza A., Villegas-Castagnasso E., Rojas P., Carino M., Ripoli M., Giovambattista G. 2015. Comparación de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos CAPN1-316 y CAPN1-4751 del gen de la calpaína en tres poblaciones de ganado Criollo Boliviano. *AICA 6* (2015). pp. 156-164.
- Raymond M., Rosusset F. 1997, *GENE Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism*. *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- Schenkel S., Miller P., Jiang Z., Mandell B., Ye X., Li H., Wilton B. 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.

Caracterización genética de bovinos Criollos mediante marcadores autosómicos, mitocondriales y del cromosoma “Y” en las provincias Vallegrande y Florida, Santa Cruz

¹ Gutierrez Luis; ² Pereira Juan; ² Loza Ariel; ² Siancas Mario

¹ Facultad Integral de los Valles; ² Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno

E-mail de contacto: antonios8@hotmail.com

Resumen. Los bovinos Criollos americanos, son descendientes directos de los animales introducidos por los conquistadores europeos, durante las primeras décadas de la colonización americana. Durante las últimas décadas, las poblaciones de bovinos Criollos han sufrido un drástico proceso de reducción poblacional, debido al reemplazo o a los cruzamientos absorbentes con animales de razas europeas e índicas, altamente seleccionadas. Sin embargo, aún existen poblaciones puras de este valioso recurso zoogenético en la mayoría de los países americanos, entre las que se encuentra el biotipo de bovino Criollo de los valles cruceños. Con el objetivo de realizar la caracterización genética de la población de bovinos Criollos de Vallegrande y Florida, se analizaron 17 microsatélites autosómicos, cinco microsatélites y un INDEL del cromosoma Y, además de la región D-loop del ADN mitocondrial. Los resultados obtenidos mostraron que la población de bovinos Criollos de Vallegrande y Florida, presentó niveles de diversidad genética medida a través de marcadores autosómicos similares a los observados en otros biotipos Criollo americanos. Los análisis de dendrograma y componentes principales evidenciaron el mayor grado de divergencia, con respecto al resto de los biotipos de bovinos Criollos incluidos en el presente estudio. La composición genética de los linajes maternos, es típica del ganado Criollo latinoamericano, evidenciando un origen mixto europeo y africano. Sin embargo, el análisis de los haplotipos del cromosoma Y, así como el de asignación racial, mostró que la población de bovinos Criollo de Vallegrande y Florida, ha presentado introgresión de genes índicos, probablemente mediado por machos. La presencia de linajes maternos privativos, así como el grado de divergencia observado con respecto a otros Criollos, justificarían la conservación de este recurso zoo genético.

Palabras clave: Diversidad genética; Recursos zoogenéticos; Introgresión génica

Introducción

La domesticación de animales silvestres ha producido lo que actualmente se conoce como "razas domésticas", es decir "grupos de animales seleccionados por el hombre, para que posean una apariencia uniforme, que los distinga de otros miembros de la misma especie" (Clutton-Brock 1987). Aproximadamente un tercio

de éstas se encuentran actualmente en riesgo de extinción o han sufrido considerables reducciones poblacionales (Loftus *et al.* 1994 a).

El ganado Criollo de Vallegrande no escapa a esta situación, esta área geográfica de Bolivia, por años permaneció prácticamente aislada de las corrientes de mejora. Esto terminó cuando la introduc-

ción de ganado lechero especializado comenzó a llegar de las regiones más pobladas de Bolivia. Los cruzamientos indiscriminados disminuyeron la frecuencia de genes criollo, drásticamente. Ante esta realidad es imperioso y urgente hacer estudios de caracterización de los recursos genéticos locales para determinar el grado de erosión de los mismos. La caracterización de las razas, originalmente basada en caracteres fenotípicos, ahora puede incorporar no sólo marcadores bioquímicos y grupos sanguíneos, sino también diferentes clases de marcadores de ADN (Loftus *et al.* 1994 b; Medjugorak *et al.* 1994).

EL objetivo del presente trabajo fue la caracterización genética, mediante marcadores autosómicos, mitocondriales y del cromosoma Y, de los bovinos de la raza Criolla de la provincia Vallegrande del departamento de Santa Cruz. Esto se logró al estimar los niveles de diversidad genética global, mediante el análisis de marcadores genéticos moleculares del tipo microsatélites, además evaluar los niveles de introgresión de genes índicos, estudiar los linajes maternos mediante el análisis de la región control (D-loop) del ADN mitocondrial, mediante secuenciación directa y estudiar los linajes paternos, mediante el estudio de polimorfismo del cromosoma Y.

Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en el departamento de Santa Cruz, el área de trabajo específica fue la provincia Vallegrande y Florida. El área de estudio se encuentra a una altura de 2030 metros sobre el nivel del mar, tiene una precipitación anual de 244 mm y una temperatura ambiente media de 18.2°C.

Unidad de muestreo y extracción de muestras

El estudio incluyó el análisis de 98 muestras de ganado Criollo, de las cuales 25 corresponden a Criollo de las provincias de Vallegrande y Florida, 35 de Criollo Yacumeño, 17 de Criollo Saavedreño y 21 de Criollo CEASIP. Esto permitió comparar a la población de Vallegrande, con otros biotipos de bovinos Criollo bolivianos.

Análisis de microsatélites autosómicos

Para caracterizar la diversidad genética total de la población en estudio, su grado de mezcla y su relación con otras razas, el ADN fue genotipado utilizando un panel de diecisiete marcadores genéticos de tipos microsatélites autosómicos. Estos microsatélites han sido estandarizados y recomendados por la *Sociedad Internacional de Genética Animal ISAG* (www.isag.org.uk/) y por la FAO (van de Goor *et al.* 2009).

Metodología estadística

Para estimar las desviaciones de las frecuencias genotípicas observadas, con respecto a las proporciones teóricas propuestas por Hardy Weinberg, se utilizó el índice FIS.

La estimación de las probabilidades del Hardy-Weinberg, se realizó con el programa GENEPOP 4 (Guo y Thompson 1992; Raymond y Rousset 1995). Los niveles de variabilidad genética se calcularon utilizando el software GENEPOP 4. Las matrices y los árboles filogenéticos se construyeron con el programa POPULATIONS 1.2.28 (Langella 2000). Para la edición del dendograma se utilizó el programa TreeView 1.6.6 (Page 2001). Los árboles filogenéticos se construyeron

a partir de las matrices de distancia DA y DSW, utilizando los métodos de UPGMA (Sneath y Sokal 1973) y neighbor-joining -NJ- (Saitou y Nei 1987).

Para estudiar las relaciones genéticas entre las razas estudiadas, se utilizó el análisis de componentes principales (ACP) (Mardia 1979).

El programa Structure 2.3.4 (Pritchard, Stephens & Donnelly 2000) se utilizó para el análisis de cluster y estimar la proporción de mezcla de los animales evaluados.

Para el estudio de ADN mitocondrial, las secuencias crudas del D-loop mitocondrial, fueron editadas y se alinearon con las reportadas en la base de datos pública Genbank, usando el software CLUSTAL-W multiple alignment, disponible en:

www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/

y el algoritmo *blastn*, disponible en:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Resultados y discusión

Medidas de diversidad genética

Los 17 *loci* autosómicos tipificados en el presente trabajo, fueron polimórficos, presentando en todos los casos, al menos dos alelos con frecuencias apreciables. El número de alelos promedio por locus fue de 5.18.

Los valores de H_e observados entre los STRs, variaron desde 0.083 en BM2113 y 0.898 en TGLA122, resultando en una heterocigosidad promedio (H_e) de 0.664 (Cuadro 1).

Estos resultados muestran que la población analizada conserva un nivel considerable de variación genética global autosómica, siendo semejante a los valores reportados en otras poblaciones de Criollo bolivianos.

El análisis de diversidad genética estimada mostró elevados niveles de diversidad genética, similares a los reportados a otras razas Criolla americanas (por ejemplo Lirón *et al.* 2006).

Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

Para evaluar el desequilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), se utilizó el índice FIS. En total 2 (TGLA126 y MN12 que se observan en negrilla en el Cuadro 1) de los 17 *loci*, mostraron desviaciones significativas del HWE, con valores de probabilidad inferiores al 5%.

No se observó un aumento significativo de genotipos homocigotos, hecho que estaría indicando la ausencia de niveles importantes de consanguinidad.

Distancias genéticas y árboles

La topología de los árboles varió considerablemente según las distancias y los algoritmos de construcción utilizados. Se observaron dos cluster principales que incluían las razas de origen índico y taurino, respectivamente.

En el grupo taurino, las razas europeas se entremezclaron de forma irregular con las Criollas americanas. Además, cabe destacar que en tres de los cuatro árboles, la población de los valles presenta la posición más divergente dentro de las razas taurinas (Figura 1).

Cuadro 1. Diversidad genética medida a través del número de alelos (n_a), y la heterocigosidad esperada (h_e) y observada (h_o) para los 17 microsatélites analizados en los Criollos de Vallegrande, Santa Cruz

Locus	n_a	h_o	h_e	F_{IS} – valor de p
BM1818	5	0.923	0.76	-0.225 - 0.164
BM1824	2	0.75	0.489	-0.571 - 0.090
ETH10	5	0.917	0.707	-0.315 - 0.432
ETH225	2	0.75	0.489	-0.571 - 0.093
ETH3	6	0.75	0.855	0.128 - 0.657
RM067	2	0.333	0.29	-0.160 - 1.000
SPS115	5	0.462	0.591	0.226 - 0.294
TGLA122	10	0.846	0.898	0.060 - 0.854
TGLA126	8	0.846	0.849	0.004 - 0.778
TGLA227	2	1	0.522	-1.000 - 0.002
BM2113	2	0.083	0.083	ND
BRR	6	0.818	0.814	-0.006 - 0.690
CSSM66	8	0.846	0.757	-0.123 - 0.670
CSRM60	5	0.6	0.737	0.194 - 0.565
INRA 063	5	0.667	0.746	0.111- 0.411
HEL9	7	0.909	0.848	-0.075 - 0.840
MN12	8	0.444	0.85	0.492 - 0.008
Promedio	5.18	0.703	0.664	p = 0.052

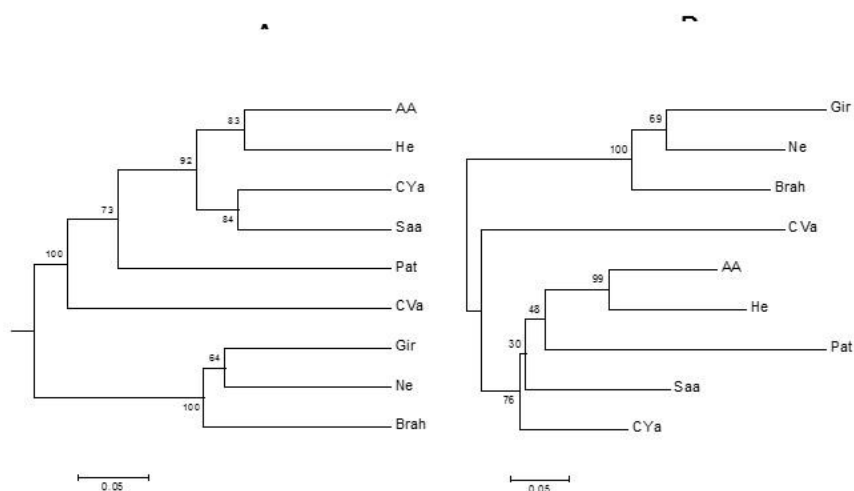


Figura 1. Fenogramas construidos con los métodos UPGMA (A) y NJ (B) a partir de la matriz de distancia DA

(los números en los nodos representan el porcentaje de ocurrencia del grupo en 1000 iteraciones del test de bootstrap)

Introgresión de genes índicos en las razas de Criollo sudamericano

Con el fin de estimar el grado de pureza de la población de los valles cruceños, y determinar si es posible diferenciarla genéticamente de otros grupos genéticos, se realizó una asignación racial, mediante análisis de clusters. La Figura 2A, sugiere que las poblaciones de Criollo analizadas, presentan diferente grado de introgresión de genes índicos, mientras que la Figura 2B muestra que los bovinos Criollos, forman un grupo natural diferenciado de los taurinos europeos.

Los resultados obtenidos pusieron en evidencia tres grupos: *taurinos europeos*, *taurinos americanos* y *cebuinos*.

Linajes paternos: Análisis de polimorfismos del cromosoma Y

El análisis de los marcadores del cromosoma Y, en los machos de la población de Criollos de los valles cruceños, detectó dos haplotipos: un haplotipo Y2 taurino (Val1) y el Y3 cebuino (Val2) (Cuadro 2). Se evidencia que la población de bovinos Criollos de los valles, estudiada en el presente trabajo, presenta niveles importantes de introgresión de genes índicos.

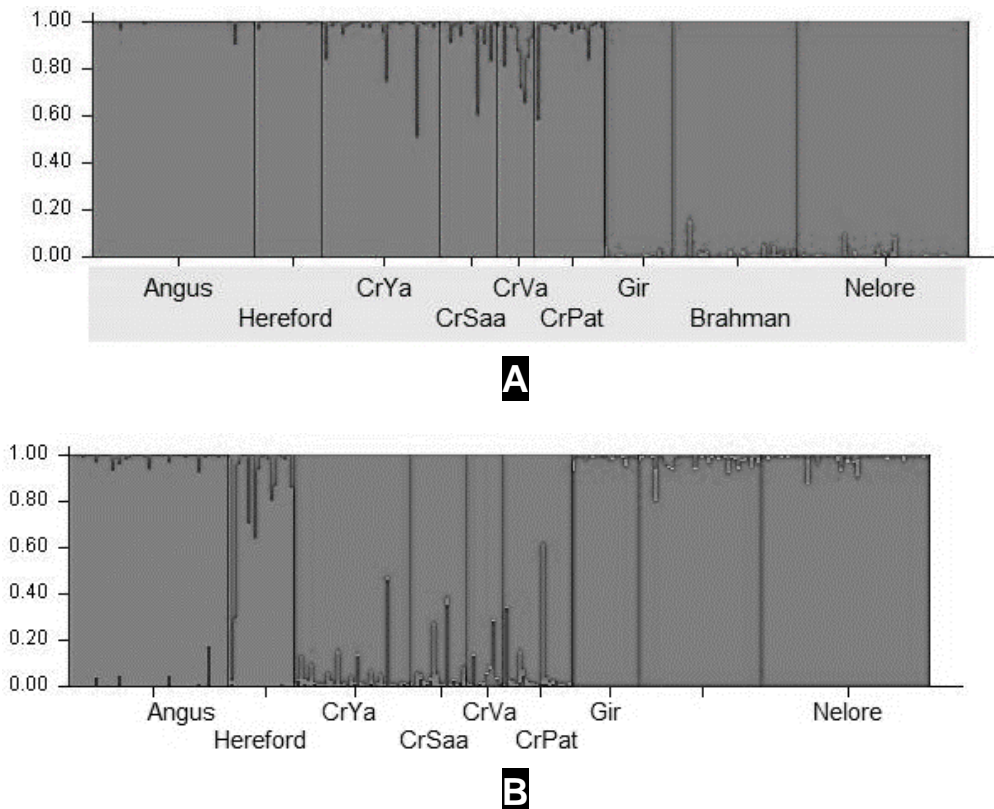


Figura 2. Representación de los resultados del análisis de cluster (asignación racial) de las razas Cebuinas Nelore y Gir; taurinas europeas Angus y Hereford y las razas de origen Criollo del Ceasip (CrPat), Criolla de los valles (CrVa), Criolla Saavedreña (CrSaa) y Criolla Yacumeña (CrCYa). a. K = 2; b. K = 3.

Cuadro 2. Haplo grupos del cromosoma Y detectados en Vallegrande obtenidos mediante la tipificación de los microsátelites BM861, INRA189, BYM, UMN0103 y UMN0307 y el INDEL ZFY

Muestra	BM 861	INRA 189	BYM	UMN0 103	UMN0 307	ZFY5 indel	Haplo grupo
Val 1	158	102	260	132	149	-	Y2
Val 2	156	90	254	114	-	GT	Y3

Linajes maternos: Análisis del ADN mitocondrial

Con el fin de determinar la diversidad mitocondrial (linajes maternos), se analizó mediante secuenciación directa, un fragmento de 240 pares de bases correspondiente a la región D-loop, en dos muestras de bovinos Criollos de Vallegrande y Florida, obtenidas en los años 2000 y 2014.

Mediante el análisis de los linajes maternos, se detectaron diez haplotipos mitocondriales en la muestra total (Cuadro 3, Figura 4), tres europeos y siete africanos. En resumen, la composición genética de los linajes maternos de los bovinos Criollos de Vallegrande y Florida, compuesta por haplotipos europeos y africanos, es típica de los bovinos Criollo bolivianos, ya que resultados similares fueron encontrados por Pereira *et al.* (2011).

Cuadro 3. Haplotipos y haplogrupos (europeos= T3; africanos= T1) mitocondriales detectados en el los muestreos de 2000 y 2014 de la población de Vallegrande

Haplo-tipo	Posición												Haplo-grupo	Nro. de animales			
	16050	16055	16056	16066	16084	16110	16113	16139	16141	16147	15154	16247		16255	2014	2000	Total
CVA1	C	T	A	A	C	C	T	C	T	T	A	C	T	Europeo	4	3	7
CVG3	C	T	G	A	C	C	A	C	T	T	A	C	A	Europeo	0	3	3
CVG4	C	T	A	A	C	C	T	C	C	T	G	C	T	Europeo	0	1	1
CVG2	T	T	A	A	C	C	C	C	T	T	A	C	C	Africano	0	1	1
CVG5	T	C	A	A	C	C	C	C	T	T	A	C	C	Africano	0	1	1
CVG6	T	T	A	A	C	C	C	T	T	T	A	T	C	Africano	0	1	1
CVG7	T	T	A	A	C	C	C	T	T	C	A	C	C	Africano	0	1	1
CVG8	T	T	A	A	T	C	C	T	T	T	A	C	C	Africano	0	1	1
CVG9	T	T	A	G	T	C	C	T	T	T	A	C	C	Africano	2	0	2
CVG10	T	T	A	A	C	T	C	T	T	T	A	C	C	Africano	1	0	1

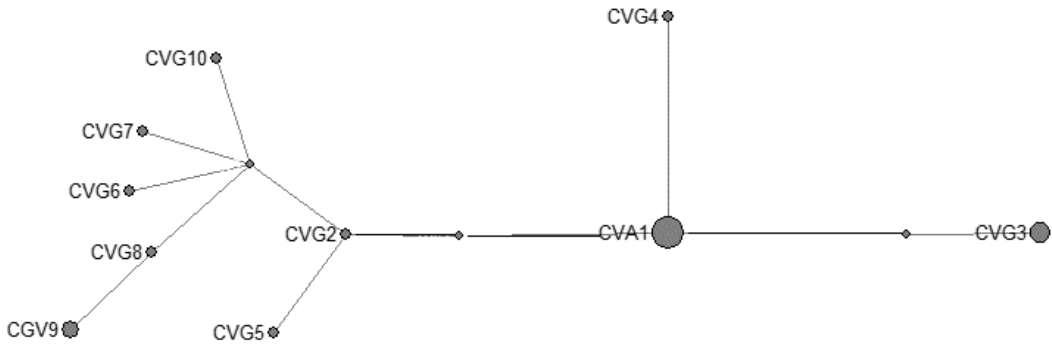


Figura 4. Network de los haplotipos mitocondriales (linajes maternos) identificados en la población de bovinos Criollos de Vallegrande

(CVG1, CVG3 y CVG4 son haplotipos europeos, mientras que CVG2, CVG5, CVG6, CVG7, CVG8, CVG9 y CVG10 son haplotipos africanos. El tamaño de los nodos es proporcional al número de animales identificados con ese haplotipo)

Conclusiones

- El gran número de haplotipos inéditos o solo presentes en los bovinos Criollos americanos, remarcan la importancia de este recurso zoogenético y justifican la implementación de programas de conservación.

Referencias citadas

Clutton-Brock J. 1987. A natural history of domesticated mammals. Cambridge University Press and British Museum (Natural History).

Guo W., Thompson A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 48: 361-372.

Langella O. 2000. Populations 1.2.30. Laboratoire Populations, Génétique et Evolution, Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS UPR9034. Gif Sur Yvette, France.

Lirón P., Bravi M., Mirol M., Peral-García P., Giovambattista G. 2006. African

matrilineages in American Creole cattle: evidence of two independent continental sources. *Animal Genetics*. 37: 379-382.

Loftus T., Machugh E., Ngere O., Balain S., Badi M., Bradley G., Cunningham P. 1994 a. Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. *Animal Genetics*. 25: 265-271.

Loftus T., Machugh E., Bradley G., Sharp M., Cunningham P. 1994 b. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 2757-2761.

Mardia V., Kent T., Bibby M. 1979. *Multivariate analysis*. Academic Press, Nueva York. pp. 213-246.

Medjugorac I., Kustermann W., Lazar P., Russ I., Pirchner F. 1994. Marker-derived phylogeny of European cattle supports endemic expansion of agriculture. *Animal Genetics*. 25: 19-27.

- Page M. 2001. Treeview 1.6. 6. Glasgow, Scotland: Division of Environmental and Evolutionary Biology, Institute of Biomedical and Life Sciences. University of Glasgow, Scotland.
- Pereira J., Posik M., Hoyos R., Liron P., Loza A., de Luca C., Peral-Garcia P., Giovambattista G. 2011. Evaluación del efecto de la fragmentación poblacional del bovino Criollo Yacumeño sobre la diversidad mitocondrial. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal. AICA.* 1: 157-160.
- Pritchard K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics.* 155: 945-959.
- Raymond M., Rousset F. 1995. Genepop (version 1.2): A population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity.* 86: 248-249.
- Saitou N., Nei M. 1987. The Neighbour-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution.* 4: 406-425.
- Sneath A., Sokal R. 1973. *Numerical Taxonomy.* W. H. Freeman, San Francisco.
- van de Goor P., Panneman H., van Haeringen A. 2009. A proposal for standardization in forensic bovine DNA typing: allele nomenclature of 16 cattle-specific short tandem repeat loci. *Animal Genetics.* 40 (5): 630-636.

Determinación de la frecuencia alélica del gen Calpastatina (CAST₂₈₂) asociado a terneza de la carne en bovinos Nelore en el departamento de Santa Cruz

Pereira Juan; Manrique Issac; Loza Ariel; Miranda Betzabeth

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno

E-mail de contacto: antonios8@hotmail.com

Resumen. El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Veterinario "PROVETSUR", de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Gabriel René Moreno. El objetivo del presente estudio fue determinar la frecuencia alélica del gen Calpastatina (CAST₂₈₂), asociado a terneza de la carne en bovinos de la raza Nelore, en Santa Cruz. El trabajo consistió en analizar mediante técnicas de biología molecular, el ADN de 52 animales de diferentes cabañas seleccionadas, a los cuales se les extrajo muestras de sangre (3 a 5 ml por vena coxígea), las que fueron remitidas a PROVETSUR, donde se realizó la extracción de ADN genómico. Se verificó la calidad y cantidad de ADN extraído mediante geles de agarosa y un espectrofotómetro Eppendorf de 260 a 280 nm, para luego realizar el amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR-RFLP. Los geles fueron visualizados y analizados por un transiluminador, registrándose con una cámara digital fotográfica. Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron determinadas mediante software específicos. Los resultados obtenidos, en frecuencia alélica de genes favorables para la terneza de la carne (C), del polimorfismo CAST₂₈₂, se encuentra en una proporción de 39% y para la frecuencia alélica desfavorable (G): 61%. También se determinó la frecuencia alélica (C) por cabañas evaluadas. La heterocigocidad observada, esperada y el estadístico Fis, para la población de ganado Nelore estudiada, fue de 0.48, 0.50 y -0.05, respectivamente, detectándose diferencias significativas en dos de seis cabañas. En general, la frecuencia para los alelos favorables en este polimorfismo es baja, existiendo una frecuencia alta de genes desfavorables, para terneza, en la raza Nelore.

Palabras clave: ADN genómico; Polimorfismos; Genotipificación; Calidad organoléptica

Introducción

Bolivia cuenta con importantes zonas aptas para la explotación bovina, así se tiene los Llanos con el 75%, Valles 12%, Altiplano 3% y Chaco con 10%. La crianza de ganado bovino es la principal actividad pecuaria y uno de los pilares fundamentales que favorece a la economía regional, departamental y nacional (Pereira y Calderón 2002).

Esta actividad también es fundamental en términos de aporte económico. Actual-

mente, la producción ganadera exige cada vez más la aplicación de los avances científicos y técnicos, con el objetivo de lograr en los sistemas de explotación, una mejor eficiencia biológica y económica, con un aprovechamiento racional de los recursos disponibles (Pereira y Calderón 2002).

La explotación ganadera en Bolivia aumentó vertiginosamente en los últimos años, hasta constituirse en parte fundamental y estratégica de la economía agropecuaria nacional; también debe

enfrentar grandes retos con respecto a su sostenimiento, puesto que es necesario producir carne de alta calidad, con características adecuadas, que logren satisfacer al consumidor y evitar que el comercio internacional cope los mercados locales, con carnes provenientes de otros países, con mejores estándares de calidad, inocuidad y precio (FEGASACRUZ, 2015).

La calidad de la carne bovina constituye un importante factor de interés económico. Entre todos los atributos que contribuyen a la calidad, se ha comprobado que la terneza es el más apreciado por los consumidores (Herrmann, 2009).

Muchas tecnologías desarrolladas en genética molecular, tienen que ver con la mejora de la calidad de la carne; con este propósito se ha estudiado bastante el complejo Calpaína y Calpastatina, para correlacionar su presencia con la terneza de la carne en bovinos. No solo es importante determinar la presencia de genes favorables para esta característica en los animales, si no también determinar su expresión fenotípica, puesto que la expresión genética en general está influenciada por el medio ambiente, lo que a su vez puede determinar que el gen se comporte no siempre de la misma manera en todos los escenarios (Cuetia *et al.* 2012).

Los genes que determinan la terneza de la carne, son los que están relacionados con la Calpaína y la Calpastatina, que determinan la proteólisis de las proteínas miofibrilares durante el periodo de refrigeración *post-mortem* de carcasas almacenadas a temperaturas de refrigeración (Soria y Corva 2004).

Existen varios estudios que indican una gran posibilidad de uso de esos marcadores del complejo Calpaína y Calpastatina

para mejorar la terneza de la carne de bovinos. Pero es necesario validar la función de los genes, en las poblaciones específicas en las que serán implementados sistemas de mejora, apoyados por marcadores moleculares (Gill 2009).

Por consiguiente, este trabajo tiene como objetivo general el determinar la frecuencia alélica y genotípica del gen Calpastatina (CAST₂₈₂) en la raza Nelore, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR - RFPL), en el departamento de Santa Cruz.

Materiales y métodos

El trabajo se realizó en el departamento de Santa Cruz, el cual está situado en la zona este del país, comprendida entre los 57°30' y 64°40' de longitud Oeste y entre los 13°40' y 20°20' de latitud Sur. Tiene una superficie territorial de 370.621 km², representando el 33,74% del territorio nacional. Alberga, según el Censo del año 2012, alrededor de 2.655.084 habitantes (INE 2015). El departamento tiene un clima semi-tropical, con un verano cálido, con temperaturas que rondan los 39°C y un invierno fresco e incluso hasta en ocasiones bastante frío (en junio y julio). Las temperaturas en la ciudad capital (Santa Cruz de la Sierra) suelen bajar de los 6°C, siendo tal descenso de temperatura ostensible en los horarios nocturnos; de esta manera existe también, aunque menos notorio, un otoño y una primavera en las cuales son frecuentes las tormentas y lluvias.

Las unidades de muestreo estuvieron constituidas por 52 bovinos de la raza Nelore, conformada por machos y hembras de diferentes edades, provenientes de seis cabañas de reproductores en Santa Cruz.

El cálculo del tamaño de muestra se basó en trabajos previos, en los cuales fueron utilizadas simulaciones teóricas en datos empíricos, a fin de determinar el tamaño mínimo de 52 animales para caracterizarlos genéticamente una población.

El error estándar de la estimación de las frecuencias génicas depende de las frecuencias alélicas y del número de individuos analizados, valor que fue utilizado para distribuir el muestreo.

Para el presente estudio se colectaron muestras de sangre distribuidas en seis cabañas de reproductores (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de animales evaluados por propiedad o cabaña de bovinos raza Nelore

Cabaña	Número
Todos Santos Hirtner	15
Chorobi Menora	4
El Trébol	11
Sausalito	9
Capiguara	7
Rancho La Caldera	6
Total	52

Para la recolección de muestras de sangre, el empaque y la utilización en el laboratorio, se utilizaron los siguientes materiales: marcadores indelebles, bolígrafos, desinfectantes, algodón, guantes de látex descartables, jeringas descartables de 10 ml con aguja, tubos con anticoagulante de 9 ml, ficha epidemiológica para identificación de los animales, cinta auto adherente. Otros materiales más específicos fueron: matraz, micropipeta monocanal ajustable de 10 - 1000 µl., viales descartables de 1 ml, papel absorbente, envases para desechos biopeligro-

sos, micropuntas descartables de 10, 20, 100, 200 y 1000 µl, gradillas para tubos de 1,5 ml, entre otros. En cuanto a equipos de laboratorio, se utilizó: termociclador, cabina de PCR, centrifugador, agitador vórtex, transiluminador y cuba de electroforesis. Entre los reactivos de laboratorio se utilizaron: Kit de extracción de ADN Wizard® del laboratorio Promega, TBE 0,5 X, cebadores (primers reverse y forwar), deoxinucleotidos (DNTP 20 mm), tampón de PCR (PCR tampón 10X - 100 mM de Tris-hcl pH 9.0, 500 mM de kcl), enzima ADN polimerasa (gotaq -Promega®), cloruro de magnesio 1,5 mM, intercalante SYBR® Green I nucleic (Sigma Aldrich), gel de agarosa, LE, Analytical Grade (Promega-Madison, USA).

Se realizó la toma de muestra de sangre en un volumen de 3 a 5 ml en cada bovino, la cual se extrajo a partir de la vena coccígea. Las muestras fueron almacenadas en tubos con anticoagulante EDTA.

Cada muestra fue identificada en una ficha de muestreo con los datos que consignaba el nombre del animal, el registro de la propiedad, la fecha de nacimiento. Las muestras se las envió a refrigeración en el laboratorio PROVETSUR, dependiente de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma Gabriel René Moreno.

Extracción de ADN. De todas las muestras de sangre, se extrajo el ADN genómico, utilizando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification del laboratorio Promega Corporation (USA, 2010), siguiendo las especificaciones del fabricante. La calidad y cantidad de ADN extraído se verificó mediante geles de agarosa al 1% y en un espectrofotómetro marca Eppendorf de 260 a 280 nm, bajo una longitud de onda.

Tipificación de los polimorfismos. Las reacciones de PCR se realizaron en el sistema de PCR GenAmp 9700 (amplificado Biosystems). Los productos de PCR correspondientes fueron 523 pb. La secuenciación de los productos de PCR reveló una transversión G/C en los productos, lo que resulta en la presencia o ausencia de un sitio de restricción Rsa-I, en la posición de 257 pb con el conocimiento de secuencia gt/ac (Shenkel *et al.* 2014) (Cuadro 2).

Condiciones para la PCR. Para este PCR de 523 pb, se utilizaron H₂O (0,6 µl), Buffer II 10X (1,0 µl), MgCL 25 Mm (0,73µl), dNTPs 10 mM (primer reverse 20 pmol/µl (0,13 µl), primer forward 20 pmol/µl (0,13 µl), Taq Gold 5 U/µl (0,1 µl) y ADN (0,6 µl), con un volumen final de 25 µl (Schenkel *et al.* 2006).

Condiciones de ciclado para la PCR de punto final. La condición de ciclo PCR fue de 95°C (10 min) durante 1 ciclo; luego 94°C (30 s), de 69 hasta 62°C (30 s) y 72°C (30 s) para 8 ciclos; luego 94°C (30 s), 61°C (30 s) y 72°C (30 s), durante 27 ciclos, y finalmente, 72°C (5 min) durante 1 ciclo, el mantenimiento de 4°C (Schenkel *et al.* 2006).

Restricción enzimática (RFLP). Los productos amplificados de PCR fueron digeridos por la endonucleasa de restric-

ción Rsa-I (Invitrogen, Life Technologies, CA, EE.UU.), la misma que se utilizó según las recomendaciones del fabricante.

Se utilizó la enzima de restricción Afa I (2 µl), con los diluyentes Buffer I (2 µl) y BSA (2 µl), agua (10 µl) y un amplificado PCR de 10 µl. Posteriormente se incubó en “baño María”, durante 3 horas, a 37°C.

Electroforesis. Para la visualización del tamaño y calidad de los fragmentos amplificados, los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en geles al 1.5% de agarosa, utilizando el Buffer 1X TBE y teñidos con bromuro de etidio, a 120 V por 30 minutos.

Los resultados fueron analizados por un transiluminador LED (2020E) y se registraron los geles con una cámara digital fotográfica (Schenkel *et al.* 2006).

Análisis estadístico. Se calculó la heterocigocidad génica y genotípica (esperada y observada), mediante el software MS-Tools®.

Además se calculó el equilibrio de Hardy Weinberg, mediante el índice FIS, utilizando el algoritmo implementado en el software Genepop 4.0.

Cuadro 2. Marcadores utilizados para el genotipo de polimorfismos de nucleótido único en el gen CAST₂₈₂

Polimorfismo genético	Secuencia del marcador 5' - 3'
CAST ₂₈₂	F:5'CCTCGACTGCTGACCAATTCCGAAGTAAAGCCA AAGGAACA-3' R:5'ATTTCTCTGATGGTGGCTGCTCACT-3'

Fuente: Schenkel *et al.* 2006.

Resultados y discusión

Frecuencia genotípica y alélica de marcadores moleculares del gen de la Calpastatina en la raza Nelore

En el presente trabajo de investigación se determinó la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo CAST₂₈₂ del gen de la Calpastatina, en bovinos de la raza Nelore, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con marcadores de polimorfismos de fragmentos de restricción (PCR - RFLP). Los resultados obtenidos se indican en el Cuadro 3, donde se evidencia una frecuencia baja para este gen CAST₂₈₂.

En un estudio realizado por Schenkel *et al.* (2006), en animales de raza *Bos taurus*, se encontraron que animales con el genotipo CC produjeron carne más tierna (-0.32 kg de fuerza de corte) en comparación con los que presentaron el genotipo GG, mientras que, el genotipo CG presentó ternera intermedia.

Los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran que las frecuencias genotípicas encontradas para los alelos favorables del gen Calpastatina, asociados a ternera de la carne, son bajas en poblaciones de los bovinos de la raza Nelore.

Estas frecuencias genéticas de la presente investigación, concuerdan con muchos otros autores (Curie *et al.* 2009; Curie *et al.* 2010; Casas *et al.* 2006), los cuales

determinaron que los *Bos taurus* son los que tienen mayor frecuencia de genes asociados a ternera, en contraste con los *Bos indicus*, cuyas frecuencias son bajas.

Sin embargo, aún con estos resultados de frecuencias bajas, se puede incentivar a los productores a que posean animales con variantes favorables de los genes asociados a la ternera de la carne, a ser reconocido por la Asociación de Criadores de Ganado Cebú (ASOCEBU), creando así el incentivo entre los socios por realizar la prueba y utilizar o seleccionar a futuros reproductores no solamente por los valores genéticos convencionales (DEPs), sino que como un valor agregado a esos valores, se podría ofertar reproductores, certificando que poseen genes asociados a la ternera de la carne.

Al actuar de esta manera se podría, a lo largo de varios años de selección, aumentar ligeramente la frecuencia de estos genes en la población cebuina del departamento de Santa Cruz.

En el Cuadro 4 se muestra los resultados del análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas de marcadores moleculares del gen Calpastatina en raza Nelore. Al analizar por biotipos, se observaron diferencias entre las poblaciones, indicando que la frecuencia alélica para el alelo favorable (C) más alta, se halla en la cabaña Capiguara y cabaña Sausalito, mientras que en las otras cabañas, se registraron valores bajos.

Cuadro 3. Frecuencia genotípica y alélica de marcadores moleculares del gen Calpastatina (CAST₂₈₂) en bovinos de la raza Nelore

Raza	Marcador	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica
Nelore	CAST ₂₈₂	GG	CG	CC	G = 0.61
		0.35	0.52	0.13	C = 0.39

Cuadro 4. Frecuencia genotípica y alélica del gen Calpastatina (CAST₂₈₂) en bovinos de la raza Nelore por cabaña

Cabaña	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica
	GG	CG	CC	
Todos Santos Hirtner	GG	CG	CC	G = 0.67 *
	0.4	0.53	0.07	C = 0.33
Trébol	GG	CG	CC	G = 0.64
	0.45	0.36	0.18	C = 0.36
Sausalito	GG	CG	CC	G = 0.50
	0.22	0.56	0.22	C = 0.50
Chorobi	GG	CG	CC	G = 0.88
	0.75	0.25	0	C = 0.12
Capiguara	GG	CG	CC	G = 0.43
	0.14	0.57	0.29	C = 0.57
Rancho La Caldera	GG	CG	CC	G = 0.67 *
	0.33	0.67	0	C = 0.33

* Se halló diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) en la cabaña Todos Santos Hirtner y en la cabaña Rancho La Caldera

Con estos resultados se debe consensuar con los criadores de ganado cebú, a través de su asociación, para modificar el reglamento de registro genealógico y adicionar algún artículo específico relacionado a la genotipificación de reproductores, tanto machos como hembras, para asignarles un distintivo; de esta manera se incentivará a los productores a identificar, dentro de sus hatos, a los pocos animales que posean uno de los polimorfismos favorables para la característica de terneza.

Estos procesos se puede dividir en técnicas de manejo pre y post faeneo. Las técnicas de pre faeneo van desde el control del estrés de los animales, hasta el desarrollo de nuevas técnicas de derribe de animales, mientras que las de post faeneo, tienen que ver con todos los pro-

cesos proteolíticos que ocurren en el proceso de maduración de la carne, que es un tema que no compete al presente estudio pero que debería ser abordados por los especialistas.

Heterocigosis esperada (He) y observada (Ho) del gen Calpastatina locus 282 en ganado Nelore de Santa Cruz

Las frecuencias para este polimorfismo evaluado, se describen con una heterocigosis esperada de 0.5 y Heterocigosis observada de 0.48 para el polimorfismo CAST₂₈₂ del gen de la Calpastatina en raza bovina Nelore, con un valor P significativo ($p < 0.05$) de 0.77, lo que da a entender que no existe equilibrio de Hardy y Weimberg en la población Nelore (Cuadro 5).

Cuadro 5. Heterocigosis esperada (He) y observada (Ho) del gen Calpastatina *locus* 282 en ganado Nelore de Santa Cruz

Raza	Polimorfismo	H _o	H _e	DE H _o	FIS	Valor p
Nelore	CAST ₂₈₂	0.48	0.50	0.07	- 0.05	0.77

Se confirma que el bovino Nelore posee un solo alelo de la variante más favorable del gen; según Hermann (2009), los heterocigotos [+0] transmiten al 50% de sus hijos, la variante alélica favorable (+) y al otro 50% la variante alélica no favorable (-).

Conclusiones

- El presente estudio reporta los primeros resultados a nivel nacional, utilizando técnicas de biología molecular, sobre la frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo CAST₂₈₂ del gen de la Calpastatina, en bovinos de raza Nelore, que son explotados en el departamento de Santa Cruz.
- Se ha logrado determinar la frecuencia alélica del polimorfismo CAST₂₈₂ asociado a la terneza de la carne, en la raza Nelore, de diferentes cabañas del departamento de Santa Cruz de la Sierra, siendo de 61% para la frecuencia alélica G y 39% de frecuencia alélica para C.
- Se ha logrado determinar la heterocigosis observada y esperada, al igual que el estadístico Fis, para la población de ganado Nelore estudiada.
- Las frecuencias genotípicas encontradas para los alelos favorables del gen Calpastatina, asociados a terneza de la carne, son variables en las estancias de raza Nelore pero, en general, la frecuencia para los alelos favorables en este polimorfismo es baja, exis-

tiendo una frecuencia alta de genes desfavorables para la terneza en la raza Nelore.

Referencias citadas

- Casas E., White N., Wheeler I., Schakelford D., Koomaraie M., Riley G., Chase C. Jr., Johnson D., Smith P. 2006. Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.* 84 (3) : 520-525.
- Cuetia J., Posso M., Muñoz E., Ariza F., Álvarez A. 2012. Allelic and genotypic frequencies of calpain, calpastatin and leptin in Colombian Creole cattle. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA.* (2): 231-234.
- Curie A., Chardulo L., Mason C., Arrigoni B., Silveira C., de Oliveira N. 2009. Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN and CAST genes on meat traits in Nelore beef cattle (*Bos indicus*) and their crosses with *Bos taurus*. *Animal Genetics.* Vol. 40, pp. 456-462.
- Curie A., Chardulo L., Giusti J., Silveira C., Martins L., de Oliveira N. 2010. Assessment of GH1, CAPN1 and CAST polymorphism as markers of carcass and meat traits in *Bos indicus* and *Bos taurus* - *Bos indicus* cross cattle. *Meat Sciences.* Vol 86. pp. 4915-920.
- FEGASACRUZ (Federación de Ganaderos de Santa Cruz). 2015. Innovando la producción ganadera. Boletín Informativo. pp. 1-3.

- Gill L., Bishop C., Mc'Corquodale C., Williams L., Wiener P. 2009. Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus – Sired beef cattle. *Genet. Sel. Evol.* 41: 36-47.
- Herrmann P. 2009. Marcadores moleculares de terneza: Calpaína y Calpastatina Hereford. Buenos Aires, Argentina. 75 (648): pp. 62-64.
- INE (Instituto Nacional de Estadística). 2015. Censo de población y vivienda 2012. Santa Cruz. pp. 7.
- Pereira J., Calderón D. 2002. Pruebas de ganancia de peso en base a pasturas en ganado Nelore en el trópico boliviano. Memoria XIV Reunión Nacional de ABOPA: "Forrajes y producción Animal", tomo 2: Producción animal. pp. 305-314.
- Schenkel S., Miller P., Jiang Z., Mandell B., Ye X., Li H., Wilton W. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and quality traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84: 291-299.
- Soria A., Corva M. 2004. Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne bovina. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 12(2). 73-88.

Diseño y aplicación de cebadores a partir del gen mitocondrial *Citocromo B* para la caracterización molecular de tejones en cautiverio

Quispe Hugo; Salazar Karina

Carrera de Ingeniería Zootécnica, Unidad Académica Campesina Tiahuanacu;
Universidad Católica Boliviana

E-mail de contacto: maxtor93@hotmail.com

Resumen. El gen mitocondrial *Citocromo B* presente en todos los genomas mitocondriales, provee de información para la reconstrucción filogenética, previa evaluación del grado de polimorfismo, para determinar si es apto usarlo en tejones en cautiverio; los cebadores del *Citocromo B* actualmente usados, no lograron amplificar de manera experimental ni *in silico* y asumiendo que no existe cebadores específicos para *Nasua nasua*, se optó por diseñar cebadores específicos y describir las características preliminares del *Citocromo B*. Para el estudio, se extrajo ADN a partir de pelo de dieciséis individuos de tejones en cautiverio; para el diseño de cebadores se descargó del GenBank la secuencia del gen *Citocromo B* de la especie de *Nasua nasua*, siendo este el molde para el diseño. Se realizó una serie de simulacros *in-silico* de la complementariedad entre la secuencia molde y los cebadores diseñados, utilizando los programas BioEdit v.7.1.8, FastPCR y AmplifX. Se realizó la respectiva extracción del material genético, posteriormente se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la respectiva secuenciación de ADN mitocondrial del gen *Citocromo B*. Finalmente se evaluó el grado de polimorfismo y variabilidad genética de las muestras analizadas, con los cebadores diseñados, y la representación de un árbol filogenético de los individuos analizados con un 12% de diferenciación, respecto a los grupos externos.
