

IDENTIFICACIÓN GENÓMICA DE SNPs ASOCIADOS A TERNEZA DE LA CARNE DE OVINO DE PELO CRIOLLO COLOMBIANO

Ortiz Y.^{1*}, Ariza M.¹, Castro S.¹, Ríos M.¹, Sierra, L.¹

¹Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia, Grupo de investigación Genética Molecular Animal. *ytortizs@unal.edu.co.

RESUMEN

La evaluación genómica se ha convertido en una herramienta importante para la mejora de los sistemas productivos pecuarios, permitiendo la obtención de asociaciones confiables entre el genoma y características de interés económico, como las características de calidad de la carne, atributos altamente exigidos por los consumidores. Esta investigación tuvo como objetivo realizar la evaluación genómica de una población de Camuros Criollos para establecer la asociación entre el componente genético y el desarrollo de la terneza de la carne. Un total de 160 ovinos fueron sacrificados, provenientes de dos regiones geográficas (Piedemonte, n=121 y Valle Interandino, n=39). La medición de la característica se realizó por el método de Warner Bratzler en el musculo Longissimus dorsi y el aislamiento de ADN se realizó mediante el método fenol cloroformo a partir de 20mg de musculo; los animales fueron genotipificados usando el chip OvineSNP50 BeadChip Data Sheet. Entre los resultados de los análisis se encontraron diferencias significativas para el origen de los animales ($p < 0.05$). A partir del microchip se obtuvo información de 35.202 SNPs que fueron evaluados en el análisis de asociación; como resultado se determinó el efecto significativo de 2.038 SNPs ($p < 0.05$), en los 26 autosomas del ovino asociados a la característica. Los resultados confirman que la variación de la terneza de la carne de ganado ovino está influenciada por la genética; este estudio permite plantear una búsqueda de genes responsables de la terneza diferentes al complejo Calpaína-Calpastatina principal responsable de la misma en otras especies.

Palabras clave: Genes; Microarray; *Ovis aries*; Polimorfismo.

GENOMIC IDENTIFICATION OF SNPs ASSOCIATED TO MEAT TENDERNESS OF THE COLOMBIAN CREOLE HAIRY SHEEP

ABSTRACT

The genomic evaluation has become an important tool for improving production systems in livestock, allowing to obtain reliable associations between genome and economic interesting traits, such as, meat quality, attributes highly demanded by consumers. This research aimed to carry out genomic evaluations from a population of Colombian Creole hairy sheep to establish the association between the genetic component and the development of meat tenderness from such individuals; 160 animals were slaughtered from two geographical regions (Piedmont from Meta and Caquetá departments, n = 121 and Interandean Valley from Tolima and Caldas departments, n = 39).. *Longissimus dorsi* (LD) muscle was extracted to measure meat tenderness by the Warner Bratzler method, DNA isolation was done using the phenol chloroform method from 20mg muscle and animals were genotyped using the OvineSNP50 BeadChip Data Sheet. Tenderness analysis results shown significant differences from the animal origin. A total of 35,202 SNPs were evaluated in the association analysis finding significant effect of 2,038 SNPs within the 26 sheep autosomes on meat tenderness. The results confirm that the variation in tenderness of sheep LD muscle is influenced by genetics; this study allows looking for candidate genes for meat tenderness other than the complex calpain-calpastatin, primarily attributed for variations in the trait.

Keywords: Genes; Microarray; *Ovis aries*; Polymorphism.

INTRODUCCIÓN

La cadena ovino-caprina en Colombia, se ha caracterizado porque en la mayoría de sus eslabones, como lo son, la producción, el acopio, la transformación y la comercialización son de tipo informal; La problemática que afronta el sector está relacionada principalmente con unos altos niveles de consanguinidad, una ausencia de programas de selección y control reproductivo, grandes problemas sanitarios, ausencia de plantas especializadas de beneficio, escasa definición de políticas gubernamentales y una poca investigación y desarrollo tecnológico, entre otros.

Para lograr un sector productivo y competitivo, la mejor estrategia; es pensar en la mejora de sus parámetros productivos y reproductivos, para ello lo primero debería ser la integración de un proceso sostenido de innovación tecnológica dentro de las explotaciones ovinas, el cumplimiento con las normas sanitarias y

técnicas exigidas en los mercados, y el mejoramiento de la calidad de los productos finales; pues como es bien sabido dentro de la comercialización de carne de cualquier especie, al momento de la compra, la presentación en general, y el color en particular, son los atributos más importantes que dictaminan las preferencias del consumidor; una vez hecha la elección, la textura de la carne (particularmente su ternura y jugosidad), es el atributo que determina la decisión de reiterar, o no, la elección del producto elegido.

Sin embargo, el uso de la mejora genética como una herramienta para aumentar la productividad de los sistemas de producción de carne ovina es insuficiente, ya que son muy pocas las evaluaciones genéticas realizadas en Colombia, esto hace que no exista un programa de mejora genética consolidado para características relacionadas a la producción, crecimiento y calidad de la carne. No obstante, el rápido desarrollo de la genómica en animales de granja ha introducido nuevas metodologías que pueden generar una descripción global de los sistemas biológicos a nivel de la expresión de genes, proteínas y su interacción. Para beneficiarse plenamente de estos avances, los diseños experimentales tienen que adaptarse a estas nuevas tecnologías, y por lo tanto significativas consideraciones deben tenerse en cuenta para la adecuada elección de la tecnología y método de análisis. Recientemente, el desarrollo de procedimientos más robustos, como los estudios de asociación genómica, ha permitido replicar asociaciones ya reportadas y a la vez descubrir nuevos genes potencialmente asociados a dichos rasgos. Los estudios de asociación genómica, se basan en la utilización de un número considerable de marcadores genéticos tipo SNP (polimorfismo de nucleótido simple), los cuales son identificados con el propósito de detectar su asociación con el incremento aditivo para una característica de importancia zootécnica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

La población objetivo se compuso de 160 ovinos de la raza Camuro criollo colombiano, 121 provenientes de las zonas de piedemonte (Meta y Caquetá), y 39 animales provenientes de los Valles Interandinos (Tolima y Caldas), su régimen alimenticio estuvo compuesto por praderas de diferentes leguminosas, y sin ninguna suplementación.

Los animales fueron reunidos antes del beneficio en la vereda de Siberia (municipio de Cota), donde se hizo la determinación del sexo, y la edad que debería estar dentro del rango de los 4 a los 12 meses determinada por cronometría dentaria.

Prueba de terneza de la carne Warner Bratzler (WB):

Posterior al sacrificio se realizó la recepción del músculo Longissimus dorsi (LD), este fue llevado a cuarto de refrigeración (4°C) hasta completar el periodo de oreo; tras el cual se realizó el deshuese de la pieza cárnica, con el fin de obtener el tejido muscular; el cual se empacó al vacío dividiéndolo en porciones de 160gr aproximadamente.

La cocción de dicho tejido se realizó al baño maría hasta alcanzar los 72°C de temperatura interna, las muestras se llevaron a refrigeración (4°C), durante las 24 horas siguientes, luego de las cuales fueron extraídos cilindros longitudinales con un diámetro de 1.27cm, que a su vez se dividieron en cilindros de 3 cm de longitud.

El análisis de la terneza se llevó a cabo en un texturómetro TA-TX2 (Texture Technologies Corp.), donde se empleó el protocolo de medición de Warner Bratzler Shear Device para carne cocida, para la determinación de la fuerza máxima de corte y el esfuerzo al corte (definido como el área bajo la curva de una gráfica fuerza-tiempo), los parámetros del ensayo fueron velocidad de pre-ensayo: 3,0 mm/seg; velocidad de ensayo de 1,3 mm/s; velocidad de post-ensayo de 3,0 mm/seg.

Extracción de DNA

El aislamiento de ADN se realizó a partir de 20mg de músculo, mediante el uso del protocolo fenol cloroformo isoamil, la precipitación del ADN se ejecutó utilizando cloruro de sodio 3M y etanol frío, finalmente para la purificación del ADN se utilizó el kit Invisorb Spin Tissue mini kit.

Una vez extraído el ADN, fue cuantificado por espectrofotometría usando el equipo Thermo spectronic modelo GENESYS 10 de la casa comercial Thermo®. Así mismo se realizó la visualización del producto de extracción mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con Sybergreen®.

Genotipificación

Para la genotipificación se utilizó un chip OvineSNP50 BeadChip de Illumina® (http://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_ovinesnp50.pdf). Siguiendo el protocolo Infinium® Assay Super II Illumina® para su uso en la plataforma HiScan®SQ System y escaneo de los BeadChips.

Después de realizada la lectura de los OvineSNP50 BeadChip por el equipo HiScan™SQ System, para la visualización de las imágenes y avalar la consistencia de los datos fue utilizado el programa GenomeStudio®, luego de este proceso los datos fueron exportados a el programa PLINK® (v1.07), este programa desarrollado por Purcell et al. (2007), fue empleado tanto para la estimación de la MAF (Minor Allele Frequency, Menor Frecuencia Alélica) como

para la obtención de las frecuencias genotípicas en Equilibrio de Hardy- Weinberg (EHW), considerando el modelo $P^2+2pq+q^2=1$. Attilo D. B. (2014).

Análisis Estadísticos

Para los datos fenotípicos (Terneza) se realizó un análisis descriptivo (promedios ajustados por mínimos cuadrados) mediante el procedimiento LSMEANS del GLM del programa S.A.S. ® bajo el siguiente modelo,

$$Y_{ijkl} = \mu + TB_i + X_j + M_k + P_l + e_{ijkl}$$

Donde Y corresponde los valores de terneza del musculo Longissimus dorsi, μ es la media poblacional, TB_i es el efecto de la edad tomada como covariable, j es el efecto del sexo, k es el efecto del origen de los animales, l es el efecto del grupo de sacrificio. X, M y P son las matrices de diseño conocidas para j, k y l respectivamente; y e corresponde al error experimental.

Así mismo se realizó un test de Tukey, con el objetivo de conocer las diferencias entre medias para los parámetros.

El análisis de asociación entre las medidas fenotípicas y los genotipos obtenidos a través del microarreglo se realizó utilizando el programa S.A.S. ®, mediante el uso de un modelo estadístico de efectos fijos,

$$Y_{ijklmn} = \mu + TB_i + CB_m + Z_n + X_j + M_k + P_l + e_{ijklmn}$$

Donde Y corresponde los valores de terneza del musculo Longissimus dorsi, μ es la media poblacional, TB_i es el efecto de la edad tomada como covariable, CB_m es el efecto del área bajo la curva tomado como covariable, n es el efecto fijo del SNP encontrado por el microarreglo, j es el efecto fijo del sexo, k es el efecto fijo del origen de los animales, l es el efecto fijo del grupo de sacrificio. Z, X, M y P son las matrices de diseño conocidas para n, j, k y l respectivamente; y e corresponde al error experimental.

Para el análisis de asociación, el método de Bonferroni fue usado como método de ajuste múltiple de los SNPs detectados como significativos con un P-valor raw < 0.05 en la asociación; el ajuste se hizo de la siguiente forma, P-valor raw /N, donde N corresponde a el número de SNP testeados durante el estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los primeros análisis arrojaron que el origen de los animales tenían diferencias significativas, mostrando que los menores valores de terneza se presentaban en animales provenientes de la zona de Piedemonte (3.83 kg/Fuerza), como se observa en la tabla I, lo que puede ser debido a el tipo de alimentación y características climatológicas de la zona donde se encontraban. Por el contrario entre los sexos no se hallaron diferencias significativas, lo que concuerda con lo reportado en una población de ovinos de cruce terminal Charoláis con Dorper y

Kathadin, alimentados con dos tipos de dietas diferentes. Vásquez Soria et al. (2011).

Tabla I. Análisis estadístico descriptivo de la terneza de la carne de Camuros Criollos (*Descriptive statistical analysis for the tenderness trait of the Colombian Creole Hairy Sheep*)

Significancia de factores en Terneza			
Factor	LD		
Sexo	0.1637		
Origen	0.0001		
Valores de Terneza Kg/s			
		Promedio	SE
LD	Machos	4.06 ^a	1.09
	Hembras	3.96 ^a	0.92
	VI	4.19 ^a	1.08
	PDM	3.83 ^b	1.0

Letras indican diferencias significancia ($P < 0.01$); a b, comparación dentro de sexo y origen. SE: Desviación estándar VI: Valles Interandinos; PDM: Pie de Monte LD: *Longissimus dorsi*.

La población genotipada obtuvo una tasa de genotipos llamados (call rate) > 0.90 . Para el estudio, fueron considerados los 26 autosomas y no se incluyeron el par de cromosomas sexuales ovinos. Los genotipos fueron determinados como homocigotos (AA y BB), heterocigotos (AB) y no identificados (NC), estos últimos no considerados dentro de los análisis estadísticos.

La matriz de SNPs que fue determinada por el microarreglo conto con 54.241 SNPs, en la cual fueron contabilizadas todas las clases genotípicas, incluyendo los SNPS que no obtuvieron valores para ScoreGenCall < 0.15 ; esta es considerada una medida de confianza para la genotipificación, está calculada para cada genotipo y es empleada para hacer el filtro de los SNPs o las muestras que presentaron mala calidad del genotipaje.

Luego de los análisis hechos en el programa PLINK® se determinó el número de SNPs utilizados para la asociación con las medidas fenotípicas de la terneza de la carne del musculo Longissimus dorsi, es así, como se disminuyó la matriz considerada para los análisis de 54.241 a 35.202.

Como resultado de la asociación de los 35.202 SNPs con las medidas de fuerza de corte para el musculo Longissimus dorsi; se encontró que el origen de los animales presento efectos significativos sobre los SNPs evaluados, en cuanto al sexo de los animales no se presentaron diferencias significativas entre machos y hembras para esta evaluación.

Se determinó el efecto significativo de 2038 polimorfismos de nucleótido simple SNP con una $p < 0.05$, distribuidos en los 26 autosomas del ovino; estos fueron considerados como SNPs informativos.

Tabla II. Relación de SNPs analizados en el estudio (*List of SNPs analyzed in the study*)

Cromosoma	SNPs en el cromosoma	N° de SNPs eliminados		N° de SNP Final	N° de SNPs Pr<0.05
		MAF	No Call		
1	5930	1948	0	3982	233
2	5474	1634	2	3838	257
3	5008	1633	1	3374	172
4	2680	849	1	1830	77
5	2363	866	0	1497	88
6	2592	846	5	1741	135
7	2252	728	0	1524	86
8	2057	688	0	1369	70
9	2140	775	0	1365	76
10	1852	636	0	1216	55
11	1180	420	1	759	41
12	1723	588	0	1135	72
13	1696	509	2	1185	62
14	1174	417	1	756	60
15	1694	526	1	1167	75
16	1580	451	0	1129	70
17	1420	439	2	979	68
18	1413	425	1	987	60
19	1248	415	0	833	51
20	1148	402	0	746	41
21	898	297	0	601	34
22	1097	363	0	734	45
23	1129	376	0	753	46
24	741	272	0	469	26
25	1001	368	0	633	49
26	924	323	1	600	34

Pr < 0.05 (Significativo), MAF: Menor frecuencia Alélica; No Call: No llamados

Luego de la realización de la prueba de ajuste de P-valor de Bonferroni se obtuvo como resultado la asociación de 3 SNPs del genoma ovino con las mediciones de terneza de la carne del musculo Longissimus dorsi extraído de ovinos de la raza Camuro criollo Colombiano.

Se realizó una búsqueda en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) para los SNPs que resultaron significativos para la asociación; encontrando que, el SNP OAR3_130491628.1 cuyo cambio nucleotídico es [C/T], fue identificado dentro del cromosoma 3 ovino, se encontró asociado a una porción exónica del gen MGAT4C el cual ha sido mapeado en el brazo q del cromosoma (NCBI/Map view); cercano al gen DCN (Decorin), que se describe como responsable de la degradación del colágeno postmortem, la proteína sintetizada a partir de este gen desarrolla un papel importante sobre la fibrillogenesis, debido a las alteraciones en la formación de la fibrilla muscular y desestabilización en las fibras de colágeno. Pinilla López Y. C. (2014).

El SNP OAR4_118954127.1 cuyo cambio nucleotídico es [A/G], identificado dentro del cromosoma 4 ovino, no se encontró asociado a ningún locus específico; y el SNP s43296.1 perteneciente al cromosoma 9 del ovino y cuyo cambio nucleotídico es [A/G] se encontró asociado a un locus aun no caracterizado. Dichos hallazgos fueron corroborados mediante la utilización de la herramienta bioinformática BLAST.

CONCLUSIONES

Los resultados confirman que la variación de la terneza de la carne de ganado ovino está influenciada por la genética; este estudio permite plantear una búsqueda de genes responsables de la terneza diferentes al complejo calpaína-calpastatina principal responsable de la misma.

A través de este estudio se realizó la primera aproximación a la caracterización del genoma del ovino Camuro criollo, hecho que cobra importancia para los sectores implicados en su producción, ya que se ha podido dilucidar que es una raza candidata a la mejora genética, con el fin de explotar su potencial de adaptación a las condiciones medioambientales de nuestro país.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y desarrollo rural (MADR), Corporación especializada de centros de investigación y desarrollo tecnológico del sector agropecuario – (CENIREDA), la Universidad nacional de Colombia sede Bogotá, y el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA).

BIBLIOGRAFÍA

- Atílio, D. B. (2014). Testes de associação em região de QTL ligados do cromossomo 1 da galinha doméstica (Doctoral dissertation, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”).
- Barendse, W., B. E. Harrison, et al. (2008). Variation at the Calpain 3 gene is associated with meat tenderness in zebu and composite breeds of cattle. *BMC genetics* 9, 41.

- Barrios C, C. E. Elección de la raza en la granja ovina. In., Asoovinos. pp. 1-10.
- Bolormaa, S., J. Pryce, et al. (2010). Multivariate analysis of a genome-wide association study in dairy cattle. *Journal of dairy science* 93, 3818-3833.
- Bolormaa, S., J. E. Pryce, et al. (2013). Detection of quantitative trait loci in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle using genome-wide association studies. *Genetics Selection Evolution* 45, 43.
- Borisov, A. B., B. M. Carlson (2000). Cell death in denervated skeletal muscle is distinct from classical apoptosis. *The Anatomical Record* 258, 305-318.
- Corpoica (2009). Orientaciones técnicas para el mejoramiento genético y el manejo reproductivo de la ovinocultura del Tolima. In: SENA (ed.).
- Elinos-Báez, C., V. Maldonado, et al. (2003). Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Med Mex* 139.
- González, A. D. (2002). Micro y nanotecnología en Medicina: Los chips o microarrays de ADN. *Encuentros multidisciplinares* 4, 31-38.
- Harshman, K. (2002). Detección de ácidos nucleicos y nanotecnología: El gran potencial de los ensayos a pequeña escala. *Encuentros multidisciplinares* 4, 26-30.
- HOLCIM Colombia, F. S. (2011). Guía práctica para pequeños productores ovinos. In: Asoprovinos (ed.). Editorial Jotamar.
- Iguácel, L., J. Calvo, et al. (2013). Nuevo SNP de la calpastatina (CAST) asociado con la terneza de la carne de bovino. XV Jornadas sobre Producción Animal AIDA, Zaragoza, JH Calvo, I. Casasús, M. Joy, J. Alvarez-Rodríguez, L. Varona, B. Panea, C. Calvete, J. Balcells (Ed.). AIDA, 547-549.
- Koohmaraie, M. (1996). Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Science* 43, 193-201.
- Koohmaraie, M., M. P. Kent, et al. (2002). Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? *Meat science* 62, 345-352.
- Lee, S. H., B. H. Choi, et al. (2013). Genome-wide association study identifies major loci for carcass weight on BTA14 in Hanwoo (Korean Cattle). *PloS one* 8, e74677.
- Londoño, C., J. Andrea (2012). Polimorfismo de los genes calpaína, calpastatina y leptina en diez razas bovinas criollas mediante siete marcadores de Polimorfismos de nucleótido simple (snps). In. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
- LTDA, B. (2005). Guía práctica de la ovinocultura. In: C. E. Barrios C (ed.).
- Lu, D., M. Sargolzaei, et al. (2013). Genome-wide association analyses for carcass quality in crossbred beef cattle. *BMC genetics* 14, 1-10.
- Mujica, F. (2009). Diversidad y Conservación de los recursos zoogenéticos del país. *Agro sur* 37, 134-175.
- Pérez Ramírez, H. (2006). Aspectos genéticos y productivos de los ovinos de pelo. In., Memorias 14° día del ganadero/FMVZ-UNAM. pp. 54-68.
- Pinilla López, Y. C. Efecto de SNPs de genes candidatos asociados a textura de la carne en bovinos *Bos indicus* y sus cruces (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Quiroz, J., G. Guerrero, et al. (2012). Evaluación genética de características de crecimiento del ovino Pelibuey en tabasco, México. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA* 2, 355-360.

- Ramirez, B., C. Hernández, et al. Calidad de la carne y análisis sensorial en ovinos de pelo y lana provenientes de engorda intensiva en México. In: Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. 2007.
- Sierra, V., I. Vega-Naredo, et al. (2010). Cell death processes and markers: a novel approach to deal with quality. *Journal concise reviews and hypotheses in food science*.
- Takahashi, K. (1996). Structural weakening of skeletal muscle tissue during post-mortem ageing of meat: the non-enzymatic mechanism of meat tenderization. *Meat science* 43, 67-80.
- Timaure, N. J. Características de la canal y de la carne.
- Urrutia, G. R. T., A. S. Escalante, et al. Características de la canal y calidad de la carne de ovinos pelibuey, engordados en Hermosillo, Sonora.
- Vázquez Soria, E. T., Partida de la Peña, J. A., Rubio Lozano, M., & Méndez Medina, D. (2011). Comportamiento productivo y características de la canal en corderos provenientes de la cruce de ovejas Katahdin con machos de cuatro razas cárnicas especializadas. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 2(3), 247-258.