

ISBN: 970-9825-00-3



VI Simposio Iberoamericano
sobre Conservación y Utilización
de Recursos Zoogenéticos

MEMORIAS

8, 9 Y 10 DE NOVIEMBRE DE 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
INSTITUTO DE ESTUDIOS INDÍGENAS

SAN CRISTÓBAL DE LAS CASAS. CHIAPAS MEXICO



Fundación
PRODUCE
Chiapas, a.c.



CARACTERIZACIÓN DE UN POLIMORFISMO EN EL GEN DE LA LEPTINA EN LA RAZA ROMOSINUANO Y SU CRUCE CON CEBU

CHARACTERIZATION OF A POLIMORPHISM IN THE LEPTINE GENE IN ROMOSINUANO BREED AND ITS CROSS WITH ZEBU

Barrera G. P., Martínez R., Ortegón Y., Ballesteros H., Ariza F., Vasquez R.

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. CORPOICA.
barreragloria2003@yahoo.es

RESUMEN

Colombia cuenta en la actualidad con una gran diversidad de recursos genéticos aptos para la producción de carne bovina de alta calidad. Uno de los principales parámetros para la evaluación de la calidad de la carne se basa en el marmoreo el cual influye en el sabor y adicionalmente participa en la jugosidad después de la cocción. Basados en el grado de marmoreo, se han diseñado estrategias para evaluar genéticamente esta característica, por ello varios reportes relacionan un polimorfismo en el gen de la Leptina con el grado de engrasamiento de la carne. El objetivo del presente estudio fue estimar las frecuencias de los alelos C y T descritos para un polimorfismo en el gen de la Leptina mediante la evaluación de 112 animales de las razas Romosinuano, Cebú, y su cruce por PCR-RFLP. Se realizó extracción de DNA a partir de muestras de sangre y músculo para la amplificación de un fragmento de 94 pb y la digestión se realizó con la enzima *Kpn2I*. Individuos homocigotos para el alelo T fueron observados en la raza criolla colombiana Romosinuano y su cruce, mientras que la raza Cebú Brahman no presentó individuos con este genotipo. El cruce de Romosinuano x Cebú Brahman presentó una elevada proporción de individuos heterocigotos. De acuerdo con reportes previos que muestran asociación del alelo T con mayor marmoreo en la canal, es posible que la raza Romosinuano y sus cruces con Cebú sean más competitivas que la raza Cebú Brahman bajo esta característica.

PALABRAS CLAVE: Leptina, Marmoreo, Romosinuano

ABSTRACT

Currently Colombia holds a huge diversity of genetic resources useful to produce high quality meat of bovine origin. One of the main parameters to evaluate meat quality is the marbling which determines the flavor and the juiciness after cook. Several strategies of genetic analysis have been developed to analyze the marbling based on the polymorphism of the gene that encodes for Leptine which is associated to the proportion of fat in meat. The aim of this study was to estimate the frequency of alleles C and T that has been described for the gene that encodes for Leptine. This estimation was done by PCR-RFLP of genomic DNA in 112 individual cattle belonging to the Romosinuano, Zebu and a Romosinuano-Zebu cross breed. Amplicons of 94 bp of the Leptine gene were obtained by PCR amplification of genomic DNA previously isolated from blood and muscle samples. Endonuclease restriction was conducted using *Kpn2I*. Homozygous individuals for the T allele were found in cattle belonging to the Colombian Romosinuano breed and its crosses. This genotype was not found in Zebu Brahman cattle. The Romosinuano - Cebú Brahman cross breed cattle show a high proportion of heterozygous individuals. According to previous studies, that report association between the presence of T allele and a high level of marbling of the meat, it is possible that the Romosinuano cattle and its crosses with Zebu Brahman cattle are more competitive than Zebu cattle for this organoleptic feature.

KEY WORDS: Leptin, Marbling, Romosinuano

INTRODUCCIÓN

El valor de un recurso genético se basa en el conocimiento que de él se tenga, sobre sus potencialidades y posibles usos presentes y futuros. La aplicación de metodologías de genética molecular, combinadas con técnicas de genética cuantitativa, ha permitido esclarecer el control genético de un número grande de características de importancia en producción animal. En este sentido, la implementación de técnicas en genética va a permitir incrementar el conocimiento que se tiene de las razas bovinas criollas y con este aspecto se va a tener la oportunidad de dar una

mejor valoración a la carne producida a partir de biotipos criollos. El objetivo del presente trabajo fue iniciar estudios de caracterización de la calidad de carnes en la raza Romosinuano, cebú y su cruce, mediante la caracterización molecular de las poblaciones por PCR-RFLP para un polimorfismo en el gen de la Leptina.

MATERIALES Y METODOS

Se seleccionaron poblaciones de medios hermanos paternos que se encuentran en el Centro de Investigación Turipana de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA ubicado en el departamento de Córdoba. Las poblaciones escogidas incluyeron 80 animales de la raza criolla colombiana Romosinuano, 16 Cebú Brahman y 17 F1 de Romo x Cebú.

A los animales escogidos se les tomó muestra de sangre con anticoagulante y se les realizó extracción de DNA mediante la metodología descrita por Sambrook. Se realizó lisis de glóbulos rojos con sucrosa 2X para obtención de leucocitos, los cuales son utilizados en el proceso de extracción de DNA. Inicialmente se realizó digestión de la muestra con proteinasa K a 56 °C y pasos sucesivos de extracción con Fenol Cloroformo.

En algunos casos se realizó extracción de DNA a partir de muestras de músculo, según la metodología descrita por Biase *et al.* (2002), en el cual se realiza un macerado con nitrógeno líquido, para adicionar 800 μ l de solución de extracción (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 25mM EDTA y 400 mM NaCl), 100 μ l de SDA10 %, y 20 μ l de proteinasa K (10 μ l/ml) e incubar a 65 °C por 3 horas. Los detritos celulares se precipitaron con 300 μ l de NaCl 6M. Al sobrenadante se le realizó extracción con hidrocloreto de guanidina (pH 8.0) y con acetato de amonio 0.49 M. El DNA se precipitó con alcohol isopropílico frío.

Para la Genotipificación de un polimorfismo dentro del gen de la leptina, se amplificó un fragmento de 94 pb incluido en el exón 2 del gen (Buchanan *et al.*, 2002). Las condiciones de PCR incluyeron dNTPs 200 μ M, cebadores directo y reverso 100 μ M MgCl₂ 2 mM, 2 U de Taq polimerasa y 50-100 ng de DNA genómico para un volumen total de reacción de 25 μ l. La amplificación se llevo a cabo en un termociclador PTC 100 bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial a 95 °C por 3 min seguido por 30 ciclos de 95 °C por 30 seg, anillaje a 53 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 90 seg. Finalmente se realizó un paso de extensión a 72 °C por 10 min.

El tamaño del producto de amplificación fue comprobado mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio. Posteriormente, el fragmento amplificado fue sometido a digestión mediante la enzima *Kpn*2I (Fermentas) por una hora a 55 °C. Los fragmentos obtenidos fueron separados en geles de poliacrilamida al 6 % por electroforesis a 150V. Lo geles fueron teñidos con nitrato de plata, donde se observaron dos fragmentos de 75 y 19 pb en los casos donde hubo digestión.

RESULTADOS Y DISCUSION

Buchanan *et al.* (2002) reportaron una transición de citosina (C) por timina (T) que genera un cambio de aminoácido de arginina por cisteína localizado en la primera base del codón 25 en el exón 2, del gen de la leptina. El alelo C se divide en dos fragmentos de 75 y 19 pb con la enzima *Kpn* 2I (Fermentas), mientras que el alelo T permanece sin cortar de 94 pb. Este cambio de arginina por cisteína se encontró asociado con niveles de grasa en la canal en cuatro razas bovinas para producción de carne. El alelo T fue asociado con mayor cantidad de grasa, mientras el C con menor cantidad. En el presente trabajo, estimamos las frecuencias de los alelos C y T descritos por Buchanan *et al.* (2002), en 80 animales de la raza Romosinuano, 17 animales cruzados Romo x Cebu y 16 Cebu, mediante PCR-RFLP.

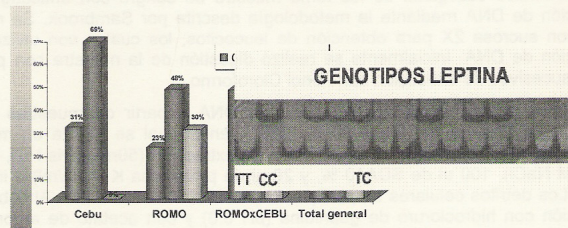
En términos generales para la población total analizada, se encontró mayor número de animales heterocigotos TC (49 %), seguido por animales homocigotos CC (27 %) y finalmente homocigotos TT (24 %).

En la raza Romosinuano, se encontró que la mayoría de los individuos son heterocigotos (49 %) para el polimorfismo analizado en el gen de la leptina y adicionalmente presentó un alto porcentaje de animales homocigotos para el alelo T (30 %). Dentro de la raza Cebú Brahman se presentó un mayor porcentaje de individuos heterocigotos (69 %), y es importante anotar que no presentó

individuos homocigotos para el alelo T. En la población F1 de Romo x Cebú se presentó mayor porcentaje de individuos homocigotos CC (47 %) seguido por los individuos heterocigotos (35 %).

Dentro de las dos razas analizadas y su cruce, se observó que los individuos de la raza Romosinuano presentan una mayor frecuencia del alelo T, el cual ha sido reportado como un polimorfismo asociado con mayor grado de engrasamiento y mejor marmoreo en la canal, mientras que en la raza Cebú Brahman se presentó mayor frecuencia del alelo C.

Grafica 1. Proporciones genotípicas para un polimorfismo en el gen de la leptina en las razas Romosinuano y su cruce con Cebú.



De acuerdo con estos resultados y con los reportes previos de asociación del alelo T con mayor marmoreo en la canal, se puede afirmar que en la raza Criolla colombiana Romosinuano y su cruce con Cebú Brahman se presenta con mayor frecuencia el polimorfismo que se asocia para producción de carne con calidad en cuanto a esta característica.

BIBLIOGRAFÍA

- SAMBROOK J., FRITSCH E. F. & MANIATIS T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. P 917.
- BUCHANAN F., FITZSIMMONS C. J., VAN KESSEL A. G., THUE T. D., WINKELMAN-SIM D. C., and SCHMUTZ S. M. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genet. Sel. Evol.* 34 (2002) 105-116.
- SWITONSKI M. Molecular genetics in beef cattle breeding- a review. *Anim Sci Papers and Reports.* 20 (2002) supp. 1, 7-18

