

COMBINACIÓN DE INFORMACIÓN DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL Y GENOTIPADO DE GENOMA COMPLETO PARA REDEFINIR REGIONES QTLs ASOCIADOS A CARACTERES DE CALIDAD DE CARNE EN BOVINO

Moreno-Sánchez, Natalia¹; Carabaño, M^a Jesús¹; Venturini, Guilherme²; Rueda, Julia³; González, Carmen¹; Serrano, Magdalena¹; Meneses, Cristina¹; Martín-Collado, Daniel¹; Díaz, Clara¹

¹Departamento de Mejora Genética Animal. INIA .

²Departamento de Mejora Genética FCAV-UNESP-Jaboticabal. Sao Paulo.Brasil

³Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid
Correo electrónico: natalia@inia.es

RESUMEN

Con el objetivo de profundizar en los mecanismos que afectan a las diferencias de calidad de carne entre músculos se han combinado diferentes fuentes de información: resultados de expresión diferencial (DE) con microarrays en los que se encontraron 204 genes diferencialmente expresados entre el músculo *M. flexor digitorum* (morcillo) y *M. psoas major* (solomillo), genotipado con chips de alta densidad de SNPs de 397 terneros de raza Avileña-Negra Ibérica y 958 regiones QTL encontradas hasta ahora para caracteres de calidad de carne. El 78% de los SNPs en el chip estaban inicialmente contenidos en las regiones QTL. Cuando se consideraban regiones QTL que contenían genes DE, el número de regiones involucradas disminuyó a 276. Se han identificado 173 genes DE como candidatos posicionales a explicar las diferencias en calidad de carne. Finalmente, al considerar las regiones genómicas asociadas a QTLs de calidad que contenían los genes DE entre músculos se pudo reducir notablemente el número de SNPs implicados. Como ejemplo, para terneza, flavor y jugosidad, tres caracteres identificados como prioritarios por los consumidores, se seleccionaron 1092, 3046 y 2103 SNPs asociados, respectivamente.

Palabras clave: expresión diferencial, SNP, QTL

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente la selección genética en vacuno de carne se ha orientado hacia la mejora del peso al sacrificio y las aptitudes maternas, sin embargo existe un interés creciente entre los productores en la selección por calidad de carne (Díaz and Quintanilla, 2002; Garrick, 2005) que coincide con una mayor demanda de calidad de la carne de vacuno por parte del consumidor (Martín-Collado y Díaz, 2009). Por otro lado, existe un creciente interés en estudiar las diferencias en calidad que existen entre las distintas partes de la canal.

La calidad de la carne es un carácter complejo, influido por un gran número de factores como la bioquímica del músculo, la composición fibrilar, la raza, el sexo o las condiciones de sacrificio entre otros (Insausti et al., 1999, Totland, Kryvi & Slinde, 1988). Existen numerosos trabajos de búsqueda de QTLs para caracteres de calidad de carne en vacuno, sin embargo éstos son muy limitados en las razas autóctonas, particularmente en Avileña-Negra Ibérica (ANI). Por otro lado, la mayoría de los estudios de asociación están hechos utilizando el *Longissimus dorsi* como músculo de referencia. Sin embargo, existen diferencias de calidad entre los diversos músculos que constituyen la canal y por lo tanto es razonable pensar que los mecanismos moleculares responsables de dichas características de calidad, podrían ser dependientes del músculo (Díaz et al., 2006; López de Maturana et al., 2009). Moreno-Sánchez et al. (2011) encontraron 204 genes diferencialmente expresados (DE) entre los músculos *Psoas major* y *Flexor digitorum* en ANI, músculos que son distintos desde el punto de vista histológico, metabólico y bioquímico (Moreno-Sánchez et al., 2008). Parte de dichos genes han sido asociados a características de calidad de carne en otras poblaciones (Reverter et al., 2008). En los últimos años se han iniciado estudios de genotipado de

genoma completo con la idea de redefinir las regiones e identificar nuevas regiones asociadas fundamentalmente a caracteres no convencionales con el objetivo de rentabilizar los genotipados (Goddard, 2008; Boloorma et al., 2011).

El objetivo de este trabajo es identificar y acotar regiones candidatas asociadas a calidad de carne en vacuno para el estudio de su posible asociación con caracteres de calidad en dos músculos distintos en ANI. Para ello se han combinado resultados de experimentos de expresión y genotipado de genoma completo con estudios previos de caracterización de regiones QTL asociadas a la calidad de carne en vacuno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han combinado diferentes fuentes de información bajo la versión Btau4.0 del mapa bovino:

- Genes diferencialmente expresados (DE) entre dos músculos (*Psoas major* y *Flexor digitorum*) de distinta calidad (Moreno-Sánchez et al., 2011) en terneros de ANI. Son un total de 204 genes, 93 sobre-expresados en solomillo y 111 en morcillo.
- QTLs para caracteres de calidad de carne en bovino publicados hasta la fecha, recopilados en la base de datos pública Animal Genome (www.animalgenome.org).
- Genotipados de 397 terneros de raza ANI, con la plataforma Illumina Bovine SNP50. Se dispone de información sobre 22 parámetros de calidad de carne en los músculos anteriormente mencionados para esos 397 terneros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los terneros se han genotipado para un total de 54.606 SNPs, 47.585 marcadores no presentaron problemas y el 4% presentaron un “call rate” inferior al 98%. La distribución de frecuencias alélicas muestra que un 23% de los marcadores tienen alelos a una frecuencia mínima menor del 5% y que el 11,7% de éstos están fijados en la población de ANI. Estos resultados coinciden con los descritos en otras poblaciones no utilizadas para el desarrollo del chip (Mackay et al 2008).

Hasta la fecha se han publicado un total de 958 QTLs asociados a caracteres de calidad de carne en vacuno. En la Tabla 1 se recoge una clasificación en 12 grupos de dichos QTLs. Cada uno de los grupos contiene diferentes caracteres relacionados con el término bajo el que se engloban. Esta tabla muestra también la cifra de genes diferencialmente expresados, el número de QTLs que contienen dichos genes y el número de SNPs contenidos en esas regiones QTL. En la última columna se recoge el número de los SNPs anteriores que están en genes DE contenidos a su vez en un QTL.

Tabla 1. Resumen general de las coincidencias entre experimentos.

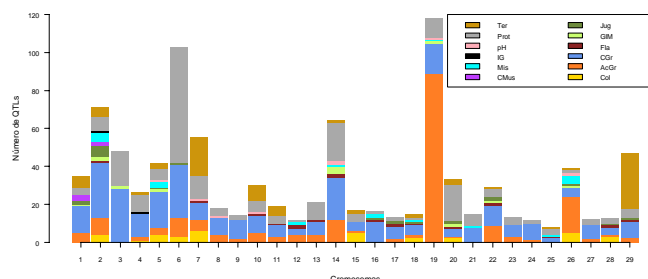
Grupos de caracteres	Nº de QTLs	Nº de genes DE en QTLs	Nº de QTLs que contienen genes DE	Nº de SNPs en regiones QTL	Nº de SNPs en genes DE en QTLs
Color	35	13	6	3119	2
Ácidos grasos	202	60	44	13769	46
Cantidad de grasa	312	143	121	34598	79
Flavor	19	8	5	3046	6
Grasa intramuscular	15	5	4	1034	0
Jugosidad	19	11	7	2103	5
Fibras musculares	5	1	2	15	0
Otros	21	18	5	2429	9
Aceptación general	2	1	1	15	0
pH	9	9	3	1581	4
Proteína	231	84	45	19928	43
Terneza	88	14	33	1092	8
Total	958	173	276	42412	100

Algunos genes están en más de una región QTL correspondiente a distinto grupo de caracteres. Por tanto, la suma de filas no coincide con la fila de Total

Así, de las 958 regiones QTL detectadas por su asociación a algún carácter de calidad de carne, los grupos mayoritarios son: en primer lugar el de cantidad de grasa con 312 QTLs, en segundo el de contenido proteico con 231, y en tercero el de ácidos grasos con 202. En esos tres grupos generales, a su vez, están contenidos el mayor número de genes diferencialmente expresados y de SNPs. En cambio este orden se altera ligeramente si consideramos el número de SNPs dentro de genes DE. Entonces la cantidad de grasa sigue en primera posición pero a continuación aparece el contenido de ácidos grasos, con 46 SNPs en genes DE y después la cantidad de proteína con 43 SNPs.

En la Figura 1 se representa la distribución en los diferentes cromosomas de los 12 grupos de caracteres de calidad presentados en la Tabla 1. En la Figura 2 se representa la distribución sólo para aquellos QTLs que contienen genes diferencialmente expresados. En la Figura 1 se observa una mayor concentración de QTLs en los cromosomas 19, 6 y 2. Aunque si consideramos los QTLs que contienen algún gen diferencialmente expresado (Figura 2) los que presentan una mayor cantidad de QTLs son los cromosomas 2, 29 y 19.

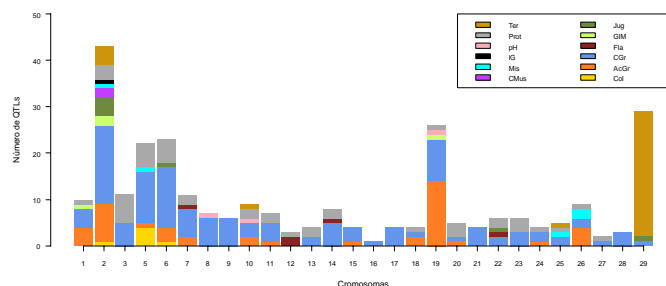
Figura 1. Número de QTLs de los distintos grupos de calidad de carne en cada cromosoma.



En la Figura 1 se observa cómo grupos como el de ácidos grasos o cantidad de ácidos grasos están presentes en casi todos los cromosomas mientras que otros caracteres, como el MC (características del músculo) se sitúan sólo en los cromosomas 1 y 2. Dicha figura muestra también cómo aquellos cromosomas con un número elevado de QTLs no contienen

muchos tipos de caracteres sino un número elevado de QTL pertenecientes a un solo grupo como los ácidos grasos en el cromosoma 19 o la proteína en el 6. Los genes FASN y ACACA están en esa región del cromosoma 19 y codifican enzimas esenciales en la síntesis *de novo* de ácidos grasos.

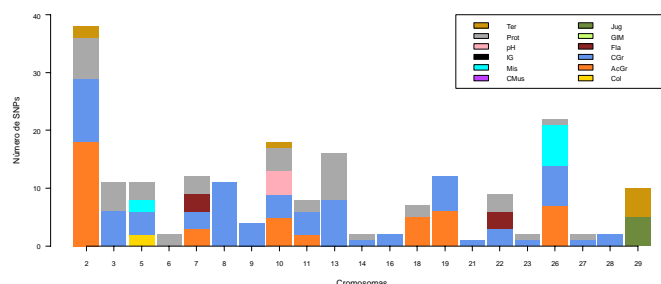
Figura 2. Número de QTLs de calidad de carne por grupo de carácter que contienen genes diferencialmente expresados en cada cromosoma.



En la Figura 2 se puede observar una reducción drástica en el número de QTLs que contienen genes DE entre músculos de diferente calidad (solomillo y morcillo), que podrían ser parcialmente responsables de dichas diferencias y que, por tanto, se postularían como potenciales candidatos. Los QTLs para cantidad de grasa siguen representados en casi todos los cromosomas mientras que los de ácidos grasos pierden representatividad con respecto a la Figura 1. Hay un número importante de QTLs asociados a terneza en el cromosoma 29, donde se encuentra el gen CAPN1 responsable de la codificación de proteína proteolíticas como la calpaína. En términos globales, el 78% de los SNP contenidos en el chip estarían presentes en los QTLs de calidad conocidos (Tabla1). Sin embargo, cuando se estudian los grupos de caracteres se reduce sustancialmente el número de SNPs que van a formar parte de los estudios de asociación. De los SNPs contenidos en genes DE que a su vez están contenidos en regiones QTL el 15% están fijados en la población objeto de estudio y el 24% están a un frecuencia inferior al 0,05.

La Figura 3 presenta la distribución del número de SNPs que están contenidos en alguno de los genes DE por cromosoma y grupo de caracteres. Destacan de nuevo los cromosomas 29 para terneza y jugosidad y el cromosoma 2 con una mezcla de caracteres entre los que vuelve a destacar la composición en ácidos grasos y la cantidad de grasa.

Figura 3. Nº de SNPs en genes DE contenidos en regiones QTL de calidad de carne por grupo de carácter en cada cromosoma.



Al considerar las regiones genómicas asociadas a QTLs de calidad que contenían los genes DE entre músculos se pudo reducir el número de SNPs implicados notablemente. Como

ejemplo, para ternura, sabor y jugosidad, tres caracteres identificados como prioritarios por los consumidores (Martín-Collado y Díaz, 2009), se seleccionaron 1092, 3046 y 2103 SNPs asociados, respectivamente. De éstos, 806, 2327 y 1624 tienen un MAF mayor de 0,05.

CONCLUSIONES

Se ha detectado una distribución muy heterogénea de los distintos grupos de caracteres de calidad de carne a lo largo de los distintos cromosomas. Se han identificado genes DE como candidatos posicionales a explicar las diferencias en calidad de carne. Utilizando distintas fuentes de información molecular se ha establecido un criterio que permite acotar el número de SNPs, en particular para cada grupo de caracteres, a utilizar en posteriores análisis de asociación. Esto supone una mejora en experimentos como éste en los que el tamaño muestral del que se dispone es limitado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la contribución en la toma de las muestras de AECRANI y al Consejo Regulador de Carne de Ávila. Este estudio está financiado por el programa NEWGAN-CAM.

BIBLIOGRAFÍA

- Bolormaa S., Hayes B. J., Savin K., Hawken R., Barendse W., Arthur P. F., Herd R. M., Goddard M. E., 2011. *J Anim Sci* (in press).
- Díaz C. y Quintanilla R., 2002. *ITEA. Producción Animal* 98: 118-.
- Díaz C., Moreno-Sánchez N., Moreno A., Rueda J., Carabaño M. J., 2006. XVI Congreso de Zootecnia. Castelo Branco, Portugal pp 21-26.
- Garrick D.J., 2005. 37th Annual Research Symposium and Annual Meeting. Billings, Montana 37: 105-111.
- Goddard, M., 2008. Animal genomics for animal health: Paris, France, 25-27 October 2007
- Insausti K., Beriain M.J., Purroy A., Alberti P., Lizaso L., Hernandez B., 1999. *Meat Sci* 53:241-249.
- López de Maturana E., Carabaño, M.J., García-Cachán, M.D., Díaz, C, 2009. 60th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Barcelona, España. Book of abstracts 15:21.
- Mckay, S., Schnabel, D et al. 2008. *BMC Genetics*.9:37
- Martín-Collado D., Díaz C., 2009. Informe INIA.
- Moreno-Sánchez, N., C. Díaz, M. J. Carabaño, J. Rueda, and J. L. Rivero. 2008. *BMC Cell Biol* 9: 67.
- Moreno-Sánchez N., Rueda J., Reverter A., Carabaño M. J., Díaz C., 2011. *Functional & Integrative Genomics*. DOI 10.1007/s10142-011-0249-9.
- Reverter A., Chan E. K. F., Lehnert S. A., Barris W., McWilliam S. M., Dalrymple B., Barendse W., 2008. *Aus J Exp Agric* 48: 1053-1061.
- Totland G. K., Kryvi H., Slinde E., 1988. *Meat Sci* 23: 303-315.