

## DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS NO EXON14 DO GENE CAPN1 EM RAÇAS BOVINAS EUROPEÍAS, ZEBUÍNAS E SEUS MESTIÇOS

### DETECTION OF POLYMORPHISMS IN EXON14 OF CAPN1 GENE IN EUROPEAN AND ZEBU CATTLE BREEDS AND THEIR CROSSBRED

Lara M.A.C.<sup>1\*</sup>, Gutmanis G.<sup>1</sup>, Pinatti E.<sup>2</sup>, Faria M.H.<sup>3</sup>, Cavalcante-Neto, A.<sup>4</sup>, Resende F.D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Zootecnia. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA. Nova Odessa, SP, Brasil. \*malara@iz.sp.gov.br

<sup>2</sup>Instituto de Economia Agrícola. APTA. São Paulo, SP, Brasil

<sup>3</sup>Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios - APTA. Colina, SP, Brasil

<sup>4</sup>Faculdades Integradas Aparício Carvalho, FIMCA, Porto Velho, RO, Brasil.

#### Abstract

The present study aimed to develop a simple protocol for the identification of variability in exon14 of calpain (CAPN1) in 727 DNA samples of European and Zebu cattle breeds and their crossbred (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), in order to detect new markers for meat tenderness. Sequencing analysis of part of samples genotyped by PCR-RFLP and PCR-SSCP techniques confirm the relationship of the genotypes AA, GA and GG with the SNP530 (G4558A) and reveal other polymorphism (C4554T), justifying the six electrophoretic migration patterns observed by SSCP technique. These results indicate that the PCR-RFLP technique was sensitive to detect the SNP530, although the SSCP analysis has been more efficient and lower cost, allowing to identify the two SNP simultaneously. The allele G, considered favorable for meat tenderness in European breeds, was the most frequent in all breeds investigated, except in the Simmental. The C4554T polymorphism was not observed in European breeds, except in Aberdeen Angus, although the T allele has been detected in very low frequency (0.0164). In native breed Caracu, this allele was also not frequent (0.0268), being detected only three heterozygotes CT. The genotype TT was detected only in the Zebu breeds (Guzerá and Nelore) and their crossbred, whose allele frequencies of T were 0.1300, 0.1127 and 0.1149, respectively. The results obtained suggest that the allele T is marker of Zebu, whose genotypes are being investigated in conjunction with shear force data to find possible relationship with meat tenderness Zebu.

#### Keywords:

Single Nucleotide  
Polymorphism  
Meat quality  
PCR-SSCP  
PCR-RFLP

#### Palavras-chave:

Polimorfismo de  
base única  
Qualidade de carne  
PCR-SSCP  
PCR-RFLP

#### Resumo

O presente estudo objetivou desenvolver um protocolo simples para a identificação da variabilidade no exon 14 do gene calpaína (CAPN1) em 727 amostras de DNA de bovinos de raças europeias, zebuínas e mestiços (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), visando detectar novos marcadores para maciez de carne. As análises de seqüenciamento de parte das amostras genotipadas pelas técnicas de PCR-RFLP e PCR-SSCP confirmam a relação dos genótipos AA, GA e GG com o SNP530 (G4558A) e revelam outro polimorfismo (C4554T), justificando os seis padrões de migração eletroforética observados pela técnica de SSCP. Estes resultados indicam que a técnica PCR-RFLP foi sensível para detectar o SNP530, embora a análise de SSCP tenha sido mais eficiente e com custo inferior, permitindo identificar os dois SNP simultaneamente. O alelo G, considerado favorável para maciez de carne em raças europeias, foi o mais freqüente em todas as raças investigadas exceto na Simental. O polimorfismo C4554T não foi observado nas raças europeias, exceto na Aberdeen Angus, embora o alelo T tenha sido detectado em freqüência muito baixa (0,0164). Na raça Caracu, este alelo também não foi freqüente (0,0268), sendo detectado apenas três heterozigotos CT. O genótipo TT foi detectado apenas nas raças zebuínas (Guzerá e Nelore) e seus cruzados, cujas freqüências do alelo T foram 0,1300, 0,1127 e 0,1149, respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que o alelo T seja marcador de raças zebuínas, cujos genótipos estão sendo investigados em conjunto com dados força de cisalhamento visando encontrar possível relação com maciez de carne zebuína.

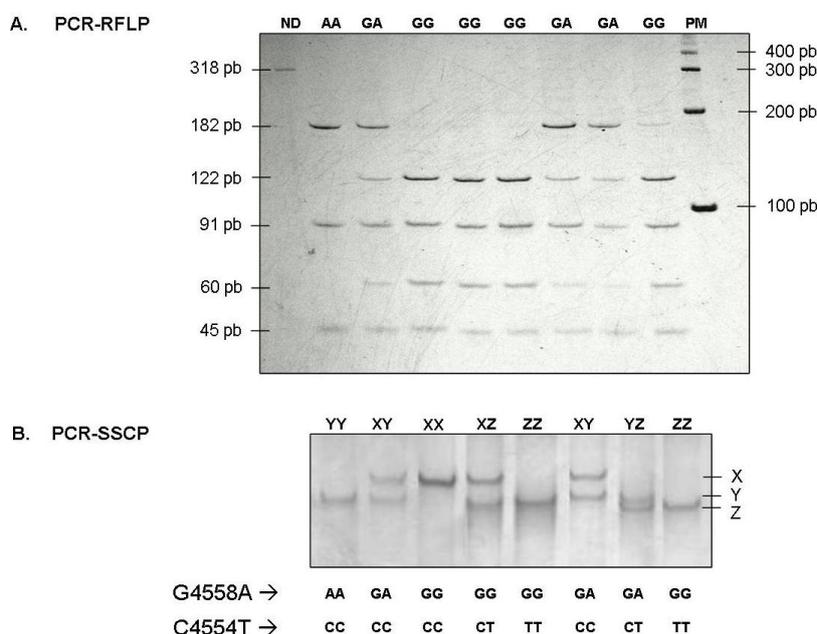
## Introdução

As oportunidades de expansão do mercado de carne bovina estão intimamente associadas à capacidade competitiva do setor produtivo e, nos dias de hoje, complementadas com a qualidade do produto que entra no mercado. Dentre as características relacionadas à qualidade, a maciez ocupa grande destaque, sendo considerada uma das características de maior influência na aceitação do produto pelos consumidores. Diversos trabalhos mostram que a raça bovina e seus cruzamentos estão altamente relacionados com esta característica (Oliveira, 2000; Alves *et al.*, 2005; Muchenje *et al.*, 2008). Historicamente, a carne dos bovinos de origem zebuína (*Bos taurus indicus*) é considerada dura, principalmente pela justificativa de que esses animais são criados extensivamente e, em geral, abatidos em idades mais avançadas, quando comparados com raças européias mais precoces (*Bos taurus taurus*) ou cruzados (*Bos taurus taurus* × *Bos taurus indicus*). Contudo, dificuldades têm sido relatadas quanto à inclusão da maciez de carne como objetivo de seleção em programa de melhoramento genético, por ser uma característica de difícil avaliação, que em geral, requer técnicas invasivas e idade avançada do indivíduo. Com o advento das técnicas de genética molecular, tem sido possível prever o potencial genético do animal para produção de carne. Para esse propósito, destaca-se o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) em genes que codificam as calpaínas e calpastatina, por ser um marcador co-dominante, bi-alelético e muito utilizado em análises de associação com maciez de carne (Page *et al.* 2002). As calpaínas são classificadas como proteases de cisteína, denominadas  $\mu$ -calpaína (CAPN1) e m-calpaína (CAPN2), e dependentes de cálcio em concentrações micromolares e macromolares, respectivamente. As calpaínas de várias espécies apresentam homologias próximas a 90% (Goll *et al.*, 2003) e são formadas por duas subunidades. A subunidade regulatória ou menor (28 kDa) é idêntica nas duas calpaínas e possui dois domínios. Por outro lado, as subunidades de 80 kDa das  $\mu$ -calpaína e m-calpaínas são produtos de genes diferentes e são divididas em seis domínios, preditos por cristalografia, ou em quatro domínios, preditos por sequência de aminoácidos (Page *et al.*, 2002; Goll *et al.*, 2003). Essas calpaínas participam da proteólise *post mortem*, que conduz a um aumento de maciez na carne, e são inibidas pela calpastatina (Koohmarie, 1994). Estudos, no entanto, têm revelado que no período *post-mortem*, a  $\mu$ -calpaína (CAPN1) e seu inibidor, a calpastatina, sofrem queda progressiva enquanto que a m-calpaína (CAPN2) permanece constante. Dessa maneira, a  $\mu$ -calpaína é implicada como a maior causa do amaciamento no músculo esquelético, por degradar importantes proteínas miofibrilares, sendo responsável por 90% do amaciamento proteolítico observado durante os primeiros 7-10 dias de estocagem a 2-4°C (Boehm *et al.*, 1998). Alguns polimorfismos no gene da subunidade maior da  $\mu$ -calpaína (CAPN1; produto de 22 exons no cromossomo bovino 29) já foram reportados por Page *et al.* (2004), Casas *et al.* (2005), White *et al.* (2005), Casas *et al.* (2006), influenciando significativamente a maciez da carne em bovinos de raças taurinas. Em bovinos de raças zebuínas e seus mestiços (*Bos taurus taurus* × *Bos taurus indicus*), no entanto, estes polimorfismos têm sido ainda pouco investigados, necessitando de estudos adicionais para validação de possíveis efeitos na maciez de carne. De entre as variantes alélicas detectadas no gene CAPN1, que se associam com caracteres de produção de carne, destaca-se o SNP530 (G4558A) no exon14. Este polimorfismo, caracterizado pela transição de G por A, que resulta na substituição de valina por isoleucina, foi relacionado à diminuição da maciez de carne bovina (Page *et al.*, 2002). No entanto, o efeito deste polimorfismo na maciez de carne de bovinos de origem *Bos taurus indicus* não tem sido observado, embora o alelo favorável G esteja presente nas populações zebuínas. Com base nestas evidências, estamos desenvolvendo um estudo mais amplo com a finalidade de detectar e validar outras alterações moleculares nos genes CAPN1, Calpastatina e Leptina, principalmente em raças zebuínas, nativas Brasileiras e cruzadas que poderiam estar relacionadas à qualidade de carne. O presente estudo faz parte do referido estudo e teve como objetivo principal estabelecer um protocolo simples e de baixo custo para detecção de polimorfismos no exon 14 do gene CAPN1 em 727 amostras de bovinos de raças européias, zebuínas e mestiços (*Bos taurus taurus* × *Bos taurus indicus*).

## Material e métodos

Duas técnicas de análise de SNP, denominadas PCR-RFLP e PCR-SSCP foram investigadas em 727 amostras bovinas, representando três raças européias: Aberdeen Angus (n=122), Hereford (n=110) e Simental (n=31), uma raça nativa Brasileira: Caracu (n=56), duas raças zebuínas: Nelore (n=89) e Guzará (n=50) e um grupo genético, com 269 mestiços (*Bos taurus taurus* × *Bos taurus indicus*). O DNA foi extraído a partir de sangue total ou de amostras de carne pela técnica padrão de fenol-clorofórmio. Para a amplificação do exon14 foi desenhado um par de *primers* (5' GGAAGGTGACTTTGTGCTGCGTTT -3' e 5'-AAAGTGCTTGGCAAGTGAGGGATG -3') com base na sequência do gene calpaína bovino (GenBank

AF248054). A reação de PCR foi realizada em um volume de 25  $\mu$ L contendo 100 ng de DNA genômico, 0,15  $\mu$ M de cada primer, 200  $\mu$ M de dNTP, 1,5 mM de  $Mg^{2+}$ , 2,5 U de Taq DNA polimerase e 1x tampão de reação. O programa de amplificação consistiu de 3 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C e 30 seg a 72°C, com extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos amplificados foram checados em gel de agarose 1,5% empregando o corante *Blue Green* fluorescente (LGC), que permitiu a visualização dos fragmentos em luz branca. Para as análises de RFLP do SNP530 (G4558A), cerca de 5  $\mu$ L do produto amplificado foi digerido com 5U de *AvaII*, durante 3 horas a 37°C. Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliácridamida 10% e visualizados mediante a coloração de prata, descrita por Sanguinetti *et al.* (1994) (Figura 1-A). Para as análises de SSCP, uma alíquota do produto amplificado foi diluída na proporção 1:5 em solução desnaturante, contendo 95% formamida, 12,5 mM EDTA – pH 8,0, 0,025% de azul de bromofenol e 0,025% de xileno cianol. Após desnaturação a 95°C por 5 minutos, as amostras foram rapidamente resfriadas em gelo até serem aplicadas em gel de poliácridamida 10% (49:1). As análises de eletroforese foram realizadas a 400 V empregando um sistema de circulação de água a 12°C, durante 20 horas. Para a visualização do SSCP, o gel foi corado com prata (Figura 1-B). Um total de 27 amostras, sendo três de cada genótipo detectado pelas técnicas de RFLP e SSCP foi sequenciado pelo método de *Cycle Sequencing*, empregando-se o sistema de eletroforese capilar contido na plataforma ABI3130 Genetic Analyzer, segundo recomendações do fornecedor (*Applied Biosystems*).



**Figura 1.** (A) Análise de PCR-RFLP do gene CAPN1 (exon14), gel de poliácridamida 10%, mostrando os genótipos para a mutação G4558A, após digestão do produto de PCR de 318pb com a enzima *AvaII*. ND: amostra não digerida e PM: marcador de 100pb. (A: *PCR-RFLP analysis of CAPN1 gene (exon14) in polyacrylamide gel 10%, showing the genotypes for G4558A mutation, after digestion of PCR product of 318 bp with the enzyme AvaII. ND: sample undigested and PM: marker of 100 bp*). (B) Análise de PCR-SSCP, mostrando seis padrões correspondentes às mutações G4558A e C4554T, detectados em gel de poliácridamida (49:1), empregando-se 400V, 12°C por 20 horas (*PCR-SSCP analysis, showing the six patterns corresponding to G4558A and C4554T mutations detected in polyacrylamide gel (49:1), employing 400V, 12°C for 20 h*).

## Resultados e discussão

No presente estudo, as análises PCR-RFLP do fragmento com 318 pb do gene CAPN1, hidrolisado com a enzima de restrição *AvaII*, revelaram três genótipos (AA, GA, GG) correspondentes ao SNP G4558A. O alelo A apresentou três sítios de restrição para *AvaII*, resultando em três fragmentos (182, 91 e 45 pb). O alelo G apresentou um sítio a mais para *AvaII*, resultando em quatro fragmentos com 122, 91, 60 e 45 pb. Como pode ser visto na Figura 1, os animais homocigotos AA apresentaram três bandas (182, 91 e 45 pb), os homocigotos GG, quatro bandas (122, 91, 60 e 45 pb) e, os heterocigotos GA, cinco bandas, cujos fragmentos são correspondentes a ambos os alelos. Em relação às análises de SSCP, o protocolo que foi padronizado para o

presente estudo revelou seis padrões de migração eletroforética (XX, XY, YY, XZ, YZ e ZZ), que foram relacionados às alterações moleculares no exon14 (G4558A e C4554T). Como pode ser visto na Figura 1, o polimorfismo conformacional de fita simples do fragmento 318 pb foi caracterizado pelas diferenças na migração de três bandas, denominadas X, Y e Z. A banda Y foi relacionada ao alelo A da mutação G4558A, e a banda Z, ao alelo T da mutação C4554T. Dessa forma, para a interpretação dos genótipos para mutação G4558A, os animais homozigotos AA foram caracterizados pela presença de uma única banda Y, os heterozigotos GA, pela presença de duas bandas, uma Y e a outra, X ou Z enquanto que os homozigotos GG, pela ausência da banda Y. Para a mutação C4554T, os animais homozigotos TT foram caracterizados pela presença de uma única banda Z, os heterozigotos CT, pela presença de duas bandas, uma Z e a outra X ou Y enquanto que os homozigotos CC, pela ausência da banda Z. As análises de sequenciamento, realizadas em 27 amostras genotipadas por ambas as técnicas, confirmam a relação dos genótipos AA, GA e GG com o polimorfismo no nucleotídeo 4558 (alelos G/A), descrito por Page *et al.* (2002) e revelam outro polimorfismo no nucleotídeo 4554 (alelos C/T), justificando assim os seis padrões de migração eletroforética observados pela técnica de SSCP (Tabela I). Estes resultados revelam que a técnica PCR-RFLP foi sensível para detectar o SNP530 (G4558A), embora o protocolo, que foi padronizado no presente estudo, para análise de SSCP tenha sido mais eficiente e com custo inferior, permitindo identificar os dois SNP, simultaneamente, no exon 14 do gene CAPN1. Os polimorfismos observados no exon 14 já haviam sido detectados pelas técnicas de sequenciamento por Page *et al.* (2002) e pelas análises de PCR-RFLP (Soria *et al.*, 2010). Neste último trabalho, para identificação das mutações G4558A e C4554T num fragmento de 787 pb amplificado por PCR, empregou-se as enzimas de restrição *AvaII* e *PfFI*. Contudo, o nosso protocolo, que foi desenvolvido para a identificação de variabilidade no exon 14 pela técnica de SSCP, é ainda mais simples, uma vez que permite identificar em uma única eletroforese, ambas as mutações. Com relação ao SNP530 (G4558A), caracterizado pela transição de G por A no nucleotídeo 4558 do exon 14 do gene CAPN1, que resulta na substituição de valina por isoleucina e, conseqüentemente, na diminuição da maciez de carne (Page *et al.*, 2002), observou-se que o alelo G foi o mais freqüente em todas as populações, exceto na raça Simental (Tabela II). A literatura tem apontado que a relação deste polimorfismo com maciez de carne deve ser investigada em bovinos de origem *Bos taurus indicus*, pelo fato do alelo G, favorável para maciez de carne em raças européias, ocorrer em freqüências altas no gado zebu, que apresenta em geral carnes mais duras em relação ao gado de origem *Bos taurus taurus*. Uma possível justificativa poderia ser a ação inibidora da calpastatina durante o processo de proteólise *post-mortem*, cuja relação entre este inibidor e a menor maciez da carne zebuína tem sido documentada (Wheeler *et al.*, 1996). Isto porque animais zebuínos, em geral, apresentam concentrações superiores de calpastatina quando comparadas com bovinos de origem *Bos taurus taurus*. Com relação ao polimorfismo C4554T não foi observado nas raças européias, exceto na raça Aberdeen Angus, embora o alelo T tenha ocorrido em freqüência muito baixa (Tabela II). Na raça nativa Caracu, este alelo também não foi freqüente (0,0268), sendo detectado apenas três animais heterozigotos CT (0,0536). Em oposição, pode-se ainda observar na Tabela II que o genótipo TT foi detectado apenas nas raças zebuínas e seus cruzados, cujas freqüências do alelo T foram maiores em relação às raças européias. Esta variabilidade será relacionada com dados de força de cisalhamento visando explicar essa variação genética e encontrar possível marcador para maciez de carne zebuína.

**Tabela I.** Genótipos caracterizados pela técnica de SSCP e sua relação com os polimorfismos G4558A e C4554T no exon 14 do gene CAPN1 (*Genotypes characterized by SSCP technique and its relationship with G4558A and C4554T polymorphisms in exon 14 of CAPN1 gene*)

| SNP      | GENÓTIPOS |     |     |     |     |     |
|----------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Posição* | XX        | XY  | YY  | XZ  | YZ  | ZZ  |
| 4558     | g/g       | g/a | a/a | g/g | a/g | g/g |
| 4554     | c/c       | c/c | c/c | c/t | c/t | t/t |

\* Posição do SNP relativa ao primeiro nucleotídeo do acesso AF248054 (exon 11 a 22 do CAPN1).

**Tabela II.** Distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos RFLP (G4558A) e SSCP (C4554T) no exon14 do gene CAPN1 bovino (*The distribution of allelic and genotypic frequencies of RFLP (G4558A) and SSCP (C4554T) in the bovine CAPN1 gene*)

| Populações | SNP G4558A           |        |                         |        |        | SNP C4554T           |        |                         |        |        |
|------------|----------------------|--------|-------------------------|--------|--------|----------------------|--------|-------------------------|--------|--------|
|            | Frequências Alélicas |        | Frequências Genotípicas |        |        | Frequências Alélicas |        | Frequências Genotípicas |        |        |
|            | G                    | A      | GG                      | AG     | AA     | C                    | T      | CC                      | CT     | TT     |
| Ab. Angus  | 0,8770               | 0,1230 | 0,7705                  | 0,2131 | 0,0164 | 0,9836               | 0,0164 | 0,9672                  | 0,0328 | 0      |
| Hereford   | 0,8318               | 0,1682 | 0,6909                  | 0,2818 | 0,0273 | 1                    | 0      | 1                       | 0      | 0      |
| Simental   | 0,3387               | 0,6613 | 0,0645                  | 0,5484 | 0,3871 | 1                    | 0      | 1                       | 0      | 0      |
| Caracu     | 0,5625               | 0,4375 | 0,3393                  | 0,4821 | 0,1786 | 0,9732               | 0,0268 | 0,9464                  | 0,0536 | 0      |
| Guzerá     | 0,9800               | 0,0200 | 0,9600                  | 0,0400 | 0      | 0,8700               | 0,1300 | 0,8100                  | 0,1400 | 0,0500 |
| Nelore     | 0,9173               | 0,0827 | 0,8427                  | 0,1493 | 0      | 0,8873               | 0,1127 | 0,8202                  | 0,1348 | 0,0449 |
| Mestiços   | 0,8506               | 0,1494 | 0,7241                  | 0,2529 | 0,0230 | 0,8851               | 0,1149 | 0,7969                  | 0,1762 | 0,0268 |

### Conclusão

Os resultados obtidos revelam que a técnica PCR-RFLP foi sensível para detectar o SNP530 (G4558A), embora a técnica de SSCP, padronizada no presente estudo, tenha sido mais eficiente e com custo inferior, permitindo identificar simultaneamente as mutações G4558A e C4554T no exon 14 do gene CAPN1. Os resultados obtidos sugerem que o alelo T seja marcador de raças zebuínas, cujos genótipos estão sendo investigados em conjunto com dados força de cisalhamento visando encontrar marcador para maciez de carne zebuína.

### Agradecimentos

À FAPESP, pelo apoio financeiro (Processo 05/54460-6 – Projeto IZ-NRP2737 e NRP4121) e ao Frigorífico MERCOSUL, pelas amostras de carne investigadas no presente estudo.

Aos editores e revisores da AICA pelas sugestões, recomendações e correções do presente manuscrito.

### Bibliografia

- Alves D.D., Goes R.H.T.B. & Mancio A.B. 2005. Maciez da carne bovina. *Ciência Animal Brasileira* 6, 135-49.
- Boehm M. L., Kendall T. L., Thompson V. F. & Goll D. E. 1998. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *Journal of Animal Science* 76, 2415-34.
- Casas E., White S.N., Riley D.G., Smith P.L., Brennehan R.A., Olson T.A., Johnson D.D., Coleman S.W., Bennett G.L. & Chase C.C. 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science* 83, 2661-8.
- Casas E., White S.N., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Riley D.G., Chase-Junior C.C., Johnson, D.D. & Smith T.P.L. 2006. Effects of calpastatin and {micro}-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science* 84, 520-525.
- Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W. & Cong J. 2003. The Calpain System. *Physiological Review* 83, 731-01; doi:10.1152/physrev.00029.2002
- Koohmaraie M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science* 36, 93-104.
- Muchenje V., Dzama K., Chimonyo M., Raats J.G. & Strydom P.E. 2008. Meat quality of Nguni, Bonsmara and Aberdeen Angus steers raised on natural pasture in the Eastern Cape, South Africa. *Meat Science* 79, 20-8.
- Oliveira, A.L. 2000. Maciez da carne bovina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia* 33, 7-18.
- Page B.T., Casas E., Quaas R.L., Thallman R.M., Heeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., White S.N., Bennett G.L., Kelle J.W., Dikeman M.E. & Smith T.P. 2004. Association of markers in the bovine CAPN gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal Animal Science* 82, 3474-81.

- Page B.T., Casas E., Heaton M.P., Cullen N.G., Hyndman D.L., Morris C.A., Crawford A.M., Wheeler T.L., Koohmaraie M., Keele J.W., Smith T.P.L. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPNI* for association with meat tenderness in cattle. *Journal Animal Science* 80, 3077-85.
- Sanguinetti C.J., Dias-Neto E. & Simpson A.J. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechnique* 17, 914-21.
- Soria L.A., Corva P.M., Huguet M.J., Miño S. & Miquel M.C. 2010. Bovine  $\mu$ -Calpain (*CAPNI*) gene polymorphisms in Brangus and Brahman bulls. *Journal of Basic & Applied Genetics* 21, 61-9.
- Wheeler T.L., Cundiff L.V. & Koch R.M. 1996. Characterization of biological types of cattle (Cycle IV): carcass traits and longissimus palatability. *Journal Animal Science* 74, 1023-35.
- White S.N., Casas E., Wheeler S.D., Shackelford M., Koohmaraie M., Rile Y.D.G., Chase C.C., Johnson D.D., Keele J.W. & Smith T.P.L. 2005. A new single nucleotide polymorphism in *CAPN* extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *Journal Animal Science* 83, 2001-8.