ITEA (2000). Vol. **96A N.° 3,** 254-260

POLIMORFISMO *Hha*I DEL GEN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN CERDOS IBÉRICOS: RELACIÓN CON CARACTERES PRODUCTIVOS

A. Fernández, C. Óvilo, C. Rodríguez, L. Silió

Dpto. Mejora Genética y Biotecnología SGIT-INIA, Ctra. Coruña, km 7, 28040 Madrid, España

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia un polimorfismo del gen de la hormona de crecimiento porcina (*GH*) en distintas poblaciones de cerdos de las razas Ibérica y Duroc y se analiza la asociación de variantes alélicas con caracteres de crecimiento y composición de la canal, en una muestra de 199 cerdos ibéricos de la estirpe Torbiscal. Esta población está compuesta de dos líneas, una línea de conservación y otra seleccionada para crecimiento magro, que presentan diferencias significativas en algunos de estos caracteres productivos. El polimorfismo utilizado es del tipo PCR-RFLP (*Hha*I) y se localiza en el segundo exón del gen. El estudio de asociación del polimorfismo se realizó utilizando un modelo animal en el que el genotipo del gen *GH* se incluye como efecto fijo. A pesar de las evidencias previas de asociación de este polimorfismo con distintos caracteres de interés económico y de la diferencia en las frecuencias alélicas de las dos líneas estudiadas, no se detecta asociación de este marcador con ninguno de los caracteres analizados en el presente trabajo.

Palabras clave: Cerdo, Gen de la hormona de crecimiento, Gen candidato, Caracteres de crecimiento y composición corporal.

SUMMARY

*Hha*I POLYMORPHISM OF THE GROWTH HORMONE GENE IN IBERIAN PIGS: RELATION WITH PRODUCTIVE TRAITS

In this work we analyze a polymorphism in the porcine growth hormone gene (*GH*) in different populations of Iberian and Duroc pigs, and we study the association of the different alleles with growth and carcass traits in a sample of 199 Iberian pigs from the Torbiscal strain. This population includes two lines, the conservation line and a selected one, which present significant differences in some of the productive traits. The polymorphism used is a PCR-RFLP (*Hha*I) localized in the gene's second exon. The association study was performed using an animal model in which the genotype was included as a fixed effect. Instead of the previous association evidences of this polymorphism with several economic traits and the difference in the allelic frequencies between the studied lines, we could not detect any association of this marker with the traits analyzed.

Key words: Pig, Growth hormone gene, Candidate gene, Growth and carcass traits.

Introducción

Los estudios de asociación de genes candidatos son un método adecuado para la identificación de genes relacionados con caracteres productivos, y son utilizados actualmente como alternativa o complemento a los experimentos de detección de QTLs mediante el barrido genómico con marcadores anónimos. Estos dos tipos de estudios permiten la aplicación de la tecnología del ADN al conocimiento de la base genética de los caracteres de interés económico. Por otro lado, la aproximación del gen candidato facilita el desarrollo, en caso de confirmarse asociaciones significativas entre el gen y dichos caracteres, de kits moleculares que harían más asequible el empleo de esta información molecular en la mejora genética de animales domésticos.

El gen de la hormona de crecimiento (*GH*), se suele considerar buen candidato para ciertos caracteres productivos, habiendo sido objeto de múltiples estudios de asociación, debido a la relación directa que esta hormona muestra con el crecimiento y la composición corporal, ya que es el principal factor endocrino en la regulación del desarrollo muscular. El gen *GH* esta localizado en cerdos en el brazo corto del cromosoma 12, constituido por 5 exones y con un transcrito total de 1,7 Kb. En los últimos años se han desarrollado múltiples trabajos que han permitido identificar numerosos polimorfismos en este gen, principalmente del tipo PCR-RFLP, en la región flanqueante 5', segundo exón y regiones intrónicas (DWORAK *et al.*, 1997; JIANG *et al.*, 1996; KUCIEL *et al.*, 1992). En muchos de estos trabajos se ha tratado de encontrar alguna asociación entre los distintos polimorfismos y caracteres de composición de la canal y engrasamiento con resultados, en general, contradictorios. Según CASAS-CARRILLO *et al.* (1997) el efecto de la sustitución de una base en la región promotora y en el segundo exón del gen sobre el crecimiento y la composición de la canal en cerdo es trivial. NIELSEN *et al.* (1995) sugieren la existencia de diferencias en la actividad transcripcional entre distintas variantes del gen *GH*, afectando a caracteres de crecimiento en cerdo. DWORAK *et al.* (1996) encuentran cierta asociación con la ganancia diaria en peso, KNORR *et al.* (1997) concluyen que el gen *GH* esta relacionado con la variación observada en engrasamiento y sugieren que el efecto puede atribuirse a variantes dentro del propio gen y no a QTLs ligados.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la asociación del polimorfismo PCR-RFLP, *Hha*I descrito por LARSEN y NIELSEN (1993) con caracteres de crecimiento y composición de la canal en poblaciones de cerdo de la raza Ibérica.

Material y métodos

El polimorfismo fue analizado en 428 animales de los cuales, 350 corresponden a la estirpe Torbiscal, donde se cuenta con una línea seleccionada para mejor crecimiento magro en relación con la línea control (SILIO *et al.*, 1997), 30 animales de la estirpe Guadyerbas (TORO *et al.*, 2000) y 48 animales inscritos en el Libro Genealógico y correspondientes a otras estirpes de la raza Ibérica. También fueron analizados 44 animales pertenecientes a distintos orígenes de la raza Duroc.

Los genotipos fueron identificados por PCR-RFLP. Para la reacción de PCR se utilizaron cebadores específicos (LARSEN y NIELSEN, 1992), que permiten la amplifica-

ción de un fragmento de 605 pb, comprendido entre las posiciones +61 y +665, incluyendo el primer y segundo exón del gen de la hormona de crecimiento porcino.

El protocolo de genotipado se realizó como se describe en el trabajo de OVILO *et al.* (1999). Los genotipos fueron identificados por la aparición de fragmentos con los siguientes tamaños, estimados a partir de la secuencia publicada del gen *GH* (Genbank, n.º de acceso: M17704): alelo C1: 605 pb; alelo C2: 496 y 109 pb; alelo C3: 447 y 158 pb; alelo C4: 447, 109 y 49 pb.

Los análisis de asociación del polimorfismo con los caracteres medidos se realizaron sobre un subgrupo de 199 animales, pertenecientes a ambas líneas de la estirpe Torbiscal: 148 Conservación (Torbiscal-C) y 53 Selección (Torbiscal-S). Los caracteres analizados en el estudio fueron: crecimiento en recría (GMD1), medido como ganancia de peso diaria desde el destete hasta el inicio del periodo de ceba; Espesor de grasa dorsal, medido a los 100 kg; Crecimiento en ceba (GMD2), medido como la ganancia de peso diaria desde que finaliza el periodo de recría hasta el sacrificio y porcentajes sobre peso de la canal de jamones, paletas y lomos.

El análisis estadístico de asociación fue realizado con el programa PEST, para estimar el efecto de cada genotipo sobre los caracteres medidos. El modelo lineal usado incluye como efectos fijos la línea (dos niveles), año (tres niveles) y genotipos del polimorfismo *Hha*I (tres niveles), y en el análisis de las piezas nobles el peso de la canal como covariable. Para cada carácter analizado fueron estimados dos contrastes: la diferencia entre los genotipos homocigotos ($2a$ = C3C3-C4C4), y el efecto dominante, estimado como la desviación de los genotipos heterocigotos de la media de los genotipos homocigotos (d = C3C4-1/2(C3C3+C4C4)).

Para realizar estos análisis se llevó a cabo la estimación previa de componentes de varianza, mediante máxima verosimilitud restringida, utilizando el programa VCE. El modelo de análisis fue similar al descrito previamente, excluyendo el efecto del polimorfismo, disponiéndose de registros productivos de 610 machos castrados (343 de la línea C y 267 de la línea S), sacrificados en los últimos seis años. El total de animales en la genealogía ascendió a 1004.

Resultados

Se analizó el polimorfismo en las distintas poblaciones de ambas razas, encontrando la presencia de sólo dos alelos (C3 y C4) de los cuatro previamente descritos, con la única excepción de un animal Duroc con genotipo C1C4. El predominio de estos alelos está en concordancia con los resultados de experimentos previos en distintas razas porcinas en las que, a pesar de aparecer los cuatro alelos descritos, presentan generalmente los alelos C1 y C2 a baja frecuencia (HANDLER *et al.*, 1996; JIANG *et al.*, 1996; KUCIEL *et al.*, 1998).

En el cuadro 1 se presentan las frecuencias relativas para cada genotipo en cada una de las poblaciones estudiadas. Se puede observar la existencia de los tres genotipos en Torbiscal-C, Torbiscal-S y Duroc, mientras que en la estirpe Guadyerbas sólo aparece representado el alelo C3. Respecto al grupo de otros animales ibéricos, al tratarse de un conjunto muy heterogéneo, formado por pequeñas poblaciones cerradas, comprende estirpes donde aparecen los dos alelos representados a distintas frecuencias, a

excepción del caso de Coronado, donde sólo aparece representado el alelo C3, en concordancia con la otra estirpe de cerdo Negro Lampiño (Guadyerbas).

Las frecuencias genotípicas difieren entre las dos líneas de la estirpe Torbiscal ($\chi^2 = 44.59$, $p < 0{,}0001$), siendo significativamente mas frecuente el alelo C3 en Torbiscal-S y el C4 en Torbiscal-C.

En el cuadro 2 se presentan la media, desviación típica y rango de variación de los caracteres registrados en los 510 animales Torbiscal con información fenotípica disponible. En el cuadro 3 figuran las estimas de los parámetros genéticos (heredabilidades y correlaciones genéticas) de estos caracteres. En el cálculo de estas estimas se ha asumido correlación nula entre los grupos de caracteres de crecimiento y rendimiento de piezas nobles.

Las estimas de cocientes de varianzas (heredabilidades y correlaciones) obtenidas para los caracteres de composición corporal son algo más elevadas que las encontradas en la literatura para este tipo de caracteres. Estos elevados valores pueden deberse a que las condiciones de manejo, sacrificio y despiece de los animales han sido relativamente homogéneas a lo largo de los seis años de control. Se han detectado diferencias genéticas entre las líneas Torbiscal (S-C), que son estadísticamente significativas para el espesor de grasa a 100 kg y el porcentaje de paletas sobre el peso de la canal.

En el cuadro 4 se indica la diferencia entre los genotipos homocigotos (*2a*) y el efecto dominante (*d*) de los genotipos encontrados sobre los caracteres de crecimiento y composición de la canal. Estos resultados corresponden a los 199 animales Torbiscal de los cuales se dispone de información fenotípica y genotípica. Ninguno de los efectos observados alcanza significación estadística.

Discusión

La administración exógena de *GH* produce en los animales un aumento en la masa muscular y una reducción del engrasamiento, así como una mejora en el índice de conversión y en la ganancia diaria de peso. Por otra parte existen estudios moleculares que relacionan ciertas variantes alélicas con diferencias en la actividad transcripcional del gen que codifica esta hormona. Esto implica

Cuadro 1
Frecuencias genotípicas para el polimorfismo *Hha*I
Table 1
Frequencies of genotypes for HhaI *polymorphism*

Población	N	C3C3	C3C4	C4C4
Torbiscal-C	229	0,280	0,563	0,157
Torbiscal-S	121	0,636	0,331	0,033
Guadyerbas	30	1	0	0
Otros ibéricos	48	0,396	0,354	0,250
Duroc	44*	0,163	0,488	0,349

(*) Se identificó un animal con genotipo C1/C4.

Cuadro 2
Datos productivos utilizados en el análisis
Table 2
Productive data used in the analysis

Caracteres	Media	DT	Rango de variación
GMD1 (g/d)	387	43	242 – 512
GMD2 (g/d)	521	74	246 – 746
Espesor grasa dorsal(mm)	26,7	4,7	14,9 – 38,5
Peso canal (kg)	126,9	11,6	90,9 – 160,4
% jamones	16,8	0,8	14,4 – 20,2
% paletas	11,4	0,6	9,9 – 13,9
% lomos	3,0	0,3	2,1 – 4,3

Cuadro 3
Heredabilidades (diagonal) y correlaciones genéticas de caracteres de crecimiento y canal
Table 3
Heredabilities (diagonal) and genetic correlations of growth and carcass traits

Carácter	GMD1	GMD2	Espesor grasa	% jamones	% paletas	% lomos
GMD1	0,48(.04)	—	—	—	—	—
GMD2	0,19(.14)	0,29(.07)	—	—	—	—
Espesor grasa	-0,34(.11)	-0,42(.18)	0,56(.09)	—	—	
% jamones	—	—	—	0,88(.09)	—	—
% paletas	—	—	—	0,73(.07)	0,47(.08)	—
% lomos	—	—	—	0,52(.08)	0,47(.08)	0,85(.08)

Errores típicos entre paréntesis.

Cuadro 4
Efectos aditivo y dominante del polimorfismo *GH HhaI* sobre caracteres de crecimiento y composición de la canal
Table 4
Additive and dominant effects of GH Hha*I polymorphism on growth and carcass traits*

Carácter	*2a*	*d*
GMD1 (g/d)	5 ± 11	5 ± 7
GMD2 (g/d)	-4 ± 18	-3 ± 11
Espesor grasa dorsal (mm)	-1,27 ± 0,95	-0,86 ± 0,57
% jamones	-0,09 ± 0,17	-0,06 ± 0,10
% paletas	-0,01 ± 0,12	0,03 ± 0,07
% lomos	0,01 ± 0,06	0,01 ± 0,04

que los distintos alelos del gen puedan ser responsables de distintos niveles plasmáticos de *GH* y por tanto también de parte de la variación observada en los caracteres de crecimiento y engrasamiento.

El polimorfismo *Hha*I utilizado en este trabajo está localizado en el segundo exón del gen y modifica la composición aminoacídica de la proteína codificada lo que hace suponer que podría modificar su actividad hormonal. Por otra parte, la diferencia significativa observada en las frecuencias alélicas en las dos líneas de la estirpe Torbiscal indicaría una posible asociación de estos alelos con los caracteres seleccionados.

Entre los diversos experimentos previos que han detectado diferencias fenotípicas en caracteres productivos asociadas a las distintas variantes moleculares del gen, varios han analizado el polimorfismo *Hha*I, siendo los resultados bastante dispares. Entre ellos, en el trabajo de DWORAK *et al.* (1996) se describe la asociación de este polimorfismo con la ganancia diaria de peso. Sin embargo, los dos caracteres de crecimiento GMD1 y GMD2, analizados en el presente trabajo no han mostrado asociación con las variantes del gen, con lo que no se ha podido confirmar el efecto descrito previamente para el primero de ellos.

KNORR *et al.* (1997) han descrito la asociación del polimorfismo analizado con distintos caracteres de engrasamiento en poblaciones procedentes del cruce de las razas Meishan x Pietrain, mientras que esta asociación no se detecta en los cruces de Jabalí con Pietrain. Estos autores sugieren que esta diferencia entre poblaciones podría deberse a que el efecto de la somatotropina porcina depende del potencial genético para deposición grasa de la raza, siendo mayor en razas muy grasas no seleccionadas. En este sentido cabría esperar también una influencia de este gen sobre la deposición grasa en la población Ibérica utilizada en este estudio. Entre los caracteres de engrasamiento que muestran asociación en los trabajos citados está el espesor de la grasa dorsal analizado también en este trabajo. Sin embargo, los resultados obtenidos en la población Ibérica no permiten confirmar la asociación del gen *GH* con este carácter.

MOSER *et al.* (1996) detectan, en cruces experimentales Jabalí x Pietrain y Meishan x Pietrain, efectos significativos del polimorfismo *Hha*I sobre distintos caracteres de composición de la canal. Sin embargo, la asociación del polimorfismo con alguno de los caracteres de composición de la canal registrados en este trabajo no ha podido confirmarse.

Por otra parte existen también trabajos que coincidiendo con nuestros resultados descartan la asociación de distintos polimorfismos en el gen, entre ellos el RFLP *Hha*I, con varios caracteres de crecimiento y composición de la canal (CASAS-CARRILLO *et al.*, 1997).

Considerando el conjunto de resultados de distintos trabajos relativos al gen *GH*, podría sugerirse que el efecto observado en algunos de los trabajos que analizan el polimorfismo *Hha*I, podría ser debido a otro polimorfismo en el mismo gen, de modo que la detección del efecto en los estudios de asociación dependiera de la fase de ligamiento con el marcador analizado y de los haplotipos presentes en cada población. Otra explicación podría ser que el efecto se debiera a otro gen o genes próximos, aunque ello parece en principio menos probable. Los numerosos experimentos realizados de mapeo de QTLs en porcino no han aportado resultados relevantes en esta región y tampoco se conocen en el cromosoma 12 otros genes candidatos para caracteres de crecimiento o composición corporal. La dificultad de asignar

un efecto fenotípico a un polimorfismo concreto detectado en un gen es un problema común de la estrategia del gen candidato, que en este caso se pone en evidencia debido a la gran cantidad de trabajos relativos a distintos polimorfismos que se han realizado sobre el gen de la hormona de crecimiento.

Por otro lado en la interpretación de los resultados de asociación de genes candidatos, también hay que tener en cuenta que en el efecto de un determinado alelo o haplotipo influye el ambiente genético y las interacciones con otros genes que también afectan a estos caracteres productivos, como es el caso de los genes relacionados con el eje somatotrópico cuyas interacciones son conocidas (NIELSEN *et al.*, 1995).

Agradecimientos

Al personal del CIA Dehesón del Encinar por su dedicación al manejo de los animales. A las industrias cárnicas INPORCASA y Chacinas de Candelario por las facilidades en la obtención de registros de despiece. A. Fernández disfruta de una beca de la Comunidad de Madrid. Proyecto financiado por el INIA (proyecto SC98-083).

Bibliografía

CASAS-CARRILLO E., PRILL-ADAMS A, PRICE S G., CLUTTER A C., KIRKPATRICK B W., 1997. Relationship of growth hormone and insuline-like growth factor-1 genotypes with growth and carcass traits in swine. Animal Genetics, 28, 88-93.

DWORAK J., MAYR B., TAXACHER A., SEIWALD G., KLEIBEL A., 1996. Growth hormone polyorphisms, growth performance and meat quality in Austrian slaughtering pigs. 25Th International Conference on Animal Genetics, ISAG (Tours, France).

DWORAK J., VRTKOVÁ I., KAHÁKOVÁ L., 1997. Genotypes of candidate genes for QTL in slaughter pigs in the Czech Republic. 49Th Annual Meeting of the EAAP(Viena)

HANDLER J., SHOMOLL F., STUR I., BREM G., SCHELLANDER K., 1996. Distribution of ApaI and CfoI polymorphism of the porcine growth-hormone (pGH) gene in two ryr 1 genotype Austrian pig breeds. J. Anim. Breed. Genet.113, 56-61.

JIANG Z.H., ROTTMANN O.J., PIRCHNER F., 1996. *Hha*I enzyme reveals genetic polimorphisms at the second exon of porcine-growth-hormone gene. J. Anim. Breed: Genet. 113, 553-558.

KNORR C., MOSER G., MÜLLER E., GELSERMANN H., 1997.Associations of *GH* gene variants with performance traits in F2 generations of European wild boar, Piétrain and Meishan pigs. Animal Genetics, 28, 124-128.

KUCIEL J., KRENKOVA L., URBAN T., 1998. Polymorphisms of HaeII and MspI growth hormone genes in commercial hybrid pigs with different RYR1 genotypes. J. Anim. Breed. Genet. 115, 397-402.

LARSEN N.J., NIELSEN V.H., 1993. ApaI and CfoI polymorphisms in the porcine growth hormone gene. Animal Genetics. 24, 71.

MOSER G., KNORR C., GELDERMANN H., BRUNSCH C., HEYDRICH C., LEUTHOLD G., 1996. Association between growth and Pit-1 genotypes with production traits in informative F2 families. 47Th Annual Meeting of the European Association for Animal Production (Lillehammer).

NIELSEN V.H., LARSEN N.J., AGERGAARD N., 1995. Association of DNA polymorphism in the growth-hormone gene with basal-plasma growth-hormone concentration and production traits in pigs. J. Anim. Breed. Genet. 112. 205-212.

ÓVILO C., FERNÁNDEZ A., 1999. Análisis de polimorfismos en el gen de la hormona de crecimiento: Estudio de la segregación de un cruce F2 entre las razas Ibérica y Landrace. ITEA, Vol. Extra 20, 294 - 296.

SILIÓ L., TORO M.A., RODRÍGUEZ C., RODRIGÁÑEZ J., 1997. Inferencias sobre cambios genéticos en una línea de cerdos ibéricos seleccionada para crecimiento magro. Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. 12 (1, 2 y 3), 65-77.

TORO M.A., RODRIGÁÑEZ J., SILIÓ L., RODRÍGUEZ C., 2000. Genealogical analysis of a closed herd of black hairless iberian pigs. Conservation Biology.