ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO: ESTUDIO DE LA SEGREGACIÓN EN UN CRUCE F2 ENTRE LAS RAZAS IBÉRICA Y LANDRACE.

C. Óvilo, A. Fernández.
Dpto. Mejora Genética y Biotecnología. INIA. Madrid

INTRODUCCIÓN

Entre las hormonas que muestran una relación directa con el crecimiento y la composición corporal, la hormona de crecimiento juega un papel fundamental en la regulación del desarrollo muscular. Como consecuencia de su papel fisiológico, el gen de la hormona del crecimiento porcina (GH) ha sido objeto de distintos trabajos de detección de polimorfismos y asociación con caracteres de composición de la canal y engrasamiento (Knorr, 1997; Moser, 1996).

En este trabajo se presentan los resultados del análisis de dos polimorfismos RFLPs descritos por Larsen y col (1993), en poblaciones de cerdos de razas Ibérica y Landrace. La mayor parte de los animales genotipados están incluidos en un proyecto de detección de QTLs asociados con caracteres de calidad, basado en un cruce F2 entre las razas citadas (The IBMAP Consortium, 1998)

MATERIAL Y MÉTODOS

Los dos polimorfismos se analizaron, en primer lugar, en 18 animales ibéricos de la línea Guadyerbas y 31 animales Landrace procedentes de Nova Genética. Uno de ellos, que mostró polimorfismo en las poblaciones anteriores, se analizó en 79 animales F1 y 263 animales F2 procedentes del cruzamiento de las razas anteriores.

Se amplificó por PCR un fragmento de ADN de 605 pb que incluye los exones uno y dos del gen de la hormona de crecimiento porcina (Vize & Wells, 1987, nº acceso EMBL/GenBank M17704). Para ello se utilizaron en la reacción de PCR dos cebadores específicos para la amplificación del fragmento comprendido entre las posiciones 61 y 665 de dicho gen.

Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25µl con las siguientes condiciones de amplificación: 2.25 mM $MgCl_2$, 67 mM Tris-HCl, 16.6 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.01% Tween-20, 0.1 mM dNTPs, 0.24 µM cebadores, 0.5 unidades de Taq polimerasa (Biotaq, Progenetic), 50 ng de ADN.

El programa de temperatura se aplicó mediante la utilización de un termociclador automático MJ Research PTC-100 y comenzó con una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de: desnaturalización : 95°C durante 45seg; anillamiento : 59°C durante 45seg; extensión : 76°C durante 1min; y finalizó con una fase de extensión a 76°C durante 4 minutos.

El producto de amplificación se sometió a digestiones simples con los enzimas de restricción *Apa* I y *Hha* I. El producto de digestión se sometió a electroforesis en geles de agarosa de alta resolución (Metaphor, FMC, Cat nº

50180) al 2.5% en tampón TAE, y tinción con bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con un marcador de peso molecular (pBR322-Msp I).

RESULTADOS

Los resultados evidenciaron polimorfismo en sólo uno de los marcadores PCR-RFLP estudiados.

El RFLP descrito para el enzima de restricción *Apa* I dio lugar a patrones de restricción monomórficos en las muestras analizadas, detectándose exclusivamente el alelo A2, con fragmentos de restricción de 316, 133, 99 y 57 pb. El alelo A1 (fragmentos de 449, 99 y 57 pb) no se detectó en las poblaciones estudiadas.

En cambio, la digestión con el enzima *Hha* I dió lugar a la aparición de los cuatro alelos descritos, debido al polimorfismo en las dos dianas de restricción presentes en el fragmento del gen amplificado. El alelo C1 (ninguna diana activa) no se digiere con este enzima y resulta en un solo fragmento de 605 pb, el alelo C2 (con la diana de posición 555-558 activa) da lugar a un patrón de digestión de dos bandas de 496 y 109 pb, el alelo C3 (con la diana de posición 506-509 activa) presenta dos fragmentos de 447 y 158 pb, por último, la digestión del alelo C4 (con las dos dianas de restricción activas) produce tres fragmentos de 447, 109 y 49 pb.

En los animales ibéricos estudiados todos los genotipos detectados fueron homocigotos para el alelo C3. Este patrón monomórfico concuerda con los niveles de consanguinidad extrema presentes en la línea Guadyerbas utilizada.

En cambio, en la población Landrace, que no es consanguínea, se pudieron observar los cuatro alelos descritos, tres de ellos a frecuencias similares (C1, C4 y C3, en orden decreciente de frecuencia) y el último (C2) a frecuencia muy baja, con un solo individuo portador heterocigoto de genotipo C1/C2. Las frecuencias alélicas se indican en la Tabla 1.

En vista de estos resultados del análisis de cerdos de raza pura, el segundo marcador, que presentó polimorfismo, se genotipó en los cerdos de las poblaciones F1 y F2, en los que pudo observarse la segregación de los alelos.

La utilidad de los marcadores moleculares en estudios de detección de QTLs está condicionada por el número de alelos y frecuencias alélicas en las poblaciones parentales. Cuanto más difieran los alelos entre estas poblaciones, mayor será la fracción de descendientes informativos. El índice de Ron (Ron et al, 1995) mide la informatividad en función de estas diferencias alélicas e indica el porcentaje esperado de progenie informativa. Para este marcador presenta un valor de 0.7.

Al igual que las frecuencias alélicas, las frecuencias genotípicas observadas (Tabla 2) presentan diferencias muy significativas entre las dos razas puras estudiadas. Los genotipos más frecuentes en la población Landrace fueron C1/C3 y C1/C4, lo cual concuerda con las frecuencias alélicas observadas.

Tabla 1: Frecuencias alélicas y heterocigosidad observada del marcador RFLP/*Hha* I en las poblaciones estudiadas.

Población	C1	C2	C3	C4	Heterocigosidad
Ibérico	0	0	1	0	0
Landrace	0.370	0.016	0.290	0.322	0.612
F1	0.221	0.018	0.632	0.126	0.734
F2	0.173	0.015	0.646	0.161	0.585
Global	0.198	0.015	0.617	0.168	0.614

Tabla 2: Frecuencias de los genotipos observados

Población	n	C1/C1	C1/C2	C1/C3	C1/C4	C2/C3	C3/C3	C3/C4	C4/C4
Ibérico	18	0	0	0	0	0	18	0	0
Landrace	31	4	1	8	6	0	3	4	5
F1	79	0	0	35	0	3	21	20	0
F2	263	5	3	63	15	5	102	68	2
Global	376	9	4	106	21	8	129	92	7

El análisis de la variación en genes candidato como el gen de la GH en distintas razas y poblaciones es el primer paso para la determinación de su influencia en la variación fenotípica de los caracteres de importancia económica. Este estudio preliminar muestra frecuencias alélicas muy diferentes para el locus de la hormona de crecimiento, en dos poblaciones que muestran valores fenotípicos extremos para los caracteres de crecimiento y composición corporal.

Agradecimientos

A todo el personal de Nova Genética y del CIA Dehesón del Encinar, por el manejo animal y obtención de las muestras. A los integrantes del proyecto Ibmap Consortium, especialmente a M. Pérez-Enciso y J.L. Noguera. Al INIA por la concesión de la beca predoctoral que ha permitido este trabajo. Proyecto financiado por la CICYT (proyecto AGF 96-2510)

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

The IBMAP Consortium (1998) *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.* Armidale, **26**, 316-319.
Knorr et al. (1997) *Animal Genetics* **28**, 124-128.
Larsen et al. (1993) *Animal Genetics* **24**, 71.
Moser et al. (1996) *47th Annual Meeting of the EAAP.* Lillehammer.
Ron et al. (1995) *Animal Genetics* **26**,439-441