

## UTILIZACIÓN DE MARCADORES RAPD's PARA LA LOCALIZACIÓN DEL GEN DE LA HIPERTROFIA MUSCULAR: ESTUDIO PRELIMINAR.

Cortés, O.<sup>1</sup>, Pastor, S.<sup>2</sup>, Barroso, A.<sup>1</sup>, Dunner, S.<sup>1</sup>, Sánchez, A.<sup>2</sup>, Cañón, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Genética, Dpto. de Producción Animal, Facultad de Veterinaria-UCM, 28040 Madrid.

<sup>2</sup> Unitat de Genètica i Millora, Facultat de Veterinària, 08193-Bellaterra, Barcelona.

### INTRODUCCIÓN

El síndrome de la hipertrofia muscular bovina está determinado por un gen autosómico recesivo de penetrancia incompleta, que ha sido recientemente mapeado en el cromosoma 2 (Charlier y col., 1995). Tres son los genotipos posibles: +/+, +/mh y mh/mh, que se corresponden con los fenotipos normal, heterocigoto y culón, respectivamente.

Está presente en determinadas razas del oeste de Europa, entre ellas la Asturiana de los Valles, en la que tradicionalmente se ha seleccionado a favor de este fenotipo. Esto se debe a que los animales culones tienen hasta un 20% más de músculo y un 50% menos de grasa en la canal, un índice de conversión más bajo y sobre todo que alcanzan un elevado precio de mercado (Hanset y col., 1987; Goyache, 1995).

El gen mh, localizado en la raza Blanco Azul Belga, parece ser también el responsable de la hipertrofia muscular de la raza Asturiana de los Valles (Dunner y col., 1997). Un trabajo realizado con datos de ambas razas muestra que el marcador más próximo (el microsatélite TGLA-44) está situado a 3 cM del gen.

Sin embargo, esta distancia es todavía suficientemente elevada como para tener una aplicación práctica en el genotipado individual. La posibilidad que ofrecen los RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA, ADN Polimórfico Amplificado al Azar) para ser utilizados en "pools" de ADN parece de interés para tratar de detectar genes mayores con un coste reducido.

Con este fin, se utilizan individualmente oligonucleótidos cortos (10 pares de bases) y al azar para amplificar mediante PCR fragmentos de ADN, buscando marcadores de tipo RAPD's. Se trata de una técnica rápida y sencilla, que no requiere un conocimiento previo del genoma, y sensible (detecta incluso mutaciones puntuales, especialmente sustituciones -Bowditch y col., 1993-).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Con la información del Libro Genealógico de la raza Asturiana de los Valles, se escogieron 10 animales no emparentados de cada una de las tres clases fenotípicas (normales, heterocigotos y culones), de acuerdo con las características morfológicas del propio animal y de sus descendientes. Los individuos heterocigotos (que fenotípicamente son normales) se eligieron de acuerdo con la segregación del marcador más próximo (microsatélite TGLA-44) y con el porcentaje de culones que tienen en su descendencia.

El ADN se obtuvo a partir de muestras de sangre y semen.

Se establecieron 2 "pools" de 5 individuos cada uno por cada clase fenotípica con el fin de

garantizar la repetibilidad de los resultados. La concentración de ADN por "pool" fue de 25 ng/ $\mu$ l, a razón de 5 ng/ $\mu$ l de ADN por individuo.

El protocolo utilizado para la PCR es una modificación del inicialmente propuesto por Williams y col. en 1990:

HotStart a 94°C durante 5 min.

Desnaturalización a 94°C durante 2 min.  
Annealing a 36°C durante 1 min. 30 sec.  
Extensión a 72°C durante 2 min.  
(3 primeros ciclos)

Desnaturalización a 94°C durante 20 sec.  
Annealing a 36°C durante 40 sec.  
Extensión a 72°C durante 2 min.  
(42 ciclos siguientes)

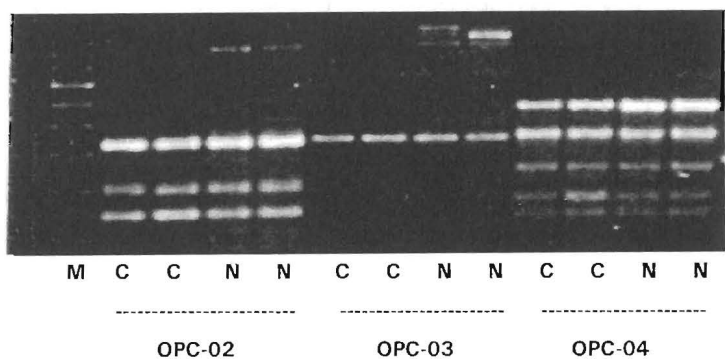
Extensión final a 72°C durante 5 min.

Los tiempos de desnaturalización y annealing de los últimos 42 ciclos se han disminuido ostensiblemente con relación al protocolo original, con lo que se acorta la duración del programa sin merma de la calidad de los patrones obtenidos. En las reacciones de amplificación se utilizó la Amplitaq DNA Polymerase, Fragmento Stoffel (Perkin Elmer), al haberse comprobado sus mejores resultados con esta técnica (Sobral y Honeycutt, 1993).

Se han probado un total de 400 cebadores (Operon Technologies Inc.) sobre cada uno de los "pools". El análisis de los patrones en cada una de las muestras dio lugar a un número de bandas polimórficas. Estos patrones fueron repetidos individualmente sobre todos los componentes del "pool" a fin de comprobar si el polimorfismo se mantiene.

## RESULTADOS

De los 400 cebadores utilizados, se seleccionaron aquéllos que dieron patrones polimórficos entre las clases fenotípicas Normal-Culón del primer "pool".



Patrones obtenidos con tres de los cebadores utilizados sobre cuatro "pools" de Asturiana de los Valles, dos de individuos normales (N) y dos de culones (C). Obsérvese que ambos "pools" de normales presentan una banda más para el cebador OPC-02 y dos más con el OPC-03.

Los cebadores seleccionados se probaron sobre el segundo "pool", tanto de normales como de culones, a fin de garantizar la repetibilidad de los resultados y utilizar en las pruebas individuales únicamente aquéllos que mantuvieran el mismo patrón polimórfico en ambos "pools".

En la tabla adjunta se detallan las características de los patrones de algunos de los cebadores elegidos.

CEBADOR	BANDAS TOTALES	BANDAS POLIMÓRFICAS		TAMAÑO DE BANDAS
		NORMAL	CULÓN	
OPB-18	4	0	2	500 y 680 pb.
OPC-02	4	1	0	1100 pb.
OPC-15	5	2	0	900 y 1100 pb.
OPD-02	6	1	0	230 pb.
OPF-10	3	1	0	790 pb.
OPH-07	8	0	1	390 pb.
OPI-14	4	1	0	700 pb.
OPI-16	3	0	1	550 pb.
OPI-20	2	0	1	1100 pb.
OPJ-14	4	1	0	1200 pb.

pb = pares de bases.

#### REFERENCIAS

- Bowditch, B.M., Albright, D.G., Williams, J.G.K. & Brawn, M.J. (1993) *Methods in Enzymology* **224**, 294-309.
- Charlier, C., Coppieters, W., Farnir, F., Grobet, L., Leroy, P., Michaux, C., Mni, M., Schwers, A., Vanmanshoven, P., Hanset, R & Georges, M. (1995) *Mammalian Genome* **6**, 788-792.
- Dunner, S., Charlier, C., Farnir, F., Brouwers, B., Canon, J. & Georges, M. (1997) *Mammalian Genome* (En prensa).
- Goyache, F. (1995) *Tesis Doctoral*, Universidad Complutense de Madrid.
- Hanset, R., Michaux, C. & Stasse, A. (1987) *Génétique, Sélection et Evolution* **19**, 225-248.
- Sobral, B.W.S. & Honeycutt, R.J. (1993) *Theoretical Applied Genetics* **86**, 105-112.
- Williams, J.G.K., Kubelick, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990) *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535.