

ETH 5001: Un microsatélite asociado a un QTL porcino.

Calvo, J.H.; Martín-Burriel, I.; García-Muro, E.; Osta, R. y Zaragoza, P.

Laboratorio de Genética Bioquímica. Facultad de Veterinaria. 50013 Zaragoza.

INTRODUCCION

En la actualidad el desarrollo del subsector porcino en España es manifiesto. En España desde 1990 hasta 1995, la evolución de la producción de carne porcina ha supuesto un incremento del 13%, debido a una intensificación del sector porcino (Buxade, 1995). Sin embargo, la intensificación del sector porcino y el no cumplimiento de las normas establecidas por la UE en relación al bienestar animal en muchas explotaciones de España, así como las grandes distancias que pueden llegar a recorrer los lechones con destino a cebo y los cerdos con destino a matadero, produce estrés en los animales que conlleva canales DFD y PSE en animales genéticamente susceptibles. Esto hace necesaria la búsqueda de estrategias para minimizar los problemas derivados del estrés, y encontrar estrategias de trabajo que puedan favorecer la selección a favor de caracteres productivos y de calidad de carne.

En este sentido la utilización de la biotecnología del DNA en el diagnóstico del Síndrome de Estrés Porcino (SSP) presenta grandes ventajas de aplicación sobre la metodología clásica del diagnóstico del SSP mediante el test del halotano y la determinación indirecta mediante grupos de ligamiento (Calvo, 1996). Asimismo, la biotecnología del ADN puede utilizarse para la localización a nivel del ADN de loci relacionados con características cuantitativas, como son los QTL's. Una vez localizados los QTL's se puede realizar una selección en favor de genotipos favorables a características productivas y de calidad de carne, este tipo de trabajo se conoce como Selección Asistida por Marcadores (MAS) (Chevalet y Boichard, 1992). Uno de los nuevos QTL's hasta ahora conocido y estudiados en la especie porcina es el gen responsable del SSP.

El Síndrome de estrés porcino (SSP) conocido, también como Síndrome de Hipertermia maligna es un conjunto de síntomas, lesiones y alteraciones bromatológicas de la canal, que se ponen de manifiesto cuando el animal es sometido a estrés o le es suministrado el anestésico halotano, que puede acabar con la muerte de los animales genéticamente susceptibles a presentar la enfermedad. La lesión más característica de la enfermedad es la aparición de carnes PSE (pálidas, blandas y exudativas). La enfermedad, hoy se conoce, que está controlada por un gen autosómico recesivo denominado ryr-1 o gen receptor de la ryanodina. Este gen puede tener dos expresiones o alelos, siendo el alelo normal (C) dominante sobre el alelo mutado (T) que es responsable de la susceptibilidad de los animales a padecer la enfermedad (Fujii y cols., 1991).

En la zona intrónica del gen se encuentra situado el microsatélite ETH 5001 (Bolt y cols.,1993). Vögeli y cols.(1994), asocian un genotipo del microsatélite ETH 5001 con la susceptibilidad de algunos animales a presentar la enfermedad.

En este trabajo presentamos los resultados encontrados para los loci ryr-1 y ETH 5001 y la relación encontrada entre ambos con el fin de utilizar el microsatélite como medio de detección de los animales genéticamente susceptibles a presentar la enfermedad.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización del presente estudio fueron testados 81 animales pertenecientes a las razas Pietrain, Landrace, Large White y Hampshire. La extracción de ADN se realizó a partir de sangre y de semen (Osta y cols., 1994).

Para llevar a cabo el diagnóstico del SSP se amplificó mediante PCR, un fragmento de 199 bp del gen ryr-1 que contenía la mutación causante de la susceptibilidad de los animales a presentar la enfermedad. Cada mezcla de amplificación presentó un volumen final de 50 µl que contienen 200 ng de ADN, 200 mM de cada dNTP, 0.2 pmol de cada oligonucleótido cebador, 10 mM de TRIS HCl, 50 mM KCl, 0.1 % Tritón X-100, 1.5 mM de MgCl₂ y 1.25 U de Taq DNA polimerasa. Se realizaron 30 ciclos por medio de la PCR, destacando una temperatura de 62°C de hibridación de los oligonucleótidos cebadores. El producto amplificado se digirió con la enzima BsiHKA I, la cual reconoce una secuencia en el alelo mutado (T) y por lo tanto corta originando dos fragmentos mientras que en el alelo normal (C) no corta apareciendo un único fragmento.

La caracterización del microsatélite ETH 5001 en la población estudiada, se llevo a cabo mediante la realización de la técnica PCR, en la que la mezcla de amplificación presentó un volumen de 25 µl que contienen 150 ng de ADN, 200mM de cada dNTP, 85 pmol de cada oligonucleótido cebador, 10 mM de Tris HCl, 50 mM KCl, 0.1% Tritón X-100, 1.5 mM MgCl₂ y 1.25 U de Taq ADN polimerasa. Se realizaron 30 ciclos por medio de la PCR, destacando una temperatura de 62°C de hibridación de los oligonucleótidos cebadores. Tras la amplificación los distintos alelos fueron visualizados mediante la separación en gel desnaturante de poli(acrilamida al 9%) y posterior tinción con plata.

RESULTADOS Y DISCUSION

En nuestro estudio obtuvimos un nuevo fragmento del locus ryr-1 de 199 bp que contenía la mutación causante de la enfermedad. Tras la digestión con la enzima BsiHKA I se pudieron diferenciar los siguientes genotipos en función de los distintos patrones de bandas encontrados: Animales sanos y no portadores de la enfermedad (C/C): una banda de 199 bp; animales sanos y portadores de la

enfermedad (C/T): tres bandas de 199, 165 y 34 bp; animales susceptibles de presentar la enfermedad y transmisores de la misma (T/T): dos fragmentos de 165 y 34 bp.

En relación al microsatélite ETH 5001 se encontraron para el mismo 3 alelos, todos ellos con herencia mendeliana y codominantes. Las tallas encontradas para dichos microsatélite fueron de 401, 389 y 349 bp que podrían ser los equivalentes a los alelos encontrados por Bolt y col. (1993) con tallas de 148, 136 y 96 bp.

Vögeli y col. (1994), encontraron una relación entre el microsatélite ETH 5001 y el locus *ryr-1*. De forma que los animales que presentan genotipo T/T para el locus *ryr-1* presentan el genotipo 96/96 (349/349 en nuestro estudio) para el locus ETH 5001, es decir, todos los animales T/T eran animales 349/349. Sin embargo, en nuestro estudio animales con genotipo T/T mostraron genotipos 349/349, 349/389 y 401/349. Aunque si se encontró una relación entre la aparición de animales con genotipo 349/349 para el locus ETH 5001 y el T/T para el locus *ryr-1*, pero sin poder concluir que todos los animales con genotipo 349/349 iban a ser animales susceptibles de presentar la enfermedad (T/T), con lo cual se hubiera simplificado y abaratado el diagnóstico al no tener que utilizar enzimas de restricción.

Podemos concluir que no se puede utilizar únicamente el microsatélite ETH 5001 como método de diagnóstico del SSP, sin embargo el diagnóstico mediante la amplificación de un fragmento de 199 bp del gen *ryr-1* que contenga la mutación responsable de la enfermedad y posterior digestión con enzimas de restricción resulta el método de elección por su eficacia y rapidez en el diagnóstico.

BIBLIOGRAFIA

- BOLT, R., VÖGELI, P. y FRIES, R. (1993). A polymorphic microsatellite at the RYR1 locus in swine. *Anim. Genet.* **24**: 72.
- BUXADE, C. (1995). La ganadería en la Unión Europea. En: "Zootecnia, bases de la producción animal. Tomo I, Capítulo III. C. Buxadé (coordinador) Ed. Mundi-Prensa.
- CALVO, J.H. (1996). Estudio de marcadores moleculares para la identificación individual y la detección de portadores del Síndrome de Estrés Porcino. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria de Zaragoza.
- CHEVALET, C. y BOICHARD, D. (1992). Utilisation des marqueurs pour localiser les gènes responsables de la variabilité des caractères quantitatifs (QTL). *Productions animales. Génétique quantitative*. INRA.
- FUJII, J., OTSU, K., ZORZATO, F., DeLEON, S., KHANNA, V.K., WEILER, J.E., O'BRIEN, P.J. y MacLENNAN, D.H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with Malignant Hyperthermia. *Science* **253**: 448-453.
- OSTA, R., ZARAGOZA, P., RODELLAR, C., MARTIN, I., MARCOS, S. y ZARAZAGA, I. (1994). Tipificación rápida mediante PCR/RFLPs de variantes génicas de lactoproteínas en 7 poblaciones españolas de ganado vacuno. *ITEA*, **90**.
- VÖGELI, P., BOLT, R., FRIES, R. y STRANZINGER, G. (1994). Cosegregation of the Malignant Hyperthermia and the arg615-cys615 mutation in the skeletal muscle calcium release channel protein in five European Landrace and Pietrain pig breeds. *Anim. Genet.* **25** (Suppl.1) 59-66.