

## ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS EN EL GEN RECEPTOR 1 DE MELANOCITOS (*MC1R*) Y EL LOCUS *E* PARA EL COLOR DEL PLUMAJE EN GALLINAS

Dávila, S. G., Gil, M. G., Resino-Talaván, P. y Campo, J. L.

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Departamento de Mejora Genética Animal, Ctra. de la Coruña, Km. 7,5, 28040 Madrid. sgdavila@inia.es

### INTRODUCCIÓN

Uno de los principales genes implicados en el color del plumaje en gallinas es el locus *E*. Este gen presenta 7 alelos: *E\*E*, negro; *E\*R*, abedul; *E\*WH*, trigueño dominante; *E\*N*, salvaje; *E\*B*, pardo; *E\*BC*, buttercup; y *E\*Y*, trigueño recesivo, que afectan a la distribución en el plumaje de dos tipos de pigmentos (eumelaninas y feomelaninas). Este locus ha sido inicialmente mapeado en el cromosoma 1 por análisis de ligamiento (Smyth y Ponce de León, 1992; Carefoot, 1993). Estudios moleculares en varias especies de mamíferos han determinado que el locus *extension* (similar al locus *E* en aves) codifica para el gen del receptor 1 de melanocitos (Robbins et al., 1993; Kijas et al., 1998; Våge et al., 1999), habiéndose establecido asociaciones entre los diferentes alelos del locus *extension* y polimorfismos en el gen *MC1R*. Las mutaciones presentes en animales con alelos dominantes del locus *extension* resultan en un receptor activo y se han asociado con el color negro, mientras que las mutaciones que causan pérdida en la función del receptor son asociadas a los alelos más recesivos y con el fenotipo rojo-amarillo.

En gallinas hay estudios que han observado que el locus *E* puede corresponderse con el gen *MC1R* (Takeuchi et al., 1996ab; Okimoto et al., 1999; Ellet y Okimoto, 2000; Kerje et al., 2003; Ling et al., 2003), que ha sido mapeado en el cromosoma 11 por mapeo físico y genético (Sazanov et al., 1998; Kerje et al., 2003). Falta por aclarar las mutaciones que se asocian con cada alelo, habiéndose caracterizado diferentes polimorfismos en el gen *MC1R* que se han asociado con diferentes colores del plumaje (Tixier-Boichard et al., 2006; Yang et al., 2008; Guo et al., 2010).

El objetivo de este estudio ha sido analizar la asociación del gen *MC1R* con el color del plumaje, utilizando las diferentes razas españolas de gallinas mantenidas en el Programa de Conservación del I.N.I.A (Campo y Orozco, 1982), junto con una línea trigueña recesiva y una población de Leghorn Blanca.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 150 aves (5 machos y 5 hembras por población) seleccionadas al azar de 13 razas españolas de gallinas (Campo, 1998), una línea trigueña recesiva (Smyth, 1990), y una población Leghorn Blanca (Campo y Jurado, 1982). Las razas españolas utilizadas son portadoras de 6 diferentes alelos del locus *E*: *E\*E* (Andaluza Azul, Andaluza Franciscana, Castellana Negra, Cara Blanca Española y Menorquina Negra), *E\*R* (Indio de León y Pardo de León), *E\*WH* (Castellana Codorniz, Prat Leonada y Vasca Barrada), *E\*N* (Andaluza Perdiz), *E\*B* (Villafranca Roja) y *E\*BC* (Prat Blanca). La línea trigueña recesiva presenta el alelo *E\*Y* y la población Leghorn Blanca es heterocigótica para el alelo *E\*E*.

Se tomaron muestras de sangre mediante punción en la vena braquial para la extracción de ADN siguiendo un protocolo clásico. Se amplificó un fragmento que contenía 945 pb de la región codificante del gen *MC1R*, mediante PCR empleando un par de cebadores descritos por Dávila et al. (2014). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados con BigDye Terminator (Secugen S.L.).

Las frecuencias alélicas y fenotípicas fueron analizadas mediante chi-cuadrado con el programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC), y los haplotipos fueron estimados mediante el programa PHASE 2.1 (Stephen y Scheet, 2005).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectó una considerable diversidad genética para el gen *MC1R*, observándose un total de 12 SNPs en la región codificante del *MC1R*. Once de estos SNPs fueron significativos para los diferentes alelos del locus *E*, de los cuales nueve fueron no sinónimos (T212C, G274A, G376A, T398AC, G409A, A427G, C637T, A644C, and G646A) y dos fueron sinónimos (C69T y C834T). Nueve de estos SNPs presentaban una frecuencia de 0,5 o superior para alguno de los alelos del locus *E* (Tabla 1). Todas las poblaciones con fenotipo

negro y portadoras de los alelos  $E^*E$  o  $E^*R$ , excepto la raza Pardo de León, presentaban el alelo que codifica para el aminoácido *Lys* del SNP G274A. Esta mutación puede ser la responsable de la activación del receptor para producir eumelaninas. En concordancia con lo observado por Ellet y Okimoto (2000) se encontró que las aves  $E^*R$  que no presentaban variabilidad en el SNP G274A eran homocigóticas AA para el SNP T398AC, por lo que este polimorfismo puede ser también responsable de la activación constitutiva del receptor, estando 2 SNPs asociados a este fenotipo (G274A y T398AC). Las aves  $E^*N$  no presentaban ningún polimorfismo, en concordancia con lo observado por Takeuchi et al. (1996b), Ling et al. (2003) y Tixier-Boichard et al. (2006), y en contradicción a lo indicado por Ellet y Okimoto (2000) y Kerje et al. (2003) que observaron el T alelo del SNP C637T asociado a este fenotipo. Los animales  $E^*WH$  presentaban el SNP A427G, aunque este alelo G no estaba presente en las aves  $E^*Y$  como habían sugerido Ellet y Okimoto (2000), indicando que los alelos trigueños dominante y recesivo pueden diferir en su secuencia. En nuestro estudio las aves  $E^*Y$  presentaban el alelo T de SNP C637T, polimorfismo que no había sido descrito para este fenotipo, aunque en los estudios previos se utilizaron otras poblaciones diferentes, sugiriendo que el SNP C637T podría ser la causa de pérdida de función del receptor para producir eumelaninas. Para el alelo  $E^*B$  se observó fijación del alelo A para el SNP G274A en concordancia con lo indicado en estudios previos, aunque no se observó para este fenotipo el alelo C del SNP A644C indicado por Ellet y Okimoto (2000). El SNP A644C solo aparecía a baja frecuencia, mientras que en nuestras aves  $E^*B$  se observó el alelo A del SNP G409A, que no aparecía en ningún otro fenotipo. Esta mutación podría ser la responsable de atenuar la activación producida por G274A, dando lugar a un fenotipo pardo en lugar de negro. Por último las aves  $E^*BC$  presentaban 3 mutaciones (T398AC, A427G y C834T) no descritas para este fenotipo en trabajos previos.

Los resultados obtenidos para los diferentes fenotipos confirman una asociación entre el gen *MC1R* y el locus *E*, como se había observado para algunos alelos por diversos autores (Takeuchi et al., 1996ab; Okimoto et al., 1999; Ellet y Okimoto, 2000; Kerje et al., 2003; Ling et al., 2003). Esto sugiere que el color del plumaje está afectado por SNPs en el gen *MC1R*, en concordancia con lo indicado por Tixier-Boichard et al. (2006), Yang et al. (2008) y Guo et al. (2010).

La asociación observada en cada una de las razas está en concordancia con los resultados obtenidos por análisis genético mendeliano en trabajos previos de nuestro departamento (Campo y Orozco, 1986; Campo y Álvarez, 1988; Campo y Álvarez 1993), con la excepción de la Castellana Codorniz y el Indio de León.

Con siete de los SNPs que presentaban una frecuencia alélica de 0,5 o superior (C69T, T212C, G274A, T398AC, G409A, A427G y C637T) se construyeron 11 haplotipos, con respecto al de *Gallus gallus* (Ling et al., 2003). La frecuencia de estos haplotipos en los distintos alelos del locus *E* y en las distintas poblaciones indica que cada uno estaba predominantemente asociado con un alelo del locus *E*. El haplotipo asociado a la raza Villafranquina Roja ( $E^*B$ ) fue exclusivo de esta raza y no había sido descrito previamente.

La cosegregación observada entre los alelos del locus *E* y los polimorfismos del gen *MC1R* sugiere que el locus *E* es equivalente al *MC1R*, aunque este gen no puede explicar toda la variación en la pigmentación y es necesario conocer los genotipos de este locus para la caracterización del color del plumaje en una raza determinada.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Campo, J. L., 1998. 6th World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. pp. 155-158
- Campo, J. L., et al., 1982. Proc. 2nd World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. pp. 88-93
- Campo, J. L., et al., 1982. Proc. 2nd World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. pp. 869-874
- Campo, J. L., et al., 1986. Br. Poult. Sci. 27, 361-367
- Campo, J. L., et al., 1988. Poult. Sci. 67, 351-356
- Campo, J. L., et al., 1993. Poult. Sci. 72, 1218-1223
- Carefoot, W. C., 1993. Br. Poult. Sci. 34, 205-209
- Dávila, S. G., et al., 2014. Poult. Sci. 93, 1089-1096
- Ellet, A. E., et al., 2000. University Student Journal Inquiri, 1, 37-41
- Guo, X. L., et al., 2010. Br. Poult. Sci. 51, 734-739
- Kerje, S., et al., 2003. Anim. Genet. 34, 241-248
- Kijas, J. M. H., et al., 1998. Genetics, 150, 1177-1185
- Ling, M. K., et al., 2003. Eur. J. Biochem. 270, 1441-1449

Okimoto, R., et al., 1999. *Poult. Sci.* 78 (sup.1), 60. • Robbins, L. S., et al., 1993. *Cell* 72, 827-834. • Sazanov, A., et al., 1998. *Chromosome Res.* 6, 651-654. • Smyth, J. R., 1990. *Poultry Breeding and Genetics*. pp. 118-224 • Smyth, J. R., et al., 1992. *Poult. Sci.* 71, 208-210. • Stephen, M., et al., 2005. *Anim. J. Hum. Genet.* 76, 449-462. • Takeuchi, S., et al., 1996a. *Biochim. Biophys. Acta*, 1306, 122-126. • Takeuchi, S., et al., 1996b. *Biochim. Biophys. Acta*, 1308, 164-168. • Tixier-Boichard, J. L., et al., 2006. *Proc. 27th International Conference an Animal Genetic, ISAG*. pp. 342. • Våge, D. L., et al., 1999. *Mamm. Genome*, 10, 39-43. • Yang, A. Q., et al., 2008. *Res. J. Anim. Sci.* 2, 45-49.

**Agradecimientos:** Trabajo financiado por el proyecto RTA2010-00138-00-00

**Tabla 1.** SNPs con frecuencia de 0,5 o superior para los alelos del locus *E*, en las 13 razas españolas de gallinas, la línea trigueña recesiva y la población Leghorn Blanca

<i>E</i> locus	Grupo <sup>1</sup>	C69T	T212C	G274A	G376A	T398AC	G409A	A427G	C637T	C834T
<i>E*E</i>		-	-	Lys	-	-	-	-	-	-
	CN	-	-	Lys	Ile	-	-	-	-	-
	MN	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-
	CB	-	-	Lys	Ile	-	-	-	-	Asn
	AF	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-
	AA	Asn	Thr	Lys	-	-	-	-	-	-
<i>E*R</i>	LGH	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-
	PA	-	-	Lys	-	Gln	-	-	-	-
<i>E*WH</i>	IN	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-
	CC	-	-	-	-	-	-	Ala	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	Ala	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	Ala	-	-
<i>E*N</i>	AP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E*B</i>	VF	Asn	-	Lys	-	-	Thr	-	Cys	-
<i>E*BC</i>	PW	-	-	-	-	Pro	-	Ala	-	Asn
<i>E*Y</i>	T	-	-	-	-	-	-	-	Cys	-

<sup>1</sup> AA: Andaluza Azul, AF: Andaluza Franciscana, AP: Andaluza Perdiz, B: Vasca Barrada, CB: Cara Blanca Española, CC: Castellana Codorniz, CN: Castellana Negra, IN: Indio de León, MN: Menorquina Negra, LGH: Leghorn Blanca, P: Prat Leonada, PA: Pardo de León, PW: Prat Blanca, T: Trigueña recesiva, VF: Villafranca Roja

### ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN THE MELANOCORTIN 1 RECEPTOR GENE (*MC1R*) AND *E* LOCUS PLUMAGE COLOR PHENOTYPE IN CHICKENS

**ABSTRACT:** The purpose of this study was to investigate the effect of the *MC1R* gene on the plumage color in chickens. The gene was sequenced in 75 males and 75 females from 13 Spanish breeds, carrying 6 different alleles in the *E* locus (*E\*E*, *E\*R*, *E\*WH*, *E\*N*, *E\*B*, *E\*BC*), a recessive wheaten tester line (*E\*Y*), and a White Leghorn population (heterozygous *E\*E*). Eleven significant SNPs were detected. Nine of them were non-synonymous (T212C, G274A, G376A, T398AC, G409A, A427G, C637T, A644C, and G646A), and 2 were synonymous (C69T, and C834T). With respect to the significant SNPs, seven had an allelic frequency of 0.5 or greater for some of the alleles at the *E* locus. These results indicated a significant correlation between *MC1R* polymorphism and different alleles at the *E* locus. Eleven haplotypes were made with seven of the significant SNPs. The distribution of these haplotypes in the different alleles of the *E* locus showed that each haplotype was predominantly associated to one allele. The observed co-segregation of the *E* locus alleles and SNPs in *MC1R* suggests that the *E* locus is equivalent to *MC1R*.

**Keywords:** melanocortin 1 receptor, single nucleotide polymorphism, *E* locus, chicken