

AVILÉS, C.¹, AZOR, P. J.¹, ÁLVAREZ, F.², FERNÁNDEZ, I.²,
PÉREZ, J.A.², MEMBRILLO, A.¹, DORADO, G.³, MOLINA, A.¹
*1*Grupo MERAGEM. Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
*2*Asociación Nacional de Criadores de Ganado Vacuno Selecto de Raza Retinta. España.
*3*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. España.



Determinación de SNPs en el gen de la diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (DGAT1): Primeros resultados en razas bovinas autóctonas maternales

RESUMEN

El nivel de grasa intramuscular o marbling constituye uno de los principales atributos de la calidad de la carne. Los avances en genética molecular en las últimas décadas han permitido la identificación de gran cantidad de marcadores genéticos asociados a genes que afectan a caracteres de interés en producción ganadera, incluyendo genes simples con efectos importantes en el fenotipo o QTL (regiones genómicas que afectan a caracteres cuantitativos).

Estas nuevas tecnologías han proporcionado herramientas con un gran potencial para mejorar la respuesta a la selección, especialmente cuando se trata de caracteres que son difíciles de mejorar a partir de prácticas convencionales por su baja heredabilidad o porque los métodos para cuantificar su expresión son caros, destructivos, poco precoces en la vida del animal o difíciles de llevar a cabo.

El objetivo de este trabajo ha sido llevar a cabo un estudio preliminar para caracterizar a las razas bovinas de fomento ligadas a la dehesa para el gen que codifica al enzima diacilglicerol O-aciltransferasa 1, enzima vinculado al carácter infiltración de grasa intramuscular, uno de los principales atributos de la calidad de la carne para el consumidor.

INTRODUCCIÓN

La reciente comercialización de kits para la determinación de marcadores genéticos asociados a caracteres cuantitativos como la cantidad de grasa intramuscular infiltrada o la ternesa de la carne ha revolucionado el mundo de la producción de carne de vacuno. Estos marcadores están asociados únicamente a uno de los genes implicados en procesos como la

maduración de la carne o el nivel de veteado intramuscular, motivo por el cual no deben ser usados como único criterio para seleccionar a un animal pero sí pueden emplearse como herramienta de selección complementando a otras o a la hora de decidir en una valoración conjunta de varios caracteres (Quaas et al., 2006).

Esta nueva tecnología se considera un instrumento con un gran potencial para mejorar la respuesta a la selección, especialmente cuando se trata de caracteres difíciles de mejorar a partir de prácticas convencionales por su baja heredabilidad o porque los métodos para cuantificar su expresión son caros, destructivos, poco precoces en la vida del animal o difíciles de llevar a cabo.

El gen que codifica a la diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (DGAT1) se localiza en el cromosoma 14. Este enzima, fundamental en la síntesis de triglicéridos, además de estar vinculada a la producción de leche y a la cantidad de grasa en la misma, está relacionada con la deposición de grasa en otros tejidos como puede ser el muscular. Según los resultados otros estudios (Thaller et al., 2003) existen hasta tres mutaciones en el gen que se asocian a mayores depósitos de grasa intramuscular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Toma de muestras y extracción de ADN. Para la obtención de ADN genómico se tomaron muestras de material biológico (sangre o músculo) de individuos de las razas Retinta (15), Avileña Negra Ibérica (5) y Morucha (5). La extracción del ADN genómico se llevó a cabo por la técnica de salting out (Miller et al., 1998) o a partir de un kit comercial de extracción de Qiagen® en función del tipo de muestra.

Amplificación y secuenciación del gen DGAT1 bovino. Una vez obtenido el ADN se amplificó un fragmento de

ADN perteneciente al gen DGAT1 (GenBank Accession AJ318490). La región amplificada del gen DGAT1 (BTA14) presenta una longitud de 727 pb., conteniendo los exones 7, 8, 9 y 10 del gen con sus correspondientes intrones intermedios. Las amplificaciones se llevaron a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador Eppendorf (Eppendorf AG®, Hamburg, Germany). Los cebadores empleados en la PCR se diseñaron con la aplicación informática Primer3®. Los amplicones se purificaron y comprobaron en un gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio. La reacción de secuenciación se realizó en un secuenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems®).

Búsqueda de polimorfismos y tratamiento estadístico. Las secuencias fueron examinadas y alineadas con el programa Sequencher v.4.6 (® Gene Codes Corporation, 1991-2006). Una vez alineadas y comparadas con las secuencias publicadas en diversos artículos (Thaller et al., 2003) y en el GenBank se detectaron los sitios polimórficos y se determinaron los correspondientes genotipos. La estimación de las frecuencias fue realizada por simple conteo dado el carácter codominante de los marcadores SNPs.

El estudio de asociación entre los dos SNPs y las razas se basó en un test de máxima verosimilitud utilizando las frecuencias de los diferentes genotipos para cada raza. Las razas secuenciadas y las procedentes de la bibliografía (Thaller et al., 2003; Casas et al., 2005) se agruparon por su aptitud en razas maternas mejoradas (razas de la dehesa), razas especializadas continentales y razas especializadas lecheras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Polimorfismos detectados.

Se han detectado dos mutaciones (SNP) en los dos sitios ya descritos por otros autores (Thaller et al., 2003; Casas et al., 2005).

Tabla 1. Descripción de los SNPs encontrados en el gen DGAT1 en las razas bovinas de fomento de la dehesa.

Locus	Posición	Cambio nucleotídico
DGAT1	10433	G/A
	10434	C/A

En la figura 1 se puede observar el electroferograma de cuatro animales, a partir de él podemos determinar los alelos que aparecen en cada animal. Así, los animales RET128 y RET072 con homocigotos para el alelo A en ambos sitios (10433 y 10434) mientras que los animales identificados como AVI003 y MOR002 son homocigotos G en el sitio 10433 y homocigotos C en el sitio 10434.

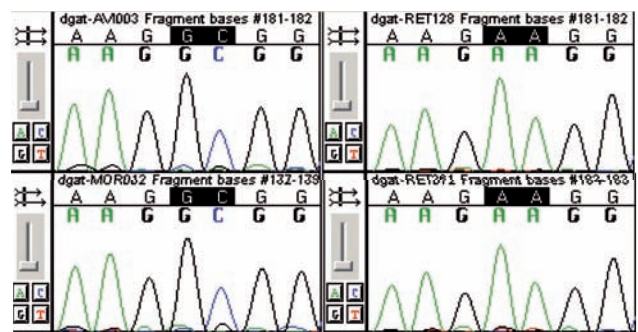


Figura 1. Electroferograma en el que se muestran los dos SNPs detectados en el exón 8 del gen DGAT1 en cuatro animales analizados.

En la tabla 2 se muestran las frecuencias alélicas de aparición para los dos sitios del gen DGAT1 en las razas autóctonas analizadas.

Tabla 2. Relación de las frecuencias alélicas para los sitios previamente descritos en el gen DGAT1 en las razas bovinas de fomento ligadas a la dehesa.

Gen	DGAT1			
	10433		10434	
Alelos	G	A	C	A
Retinta	0,20	0,80	0,20	0,80
Morucha	0,88	0,12	0,88	0,12
Avileña N-I	0,50	0,50	0,50	0,50
Totales	0,41	0,59	0,41	0,59
Test M-L	Chi ² = 11,64; p = 0,003**			

En el caso de los distintos alelos SNP detectados en el gen DGAT1, observamos que las frecuencias de presentación son muy heterogéneas entre razas debido en parte al pequeño tamaño de la población en estudio. Las diferencias entre razas son significativas al 99%.

También se pone de manifiesto el desequilibrio de ligamiento existente entre los sitios 10433 y 10434 a la vista de las frecuencias de presentación alélica en ambas posiciones esto es debido a su proximidad dentro del mismo gen.

Comparación de las diferentes razas y tipos productivos.

En último lugar se ha realizado una comparación a partir de las frecuencias alélicas de cada uno de los dos sitios analizados de las diferentes razas (tanto las secuenciadas en este estudio como las obtenidas desde los trabajos de otros autores). Para ello se han agrupado las razas siguiendo diferentes criterios. Así se han comparado las razas de aptitud cárnica (Retinta, Morucha, Avileña N-I y Charolais) o lechera (Holstein) pudiéndose observar (tabla 3) que existen diferencias significativas entre ambos colectivos.

Tabla 3. Comparación de frecuencias de los alelos analizados del gen DGAT1 entre las razas de aptitud cárnica y las de aptitud lechera.

Gen	DGAT1			
	10433		10434	
Posición	G	A	C	A
Alelos	G	A	C	A
Aptitud cárnica	0,22	0,78	0,22	0,78
Aptitud lechera	0,45	0,55	0,45	0,55
Test M-L	Chi ² = 7,97; p = 0,004**			

La comparación de las razas autóctonas de fomento ligadas a la dehesa con los animales de una raza continental europea especializada en crecimiento magro (Charolais) determina un mayor nivel de contenido lipídico en las razas maternas, puesto que según los trabajos de Thaller et al. (2003), el alelo A en ambos sitios está vinculado a unos menores niveles de deposición grasa en diferentes tejidos (en contraposición a la combinación de alelos GC en las posiciones 10433 y 10434), siendo además las diferencias estadísticamente muy significativas en este caso (tabla 4). A la combinación de alelos GC en dichas posiciones se la conoce como alelo K dado siempre siguen el mismo patrón a la hora de heredarse. Esta variabilidad en el grado de infiltración grasa se debe a que el alelo A codifica el aminoácido alanina mientras que el alelo K determina una lisina. Esto podría explicar en parte, la menor jugosidad atribuida a las razas continentales cuando se explotan en pureza (también la ventaja del cruzamiento industrial con las razas maternas españolas).

Tabla 4. Comparación de frecuencias de los alelos analizados del gen DGAT1 entre las razas maternas selectas españolas y las razas continentales europeas especializadas.

Gen	DGAT1			
	10433		10434	
Posición	G	A	C	A
Alelos	G	A	C	A
Maternas españolas	0,41	0,59	0,41	0,59
Especializadas continentales	0,11	0,89	0,11	0,89
Test M-L	Chi ² = 9,93; p = 0,001***			

CONCLUSIONES

Aún es pronto para determinar en qué situación se encuentran las 3 razas maternas en lo que a frecuencias alélicas de este gen se refiere ya que el análisis comparativo de los dos sitios previamente descritos, revela la necesidad de ampliar el tamaño muestral.

De cualquier modo sería recomendable, en el caso de que las frecuencias persistieran, incluir al alelo K como objetivo de selección en los programas de mejora de cada

una de las razas autóctonas analizadas ya que se vincula a unos mayores niveles de deposición y grasa y a una mayor jugosidad por tanto. Lo que sí parece evidente es la existencia de un desequilibrio de ligamiento entre los dos sitios aunque dada a la proximidad física existente entre ambos era lo que cabía esperar.

Todos estos estudios podrían ir encaminados a probar en un futuro la eficacia de las pruebas para la determinación de marcadores genéticos asociados a caracteres cuantitativos vinculados a la calidad de la carne en nuestras razas.

Finalmente, una vez determinado el polimorfismo para ambos sitios de este gen, se recomienda un análisis más detallado y con una ampliación del tamaño de muestra y del número de razas en estudio para poder hacer una caracterización más fiable y completa de las razas autóctonas de fomento.

BIBLIOGRAFÍA

Casas, E., S. N. White, D. G. Riley, T. P. L. Smith, R. A. Brennehan, T. A. Olson, D. D. Johnson, S. W. Coleman, G. L. Bennett, and C. C. Chase, Jr. (2005). Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in Bos indicus cattle. *J. Anim. Sci.* 83: 13 - 19.

Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.

Thaller, G., Kühn, C., Winter, A., Ewald, G., Bellmann, O., Wegner, J., H. Zühlke and Fries, R. (2003). DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics*, 34: 354 - 357.

Quaas R.L., J. Li1, R.M. Thallman, A.L. Van Eenennaam, R.L. Fernando and C. Gill (2006). Validation of commercial DNA tests for quantitative beef traits. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Belo Horizonte, MG, Brasil.

Asociación Nacional de Criadores de Ganado Vacuno Selecto de Raza Retinta



Murcia, 5 - 1º A - 28045 Madrid
 Tf: 91/468.22.05 - Fax: 91/467.80.00 -
 E-mail: razaretinta@retinta.es - www.retinta.es