MARCADORES DE ADN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA EN CERDOS PAMPA ROCHA (URUGUAY). PROYECTO CSIC-UDELAR

DNA MAKERS AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION IN PAMPA ROCHA PIGS (URUGUAY). PROJECT CSIC-UDELAR

Caracterización en Cerdos locales de Uruguay

Llambí S.[1*], Montenegro M del C.[1], Castro G.[1], Barlocco N.[2], Gagliardi R.[1], Vadell A.[2]

[1]Área Genética, Facultad de Veterinaria, UdelaR. Montevideo, Uruguay. [*]silvia.llambi@gmail.com

[2]Área Suinotécnia, Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

Palabras clave:
Zoometría
Genes

Keywords:
Zoometric
Genes

Abstract

Pampa Rocha Pig is one of Uruguay's animal local genetic resources. In this paper we present the first data from morphometric measurements of 10 sows experimental station belonging to the Southern Regional Centre (Faculty of Agriculture). On the other hand were amplified by PCR regions where single nucleotide polymorphisms for FUT1 genes (resistance to E. coli) and PRLR (prolactin receptor). As for the morphometric measurements were low coefficients of variation except for head width and length of croup (18% and 16%). For automated sequencing analysis of the amplified fragments were found to amplify the fragments are expected according to pig sequences BLAST (NCBI). In the analysis of FUT1 gene sequence was evidence of the animal being described SNP a heterozygous (A/G).

Resumen

El cerdo Pampa Rocha es uno de los recursos zoogenéticos locales del Uruguay. En esta comunicación se presentan los primeros datos de medidas morfométricas de 10 cerdas pertenecientes a la estación experimental Centro Regional Sur (Facultad de Agronomía). Por otro lado se amplificaron por PCR regiones donde existen polimorfismos de un solo nucleótido para los genes FUT1 (resistencia a *E. coli*) y PRLR (receptor de prolactina). En cuanto a las medidas morfométricas se encontraron coeficientes de variación bajos a excepción del ancho de cabeza y largo de grupa (18% y 16%). Por análisis de secuenciación automática de los fragmentos amplificados se comprobó que estamos amplificando los fragmentos esperados de acuerdo a BLAST pig secuences (NCBI). En el análisis de la secuencia del gen FUT1 se evidencio la existencia del SNP descripto siendo el animal un heterocigota (A/G).

Introducción

En Uruguay el cerdo Pampa Rocha es uno de los tres recursos genéticos porcinos locales que se encuentra en situación sin riesgo pero a preservar (más de 1000 reproductoras) (Castro, 2007; Delgado, 2002). Estos cerdos se encuentran adaptados a un ecosistema de bañados del Este del Uruguay, presentando a nivel fenotípico un pelaje negro con patas, punta de hocico y punta de cola de color blanco en grado variable (Vadell *et al*., 1994). En distintos países de Latinoamérica se han identificado una gran diversidad de porcinos de razas locales que son utilizados en distintos sistemas de explotación y variadas condiciones (ecosistemas, sociales). Para cualquier recurso zoogenético (RZG) la no valoración y cuidado involucra pérdida de diversidad genética llevando a la disminución de capacidades para mantener y mejorar la producción y productividad pecuaria (FAO, http://fao.org/dad-is). Un RZG para que sea valorado como tal se debe caracterizar. Existen distintas alternativas que se complementan para poder caracterizar un RZG. Dentro de las mismas tenemos a la caracterización morfológica (cualitativas y cuantitativas) (Barba *et al*., 2004). Los marcadores moleculares de ADN son también una muy valiosa herramienta para la caracterización de los RZG. Existen distintos tipos de marcadores moleculares de ADN utilizados para estudios de variabilidad genética (microsatélites, polimorfismos en genes mayores o tipo I, ADN mitocondrial, SNPs, etc). El estudio de polimorfismos en genes mayores nos permite por un lado estudiar diversidad genética (frecuencias alélicas) y poder asociar dichos polimorfismos con características de interés productivo (Rothschild, 2003).

Distintos polimorfismos en genes mayores se han detectado en razas porcinas comerciales y locales como es en el gen FUT1 (resistencia a infecciones por E.coli) y en el gen PRLR (receptor de prolactina relacionado con el tamaño de camada) (Hernández López *et al.*, 2006; Ciobanu *et al.*, 2001). En este trabajo se muestran las estrategias preliminares del proyecto I+D aprobado en el presente año por CSIC-UdelaR (Profundización en el estudio de variabilidad genética en suinos locales mediante marcadores de ADN y caracterización fenotípica) en cerdas Pampa Rocha del Centro Regional Sur de la Facultad de Agronomía.

Material y métodos

El trabajo se está desarrollando en el Centro Regional Sur (CRS, Progreso, Canelones) perteneciente a la Facultad de Agronomía de la UdelaR. Actualmente este Centro cuenta con un Plantel de 25 reproductoras madres y 5 reproductores machos de la raza Rampa Rocha. El sistema de cría es a "cielo abierto". Para la toma de medidas y muestras así como para el manejo de los animales se siguió el protocolo de la CHEA (Comisión de Experimentación Animal, UdelaR). Se realizaron medidas zoométricas (cm) y peso vivo (kg) en 10 cerdas Pampa Rocha de más de un año de edad utilizando bastón zoométrico, compás de Broca, cinta métrica inextensible y báscula electrónica (Figura 1). Las variables cuantitativas registradas fueron: Peso vivo (kg) PV, Longitud de la cabeza (cm) LCa, Anchura de la cabeza (cm) ACa, Anchura interorbital (cm) AIO, Longitud del hocico o cara (cm) LHc, Anchura del hocico (cm) Aho, Longitud de la oreja (cm) LOr, Anchura de la oreja (cm) AOr, Alzada a la cruz (cm) AC, Longitud de la paleta (cm) LP, Perímetro de la caña (cm) PC, Alzada a la grupa (cm) ALGr , Alzada al nacimiento de la cola (cm) ANC, Anchura de la grupa (cm) AnGr, Distancia interisquiática (cm) DI, Longitud de la grupa (cm) LGr, Longitud del jamón (cm) LJ, Longitud corporal (cm) LC1. Se realizó un análisis de estadística descriptiva para las variables cuantitativas registradas.

Las amplificaciones por PCR se realizaron sobre ADN extraído a partir de sangre periférica con kit AxyPrep (Axygen) utilizando el juego de cebadores F5' CTGCCTGAACGTCTATCAAGATC3' y R5' CTTCAGCCAGGGCTCCTTTAAG3' para el gen FUT1 ; F5' CCCAAAACAGCAGGAGAACG3' y R5' GGCAAGTGGTTGAAAATGGA3' para el Gen PRLR. Se adaptó un programa de PCR convencional: 95˚C, 3min, (1 ciclo) ; 95˚C, 45seg, 58˚C, 1min, 72˚C, 1min (35 ciclos); 72˚C, 5min (1ciclo) para ambos genes. Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 2% y se analizó la secuencia de los mismos mediante secuenciación automática (Capillary electrophoresis, 3730 XL) y programas de libre acceso BioEdit y BLAST pig secuences.

Resultados y discusión

En la tabla I se muestran los valores máximos, mínimos, media, el desvío estándar y coeficiente de variación (CV) obtenidos mediante estadística descriptiva correspondientes a las variables zoométricas y al peso corporal. Las variables morfológicas mostraron coeficientes de variación (CV) menores al 15% a excepción de ACa (18%) y LGr (16%) mientras que para la variable peso corporal el CV fue de 19%. Este último valor es razonable si se tiene en cuenta que las hembras se encontraban en distintos estados (preñadas, en amamantamiento, vacíos). Los CV más bajos se obtuvieron en las medidas relacionadas con la altura de los animales (AC y ALGr, 5% y 4% respectivamente) similares resultados fueron encontrados por Hurtado *et al.*, 2004 en cerdos criollos Venezolanos.

Los productos de amplificación obtenidos presentaron un tamaño de 421pb para el gen FUT1 y 457pb para el gen PRLR coincidiendo con los tamaños esperados de acuerdo con Hernández López *et al.*, 2006 y Ciobanu *et al.*, 2001. El análisis del producto de la secuenciación de dichos fragmentos reveló una identidad del 99% con secuencias de los genes FUT1 y PRLR de acuerdo al BlAST realizado sobre el ensembl del Sscrofa 10.

Al realizar el análisis de alineamiento con BioEdit entre la secuencia de referencia del GenBank para el gen FUT1 (NW 003534958.1 número de acceso) y la secuencia del animal Pampa Rocha se pudieron identificar dos sitios de variación (Y y R) (Figura 2). En el sitio R (A o G) se generaría un sitio de corte extra para la enzima de restricción HhaI (GCGC) con lo cual podemos decir que el animal Pampa Rocha es un heterocigota para el SNP FUT1 siendo su genotipo AG.

El análisis de alineamiento entre la secuencia de referencia del GenBank para el gen PRLR (NW 003536536.1 número de acceso) y la secuencia del animal Pampa Rocha reveló un 99% de identidad para 293pb no pudiendo identificar diferencias entre el alineamiento de ambas secuencias.

Tabla I. Estadísticos descriptivos del Peso vivo (Kg) y medidas zoométricas (cm) [*Descriptive statistics of weight (kg) and measures zoometric (cm)*]

Variables	Mínimo	Máximo	Media	DE	CV (%)
PV (kg)	101	186.5	137	26.2	19
LCa (cm)	26.5	39.5	35.5	3.72	10
ACa (cm)	14.5	28.5	19.75	3.51	18
AIO (cm)	14.5	17.5	16.7	1.03	6
LHc (cm)	14	21	18.2	2.2	12
Aho (cm)	10	13.5	12	0.94	8
LOr (cm)	20	29	24.75	2.64	11
AOr (cm)	12	15	13.1	1.17	9
AC (cm)	67	78	72.7	3.55	5
LP (cm)	31	39	34.95	2.54	7
PC (cm)	17.5	21	19.05	1.09	6
ALGr (cm)	81.5	91.5	86.95	3.64	4
ANC (cm)	66.5	79.5	73.05	4.85	7
AnGr (cm)	23	33	27.2	2.89	11
DI (cm)	22.5	29	25.85	2.28	9
LGr (cm)	25	45	35.1	5.54	16
LJ (cm)	26	37	33.5	3.19	10
LC1 (cm)	94	115	103.68	6.69	6

Conclusiones

En esta comunicación preliminar se presentan los primeros datos de morfometría en la raza local Pampa Rocha encontrando valores de CV bajos en la muestra estudiada. Los productos de PCR corresponden a los genes FUT1 y PRLR. Por secuenciación automática identificamos que el animal analizado es un heterocigota para el SNP del gen FUT1. Para el gen PRLR no se encontraron los polimorfismos descriptos en la secuencia analizada.

Agradecimientos y financiación

Los autores dan gracias por su colaboración a la Sra. Iris Hernández por la preparación de materiales de laboratorio. A la Sra. Tanya Aguiar por el manejo y cuidado de los animales del CRS. Este trabajo es financiado por Proyecto CSIC I+D, Udelar (Profundización en el estudio de variabilidad genética en suinos locales mediante marcadores de ADN y caracterización fenotípica).

Figura 1. Toma de medida con bastón zoométrico en una cerda Pampa Rocha (*Zoometric performed in Pampa Rocha sows*)

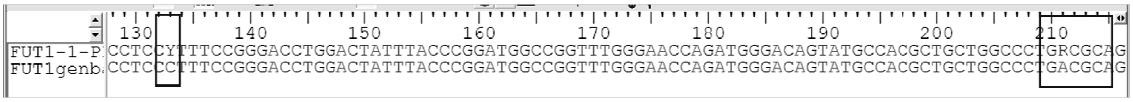

Figura 2. Alineamiento entre muestras analizadas (programa BioEdit) [*Alignment among analyzed samples (BioEdit program)*]

Bibliografía

Barba, C., A. Cabello, R. Sanz y J. Delgado. 2004. Programa demostrativo de técnicas en caracterización productiva y morfológica. En: Delgado, J. V. (Ed.). Biodiversidad Porcina Iberoamericana: Caracterización y Uso Sustentable. pp. 303-311.

Castro, G. 2007. Situación de los recursos genéticos porcinos locales en Uruguay. Arch. Zootec. 56 (Sup.1): 783-788.

Ciobanu, D., Day, A., Nagy, A., Wales, R., Rothschild, M y Plastow. G. 2001.Genetic variation in two conserved local Romanian pig breeds using type 1 DAN markers. Genet. Sel. Evol. 33:417-432.

Delgado, J. 2002. Gestión genética de las poblaciones. Jornadas Iberoamericanas sobre la Mejora y Conservación de Razas Ganaderas Locales para el Desarrollo Rural Sostenible. Antigua-Guatemala: 12-37.

Hernández López, S., Lemus, C., Alonso Morales, R y Herrera Haro, J. 2006. Effect of candidate genes on reproductive traits of sows. Rev. Cient. (Maracaibo). 16(6):648-654.

Hurtado, E., González, C y Ly, J. 2004. Estudio morfológico del cerdo criollo del estado de Apure Venezuela. Revista Computadorizada de Producción Porcina Volumen 11 (3):40-47.

Rothschild, M. 2003. Approaches and challenges in measuring genetic diversity in pigs. Arch. Zootec. 52:129-135.

Vadell, A.; Barlocco, N.; Methol, R.; Vaselli, M. y Castillos, A. 1994. Diagnóstico de la producción porcina en el departamento de Rocha. PROBIDES/UDELAR. Uruguay: 44.