



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Análisis de un SNP en el gen de la subunidad catalítica de la fosforilasa quinasa
en cerdos de la raza Duroc

Analysis of a SNP in the catalytic subunit of phosphorylase kinase in Duroc pigs

Autor/es

Inés Alonso Jáuregui

Director/es

Pascual López Buesa
Carmen Burgos Serrano

Facultad de Veterinaria

2017

DATOS PERSONALES

APELLIDOS Y NOMBRE: Alonso Jáuregui, Inés

DNI: 18457188-X

TELÉFONO: 608759150

CORREO ELECTRÓNICO: inosalonsoj@gmail.com

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS | 3 |
| 1. RESUMEN | 5 |
| 2. ABSTRACT | 6 |
| 3. INTRODUCCIÓN..... | 7 |
| 4. OBJETIVOS | 11 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 12 |
| 5.1. Muestras animales | 12 |
| 5.2. Extracción y cuantificación de DNA | 12 |
| 5.3. Análisis del genotipo de PHKG1 g. 8283 C>A por secuenciación..... | 13 |
| 5.4. Análisis del genotipo de PHKG1 g. 8283 C>A por RT-PCR | 15 |
| 6. RESULTADOS..... | 17 |
| 6.1. PUESTA A PUNTO DEL ANÁLISIS DEL GENOTIPO DE PHKG1 g. 8283 C>A POR RT-PCR..... | 17 |
| 6.1.1. Selección de los controles | 17 |
| 6.1.2. Optimización de la cantidad de DNA a ensayar | 19 |
| 6.2. ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DE LA MUTACIÓN DE PHKG1 g. 8283 C>A EN DISTINTAS POBLACIONES DE DUROC | 21 |
| 7. DISCUSIÓN..... | 24 |
| 8. CONCLUSIONES | 27 |
| 9. CONCLUSIONS..... | 28 |
| 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 29 |
| APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE | 31 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AMP: adenosin monofosfato

AMPK: proteína quinasa activada por AMP

Arg: arginina

bp: pares de bases

C: citosina

CENSYRA: Centro de Selección y Reproducción Animal

CRA: capacidad de retención de agua

DFD: oscuro, firme y seco

DNA: ácido desoxirribonucleico

DOPJT: Denominación de Origen Protegida Jamón de Teruel

G: guanina

Gly: glicina

Leu: leucina

Met: metionina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

pH₂₄: valor de pH a las 24 horas postmortem

PHKG1: subunidad catalítica gamma 1 de la fosforilasa quinasa

PRKAG3: subunidad reguladora gamma 3 de la proteína quinasa activada por AMP

QTL: locus de un carácter cuantitativo

RFLPs: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

RT- PCR: PCR a tiempo real

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido

T: timina

TBE: tris, borato, EDTA

V: voltios

1. RESUMEN

Ma *et al.* (2014) han descrito recientemente una mutación, g.8283 C>A, en el gen que codifica la subunidad catalítica de la fosforilasa quinasa, mutación que tiene efectos considerables sobre caracteres importantes de la carne como el pH₂₄ y el contenido de grasa intramuscular. En este trabajo hemos puesto a punto un test de RT-PCR para analizar en el menor tiempo y al menor coste posible esta mutación. El test resultante es fiable, rápido y económico en comparación con el descrito por Ma *et al.* El resultado del análisis de diversos grupos de cerdos Duroc muestra que el alelo A está presente en mayor proporción en las poblaciones con el menor contenido de grasa intramuscular, lo que concuerda con lo descrito por Ma *et al.* Este marcador puede ser de notable utilidad para la selección de carnes de calidad.

2. ABSTRACT

Ma *et al.* (2014) have recently described a mutation, g.8283 C>A, in the gene encoding the catalytic subunit of phosphorylase kinase, a mutation that has considerable effects on important meat parameters such as pH₂₄ and intramuscular fat content. In this project we have developed a RT-PCR test to analyze this mutation in the shortest time and at the lowest cost. The resulting test is reliable, fast and economical compared to that described by Ma *et al.* The results of the analysis of different groups of Duroc pigs show that the A allele is present in a higher proportion in the populations with the lowest intramuscular fat content, which is in agreement with Ma *et al.* This marker can be very useful for the selection of quality meats.

3. INTRODUCCIÓN

Durante la transformación del músculo en carne tiene lugar una caída del pH desde valores próximos a la neutralidad hasta pHs cercanos a 5.4, que es consecuencia sobre todo, del metabolismo postmortem del glucógeno. El valor del pH final alcanzado durante este proceso afecta considerablemente a las características organolépticas y tecnológicas de la carne obtenida, y está determinado en buena medida por el contenido antemortem de glucógeno. Del pH₂₄ dependen caracteres de calidad tan importantes como la capacidad de retención de agua (CRA), el color o la susceptibilidad al deterioro microbiano.

Las carnes con pH finales por encima de los valores normales, que para la carne de cerdo se consideran por debajo de 5.8 a las 24 horas postmortem (Warriss, 1990), producen carnes duras, firmes y secas (DFD). Este tipo de carnes aunque presentan una elevada CRA, lo que tiene ciertas ventajas, son también carnes extremadamente susceptibles al deterioro microbiano. Las carnes con valores de pH finales muy bajos presentan, por el contrario, una reducida CRA, una menor extractabilidad de las proteínas y un menor rendimiento durante el procesado (Enfält *et al.*, 1997; Joo *et al.*, 1999; Lundström *et al.*, 1996).

En la industria cárnica, las pérdidas económicas debidas a la aparición de pHs finales anómalos son considerables. Se han identificado tanto factores ambientales como factores genéticos que determinan el nivel de glucógeno en el músculo en el momento previo al sacrificio. Se han descrito multitud de locus de un carácter cuantitativo (QTL) asociados al pH₂₄, pero tan solo se han identificado unos pocos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que afecten a este parámetro. Los primeros SNPs en ser descubiertos fueron dos polimorfismos en el gen PRKAG3, que codifica una subunidad reguladora de la proteína kinasa activada por AMP (AMPK), con efectos opuestos sobre el pH₂₄.

En el año 2000, Milan *et al.*, describieron una mutación en este gen que produce una sustitución del aminoácido en la posición 200 de la cadena proteica (Arg200Gly o R200Q) que estaba asociada a baja actividad de la AMPK y a niveles elevados de

glucógeno en el músculo. Al año siguiente, Ciobanu *et al.* (2001), identificaron otra mutación en este mismo gen que origina un cambio en el aminoácido contiguo al que afecta la mutación descrita por Milan *et al.* Esta mutación (V199I) produce un descenso en el nivel de glucógeno muscular y un aumento en el pH₂₄ de la carne. Este polimorfismo, a diferencia de lo que ocurre con el de Milan *et al.*, que tan solo ha sido detectado en animales de raza Hampshire, está presente en distintas razas de cerdos (Ciobanu *et al.*, 2001; Galve *et al.*, 2013).

Otro SNP con efectos sobre el pH₂₄ es el polimorfismo en el gen de la PEPCK descubierto por Latorre *et al.* (2016). Este gen codifica la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica (PEPCK), que es una de las principales enzimas reguladoras de la gluconeogénesis y de la gliceroneogénesis. El SNP descubierto por Latorre *et al.*, c.A2456C, produce un cambio de aminoácido en la posición 139 (Met139Leu) de la proteína. Esta sustitución está asociada en el cerdo a un fenotipo caracterizado por una reducción en el contenido de grasa intramuscular, un incremento en el espesor de tocino dorsal, una reducción en el pH₂₄ y una disminución de la CRA.

En 2014, Ma *et al.*, describieron una mutación en el gen PHKG1 con efectos sobre el pH₂₄. Este gen codifica la subunidad catalítica de una de las enzimas claves en el metabolismo del glucógeno: la fosforilasa quinasa. Este enzima tiene una estructura compleja formada por cuatro subunidades distintas y 16 cadenas polipeptídicas ($\alpha\beta\gamma\delta$)₄ (Venien-Bryan *et al.*, 2009). Cataliza la fosforilación de la glucógeno fosforilasa que tiene como consecuencia la activación del enzima y el inicio de la degradación del glucógeno con la formación de glucosa-1-fosfato.

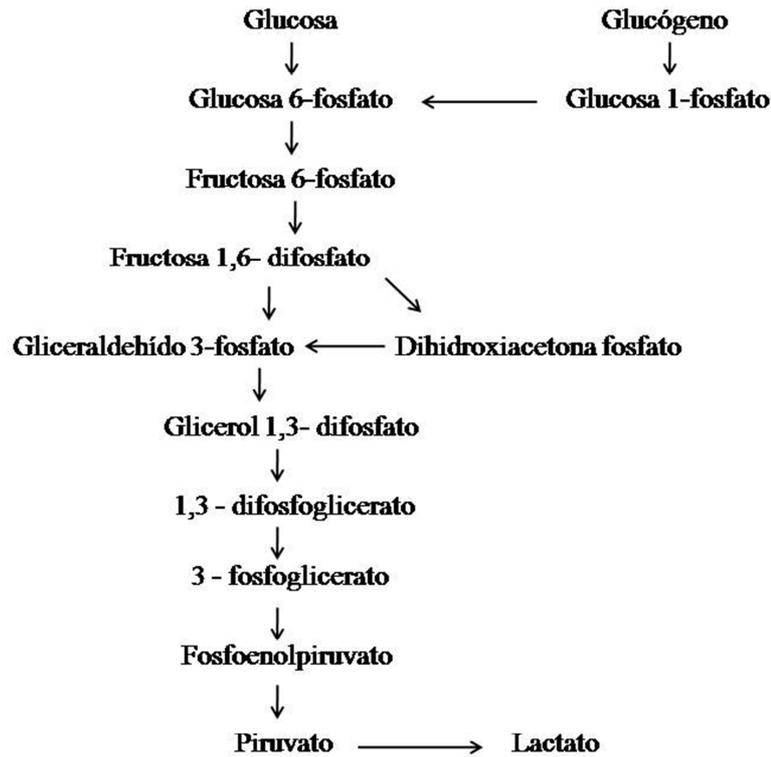


Figura 1. Ruta metabólica de la glucólisis anaerobia (Warriss, 2003). Tras la formación de Glucosa-1-fosfato se desencadena la glucólisis anaerobia para dar lugar a lactato.

El polimorfismo en el gen PHKG1 identificado por Ma *et al.*, consiste en una sustitución de una citosina en la posición 8283 del gen por una adenina. La mutación, localizada en el intrón 9 del gen, produce una alteración en el patrón de splicing que origina una proteína de menor tamaño y con una actividad enzimática unas 6 veces menor que la salvaje. La mutación causa un aumento del 43% del potencial glucolítico y una disminución del 20% de la CRA, además de producir un descenso del contenido de grasa intramuscular. Se desconoce el mecanismo molecular responsable de este último fenómeno.

Esta mutación en el gen PHKG1 es, por lo tanto, una mutación con efectos adversos sobre la calidad de la carne y sobre su aptitud tecnológica. El alelo desfavorable, el alelo A, tan solo ha sido detectado en cerdos de raza Duroc o en sus cruces con otras razas (Ma *et al.*, 2014). La raza Duroc se caracteriza por su rusticidad, por su óptima

velocidad de crecimiento y alta eficiencia alimentaria y por producir una carne con un elevado contenido en grasa intramuscular.

Esta raza se utiliza fundamentalmente como línea paterna para la producción de carne de alta calidad destinada a la elaboración de productos curados de alta gama. Es en este exigente sector donde la eliminación de todos los factores que repercutan negativamente sobre la calidad de la materia prima, como el SNP en el gen PHKG1, cobra especial relevancia. En este sentido sería interesante disponer de una forma rápida y sencilla para analizar este marcador potencial, y así ser capaces de evaluar su incidencia en diversas poblaciones porcinas. De esta forma este método podría ser utilizado si se aplica este marcador como criterio de selección.

Hasta la fecha el único procedimiento de análisis descrito para el polimorfismo en el gen de PHKG1 es el empleado en el trabajo de Ma *et al.* (2014), que es el único publicado sobre este SNP. Se trata de un análisis por PCR-RFLPs para el que en primer lugar hay que amplificar por PCR un fragmento de DNA que contiene el punto en el que se encuentra el polimorfismo, y posteriormente hay que cortar el fragmento generado con un enzima de restricción capaz de diferenciar entre el alelo mutante y el salvaje, para finalmente analizarlos por electroforesis. Este es un procedimiento que además de ser lento y tedioso no permite analizar muchas muestras simultáneamente.

4. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este trabajo son dos. El primero de ellos consiste en poner a punto un método de análisis rápido y fiable para este polimorfismo. El análisis por PCR a tiempo real basado en sondas TaqMan parece el procedimiento más indicado para ello y ya ha sido empleado con éxito por nuestro grupo de investigación para detectar otras mutaciones de interés para la industria cárnica (Carrodeguas *et al.*, 2005; Burgos *et al.*, 2006).

Dado que esta mutación afecta a diversos caracteres de calidad de la carne, el segundo de los objetivos planteados en este trabajo pretende estudiar la incidencia de esta mutación en el gen PHKG1 en distintas poblaciones de cerdos de raza Duroc sometidas a diferentes criterios de selección genética.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Muestras animales

Para la obtención de los controles necesarios para la puesta a punto de la RT-PCR se analizaron extractos de DNA de animales Landrace/LargeWhite x Duroc pertenecientes a un estudio anterior (Galve *et al.*, 2013).

Para estudiar la incidencia de la mutación de PHKG1 se analizaron muestras de semen, diluido 1:15, de verracos de raza Duroc de cuatro poblaciones diferentes:

- a) Población 1. Se trata de una población de cerdos de raza Duroc empleados actualmente como machos finalizadores para la producción de animales destinados a la producción de jamones Denominación de Origen Protegida Jamón de Teruel (DOPJT).
- b) Población 2. Es una población similar a la anterior, pero del año 2006.
- c) Población 3. Está formada por animales empleados fundamentalmente para la producción de productos curados de calidad.
- d) Población 4. Se trata de una población de cerdos Duroc del Centro de Selección y Reproducción Animal (CENSYRA) de la Junta de Extremadura, no sometida a ningún tipo de selección genómica desde los años 50 del pasado siglo.

5.2. Extracción y cuantificación de DNA

El DNA genómico se obtuvo a partir de las muestras de semen diluido 1:15 de las poblaciones anteriores utilizando el kit DNA Realpure de Durviz (Paterna, Valencia, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se introdujeron 1.5 ml de la muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad y se centrifugaron a 5000 x g durante 5 minutos en una microcentrífuga MiniSpinplus de Eppendorf (Wessening, Alemania). Tras eliminar por decantación el sobrenadante, se volvieron a añadir 1.5 ml de semen diluido y se volvió a centrifugar a 5000 x g durante 5 minutos. Esta misma

etapa se repitió dos veces más. Al pellet obtenido, tras su lavado con 900 µl de tampón TE (10 mM Tris y 1 mM EDTA), se le añadieron 565 µl de la disolución de lisis del kit, 10 µl de una disolución de 20 mg de proteinasa K/ml (Quiagen, Hilden, Alemania) y 25 µl de una disolución acuosa de ditiotreitól 1 M (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos). Tras realizar una incubación a 60°C durante 3 horas, se añadieron 360 µl de la disolución de precipitación de proteínas del kit. Se agitó enérgicamente el tubo, con ayuda de un vórtex, durante 20 segundos y se centrifugó a 14000 x g durante 5 minutos. Para precipitar el DNA presente en el sobrenadante, este se trasvasó a otro tubo Eppendorf con 600 µl de isopropanol, que se invirtió sucesivamente (unas cincuenta veces) para mezclar bien su contenido, y finalmente se centrifugó a 14000 x g durante 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante por decantación, y el pellet se lavó con 600 µl de etanol del 70%. Se centrifugó a 14000 x g durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y los restos de etanol existentes en el tubo se secaron cuidadosamente con papel absorbente. Se dejó que el pellet se terminara de secar por completo a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 35 µl de la disolución de hidratación de DNA incluida en el kit de extracción de DNA y se incubó a 65°C durante una hora, agitando periódicamente de forma manual para ayudar a dispersar el DNA. Por último, se calentó este extracto a 100°C durante 10 minutos para inactivar las DNAsas presentes en él.

La concentración de DNA en el extracto se determinó espectrofotométricamente mediante la medida a 260 nm realizada con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos).

Los extractos se almacenaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

5.3. Análisis del genotipo de PHKG1 g. 8283 C>A por secuenciación

El fragmento del gen de PHKG1 secuenciado es un fragmento de 324 bp que incluye el punto en el que se encuentra localizado este polimorfismo. La amplificación de este fragmento se llevó a cabo en un termociclador UNO-Thermoblock (Biometra, Göttingen, Alemania) con la enzima AccuPrime™ TaqPolymerase High Fidelity (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y los cebadores PHKG1F1 (5'-CCTTGGGAACTCCCTACAGC-3') y

PHKG1R1 (5'-ACCCAGTGGCCATAGATTCG-3'). Cada reacción contenía 1.0 unidad (0.2 μ l) de AccuPrimeTMTaqPolymerase High Fidelity, 5 μ l del tampón II 10 x, 0.5 μ l de cada uno de los cebadores (20 μ M), 2.5 μ l de DMSO, 4 μ l de DNA del extracto de DNA diluido a 50 ng/ μ l y 37.3 μ l de agua miliQ.

El programa de temperaturas empleado consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 51°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos, y una etapa final de extensión de 10 minutos a 68°C.

Para comprobar la eficacia y especificidad de la amplificación, se realizó un análisis por electroforesis del producto de la PCR en un gel de agarosa (Biotools, Madrid, España) al 2% en TBE con SYBR Safe® (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos). El volumen de muestra cargado en el gel fue 5 μ l y la electroforesis se llevó a cabo en una cámara de electroforesis horizontal Sub Cell GT (Biorad, California, Estados Unidos) a 100 V durante 30 minutos. La visualización del resultado se realizó mediante iluminación con luz azul, utilizando un transiluminador SafeImager™ 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos). El tamaño del producto amplificado por PCR se determinó por comparación con la posición de las bandas correspondientes al marcador de pesos moleculares 100 bp ladder (Biotools, Madrid, España) cargado en uno de los pocillos del gel de electroforesis.

Tras comprobar que la amplificación produjo un único amplicón del tamaño esperado, el producto de la PCR se purificó con el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de PCR purificado se eluyó con 20 μ l del tampón de elución del kit, se cuantificó mediante la medida de la absorbancia a 260 nm, realizada con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos) y finalmente se diluyó a 10 ng/ μ l con el tampón de elución. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad se introdujeron 2.5 μ l de este extracto, 13 μ l de agua destilada y 3.5 μ l de una disolución 1 μ M del primer PHKG1F1 y se envió a secuenciar a Sistemas Genómicos (Paterna, Valencia, España).

La determinación del genotipo con respecto a este polimorfismo se realizó por identificación del nucleótido o nucleótidos presentes en su correspondiente posición en el cromatograma de secuenciación obtenido.

5.4. Análisis del genotipo de PHKG1 g. 8283 C>A por RT-PCR

La RT-PCR es una variante de la PCR ordinaria, cuyo objetivo es amplificar un fragmento concreto de DNA y simultáneamente cuantificarlo en cada uno de los ciclos de amplificación de la reacción.

El tipo de RT-PCR empleada para realizar este análisis fue una PCR en tiempo real con sondas TaqMan. Estas sondas son oligonucleótidos con un fluorocromo donador o reporter (VIC, FAM, JOE, etc.) en un extremo y un aceptor o quencher (TAMRA) en el otro. Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador, tras ser excitado a la longitud de onda adecuada, es totalmente absorbida por el aceptor. En cuanto a su secuencia de nucleótidos, estas sondas están diseñadas para hibridar con el DNA en la región en la que se encuentra el polimorfismo objeto de estudio. En este tipo de análisis en los que se desean detectar dos posibles alelos hay que incluir dos sondas TaqMan, cada una de las cuales tiene que estar marcada con un donador diferente y debe tener una secuencia de nucleótidos que le permita hibridar perfectamente solo con uno de los dos posibles alelos.

Al igual que en una PCR clásica, en la RT-PCR la primera de las etapas de los ciclos que conducen a la amplificación es la desnaturalización o separación de las dos cadenas del DNA. A continuación tiene lugar la etapa de hibridación de los primers y de las sondas TaqMan con las regiones de las que son complementarios. En relación a esta etapa hay que indicar que aunque las dos sondas TaqMan son capaces de hibridar con los dos alelos posibles, la hibridación es perfecta solo con uno de los alelos. La tercera de las etapas de los ciclos de amplificación de la RT-PCR, que normalmente se lleva a cabo a la misma temperatura que la utilizada para la hibridación de los primers y sondas TaqMan, es la etapa de extensión en la que la polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA complementaria a la hebra molde añadiendo los nucleótidos complementarios en dirección 5' → 3'. Como puede verse en la figura 2, durante esta fase de extensión la polimerasa, en virtud de su actividad exonucleasa 5' → 3', escinde únicamente la(s)

sonda(s) TaqMan perfectamente hibridada(s) con el DNA, separando el fluorocromo donador del aceptor. Esto produce un aumento de la fluorescencia correspondiente a dicho(s) fluorocromo(s) donador(es) que es registrada por el detector de fluorescencia.

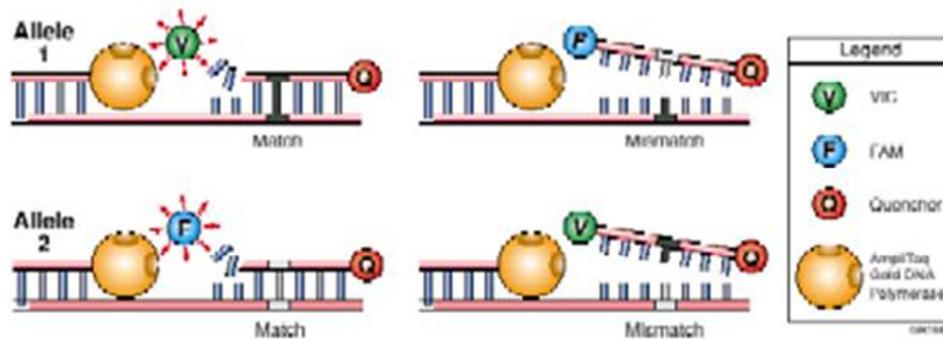


Figura 2. Funcionamiento de la PCR en tiempo real basada en el empleo de sondas TaqMan. (Fuente: Nemours Biomolecular Core Laboratory, <http://nemoursresearch.org/cores/bcl/techniques.html>)

Los análisis del genotipo de PHKG1 g. 8283 C>A por RT-PCR se llevaron a cabo en un termociclador CFX96™ Real-Time System (Bio-rad, Hércules, California, Estados Unidos) con los primers PHKG1-F2 (CCTGCCTGCGCTGGA) y PHKG1-R2 (GAAGCCAGCACCGTCAGA) y las sondas TaqMan PHKG1-V (TCACCTGCTCGAGTCC, marcada con el fluorocromo VIC) y PHKG1-M (CCTGCGCGAGTCC, marcada con el fluorocromo FAM), diseñados con la herramienta CustomTaqMan® AssayDesignTool (AppliedBiosystems, grupo Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Cada ensayo incluyó 6.3 µl de iTaq™ Universal ProbesSupermix (2x) (Bio-rad, Hércules, California, Estados Unidos), 0.3 µl de 40x AssayMix que incluye los primers y sondas TaqMan indicadas anteriormente, 2.5 µl de DNA genómico (diluido a 2 o 10 ng/µl) y 3.4 µl de agua miliQ. El programa de temperaturas empleado en la RT-PCR consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos seguida de 49 ciclos de 95°C durante 5 segundos y 60°C durante 30 segundos.

6. RESULTADOS

6.1.PUESTA A PUNTO DEL ANÁLISIS DEL GENOTIPO DE PHKG1 g. 8283 C>A POR RT-PCR

6.1.1. Selección de los controles

Con el fin de localizar los controles necesarios para la puesta a punto del análisis del genotipo de PHKG1 g. 8283 C>A por PCR en tiempo real, se analizó por secuenciación el genotipo PHKG1 de un total de 36 animales de un cruce de cerdos Landrace/LargeWhite x Duroc pertenecientes a otro estudio anterior (Galve *et al.*, 2013).

Los motivos de haber realizado la búsqueda de los controles en esta población fueron dos. En primer lugar porque ya se disponía de sus extractos de DNA y en segundo lugar porque en esta población se habían analizado multitud de caracteres fenotípicos, entre ellos el pH₂₄ que es uno de los caracteres a los que afecta este polimorfismo de PHKG1, lo que nos permitió llevar a cabo una búsqueda dirigida de los controles. En esta búsqueda dirigida, en lugar de elegir al azar las muestras a secuenciar en esta población para localizar los tres genotipos posibles de PHKG1 solo se analizaron animales con valores de pH₂₄ muy por debajo o muy por encima del valor medio de este parámetro en la población. De los 36 animales analizados, 2 fueron AA, 21 CC y 13 AC.

En la figura 3 se muestra, a modo de ejemplo, un fragmento del cromatograma de secuenciación obtenido para cada uno de los tres genotipos posibles.

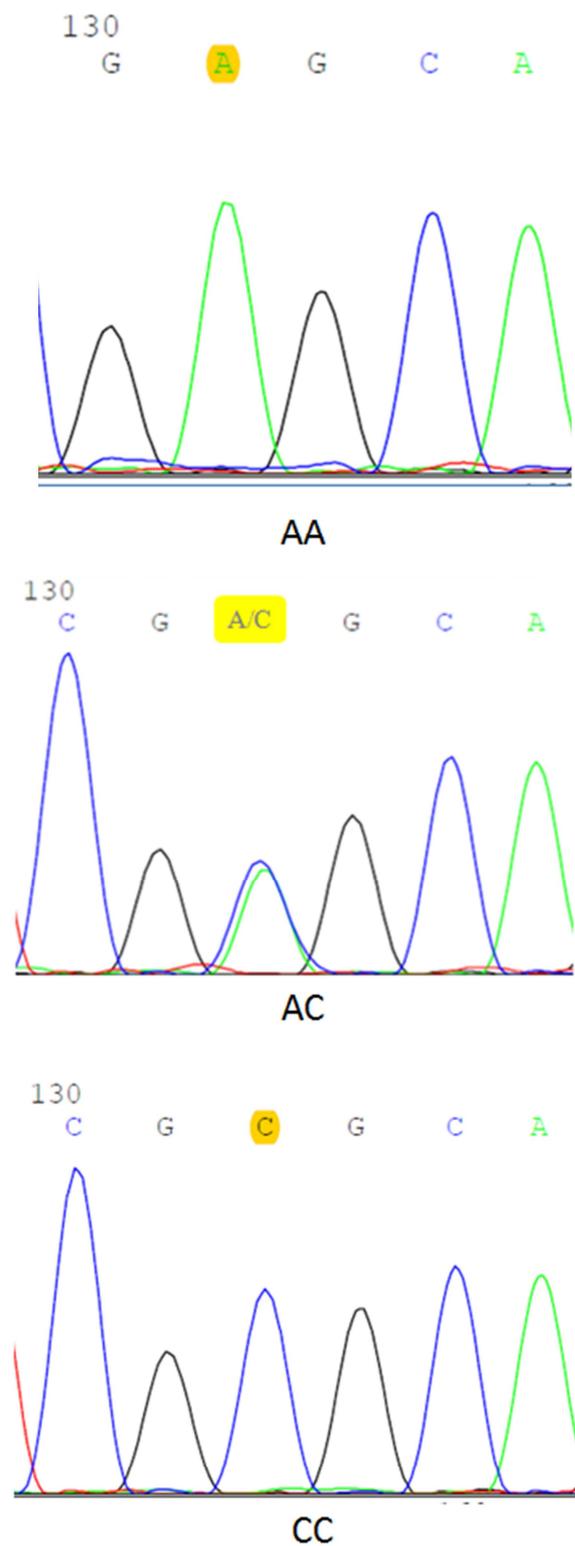


Figura 3. Cromatogramas de secuenciación obtenidos para los genotipos AA, AC y CC para el polimorfismo PHKG1 g. 8283 C>A.

Tanto para el ensayo de optimización de la cantidad de DNA a introducir en la RT-PCR como para el análisis de la incidencia de esta mutación de PHKG1 en distintas poblaciones se eligieron como controles los dos animales AA localizados y tres de cada uno de los otros dos genotipos (AC y CC).

6.1.2. Optimización de la cantidad de DNA a ensayar

Para realizar este estudio se diluyó el extracto de DNA de todos los controles empleados (2 AA, 3 AC y 3 CC) a 2 ng/μl y 10 ng/μl. Las figuras 4 y 5 muestran las gráficas de discriminación alélica obtenidas tras efectuar la RT-PCR con los controles a estas dos concentraciones.

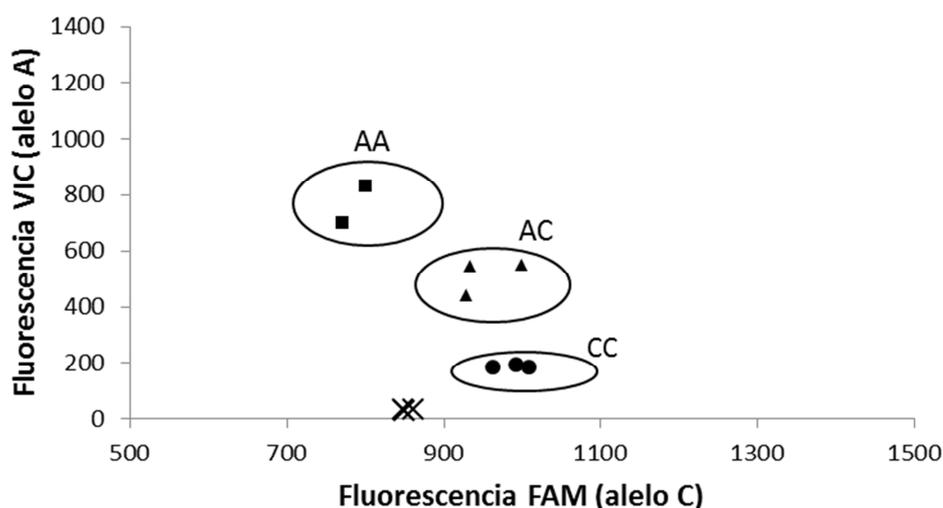


Figura 4. Diagrama de discriminación alélica por RT-PCR llevado a cabo con los controles de PHKG1 (2 AA, 3 AC y 3 CC) diluidos a una concentración de 2 ng/μl. Los cuadrados representan a los controles AA, los triángulos a los AC y los círculos a los CC. Se incluyeron también dos blancos, representados por cruces, que contenían agua en lugar de DNA.

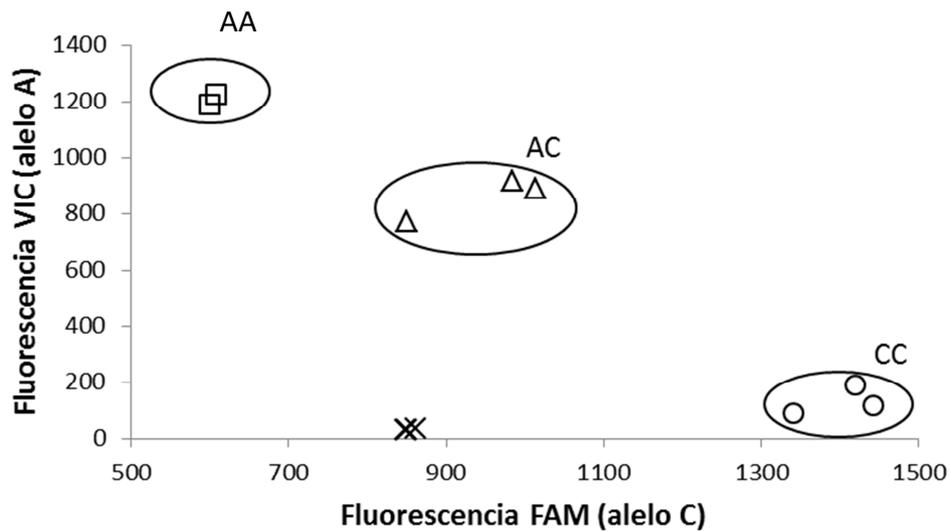


Figura 5. Diagrama de discriminación alélica por RT-PCR llevado a cabo con los controles de PHKG1 (2 AA, 3 AC y 3 CC) diluidos a una concentración de 10 ng/μl. Los cuadrados representan a los controles AA, los triángulos a los AC y los círculos a los CC. Se incluyeron también dos blancos, representados por cruces, que contenían agua en lugar de DNA.

Como puede verse en las figuras 4 y 5, en ambos casos, de las 8 muestras analizadas dos solo emitieron fluorescencia VIC, tres únicamente emitieron fluorescencia FAM y las otras tres restantes emitieron fluorescencia de ambos fluorocromos. Las dos muestras que solo emitieron fluorescencia VIC correspondieron a los dos controles AA, las tres que únicamente emitieron fluorescencia FAM correspondieron a los tres controles CC, mientras que las tres que emitieron fluorescencia de ambos fluorocromos correspondieron a los tres controles heterocigotos. Queda claro, por lo tanto, que este análisis del genotipo de PHKG1 g. 8283 C>A por RT-PCR funciona perfectamente bien con los controles diluidos tanto a 2 como a 10 ng/μl. Sin embargo, al comparar las figuras 4 y 5 puede observarse que la separación de las nubes de puntos correspondientes a los distintos genotipos es mucho más nítida con los controles diluidos a 10 ng/μl, haciendo que esta sea la concentración más adecuada para este análisis.

6.2. ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DE LA MUTACIÓN DE PHKG1 g. 8283 C>A EN DISTINTAS POBLACIONES DE DUROC

Una vez puesto a punto el procedimiento de análisis de PHKG1 g. 8283 C>A por RT-PCR, este se utilizó para analizar el polimorfismo PHKG1 en las cuatro poblaciones de Duroc indicadas en el apartado 5.1 Muestras animales. La figura 6 muestra, a modo de ejemplo, la gráfica de discriminación alélica obtenida tras la RT-PCR con las muestras de la población 1.

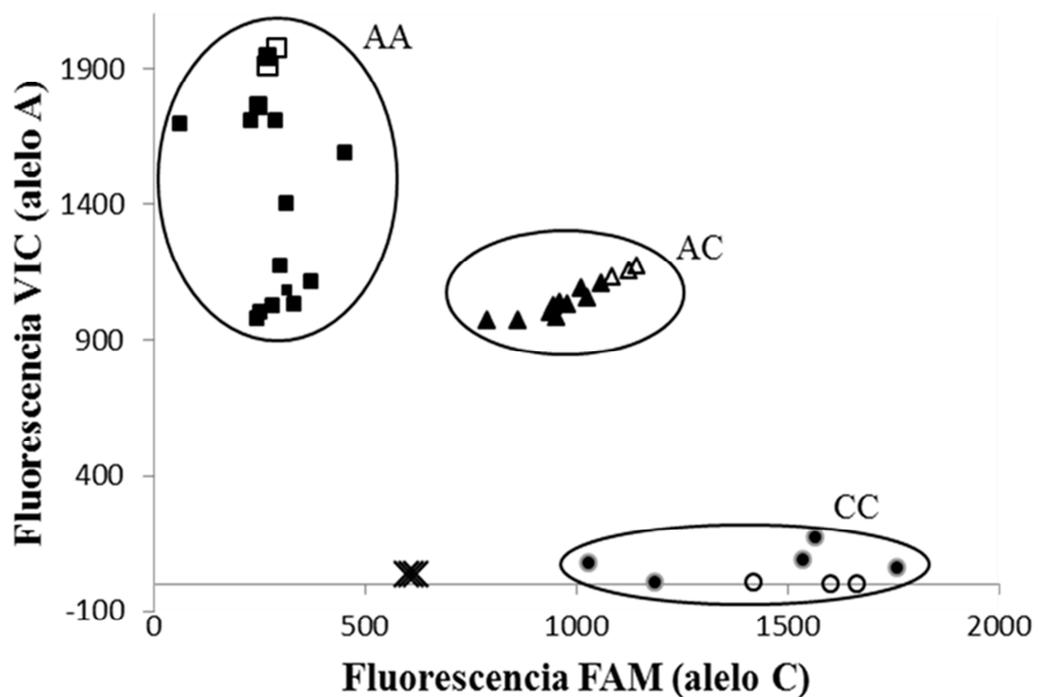


Figura 6. Diagrama de discriminación alélica por RT-PCR llevado a cabo con los animales de la población 1 (símbolos rellenos) y con los controles de PHKG1 (símbolos huecos). Se incluyeron también tres blancos, representados por cruces, que contenían agua en lugar de DNA.

Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas en estas poblaciones aparecen recogidas en la tabla 1.

| | Frecuencias genotípicas | | | Frecuencias alélicas | |
|-------------|-------------------------|-------|--------|----------------------|--------|
| | AA | AC | CC | A | C |
| Población 1 | 12/27 | 10/27 | 5/27 | 34/54 | 20/54 |
| | 44.5% | 37.0% | 18.5% | 63.0 % | 37.0% |
| Población 2 | 4/37 | 12/37 | 21/37 | 20/74 | 54/74 |
| | 10.8% | 32.4% | 56.8% | 27.0 % | 73.0% |
| Población 3 | 2/21 | 1/21 | 18/21 | 5/42 | 37/42 |
| | 9.5% | 4.8% | 85.7% | 11.9 % | 88.1% |
| Población 4 | 0/31 | 0/31 | 31/31 | 0/62 | 62/62 |
| | 0.0% | 0.0% | 100.0% | 0.0% | 100.0% |

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas de PHKG1 g. 8283 C>A en distintas poblaciones de Duroc

Como puede observarse en la tabla 1, la población con la mayor frecuencia alélica del alelo mutante, el A, es la población 1. Esta población, con un 63% de alelos A, es la población actual de machos finalizadores empleados para la producción de jamones de una empresa relevante de la DOPJT.

Le sigue, con un 27% de alelos A, la población 2, que es una población similar a la anterior pero once años más antigua. Uno de los acontecimientos reseñables durante este periodo de tiempo en la DOPJT fue la decisión de rebajar de 18 mm a 16 mm la exigencia mínima de espesor de tocino dorsal para las canales destinadas a la elaboración de jamones y paletas curadas protegidas por la Denominación de Origen (BOA, 2010). Es posible que esta modificación, que favorece a los genotipos más eficientes desde el punto de vista productivo, haya potenciado también entre la población de machos finalizadores el aumento de la frecuencia del alelo de PHKG1 asociado a un menor contenido de grasa intramuscular, el alelo A.

La siguiente población, etiquetada con el número 3, muestra una frecuencia alélica cercana al 12%. Al igual que en el caso anterior se trata de una población de la que se tomaron muestras hace once años, pero que pertenecen a una empresa fabricante de productos curados de calidad, cuyo objetivo con la elección de esta línea era incrementar la infiltración grasa.

El alelo A, sin embargo, se encuentra ausente en la población 4, que es una población antigua de cerdos Duroc no sometida a ningún tipo de selección genética desde mediados del siglo pasado.

7. DISCUSIÓN

El procedimiento de análisis del genotipo de PHKG1 g. 8283 C>A por RT-PCR puesto a punto en el presente trabajo supone un avance en la forma de analizar este polimorfismo. Preveamos que va a ser relevante para la industria cárnica, porque es un procedimiento de análisis mucho más rápido, fiable y económico que el existente hasta ahora (Ma *et al.*, 2014). Es más rápido, en primer lugar, porque implica muchas menos etapas que el método de Ma *et al.*, que es un análisis por PCR-RFLPs. Una vez extraído el DNA de las muestras y ajustada su concentración a 10 ng/μl, basta con someterlo a la RT-PCR, que dura aproximadamente una hora, para obtener el resultado. Además éste es un procedimiento que permite analizar muchas más muestras simultáneamente.

En el método de Ma *et al.*, el cuello de botella se encuentra en la etapa de electroforesis de los fragmentos generados tras el corte del producto de la PCR con el enzima de restricción. Mientras que en un termociclador de PCR en tiempo real estándar caben 96 muestras (aunque los hay incluso de 384 pocillos), los equipos de electroforesis convencionales permiten analizar como mucho 40 muestras a la vez.

El procedimiento de análisis del genotipo de PHKG1 g. 8283 C>A por RT-PCR es también un método de análisis más fiable que el de Ma *et al.*, porque implica un menor grado de manipulación de las muestras, reduciéndose así la probabilidad de errores. En este aspecto, otra ventaja adicional del análisis por RT-PCR es que en él la diferenciación entre alelos se efectúa gracias a las sondas TaqMan incluidas en la PCR y no a través del uso de enzimas de restricción que se comporten de manera diferente con el alelo salvaje que con el mutante.

En los análisis de SNPs por PCR-RFLPs una fuente de error son las digestiones incompletas del producto de PCR. En el método de Ma *et al.*, el enzima de restricción empleado es capaz de hidrolizar el alelo A, pero no el C. De este modo, si la digestión del producto de la PCR no ha sido completa un homocigoto AA puede dar lugar en la electroforesis a un patrón de bandas similar al que produciría un heterocigoto.

Otra de las ventajas del procedimiento de análisis puesto a punto en el presente trabajo es su precio. Es un análisis más barato que el de Ma *et al.*, fundamentalmente por la reducción en costes de mano de obra derivados del reducido número de etapas que incluye, así como por la posibilidad de analizar simultáneamente un elevado número de muestras.

El análisis de este polimorfismo en distintas poblaciones de cerdos Duroc reveló que las distribuciones alélicas observadas en ellas se corresponden razonablemente con la presión de selección ejercida en dicha población. Hay que apuntar aquí que la selección genética ha ido encaminada mayoritariamente, en la práctica totalidad de razas porcinas, hacia la obtención de canales magras (utilizando para ello la medición del espesor de tocino dorsal como criterio de selección), es decir, de canales desprovistas de la mayor cantidad posible de tejido adiposo subcutáneo. Dada la alta correlación genética entre el espesor de tocino dorsal y el contenido de grasa intramuscular (Sellier *et al.*, 1998), este último carácter también ha experimentado un fuerte descenso.

La población con la frecuencia alélica del alelo A más elevada es la población moderna de machos finalizadores de la DOPJT (muestras obtenidas en 2016), con un índice de transformación de 2.5-2.6. En el otro extremo se encuentra la antigua población de animales Duroc del CENSYRA de la Junta de Extremadura (muestras tomadas en 2006), que no ha sido sometida a selección genética desde hace más de 60 años y que tiene un 100% de alelos C. En una situación intermedia se encuentran la población de la DOPJT cuyas muestras fueron obtenidas hace once años y la población de una conocida empresa cárnica orientada a la producción de productos curados de calidad, cuyas muestras también fueron tomadas hace once años.

Estos resultados indican de manera indirecta que probablemente el marcador tenga, además de un efecto sobre el pH₂₄, efectos también sobre la infiltración grasa, como de hecho han descrito Ma *et al.* (2014) y como hemos comprobado en nuestro laboratorio en una población de la DOPJT (Burgos *et al.*, datos sin publicar). El mecanismo por el que se produce este fenómeno es desconocido aunque resulta llamativo que las mutaciones, como la de Fuji *et al.* (1991) y la de Ma *et al.* (2014), que afectan a la glucólisis postmortem y al pH intramuscular tengan efectos considerables sobre la infiltración de grasa en el músculo y en la canal.

Como existe cierta variabilidad genética para este marcador en la población actual de cerdos de la DOPJT éste puede constituir un complemento en la selección del ganado en esta DOP. La circunstancia de que la DOPJT planea incorporar la carne como producto protegido y el hecho que el pH₂₄, que es el carácter inicialmente afectado por esta mutación, sea muy relevante para la calidad de la misma nos permite sugerir su utilización práctica en el futuro inmediato, siempre y cuando sus efectos sobre otros caracteres, especialmente los productivos, no se vean afectados negativamente.

8. CONCLUSIONES

- 1) Hemos desarrollado un test de RT-PCR para el análisis de una mutación en el gen PHKG1 que mejora el procedimiento analítico preexistente.
- 2) El análisis de esta mutación en diversas poblaciones de cerdos Duroc se correlaciona con la implicación de la misma en la determinación del contenido de grasa intramuscular.
- 3) Dados los efectos sobre el pH₂₄ y sobre el contenido de grasa intramuscular de este marcador, creemos que puede ser muy interesante para, entre otros, la DOPJT.

9. CONCLUSIONS

- 1) We have developed a RT-PCR test for the analysis of a mutation in the PHKG1 gene that improves the preexisting analytical procedure.
- 2) The analysis of this mutation in several populations of Duroc pigs correlates with its implication in the determination of intramuscular fat content.
- 3) Based on the effects on pH₂₄ and on the intramuscular fat content of this marker, we believe that it may be very interesting for the DOPJT.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Boletín Oficial de Aragón (BOA) (2010). ANUNCIO de la Dirección General de Fomento Agroalimentario, por el que se da publicidad a la solicitud de modificación del pliego de condiciones de la denominación de origen protegida «Jamón de Teruel». 247, 28912- 28921.

Burgos, C., Carrodegua, J. A., Moreno, C., Altarriba, J., Tarrafeta, L., Barcelona, J. A., López-Buesa, P. (2006). Allelic incidence in several pig breeds of a missense variant of pig melanocortin-4 receptor (MC4R) gene associated with carcass and productive traits; its relation to IGF2 genotype. *Meat Science*, **73**, 144-150.

Carrodegua, J. A., Burgos, C., Moreno, C., Sánchez, A. C., Ventanas, S., Tarrafeta, L., Barcelona, J.A., López, M.O., Oria, R., López-Buesa, P. (2005). Incidence in diverse pig populations of an IGF2 mutation with potential influence on meat quality and quantity. An assay based on real time PCR (RT-PCR). *Meat Science*, **71**, 577-582.

Ciobanu D., Bastiaansen J., Massoud M., Helm J., Woollard, J., Plastow G., Rothschild M. (2001) Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated γ 3-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. *Genetics*, **159**, 1151–1162.

Enfält, A.C., Lundström, K., Hansson, I., Johansen, S. & Nyström, P. E. (1997). Comparison of non-carriers and heterozygous carriers of the RN- allele for carcass composition, muscle distribution and technological meat quality in Hampshire-sired pigs. *Livestock Production Science*, **47**, 221–229.

Fujii, J., Otsu, K., Zorzat, F., de León, S., Khanna, V. K., Weiler, J. E., et al. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, **253**, 448-451.

Galve, A., Burgos, C., Varona, L., Carrodegua, J.A. & Lopez-Buesa, P. (2013). Allelic frequencies of PRKAG3 in several pig breeds and its technological consequences on a Duroc 9 Landrace-Large White cross. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **130**, 382-93.

- Joo, S.T., Kauffman, R.G., Kim, B.C., & Park, G.B. (1999). The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *Meat Science*, **52**, 291–297.
- Latorre, P., Burgos, C., Hidalgo, J., Varona, L., Carrodeguas, J.A., López-Buesa, P. (2016). c.A2456C-substitution in Pck1 changes the enzyme kinetic and functional properties modifying fat distribution in pigs. *Sci. Rep.*, **6**, 19617.
- Lundström, K., Andersson, A., & Hansson, I. (1996). Effect of the RN gene on technological and sensory meat quality in crossbred pigs with Hampshire as terminal sire. *Meat Science*, **42**, 145–153.
- Ma, J., Yang, J., Zhou, L., Ren, J., Liu, X., & Zhang, H. (2014). A splice mutation in the PHKG1 gene causes high glycogen content and low meat quality in pig skeletal muscle. *PLoS Genet*, **10**, e1004710.
- Milan, D., Jeon, J.T., Looft, C., Amarger, V., Robic, A., Thelander, M., et al. (2000). A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*, **288**, 1248–1251.
- Nemours Biomolecular Core Laboratory. [online] Disponible en: <http://nemoursresearch.org/cores/bcl/techniques.html> [Último acceso: 11- 05-2017].
- Sellier, P. in *The Genetics of the Pig* (eds. Rothschild, M. F. & Ruvinsky, A.) Ch. 15, 463-510 (CAB International Publishing, 1998).
- Venien-Bryan, C., Jonic, S., Skamnaki, V., Brown, N., Bischler, N., Oikonomakos, N. G., Boisset, N., and Johnson, L. N. (2009). The structure of phosphorylase kinase holoenzyme at 9.9 angstroms resolution and location of the catalytic subunit and the substrate glycogen phosphorylase. *Structure* **17**, 117-127.
- Warriss, P.D. (1990) The handling of cattle pre-slaughter and its effects on carcass and meat quality. *Applied Animal Behaviour Science*. **28**, 171-186.
- Warriss, P.D. *Ciencia de la carne*. (ed. Acribia) Ch. 5, 114-115 (2003)

APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE

La realización del Trabajo Fin de Grado me ha permitido adquirir una serie de competencias de gran utilidad para mi futura vida profesional, que únicamente con el resto de asignaturas no hubiera sido posible. Dichos conocimientos están relacionados con:

- El aprendizaje y aplicación de diversas técnicas moleculares. Algunas de estas técnicas las había estudiado de manera teórica en el Grado, pero no ha sido hasta este momento cuando las he podido poner en práctica. Además, he manejado todos los equipos necesarios para poder llevarlas a cabo.
- El trabajo autónomo en un laboratorio científico. Poco a poco he ido adquiriendo autonomía ya que he tenido que realizar los ensayos sin otros compañeros, como había sido hasta ahora en las prácticas de cada asignatura. El hecho de estar sola en el laboratorio me ha llevado a tomar decisiones ante problemas que han ido surgiendo.
- El trabajo en equipo. A pesar de realizar mi tarea de manera autónoma, he contado con la ayuda de mis directores para la resolución de dudas y la redacción de la memoria.
- La búsqueda y gestión de información científica en inglés como herramienta para el desarrollo del Trabajo Fin de Grado. Esto me ha permitido adquirir agilidad en la comprensión de textos científicos, así como en su redacción.
- La realización de informes científico-técnicos. He aprendido cuál es la estructura de un informe científico-técnico, la manera en que este ha de ser escrito, así como la interpretación de unos resultados y la obtención de conclusiones.