

Como resultado más importante cabe señalar que los criterios de calificación de los expertos son muy diferentes dependiendo de si se trata de canales ligeras o pesadas. En consecuencia, se precisa redefinir la normativa SEUROP; esta me-

todología fue diseñada para canales pesadas y no resulta aplicable, en la práctica, para las canales ligeras. En los países latinos de la UE, donde el mercado prefiere canales ligeras, la calificación no está resultando ni fiable ni uniforme.

PC REC01-01. Diseño de un protocolo diagnóstico de los alelos responsables de la variación del color de la capa en ganado bovino, mediante estrategias de gen candidato

Investigador responsable

Félix M^a Goyache Goñi

Organismo

SERIDA

Equipo investigador

Isabel Álvarez Fernández
Luis J. Royo Martín

SERIDA
"

Equipo técnico

Iván Fernández Suárez

SERIDA

Entidades participantes

DISMED S.L.

Objetivos

- Identificar las series alélicas del *locus* Extensión que determinan la variación del color de la capa compacta en ganado bovino para el desarrollo de un protocolo diagnóstico de polimorfismos.

Resultados

Las variantes alélicas encontradas fueron:

a) Alelo **e (310delG)**: pérdida de una Guanina (G) en la posición 310, que da lugar a un cambio de la pauta de lectura de la proteína, lo que origina la síntesis de una proteína diferente a partir del aminoácido 310.

b) Alelo **E^P (L99P)**: sustitución de una Timina (T) por una Citosina (C) en el alelo mutado, que provoca el cambio aminoacídico de Leucina a Prolina (L→P).

c) Alelo salvaje **E⁺**: consta de 954 pb (ATG-TGA); da lugar a una pauta de lectura abierta, que traducida, forma una proteína de 318 aminoácidos con las características específicas de los miembros de la familia de receptores de la melanocortina.

d) Alelo **E¹ (ARGI218-219ins)**: inserción de 12 pb, entre los nucleótidos 654 y 655, que al traducir da lugar a una proteína idéntica al alelo salvaje, excepto para una inserción de cuatro aminoácidos (Alanina, Arginina, Glicina e Iso-leucina) en fase, en la posición 218.

e) Alelo **E² (R223W)**: sustitución en la posición 667 de una Citosina (C) por una Timina (T) en el alelo mutado, que origina un cambio aminoacídico de Arginina a Triptófano (R→W) en la posición 223 de la proteína.



El diagnóstico se lleva a cabo en dos etapas sucesivas:

1) Diagnóstico negro-rojo: se realiza en las variedades E^D y e que solo permiten la expresión de los colores negro dominante y rojo recesivo. Se trata de un protocolo diagnóstico basado en la técnica de PCR fluorescente alelo específica. El procedimiento consiste en una PCR con un oligonucleótido marcado con el fluorescente Cy5 en 5' (nt 486-506) y dos oligonucleótidos alelo específicos no marcados (nucleótido variable en posición 3'), para las mutaciones correspondientes a los alelos E^D (296 C/T) y e (310-1GG/ 311-2 GT) (Tabla 1). El patrón obtenido se detalla en la figura 1.

2) Diagnóstico castaño: Aquellos animales que no presentan los dos alelos con las varie-

Tabla 1.—Oligonucleótidos utilizados en la primera etapa del protocolo diagnóstico diseñado para la identificación de variantes alélicas del gen MC1R (Extension)

| Oligonucleótido | Secuencia (5'-3') |
|-----------------|--------------------------|
| negro-rojo-dn | CAGATGGCCGCAATGATCCTC |
| NO-rojo-up | AGTCATGCGTGCTGGAGGCCGG |
| Rojo-up | ATGCTGCTGCTGGAGGCCGT |
| NO-negro-up | CGTGCTGGAGACGGCAGTCATGCT |
| Negro-up | CTGGAGACGGCAGTCATGCC |

dades E^D o e , son sometidos a la segunda etapa de diagnóstico para la identificación de las variantes alélicas que permiten la expresión

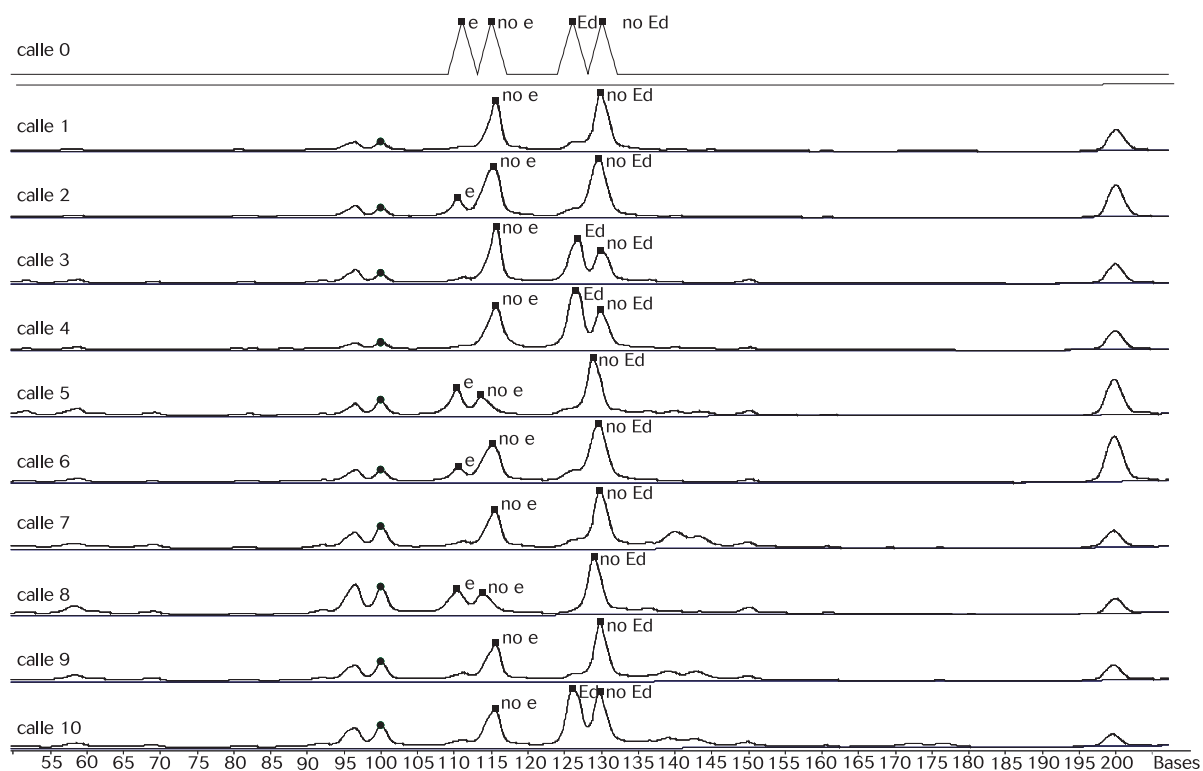


Figura 1.—Electroferograma correspondiente al diagnóstico de los alelos E^D , E^+ y e . En la calle 0 se encuentra la línea de referencia de las variantes, y en las calles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, respectivamente, ejemplos de los resultados obtenidos con los siguientes genotipos:

E^+/E^+ , e/E^+ , E^+/E^D , E^+/E^D , e/E^+ , e/E^+ , E^+/E^+ , e/E^+ , E^+/E^+ , E^+/E^D





del patrón de color de tipo salvaje (E^+ , E^1 y E^2). Este protocolo diagnóstico está basado en la PCR-RFLP fluorescente. El procedimiento que se lleva a cabo es el siguiente: se realiza una PCR fluorescente de un fragmento de 300 pb (472-772) utilizando los oligonucleótidos detallados en la tabla 2. La mitad de la PCR se digiere con el enzima HpaII. El patrón obtenido se detalla en la figura 2.

Tabla 2.—Oligonucleótidos utilizados en la segunda etapa del protocolo diagnóstico diseñado para la identificación de variantes alélicas del gen MC1R (Extension)

| Oligonucleótido | Secuencia (5'-3') |
|-----------------|---------------------------|
| Castaño-up | CTGCCCCGAGCGTGGAGGATCATTG |
| Castaño-dn | AGCAGAGGAAGAAGACGCCAGCAG |

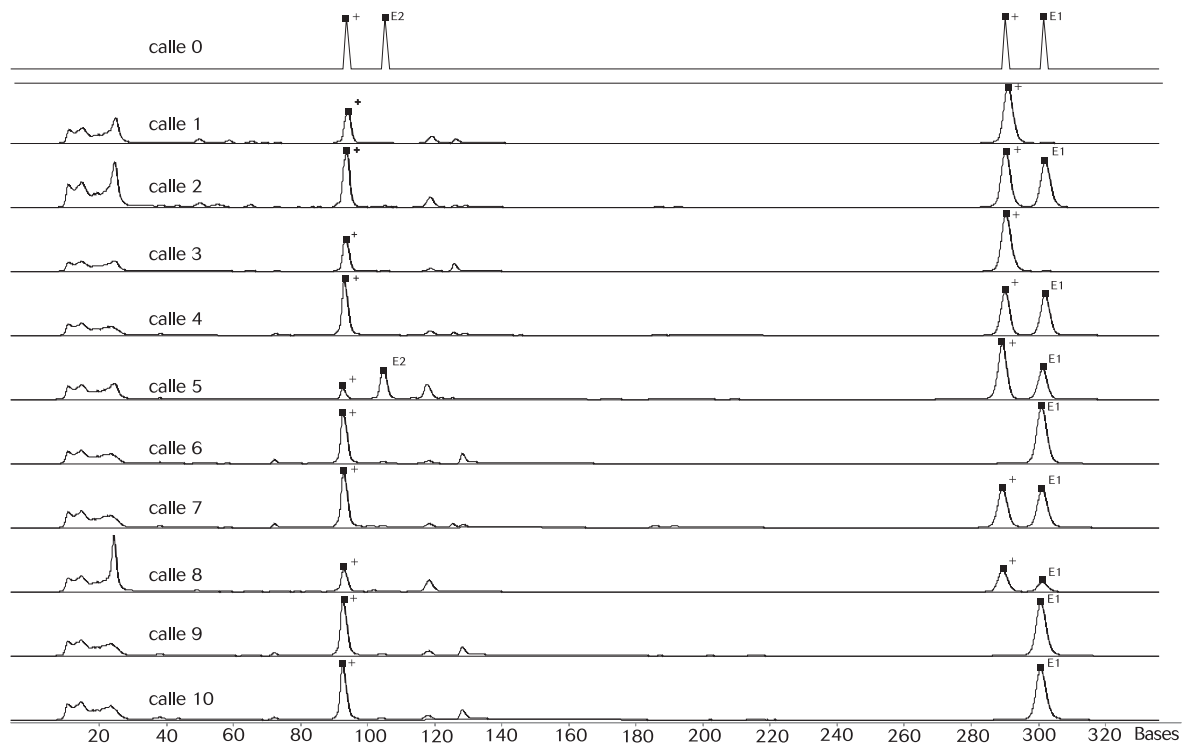


Figura 2.—Electroferograma correspondiente al diagnóstico de los alelos E^+ , E^1 y E^2 . En la calle 0 se encuentra la línea de referencia de las variantes y en las calles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, respectivamente, ejemplos de los resultados obtenidos con los siguientes genotipos: E^+/E^+ , E^+/E^1 , E^+/E^+ , E^+/E^1 , E^2/E^1 , E^+/E^1 , E^+/E^1 , E^+/E^1 , E^+/E^1 , E^+/E^1 , y E^+/E^1