

DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DE EFECTO MAYOR GDF9 EN REBAÑOS DE OVEJAS CORRIEDALE EN LA REGIÓN DE AYSÉN, CHILE

DETECTION OF POLYMORPHISMS MAJOR GENE GDF9 IN CORRIEDALE FLOCKS IN AYSÉN REGION, CHILE

Jorge Vera¹, Silvana Bravo^{2*}, Erwin Paz², y Néstor Sepúlveda²

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera, Av. Francisco Salazar 01145, Temuco, Chile.

² Laboratorio de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera, Av. Francisco Salazar 01145, Temuco, Chile.

* Autor para correspondencia E-mail: silvana.bravo@ufrontera.cl.

RESUMEN

En varias razas ovinas alrededor del mundo se han identificado polimorfismos en genes que tienen un efecto mayor sobre la tasa de ovulación. Diferentes polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en el gen del factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9) provocan incrementos de la prolificidad y esterilidad funcional en ovinos. El objetivo de este estudio fue identificar la presencia de los polimorfismos *FecG¹* (G1) y *FecG^H* (G8) en ovinos de la raza Corriedale, pertenecientes a la Región de Aysén, Chile. Para ello se obtuvieron 92 muestras de sangre de ovejas de cuatro rebaños comerciales, que se analizaron mediante la técnica PCR-RFLP. Se detectó sólo la presencia del polimorfismo *FecG¹* en las muestras analizadas. Las frecuencias genotípicas fueron de 0,73 (genotipo +/+), 0,27 (genotipo +/-), 0 (genotipo -/-), y las frecuencias alélicas 0,86 (alelo +) y 0,14 (alelo -), respectivamente. Este es el primer reporte de polimorfismos asociados a prolificidad en ovinos Corriedale en Chile, raza de doble propósito de gran existencia en la zona Austral del país, donde su rol como raza materna en sistemas intensivos de producción de carne se trabaja en conjunto a la selección de líneas prolíficas dentro de la raza, buscando un aumento en el porcentaje de señalada de corderos en sistemas de cruzamientos terminales.

Palabras clave: PCR-RFLP, prolificidad, SNP, selección asistida por marcadores.

ABSTRACT

In several sheep breeds, polymorphisms have been identified in genes that present major effects on ovulation rate. Different single nucleotide polymorphisms (SNP) in growth differentiation factor 9 gene (GDF9) can cause increased prolificacy and infertility in sheep. The aim of this study was to identify the presence of the *FecG1* (G1) and *FeG^H* (G8) polymorphisms in Corriedale sheep of the Region of Aysén, Chile. Ninety-two blood samples from four commercial sheep flocks were collected and analyzed by PCR-RFLP techniques. G1 was detected in the samples analyzed. Genotype frequencies were 0.73 (genotype +/+), 0.27 (genotype +/-), 0 (genotype -/-), while alleles frequencies were 0.86 (allele +) and 0.14 (allele -), respectively. This is the first report of polymorphisms associated with prolificacy in Corriedale sheep in Chile, which corresponds to a dual-purpose breed of great importance in the Austral zone of the country; its role as a maternal breed in intensive meat production systems works together with the selection of highly prolific

lines within the breed in order to increase lamb marking percentage in terminal crossbreeding systems.

Key words: PCR-RFLP, prolificacy, SNP, marker assisted selection.

INTRODUCCIÓN

En los rebaños ovinos destinados a la producción de lana y carne, resulta de gran importancia la cantidad de crías que se obtiene en cada parición, refiriéndonos de esta manera al concepto de prolificidad. La raza Corriedale es una raza de doble propósito, destinada a la producción de lana y carne. Respecto a la prolificidad obtenida por esta raza en sistemas extensivos en Chile, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIA Kampenaike ubicado en la Región de Magallanes, reportó que ovejas Corriedale presentan una prolificidad de 1,12 corderos por parto (Mujica, 2004). La raza se adapta bien a las condiciones extensivas y climáticas desfavorables imperantes en la zona Austral de Chile. Además es la raza de mayor predominio en el país, con un 63% a nivel nacional (García, 2000; Mujica, 2004).

La prolificidad es un carácter de baja heredabilidad y se ve influenciada por factores ambientales y genéticos (Ponz et al., 2006). Dentro de los factores genéticos, son de gran importancia los relacionados con la raza y la selección de animales más eficientes (García, 2000). La selección de individuos permite conservar las características que definen a una raza; de acuerdo a esto, se han realizado estudios cuyo objetivo es detectar la presencia de genes que tengan un efecto en la prolificidad de un rebaño (Notter y Cockett, 2005; Laviña, 2012).

Los genes de efecto mayor más importantes asociados a prolificidad son: BMPR1B, BMP15 y GDF9, los cuales pertenecen a la misma vía metabólica de control de la ovulación (Bodin, 2006). En los genes BMP15 y GDF9 se produce esterilidad en hembras homocigotas, a causa de un fallo en el desarrollo normal de los folículos ováricos, a diferencia de las hembras heterocigotas, las cuales presentan una mayor tasa de ovulación (Hanrahan et al., 2004). El gen GDF9 pertenece a la familia de los TGF- β (Factor de crecimiento transformante beta) y está localizado en el cromosoma ovino 5. GDF9 es esencial para la foliculogénesis, codifica la proteína encargada del desarrollo folicular del ovocito, siendo fundamental en la fertilidad de la especie ovina (Hanrahan et al., 2004; Lahoz et al., 2010). En el gen GDF9 se han descubierto ocho polimorfismos (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8), de los cuales tres no causan cambios de

aminoácidos en la proteína (G2, G3 y G5). De los cinco polimorfismos restantes, G8 se destaca por producir cambios relacionados con esterilidad y aumento en la tasa ovulatoria (Hanrahan et al., 2004). Estas mutaciones difieren según sus características alélicas; en estado heterocigoto la mutación de este gen proporciona un aumento en la tasa de ovulación (+1,5 óvulos), pero en homocigosis se presenta una esterilidad funcional (Bodin, 2006). Los polimorfismos del gen GDF9 han sido encontrados y descritos por primera vez en las razas Belclare y Cambridge (Hanrahan et al., 2004).

Mediante la selección asistida por marcadores (MAS) se pueden identificar genes con funciones conocidas. Esto permite detectar la transmisión de un locus de una generación a otra, utilizándose en programas de selección de individuos portadores en explotaciones comerciales, dedicadas a la producción animal (López-Zavala et al., 2007).

El objetivo de este estudio fue identificar la presencia de los polimorfismos *FecG*¹ (G1) y *FecG*^H (G8) del gen GDF9 en ovejas de raza Corriedale, pertenecientes a la Región de Aysén, Chile, a través de la técnica PCR-RFLP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se analizaron 92 muestras de sangre, pertenecientes a dos rebaños de ovejas de raza Corriedale de la Asociación de Criadores de Corriedale, Aysén, y dos rebaños comerciales, ubicados en la comuna de Coyhaique, Región de Aysén, Chile (45°34'12" S y 72°03'58" O). Las muestras de sangre correspondían aproximadamente a un 10% del total de hembras de cada rebaño, que se obtuvieron por punción de la vena yugular por medio del sistema de extracción BD (Vacutainer®) K2 EDTA 10,8 mg (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Las muestras fueron transportadas en cadena de frío, hasta el Laboratorio de Producción Animal, de la Universidad de La Frontera, donde se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

Análisis PCR-RFLP

La extracción de ADN se realizó por medio del kit comercial Axyprep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (AxygenSci. Inc., California, USA). El DNA extraído se cuantificó por medio de un espectrofotómetro (Halo DNAmaster, Dynamica

Scientific Ltd., Kowloon, Hong Kong), para después igualar las concentraciones de cada muestra a $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$. La PCR fue realizada con partidores específicos para la variante *FecG^I* (F: 5' -GAAGACTGGTATGGGGAAATG-3' y R: 5'-CCAATCTGCTCTACACACCT-3') y para *FecG^H* (F: 5'-CTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAAC-3' y R: 5' ATG-GATGATGTTCTGCACCATGGTGTGAACCTGA-3') descritos por Hanrahan et al. (2004). La mezcla de PCR contenía $15,75 \mu\text{l}$ de dH_2O ; $2,5 \mu\text{l}$ de buffer de reacción Paq5000TM; $0,5 \mu\text{l}$ de dNPTs; $1 \mu\text{l}$ de partidores ($0,5 \mu\text{l}$ de forward y $0,5 \mu\text{l}$ de reverse); $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ de DNA; $0,25 \mu\text{l}$ de enzima Paq5000TM DNA polimerasa (Agilent Technologies, California, USA), para formar un volumen total de $25 \mu\text{l}$. Las muestras se realizaron en un termociclador (Multigene Gradient, Labnet International Inc., New Jersey, USA). Estas fueron sometidas a una denaturación inicial de 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de denaturación a 95°C por 20 segundos, hibridación a 59°C por 20 segundos para el SNP *FecG^I* y 53°C por 20 segundos para el SNP *FecG^H*, extensión de 72°C por 30 segundos, seguido de una extensión final a 72°C por 5 minutos. El producto de PCR fue visualizado en gel de agarosa al 1% (p/v) mediante un transiluminador (UVITEC, UVIdoc, Cambridge, UK) bajo luz UV, teñido con GelRed (Biotium Inc., California, USA). Para la realización del RFLP se utilizó la enzima de restricción *HhaI* para la mutación *FecG^I* y *Ddel* para la mutación *FecG^H* (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA). Se consideró un volumen total de $20 \mu\text{l}$, los cuales contenían $0,3 \mu\text{l}$ de su respectiva enzima; $2 \mu\text{l}$ de Buffer M (específico de la enzima); $15 \mu\text{l}$ del producto de PCR y $2,7 \mu\text{l}$ de dH_2O . Cada reacción fue incubada por 3 horas a 37°C , posteriormente los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3% (p/v) y teñidos con GelRed, productos que fueron visualizados en un transiluminador bajo luz UV.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado mediante el software Genepop versión 3.4 (Raymond y Rousset, 1995) para determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos *FecG^I* y *FecG^H* en las ovejas evaluadas.

RESULTADOS Y DISCUSION

La técnica PCR-RFLP permite identificar SNP ya descritos en una secuencia de ADN que es reconocida y cortada por una enzima de restricción específica para cada SNP. Este método ofrece resultados rápidos y precisos, el cual ha sido

utilizado en investigaciones similares (Ghaffari et al., 2009; Silva et al., 2010; Moradband et al., 2011; Paz et al., 2014a).

La mutación *FecG^I* es un polimorfismo que se encuentra en el exón 1 del gen GDF-9, donde se produce un cambio de nucleótidos, específicamente guanina (G) por adenina (A). El producto de la digestión de PCR-RFLP permite reconocer los distintos genotipos, mediante la utilización de la enzima de restricción *HhaI*, los cuales se identifican de acuerdo a los sitios de restricción que posean. Cuando se observa tres fragmentos (52 , 156 y 254 pb) se denominan como $+/+$, en el caso de observar cuatro fragmentos (52 , 156 , 254 , y 410 pb), se habla de individuos $+/-$ y cuando se observan dos fragmentos (52 y 410 pb), identificamos a los individuos mutados $-/-$ (Barzegari et al., 2010; Moradband et al., 2011).

La mutación G8 conocida como *FecG^H* (mayor fertilidad) se encuentra en el exón 2 de gen GDF-9, la presencia de la mutación produce un cambio de los nucleótidos citosina (C) por timina (T). Para detectar esta mutación se utiliza la enzima de restricción *Ddel*, la cual reconoce un sitio de restricción cuando la mutación no está presente, generándose dos fragmentos (31 y 108 pb). En nuestro estudio solo se pudo identificar el genotipo $+/+$ (Hanrahan et al., 2004).

De acuerdo a los resultados de PCR-RFLP (Fig. 1), se identificó que la frecuencia genotípica para la mutación G1 fue de $0,73$ para $+/+$; $0,27$ para $+/-$ y $0,0$ para $-/-$ (Tabla 1), mientras que la frecuencia alélica fue de $0,86$ para $+$ y $0,14$ para $-$. De acuerdo con Hanrahan et al. (2004), el polimorfismo *FecG^I* produce una sustitución de arginina por histidina, con un residuo de 87 aminoácidos. Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados en la raza Baluchi, donde el incremento de prolificidad se daba solo en animales heterocigotos para la mutación, con frecuencias genotípicas de $0,72$ ($+/+$), $0,20$ ($+/-$) y $0,08$ ($-/-$), siendo el primer reporte que demuestra la asociación de la mutación *FecG^I* con la prolificidad en ovejas (Moradband et al., 2011). Javanmard et al. (2011) obtuvieron resultados comparables en la raza Mehraban, con frecuencias genotípicas de $0,64$ ($+/+$), $0,36$ ($+/-$) y $0,0$ ($-/-$). En Chile, Paz et al. (2014b) reportaron la mutación *FecG^I* en las razas Araucana, Chilota y Austral, obteniendo frecuencia genotípicas promedio para las tres razas de $0,81$ ($+/+$), $0,19$ ($+/-$) y $0,0$ ($-/-$), resultados que permiten destacar la alta frecuencia del genotipo $+/-$ en la población de ovejas Corriedale, respecto a otras razas presentes en Chile.

El SNP *FecG^H* resultó monomórfico para la población de ovejas Corriedale evaluadas, resultados que coinciden con otros estudios en ovinos (Moradband et al., 2011; Paz et al., 2014a)

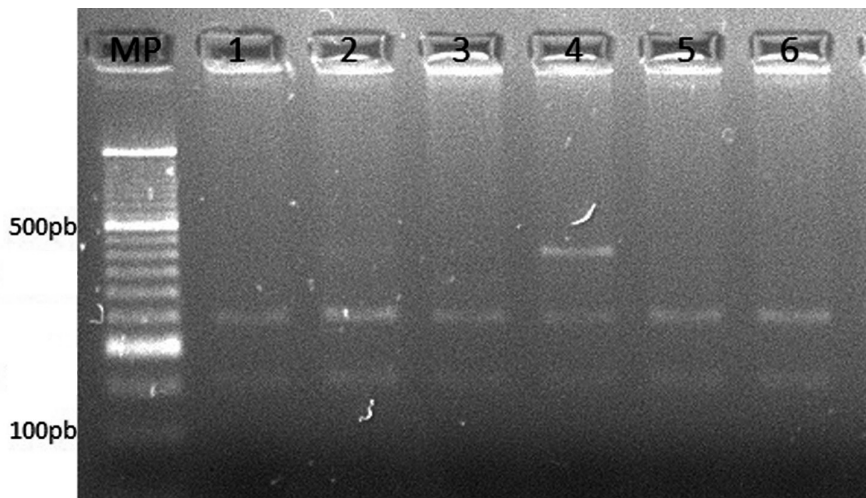


Fig. 1. PCR-RFLP para la mutación *FecG¹* en ovejas Corriedale. Líneas 1-3, 5 y 6: genotipo homocigoto +/+; Línea 4: genotipo heterocigoto +/-; MP: marcador de peso molecular de 50 pb.

Fig. 1. PCR-RFLP for *FecG¹* mutation in Corriedale sheep. Lanes 1-3, 5 and 6: homozygous genotype +/+; Lane 4: heterozygous genotype +/-; MP: molecular weight marker 50 bp

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP *FecG¹* y *FecG^H* en ovejas Corriedale.

Table 1. Genotypic and allelic frequencies of SNP *FecG¹* and *FecG^H* in Corriedale sheep.

SNP	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas	
	+/+	+/-	-/-	+	-
<i>FecG¹</i> (G1)	0,73	0,27	0	0,86	0,14
<i>FecG^H</i> (G8)	1	0	0	1	0

donde las muestras analizadas no presentaron esta mutación, encontrando solo el genotipo homocigoto (+/+). (Fig. 2)

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio indican que solo la mutación *FecG¹* del gen GDF-9 está presente en ovinos de la raza Corriedale de la Región de Aysén, por lo que se propone realizar estudios que verifiquen la asociación de esta mutación con la prolificidad y tasa ovulatoria de esta raza. Por otra parte, este primer reporte permite generar herramientas que podrían ser utilizadas en programas de selección asistida por marcadores moleculares para mejorar prolificidad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Héctor Cantín Bus, presidente de Asociación de Criadores Corriedale de Aysén, y a los propietarios de los rebaños muestreados, señores Marcos Sandoval, Hernando Muñoz y Cirilo Peede. Además, a los proyectos Fondecyt Regular 1120474 y DIUFRO DI11-0021.

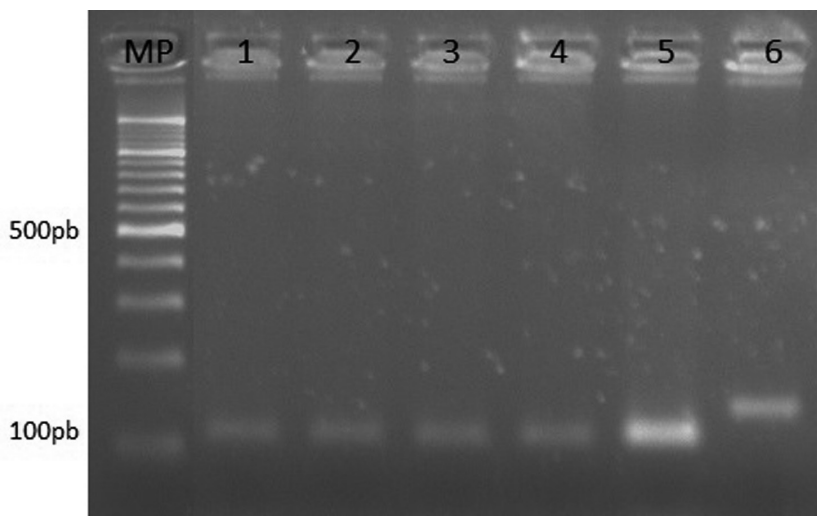


Fig. 2. PCR-RFLP para la mutación *FecG^H* en ovejas Corriedale. Líneas 1 a 5: genotipo homocigoto (+/+); Línea 6: control negativo de la digestión; MP: marcador de peso molecular de 100 pb.

Fig. 2. PCR-RFLP for *FecG^H* mutation in Corriedale sheep. Lanes 1 to 5: homozygote (+ / +); Lane 6: negative control; MP: molecular weight marker 100 bp.

LITERATURA CITADA

- Barzegari, A., S. Atashpaz, K. Ghabili, Z. Nemati, M. Rustaei, and R. Azarbaijani. 2010. Polymorphisms in GDF9 and BMP15 associated with fertility and ovulation rate in Moghani and Ghezel sheep in Iran. *Reprod. Dom. Anim.* 45(4):666-669.
- Bodin, L. 2006. Genes mayores en ganado ovino, implicaciones en la reproducción. *Pequeños Rumiantes* 7(3):38-45.
- Ghaffari, M., A. Nejati-Javaremi, and G. Rahimi-Mianji. 2009. Lack of polymorphism in the oocyte derived growth factor (GDF9) gene in the Shal breed of sheep. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 39(4):355-360.
- García, G. 2000. Como debe ser el Corriedale. *Publicación Técnico Ganadera* N° 26. Disponible en <http://www2.agronomia.uchile.cl/extension/publicaciondeextension/26/corriedale.htm> (Consulta 14 Marzo de 2014).
- Hanrahan, J.P., S.M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G.H. Davis, R. Powell, and S. Galloway. 2004. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol. Reprod.* 70(4):900-909.
- Javanmard, A., N. Azadzadeh, and A.K. Esmailzadeh. 2011. Mutations in bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation Factor 9 genes are associated with increased litter size in fat-tailed sheep breeds. *Vet. Res. Commun.* 35:157-167.
- Lahoz, B., J.L. Alabart, J. Folch, J.H. Calvo, A. Martínez-Royo, E. Fantova, y Equipo de Veterinarios de UPRA-Grupo Pastores. 2010. Genes mayores para el incremento de la prolificidad. *Portal Veterinario Albéitar* 136:20-21.
- Laviña, A., G. 2012. Identificación de la delección *FecX^R* del gen ovino BMP15 en la raza Aragonesa: su implicación en la mejora genética de la prolificidad y su difusión en la cabaña ganadera. Tesis doctoral. Facultad de Farmacología y Fisiología, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.
- López-Zavala, R., H. Cano-Camacho, O. Chassin-Noria, y M.G. Zavala-Páramo. 2007. Selección asistida por marcadores genéticos moleculares en especies animales de interés pecuario. *Ciencia Nicolaita (México)* 46:43-56.
- Moradband, F., G. Rahimi, and M. Gholizadeh. 2011. Association of polymorphisms in fecundity genes of GDF9, BMP15 and BMP15-1B with litter size in Iranian Baluchi sheep. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24(9):1179-1183.
- Mujica, F. 2004. Razas ovinas y caprinas en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias. p. 30-32. Raza Corriedale. *Boletín INIA* N° 127. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Osorno, Chile.

- Notter, D.R., and N. Cockett. 2005. Opportunities for detection and use of QTL influencing seasonal reproduction in sheep: a review. *Genet. Sel. Evol.* 37(1):39-53.
- Paz, E., J. Quiñones, S. Bravo, E. Rodero, A. Gonzalez, y N. Sepúlveda. 2014a. Identificación de los polimorfismos G1 y G8 en el gen GDF9 en ovinos criollos Araucanos. *Arch. Med. Vet.* 46(2):327-331.
- Paz, E., J. Quiñones, S. Bravo, E., H. Montaldo, y N. Sepúlveda. 2014b. Genotyping of BMPR1B, BMP15 and GDF9 genes in Chilean sheep breeds and association with prolificacy. *Animal Genetics*. doi: 10.1111/age.12254.
- Ponz, R., G. G. Yagüe, y J. Altarriba. 2006. ¿Reposición por parto doble o mediante evaluación genética? *Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia* 31:163-166.
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995. Genepop (versión 1.2): Population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86(3):248-249.
- Silva, B.D., E.A. Castro, C.J. Souza, S.R. Paiva, R. Sartori, M.M. Franco, H.C. Azevedo, T.A. Silva, A.M. Vieira, J.P. Neves, and E.O. Melo. 2010. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Anim. Genet.* 42(1):89-92.