



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Estudio de polimorfismos en el gen de la miostatina bovina.

Study of polymorphisms in the bovine myostatin gene.

Autor/es

Irene Bernal Andrés
620584@celes.unizar.es

Director/es

Clementina Rodellar Penella
Arianne Sanz Fernández

Facultad de Veterinaria

2017

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Calidad y cantidad de la carne	3
2.2. El gen <i>MSTN</i> y la miostatina	4
2.3. Análisis de polimorfismos en el gen <i>MSTN</i>	6
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	11
4. METODOLOGÍA	12
4.1. Muestras analizadas	12
4.1.1. Extracción y purificación del DNA	12
4.1.2. Cuantificación y calidad del DNA	13
4.2. Análisis de polimorfismos en el gen <i>MSTN</i>	13
4.2.1. Polimorfismos analizados.....	13
4.2.2. Amplificación de los fragmentos de DNA	14
4.2.3. Visualización de los fragmentos amplificados	15
4.2.4. Purificación del producto amplificado de la PCR	15
4.2.5. Reacción de secuenciación	16
4.2.6. Purificación del producto de secuenciación.....	16
4.2.7. Análisis de las secuencias y determinación de genotipos.....	17
4.3. Determinación de las frecuencias alélica y genotípicas.....	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1. Cantidad y calidad del DNA.....	19
5.2. Amplificación de los fragmentos.....	19
5.3. Identificación de polimorfismos descritos en otras razas	20
5.4. Descripción de nuevos polimorfismos en el gen <i>MSTN</i>	23
6. CONCLUSIONES	25
7. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE	27
8. BIBLIOGRAFÍA	28
9. ANEXOS	31
ANEXO 1.Secuencia completa del gen <i>MSTN</i>	31
ANEXO 2. Tabla con los genotipos de los animales analizados para los nueve polimorfismos capaces de alterar la secuencia de la miostatina	36
ANEXO 3.Tabla con los genotipos de los animales analizados para las mutaciones silentes	37

1. RESUMEN

Los consumidores demandan cada vez más la producción de carne de alta calidad. La calidad de la carne está determinada por numerosos atributos tales como la terneza, el aspecto visual o la cantidad de grasa intramuscular, entre otros. Dichos atributos pueden estar influenciados tanto por factores ambientales como por factores genéticos.

Uno de los primeros genes identificados con efectos importantes desde el punto de vista económico en el ganado es el gen de la miostatina o *MSTN*. Este gen es el responsable del fenotipo de la doble musculatura. Codifica la proteína miostatina o factor 8 de crecimiento y diferenciación (GDF8), que actúa como regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético.

En el gen *MSTN* se han descrito hasta 19 mutaciones, siendo algunas de ellas capaces de inactivar completa o parcialmente la proteína. Cada una de las mutaciones presenta una frecuencia muy diferente dependiendo de la raza bovina estudiada.

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es el estudio de polimorfismos en el gen de la miostatina y el estudio de sus frecuencias alélicas y genotípicas en una población de de raza Parda de Montaña ($n=36$) que en mayor o menor grado mostraban signos de hipertrofia muscular. Para llevar a cabo el estudio, se ha utilizado la técnica de la PCR y la secuenciación, se han determinado los genotipos para los diferentes polimorfismos y se han calculado las frecuencias alélicas y genotípicas.

En este estudio se han identificado individuos con una sola mutación disruptiva, *nt821*, que consiste en una delección de 11pb, con una frecuencia alélica para la delección de 0,500 y una frecuencia de homocigotos y heterocigotos para el alelo mutado de 0,235 y 0,529 respectivamente. Se ha detectado también un polimorfismo silente de un solo nucleótido (SNP) en el segundo exón, *nt414(C→T)*, con una frecuencia alélica de 0,222. Además, se han descrito dos nuevos SNPs localizados en el segundo y tercer exón, sobre los que sería de gran interés realizar investigaciones posteriores, ya que ambos provocan la modificación de un aminoácido en la secuencia de la miostatina y, por tanto, podrían tener un efecto fenotípico sobre la hipertrofia muscular.

ABSTRACT

Consumers increasingly demand the production of high-quality meat. The meat quality is determined by many attributes such as tenderness, visual appearance or the proportion of the intramuscular fat, among others. These attributes may be influenced by both environmental factors and genetic factors.

One of the first genes identified with great economic effects in cattle is the myostatin gene or *MSTN*. This gene is responsible for the phenotype of the double-muscling. It is localized at the centromeric extreme of bovine chromosome 2, encodes the myostatin or growth and differentiation factor 8 (GDF8), which acts as a negative regulator of skeletal muscle growth.

In the *MSTN* gene, up to 19 mutations have been described, some of which are capable of inactivating the gene completely or partially. Each mutation presents a very different frequency depending on the studied bovine breed.

The objective of this work is the study of polymorphisms in the myostatin gene and the study of its allelic and genotypic frequencies in a population of the Parda de Montaña breed ($n=36$) that showed signs of muscular hypertrophy to a greater or lesser degree. To carry out the study, the methodology used have been the PCR technique and the sequencing, the genotypes for the different polymorphisms have been determined and the allele and genotype frequencies have been calculated.

In this study, a single disrupting mutation has been identified, *nt821*, consisting of a 11-bp deletion, with an allele frequency for the deletion of 0.500 and a frequency of homozygous and heterozygous animals of 0.235 and 0.529 respectively. A silent single nucleotide polymorphism(SNP) has also been detected in the second exon, *nt414(C→T)*, with an allelic frequency of 0.222. Moreover, two new SNPs have been described located in the second and third exons, on which further research would be of great interest, due to the fact that both polymorphisms cause a modification of an aminoacid in the sequence of the myostatin and, therefore, they could have a phenotypic effect on muscle hypertrophy.

2. ANTECEDENTES

2.1. Calidad y cantidad de la carne

Los consumidores demandan cada vez más la producción de carne de alta calidad, siendo necesario para las industrias alimentarias adaptar sus productos a las exigencias del mercado. La calidad de la carne está definida en función de las características que el consumidor considera deseables, como el aspecto visual, la terneza y la jugosidad, entre otros. A pesar de los diferentes criterios entre los consumidores en lo referente a los atributos que ha de tener la carne, la terneza es uno de los más apreciados. Este atributo tiene una elevada importancia comercial, sin embargo es difícil de predecir y de medir, por lo que resulta complicado introducir la terneza como objetivo en programas de mejora genética (Soria and Corva, 2004; Warner et al., 2010).

Los atributos están influenciados por factores ambientales, como las condiciones de engorde y las condiciones de almacenamiento antes y después del sacrificio. (Warner et al., 2010).

Pueden estar influenciados, además, por factores genéticos. Es muy habitual que los caracteres estén determinados por múltiples genes, sin embargo, se han descubierto genes individuales capaces de provocar importantes variaciones en la cantidad de carne producida y en su calidad. Estos genes son frecuentemente utilizados en programas de mejora y de selección genética (Burrow et al., 2001).

Uno de los primeros genes identificados capaces de influir directamente en rasgos de importancia económica en ganado bovino es el gen de la miostatina o *MSTN*, descubierto en 1997 por McPherron et al. Algunas de las mutaciones que ocurren en este gen pueden producir la inactivación parcial o completa de la proteína que codifica, provocando la aparición del fenotipo de la doble musculatura o fenotipo culón, que se caracteriza por manifestar una hipertrofia muscular (*mh*) debida al aumento de la masa muscular esquelética.

Los animales homocigotos (*mh/mh*) manifiestan una hipertrofia muscular muy pronunciada. También se ha observado que los animales heterocigotos (*mh/+*) muestran fenotipos intermedios, presentando una hipertrofia muscular menos pronunciada y en general con características intermedias entre los animales con una doble musculatura extrema (*mh/mh*) y los animales con un fenotipo normal (+/+) (Aldai et al., 2006).

Los animales que presentan el fenotipo de la doble musculatura o hipertrofia muscular tienen una carne más magra y tierna, con menor proporción de grasa total y grasa intramuscular, menor cantidad de colágeno y una menor capacidad de retención de agua, así como una mayor proporción de músculo y mayor contenido en proteínas (Campo et al., 1999; Fiems, 2012; Oliván et al., 2004). Estos animales tienen además un mayor rendimiento de la canal y una mayor proporción de cortes mejor valorados económicamente en el mercado que los animales con un fenotipo normal (Arthur, 1995; Fiems, 2012). Algunos estudios como el realizado por Wheeler et al. en 2001 en animales de la raza Piedmontese, corroboran la obtención de una carne con mayor terneza en los animales con doble musculatura.

La hipertrofia muscular se ha asociado también con una reducción de la fertilidad, reducción de la tolerancia al estrés, aumento de la incidencia de distocia o problemas durante el parto, menor supervivencia de los terneros y mayor susceptibilidad a enfermedades respiratorias (Fiems, 2012). Aun así, los beneficios aportados por la doble musculatura son mucho mayores.

Dada la importancia y el interés del gen de la miostatina, durante las últimas décadas, se ha intentado llevar a cabo un aumento de la frecuencia de la doble musculatura en algunas razas de interés, como la raza Piedmontese y la Belgian Blue (Arthur, 1995; Fiems, 2012).

Concretamente en la raza Parda de Montaña, y tal y como figura en el Programa de Mejora Genética: “*en paralelo con la creación del banco de ADN, se propone estudiar el gen de la Hipertrofia Muscular Hereditaria, e identificar los marcadores genéticos que permitirán detectar a los animales portadores del gen*” (ARAPARDA, 2012) .

2.2. El gen *MSTN* y la miostatina

El gen *MSTN*, se encuentra ubicado en el extremo centromérico del cromosoma 2 bovino y está constituido por 3 exones y 2 intrones (Figura 1). Este gen codifica una proteína compuesta por 376 aminoácidos, denominada miostatina o factor 8 de crecimiento y diferenciación (GDF-8, *growth/diferentiation factor-8*).

La miostatina, hallada principalmente en roedores y altamente conservada en especies de mamíferos tales como las especie ovina y porcina, pertenece a la

superfamilia de factores de crecimiento TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) (McPherron et al., 1997). Ésta engloba factores de crecimiento y diferenciación relevantes en la regulación de la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario y el mantenimiento del tejido homeostático en animales adultos (McPherron and Lee, 1996).

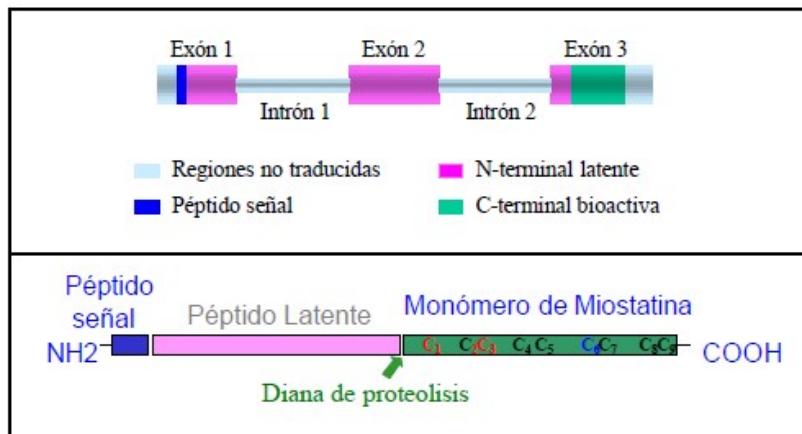


Figura 1. Características del gen de la miostatina en la parte superior de la imagen y de la proteína en la parte inferior. (Royo Martín, 2005)

Esta proteína es sintetizada como un péptido precursor, de la misma manera que los otros miembros de la superfamily TGF- β . Este péptido contiene una secuencia señal para la secreción, un lugar diana de procesamiento proteolítico, un dominio N-terminal y un dominio C-terminal que contiene un patrón característico de nueve residuos de cisteína. La miostatina, tras ser secretada en su forma latente, sufre modificaciones proteolíticas que dan lugar a la proteína madura o procesada. Tanto la miostatina no procesada como la proteína madura, son capaces de formar dímeros mediante enlaces disulfuro. No obstante, solo los dímeros de la proteína madura constituyen la forma activa de la proteína (Jouliaekaza and Cabello, 2007; McPherron et al., 1997).

La función principal de este factor de crecimiento es la regulación negativa del músculo esquelético. El estudio realizado por McPherron et al. en 1997 en ejemplares de roedores, mostró un aumento del peso de entre 2 y 3 veces en los animales homocigotos a los que se les había eliminado la región bioactiva de la proteína respecto a aquellos animales no modificados, indicando además la similitud entre el contenido graso de ambos tipos de animales y la enorme diferencia en el incremento de masa muscular esquelética. Por tanto, dichos autores establecieron que, la inactivación en el

gen *MSTN* capaz de provocar la pérdida de función de la proteína, era la principal causa del fenotipo de la doble musculatura.

2.3. Análisis de polimorfismos en el gen *MSTN*

Numerosos autores han demostrado posteriormente la producción del fenotipo *mh* debido a la presencia de mutaciones capaces de provocar la pérdida parcial o completa de la función de la proteína miostatina en numerosas razas de ganado, como la Belgian Blue (Kambadur et al., 1997), Piedmontese y Limousin (Grobet et al., 1998) o Asturiana de los Valles (Dunner et al., 2003).

La primera mutación disruptiva descubierta fue una delección de 11 pares de bases en la secuencia codificante del dominio carboxi-terminal bioactivo de la proteína (localizado en el tercer exón del gen) en la raza Belgian Blue. Dicha delección, denominada *nt821(del11)*, se produce después de los siete primeros aminoácidos, provocando la pérdida de más de 100 aminoácidos de la proteína y dando lugar a una proteína truncada, por lo que su actividad queda completamente inhibida (Grobet et al., 1997; Kambadur et al., 1997; McPherron and Lee, 1997).

Esta mutación se encontró en homocigosis en otras razas como la Asturiana (Grobet et al., 1997). Sin embargo, estos mismos autores no detectaron la delección en ganado francés Maine-Anjou que presentaba el fenotipo de la doble musculatura, siendo una de sus posibles explicaciones la heterogeneidad alélica del gen de la miostatina y, por tanto, la existencia de otros polimorfismos.

McPherron and Lee (1997) constataron la presencia de modificaciones en dos nucleótidos en la raza italiana Piedmontese. La primera (*F94L*), situada en el primer exón, consiste en la transversión de una citosina a una adenina, provocando una sustitución de una leucina por una fenilalanina en el aminoácido 94. Aunque *F94L* no provoca una modificación del fenotipo, cuando se presenta conjuntamente con una mutación disruptiva como *nt821(del11)* en heterocigosis, induce la aparición del fenotipo de la hipertrofia muscular de manera similar a la inducida por la misma mutación disruptiva en homocigosis (Miranda et al., 2002a).

La segunda mutación (*C313Y*), está situada en el tercer exón y consiste en la transición de una guanina en una adenina en el aminoácido 313, dando lugar a una mutación puntual de cambio de sentido. Esta mutación produce la sustitución de una

cisteína por una tirosina, provocando la pérdida de la mayor parte de la función de la proteína.

Ambas mutaciones fueron detectadas simultáneamente por otros autores: Kambadur et al. (1997) detectaron la mutación *C313Y* en la raza Piedmontese y Grobet et al. (1998) detectaron *F94L* en la raza francesa Limousin y *C313Y* en la raza Gasconne, también francesa.

Grobet et al. (1998) identificaron además 8 nuevos polimorfismos: 4 de ellos en las regiones codificantes del gen y otros 4 en las regiones intrónicas. En la región codificante, describieron una transición silente $C \rightarrow T$ en el codón número 138 en el segundo exón, denominada *nt414(C → T)*, y tres nuevas mutaciones disruptivas de la proteína:

- *nt419(del 7-ins10)*: Una inserción/delección en la posición 419 desde el codón de iniciación, que consiste en la delección de 7 pares de bases y una inserción de otras 10 pares de bases, provocando la aparición de un codón de terminación prematuro. Fue detectada en la raza francesa Maine-Anjou.
- *Q204X*: consiste en una transición $C \rightarrow T$ en el nucleótido 610 situado en el segundo exón, dando lugar a un codón de stop prematuro en el péptido N-terminal latente en la posición del aminoácido 204. Esta mutación se detectó en la razas francesas Charolais, en la que predomina esta mutación (Allais et al., 2010), y Limousin.
- *E226X*: es una mutación detectada en la raza Maine-Anjou que consiste en una transversión $G \rightarrow T$ en el nucleótido 676, generando un codón de stop prematuro en el péptido N-terminal latente en la posición del aminoácido 226.

En la región no codificante, localizaron 3 polimorfismos en el primer intrón: *nt374-51(T → C)*, *nt374-50(G → A)* y *nt374-16(dell)*; y 1 en el segundo: *nt748-78(dell)*. No obstante, dichos polimorfismos no afectan a la función de la proteína, siendo calificados como polimorfismos neutrales.

Por otro lado, Cappuccio et al. describieron en 1998 un nuevo polimorfismo en la raza italiana Marchigiana, denominado *E291X*, que consiste en una transversión

G→T en el nucleótido 874 del tercer exón, lo que genera la aparición de un codón de stop prematuro en el región bioactiva de la proteína.

En estudios posteriores (Dunner et al., 2003; Miranda et al., 2001) realizados en 28 razas de ganado bovino europeo (4 españolas, 12 francesas, 2 belgas, 9 británicas y 1 italiana), se detectaron, además de las 12 mutaciones mencionadas anteriormente, 7 mutaciones nuevas: 2 mutaciones intrónicas (*nt747+7(G→A)* y *nt747+11(A→G)*); 3 silentes (*nt267(A→G)*, *nt324(C→T)*, *nt387(G→A)*) y 2 conservadas (*D182N*, *S105C*).

Las dos nuevas mutaciones intrónicas detectadas, *nt747+7(G→A)* y *nt747+11(A→G)*, están localizadas en el segundo intrón y fueron identificadas en razas británicas.

En relación con las mutaciones silentes, dos de ellas se encuentran en el primer exón (*nt267(A→G)*, *nt324(C→T)*), mientras que la tercera de ellas, *nt387(G→A)*, está localizada en el segundo. *Nt267(A→G)* fue detectada en las razas francesas Aubrac, Bazadaise y Salers; *nt324(C→T)* se identificó en las razas Aubrac, Charolaise, Salers, Inra95 sire line y Maine-Anjou; y por último, *nt387(G→A)* en las razas francesas Maine-Anjou y Salers y en las británicas Ayrshire y Galloway.

Las dos últimas mutaciones, *S105C* y *D182N*, son dos mutaciones de cambio de sentido. La primera, *S105C*, fue encontrada en la raza francesa Parthenaise y consiste en una transversión C→G en el aminoácido 105 situado en el primer exón, que produce la sustitución de una serina por una cisteína. La segunda, *D182N*, fue detectada en la raza Maine-Anjou y consiste en una transición G→A en el aminoácido 182 situado en el segundo exón, provocando la síntesis de una asparagina en lugar de ácido aspártico.

En resumen, se han identificado 19 polimorfismos en el gen *MSTN* en ganado bovino (Figura 2), 9 de los cuales (2 localizados en el primer exón, 4 en el segundo y 3 en el tercero) son capaces de provocar modificaciones en el fenotipo. Éstos polimorfismos son: *F94L*, *S105C*, *nt419(del7-ins10)*, *D182N*, *Q204X*, *E226X*, *nt821(del11)*, *E291X* y *C313Y*. De estas 9 mutaciones, 5 de ellas (*nt419(del7-ins10)*, *Q204X*, *E226X*, *nt821(del11)* y *E291X*) provocan la aparición de un codón de terminación prematuro, dando lugar a una proteína truncada. Las 4 mutaciones restantes (*F94L*, *S105C*, *D182N* y *C313Y*) producen un cambio de aminoácido en la secuencia de la proteína, siendo *C313Y* la que genera una mayor modificación del fenotipo debido a

que se encuentra en la región bioactiva de la proteína y causa la pérdida de la mayor parte de su función.

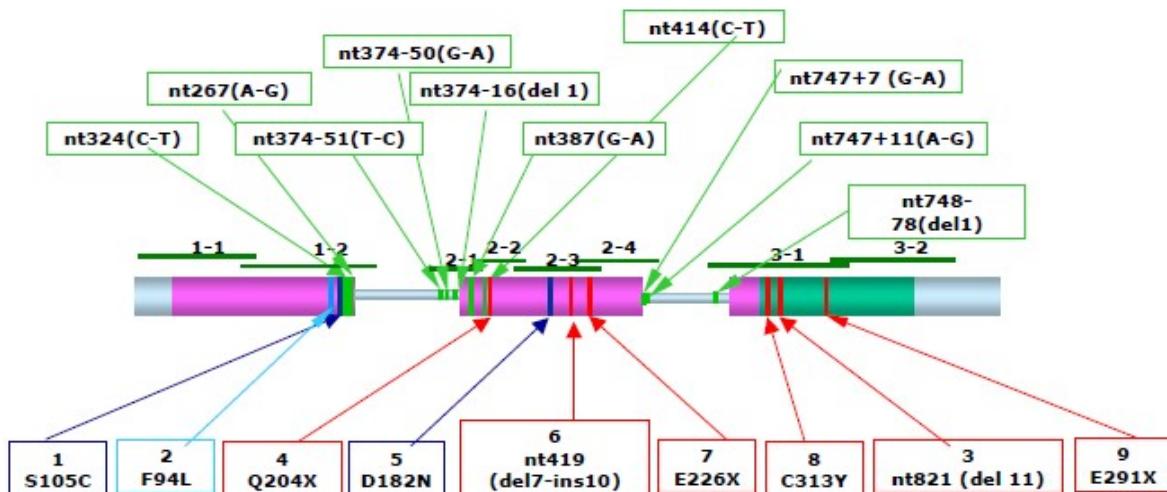


Figura 2. Gen de la miostatina. La figura muestra los tres exones y los dos intrones del gen con las mutaciones identificadas (las silentes en verde; cambio de sentido pero no disruptivas en azul; y disruptivas en rojo). (Dunner et al., 2003).

Cabe destacar que, aunque todas las mutaciones alteran la estructura del gen, no todas tienen el mismo efecto fenotípico. Aquellas mutaciones capaces de alterar la estructura del gen de tal forma que la proteína quede inactivada, como es el caso de *nt821(del11)*, provocan la aparición de la doble musculatura de una manera mucho más pronunciada. En comparación con las mutaciones disruptivas de la miostatina, aquellas que no inactivan la proteína completamente producen un aumento de la musculatura menos extremo (Smith et al., 2000).

La presencia de polimorfismos en el gen de la miostatina varía considerablemente de unas razas de ganado bovino a otras, mientras que algunos se encuentran difundidos en un gran número de razas, como *nt821(del 11)*, otros solo se han identificado en una raza, como es el caso de la mutación *E291X* en la raza italiana Marchigiana (Dunner et al., 2003). Numerosos autores han interpretado este hecho como una prueba del diferente origen de los polimorfismos, considerando que aquellos más difundidos en las razas europeas tuvieron un antecesor común, mientras que aquellos encontrados exclusivamente en una o dos razas tienen un origen más próximo en el tiempo. Así mismo, la heterogeneidad alélica también varía entre las diferentes razas. Algunas como la francesa Maine-Anjou presentan una alta heterogeneidad, mientras que la Belgian Blue se presenta en homocigosis para *nt821(del 11)* en un gran

número de casos según los estudios realizados (Dunner et al., 2003; Grobet et al., 1998; Miranda et al., 2001).

Respecto a la raza bovina Parda de Montaña, no se han encontrado en la literatura referencias a esta raza en estudios de polimorfismos en el gen *MSTN*.

El estudio de los polimorfismos permite, además, la selección asistida por marcadores genéticos en ganado, tanto para evitar la doble musculatura como para favorecerla (Grobet et al., 1998).

Por todo ello, ha sido necesario el desarrollo de nuevas técnicas con el objetivo de llevar a cabo el genotipado de diferentes muestras de una manera más rápida y simultánea, facilitando la determinación tanto de la frecuencia alélica de los polimorfismos descritos anteriormente como de los diferentes haplotipos. En las últimas décadas, un gran número de investigadores han utilizado técnicas de biología molecular como métodos alternativos a la secuenciación completa de un gen, tales como la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) o técnica OLA (*Oligonucleotide ligation assay*) entre otros (Casas et al., 2005; Karim et al., 2000; Miranda et al., 2002b).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el estudio de polimorfismos en las regiones codificantes del gen de la miostatina en una población de animales de raza Parda de Montaña.

Ésta es una raza bovina de interés cárnico situada en España en las comunidades de Castilla y León, Aragón, Cantabria, Principado de Asturias y Galicia principalmente. La inhibición del gen *MSTN* influye en la calidad y cantidad de la carne, y por tanto, en su valor económico. La mutación causante de la doble musculatura analizada comúnmente en esta raza es la delección 11 o *nt821*. Sin embargo, existen otros polimorfismos capaces de inactivar el gen parcial o totalmente en otras razas europeas, por lo que es posible que estén presentes también en esta raza.

Por ello, en el presente Trabajo de Fin de Grado se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación en la raza Parda de Montaña de polimorfismos del gen *MSTN* descritos anteriormente en otras razas bovinas
2. Búsqueda e identificación de nuevos polimorfismos en la raza
3. Estudio de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos identificados

4. METODOLOGÍA

4.1. Muestras analizadas

En este Trabajo de Fin de Grado, se utilizaron muestras de 36 animales de la raza bovina Parda de Montaña proporcionadas por el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Los animales utilizados fueron seleccionados debido a que presentaban en mayor o menor grado una hipertrofia muscular.

4.1.1. Extracción y purificación del DNA

Para realizar la obtención del DNA, se utilizó el kit Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin. Éste es un kit diseñado para realizar la extracción y purificación del DNA genómico a partir de sangre completa. Contiene un agente caotrópico, una membrana de sílice adherida a una columna, un tampón de lisis tipo 10 y la proteinasa K. Esta enzima es capaz de digerir las proteínas de las muestras incluso en presencias de inhibidores como detergentes o EDTA. La sal caotrópica en tampón de lisis tipo 10 y en presencia de la proteinasa K lisa las células sanguíneas, desnaturaliza compuestos proteicos y promueve la unión selectiva del DNA genómico a la membrana de sílice. Las etapas seguidas fueron las siguientes:

En primer lugar, se realizó la lisis de las células sanguíneas. Se añadieron 20 µL de proteinasa K, 300 µL de muestra de sangre y 400 µL de solución tampón tipo 10 en un tubo de microcentrífuga. Se agitó la mezcla durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, agitando la muestra de manera intermitente para facilitar la lisis. Una vez completado el tiempo de incubación, el color de la muestra viró de rojo a marrón oscuro.

Tras lisar las células sanguíneas se realizó el aislamiento del DNA genómico. Para ello, se utilizó una columna para cada muestra de DNA. Se añadió el producto lisado en el centro de la columna, se centrifugó durante 1 minuto a 11000 g y se desechó cuidadosamente el líquido situado en el interior del tubo.

Posteriormente, se eliminaron los contaminantes proteicos desnaturalizados mediante el lavado de la membrana de sílice añadiendo 500 µL de solución tampón tipo 10, centrifugando la muestra durante 1 minuto a 11000 g y desechariendo el líquido

resultante. Después, se llevó a cabo un segundo lavado. Para ello, se adicionaron 500 μ L de solución tampón tipo 6 y se centrifugó la muestra durante 3 minutos a 11000 g. Se desecharon el líquido resultante y el tubo utilizado.

Por último, se realizó la elución del DNA genómico. Se introdujo la columna de purificación a un nuevo tubo, se adicionaron 200 μ L de un tampón de baja fuerza iónica (tampón de elución tipo 5) calentado previamente a 70°C, se agitó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 minuto a 11000 g para recoger el DNA. El DNA obtenido se almacenó a -20°C.

4.1.2. Cuantificación y calidad del DNA

Para llevar a cabo la cuantificación de DNA, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 260 nm mediante la utilización de un espectofotómetro (NanoDrop ND-100 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España). El valor obtenido de esta medida permite determinar la cantidad de ácidos nucleicos en μ g/mL de DNA.

El equipo utilizado mide también la absorbancia de las muestras a longitudes de onda de 230 nm y 280 nm. La relación entre las absorbancias permite conocer el grado de pureza de las muestras obtenido. La relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ debe estar entre 1,5 y 2, y la relación $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ debe ser aproximadamente 2.

Un valor menor en la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ indica una contaminación con compuestos fenólicos o proteínas, mientras que en el caso de $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ podría deberse a una contaminación con hidratos de carbono, sales caotrópicas y fenoles.

4.2. Análisis de polimorfismos en el gen *MSTN*

4.2.1. Polimorfismos analizados

En este trabajo se analizaron todos los polimorfismos descritos en las regiones codificantes del gen, 4 silentes (*nt267(A → G)*, *nt324(C → T)*, *nt414(C → T)* y *nt387(G → A)*) y 9 capaces de alterar la secuencia de la proteína (*F94L*, *S105C*, *nt419(del7-ins10)*, *D182N*, *Q204X*, *E226X*, *nt821(del11)*, *E291X* y *C313Y*).

4.2.2. Amplificación de los fragmentos de DNA

En primer lugar, se llevó a cabo la amplificación de cada uno de los tres exones del gen de la miostatina mediante una reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para ello, se adicionaron 2 µL de DNA a una mezcla de 23 µL que contenía todos los componentes necesarios para llevar a cabo la amplificación (Tabla 1) y se introdujeron en un termociclador (ABI 2720 Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific S.L., Barcelona, España).

Tabla 1. Componentes utilizados en la PCR para la amplificación individual de los fragmentos del gen MSTN.

Reactivos	Volumen	
	Muestras	Control negativo
H ₂ O mQ	16,2 µL	18,2 µL
Solución tampón	2,5 µL	2,5 µL
MgCl ₂	1 µL	1 µL
dNTPs	2 µL	2 µL
foward primer (10 µM)	0,5 µL	0,5 µL
reverse primer (10 µM)	0,5 µL	0,5 µL
Taq DNA polimerasa	0,3 µL	0,3 µL
DNA	2 µL	-
TOTAL	25 µL	25 µL

Se realizó un control negativo sin adición de DNA para comprobar que los componentes de la mezcla no estuvieran previamente contaminados. La diferencia de volumen fue compensada con 2 µL de H₂O mQ.

Las secuencias de los primers utilizados en la amplificación, diseñados a partir de la secuencia del gen de la miostatina (GenBank acceso nº JQ700080.1), se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2. Secuencia de los primers diseñados para realizar la amplificación de los 3 exones del gen MSTN (GenBank acceso nº JQ700080.1) mediante la técnica de la PCR.

Localización	Sentido	Secuencia del primer (5'→3')	Posición (pb)
Exón 1	Forward	CTGATTGTTGCTGGCCAGT	776-795
	Reverse	AACGGTCATTACCATGCCCA	1081-1100
Exón 2	Forward	GCTGATCTTCTAACGCAAGTGGA	2936-2958
	Reverse	ATTACTGAAAATAACATGCTAAAACCTTG	3318-3347
Exón 3	Forward	AACAGACACACCAAAAAGATCTAGGAG	5367-5393
	Reverse	TCCTACAAAGATGTCTCCAATTAATATGC	5619-5647

El programa de amplificación consistió en 40 ciclos de 95°C durante 5 minutos; 94°C durante 30 segundos; 60°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto; y por último 72°C durante 5 minutos.

4.2.3. Visualización de los fragmentos amplificados

Para verificar la amplificación de los exones, se realizó un gel de agarosa al 2%, disolviendo para ello 2 g de agarosa en 100 mL de tampón TBE (Tris, borato y EDTA), y calentándolo posteriormente hasta disolver la agarosa. Despues, se adicionaron 8 µL de colorante GelGreen, diluido H₂O mQ en una proporción 1/5, se vertió en un molde y se dejó solidificar.

Una vez solidificado, se introdujo el gel en una cubeta, se cubrió con tampón TBE y se introdujeron en cada pocillo una mezcla de 5 µL de producto amplificado y 2 µL de azul de bromofenol, utilizado para observar el progreso de la electroforesis debido a su coloración azul. Así mismo, se introdujeron 5 µL del control negativo y de un marcador de talla mezclados también con 2 µL de azul de bromofenol.

Por ultimo, se expuso el gel de agarosa a luz ultravioleta en un transiluminador de luz ultravioleta (UV transiluminator ECX-F15, I.C.T., S.L., Lardero, España) para visualizar así el producto amplificado.

4.2.4. Purificación del producto amplificado de la PCR

Tras realizar la electroforesis y comprobar la correcta amplificación de los fragmentos, se realizó una purificación del producto de PCR amplificado mediante un método enzimático basado en la hidrólisis del exceso tanto de primers como de nucleótidos en una misma reacción. Se utilizó para ello el kit ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup, el cual contiene una solución tampón especial y dos enzimas con actividad hidrolasa, la exonucleasa I y la fosfatasa alcalina o SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*).

La mezcla de enzimas y solución tampón se diluyó en H₂O en proporción ¼, se adicionaron 4 µL de dicha solución a 10 µL de producto de PCR amplificado para realizar la reacción de secuenciación.

Las muestras se introdujeron en el termociclador y se utilizó un programa de 45 minutos a 37°C y 15 minutos a 80°C.

4.2.5. Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación de las muestras previamente purificadas se realizó utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Este kit proporciona una solución denominada BigDye Ready Reaction Mix (conservada entre -15 y -25°C) que contiene todos los reactivos necesarios para realizar la secuenciación. Dicha solución fue centrifugada en la microcentrífuga, se extrajo el contenido necesario del fondo del tubo y posteriormente se mezcló con el resto de los componentes en una placa. Los componentes y cantidades utilizadas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Componentes utilizados en la reacción de secuenciación de los exones del gen MSTN en muestras de raza Parda de Montaña.

Reactivos	Volumen
BigDye Ready Reaction Mix	1 µL
Primer	0,25 µL
H ₂ O di-ionizada	1,75 µL
Producto de la PCR purificado	2 µL
TOTAL	5 µL

Los primers utilizados en la reacción de secuenciación fueron los siguientes (Tabla 4):

Tabla 4. Secuencia de los primers diseñados para realizar la secuenciación de los 3 exones del gen MSTN (GenBank acceso nº JQ700080.1).

Localización	Sentido	Secuencia del primer (5'→3')	Posición (pb)
Exón 1	Forward	CTGATTGTTGCTGGCCAGT	776-795
Exón 2	Reverse	ATTACTGAAAATAACATGCTAAAAACCTTG	3318-3347
Exón 3	Reverse	TCCTACAAAGATGTCTCCAATTAATATGC	5619-5647

Se introdujo la placa en el termociclador y se utilizó un programa consistente en un calentamiento inicial a 96°C durante 1 minuto y 25 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 50°C durante segundos y 60°C durante 4 minutos. Tras realizar los ciclos de secuenciación se mantuvo la placa a 4°C.

4.2.6. Purificación del producto de secuenciación

Para realizar la purificación de los fragmentos se utilizaron dos soluciones provenientes del kit: denominadas BigDye XTerminator y SAM solution. Esta última mejora el rendimiento del reactivo y estabiliza la muestra tras la purificación.

Se agitó la solución BigDye XTerminator durante 10 segundos antes de ser mezclada con la solución SAM. Para la mezcla se utilizaron 22,5 µL de solución SAM y

5 µL de BigDye XTerminator por cada 5 µL de producto de secuenciación. Posteriormente, se añadió la mezcla realizada a cada muestra de producto de secuenciación, se agitaron durante 20 minutos a 1800 rpm y finalmente se centrifugaron a 1000 g durante 2 minutos.

4.2.7. Análisis de las secuencias y determinación de genotipos

El producto de secuenciación purificado se introdujo en un secuenciador automático (ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific S.L., Barcelona, España) y se realizó una electroforesis capilar utilizando el polímero Pop 7.

En la electroforesis se separan los fragmentos por tamaño. El secuenciador emite un laser que incide en las cadenas de DNA al pasar por un punto determinado del capilar y el fragmento emite una señal a una determinada longitud de onda en función del fluorocromo que tenga unido. La señal emitida se traduce posteriormente en un electroferograma en el cual se puede visualizar la secuencia de bases.

Para realizar la lectura de las secuencias se utilizó el programa informático BioEdit Sequence Alignment Editor.

4.3. Determinación de las frecuencias alélica y genotípicas

Se pueden encontrar dos alelos diferentes: **A** y **a**, siendo considerado **A** como el alelo presente en la secuencia nativa y **a** como el alelo mutado. Los dos alelos pueden dar lugar a tres genotipos diferentes: AA, Aa y aa.

La frecuencia alélica consiste en la proporción en la que se determina un alelo en una población N. Para el cálculo de las frecuencias alélicas se utilizaron las fórmulas mostradas a continuación:

$$p = \frac{1(AA) + 0,5(Aa)}{N}$$

$$q = \frac{1(aa) + 0,5(Aa)}{N}$$

p corresponde a la frecuencia del alelo **A** y **q** corresponde a la frecuencia del alelo **a**. **N** es al tamaño total de la muestra.

La frecuencia genotípica es la proporción en la que se encuentra cada uno de los genotipos presentes en una población N. Para calcular las frecuencias genotípicas las fórmulas utilizadas fueron las siguientes:

$$f(AA) = \frac{(AA)}{N}$$

$$f(Aa) = \frac{(Aa)}{N}$$

$$f(aa) = \frac{(aa)}{N}$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Cantidad y calidad del DNA

Se extrajo el DNA de las muestras seleccionadas, se cuantificó y se analizó su calidad. Todas las muestras estuvieron dentro de los valores considerados como adecuados, siendo para la calidad entre 1,5-2 y para la cantidad entre 25 y 30 µg/mL.

5.2. Amplificación de los fragmentos

Se realizó la amplificación de las muestras mediante la técnica de la PCR y después se visualizaron los fragmentos amplificados mediante electroforesis en un gel de agarosa expuesto a luz ultravioleta.

La correcta amplificación de los exones de varias muestras en el gel de electroforesis se puede observar en la Figura 3.

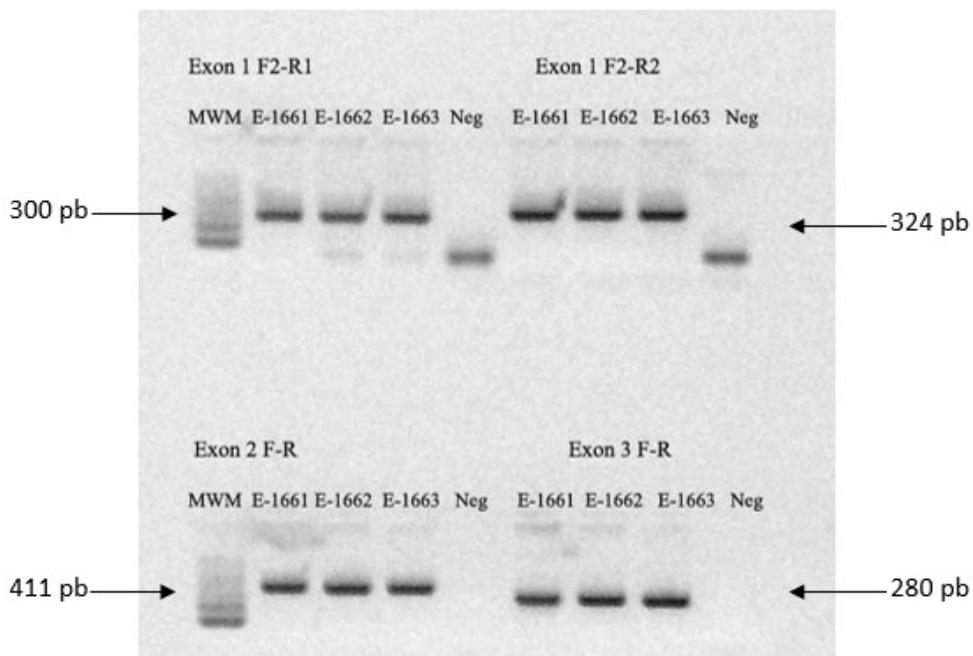


Figura 3. Fragmentos del gen *MSTN* amplificados y sometidos a electroforesis en gel de agarosa y expuestos a luz ultravioleta. Los fragmentos corresponden de izquierda a derecha y de arriba abajo: E-1661(exón 1); E-1662 (exón 1); E-1663 (exón 1); control negativo; E-1661(exón 1); E-1662 (exón 1); E-1663 (exón 1); control negativo; E-1661(exón 2); E-1662 (exón2); E-1663 (exón 2); control negativo; E-1661(exón 3); E-1662 (exón 3); E-1663 (exón 3); control negativo.

5.3. Identificación de polimorfismos descritos en otras razas

Una vez comprobada la amplificación, los fragmentos se purificaron y se secuenciaron en el secuenciador automático. Tras obtener las secuencias, se identificaron los polimorfismos presentes en las muestras y se calcularon sus frecuencias alélicas y genotípicas.

En primer lugar, se presentan los resultados de las mutaciones descritas que tienen un efecto fenotípico. Las frecuencias genotípicas y alélicas de dichas mutaciones obtenidas se muestran respectivamente en las Tablas 5 y 6:

Tabla 5. Frecuencias genotípicas de polimorfismos en el gen MSTN (GenBank nº de acceso JQ700080.1) causantes de modificaciones fenotípicas en la raza Parda de Montaña.

Frecuencias genotípicas en el gen MSTN en la raza Parda de Montaña				
Polimorfismo	Exón	Nº GenBank	Genotipos	Frecuencias genotípicas
F94L(C→A)	1	1015	<i>F94L-F94L</i>	0
			<i>F94L-0</i>	0
			0-0	1
S105C(C→G)	1	1047	<i>S105C-S105C</i>	0
			<i>S105C-0</i>	0
			0-0	1
Nt419(del 7-ins 10)	2	2982	<i>Nt419-nt419</i>	0
			<i>Nt419-0</i>	0
			0-0	1
D182N(G→A)	2	3107	<i>D182N-D182N</i>	0
			<i>D182N-0</i>	0
			0-0	1
Q204X(C→T)	2	3173	<i>Q204X-Q204X</i>	0
			<i>Q204X-0</i>	0
			0-0	1
E226X(G→T)	2	3239	<i>E226X-E226X</i>	0
			<i>E226X-0</i>	0
			0-0	1
Nt821(del 11)	3	5414	<i>Del 11-Del 11</i>	0,235
			<i>Del11-0</i>	0,529
			0-0	0,235
E291X(G→T)	3	5467	<i>E291X-E291X</i>	0
			<i>E291X-0</i>	0
			0-0	1
C313Y(G→A)	3	5534	<i>C313Y-C313Y</i>	0
			<i>C313Y-0</i>	0
			0-0	1

Tabla 6. Frecuencias alélicas de polimorfismos en el gen *MSTN* (GenBank nº de acceso JQ700080.1) causantes de modificaciones fenotípicas en la raza Parda de Montaña.

Frecuencias alélicas en el gen <i>MSTN</i> en la raza Parda de Montaña				
Polimorfismos	Exón	Nº GenBank	Frecuencia alelo nativo	Frecuencia alelo mutado
<i>F94L(C→A)</i>	1	1015	1	0
<i>S105C(C→G)</i>	1	1047	1	0
<i>Nt419(del 7-ins 10)</i>	2	2982	1	0
<i>D182N(G→A)</i>	2	3107	1	0
<i>Q204X(C→T)</i>	2	3173	1	0
<i>E226X(G→T)</i>	2	3239	1	0
<i>Nt821(del11)</i>	3	5414	0,500	0,500
<i>E291X(G→T)</i>	3	5467	1	0
<i>C313Y(G→A)</i>	3	5534	1	0

En relación al análisis de las secuencias, el primer exón del gen *MSTN* apenas mostró variabilidad entre las muestras y la secuencia original. Los polimorfismos *F94L* y *S105C* tuvieron una frecuencia para el alelo presente en la secuencia nativa del gen de 1, ya que en ninguno de los dos casos se detectó el alelo mutado. Tampoco se detectaron otros polimorfismos.

No es de extrañar que *S105C* no estuviera presente en los animales de Parda de Montaña analizados, ya que no había sido detectada en otras razas españolas de interés cárnico como Asturiana de los Valles, Asturiana de Montaña y Pirenaica. Esta mutación solo ha sido detectada en la raza francesa Parthenaise (Dunner et al., 2003; Miranda et al., 2002a).

F94L, a diferencia de la mutación anterior, fue detectada en la raza Pirenaica con una frecuencia en homocigosis y heterocigosis de 0,214 y 0,332 respectivamente (Miranda et al., 2002a). Esta mutación fue detectada también en las razas españolas Asturiana de los Valles y Rubia Gallega, aunque con una frecuencia muy baja, y en numerosas razas francesas, como la Blonde d'Aquitaine, Charolais y Limousine (Dunner et al., 2003; Grobet et al., 1998).

En el segundo exón, las mutaciones capaces de influir en el fenotipo (*nt419(del7-ins10)*, *D182N*, *Q204X* y *E226X*) no estuvieron presentes en los animales analizados, suponiendo por tanto en todos los casos una frecuencia alélica de 1 para el alelo nativo. Estos polimorfismos tampoco fueron detectados en otras razas españolas, a excepción de *nt419(del7-ins10)*, que fue detectada en la raza Pirenaica (Miranda et al.,

2002a), aunque en una frecuencia muy baja. *D182N*, *Q204X* y *E226X* han sido identificadas en varias razas francesas por Miranda et al. (2002a) y Dunner et al. (2003).

Por último, en el tercer exón la única mutación disruptiva detectada fue *nt821(del11)*, siendo 8 de los ejemplares estudiados homocigotos para la delección, 18 heterocigotos y 8 homocigotos para el alelo nativo (Figura 4). Estos resultados suponen una frecuencia para el alelo mutado y el alelo nativo de 0,500 y una frecuencia genotípica para la delección en homocigosis y en heterocigosis de 0,235 y 0,529 respectivamente.

La frecuencia de *nt821(del11)* obtenida en la raza Parda de Montaña fue menor que en otras razas españolas como la Asturiana de los Valles y Rubia Gallega, que presentaron una frecuencia en homocigosis de 0,740 y 0,287 respectivamente. Comparando la frecuencia de la delección en heterocigosis, la obtenida en la Parda de Montaña (0,529) fue mayor que en la Asturiana de los Valles (0,235) y Pirenaica (0,221) y menor que en la Rubia Gallega (0,614) (Miranda et al., 2002a).

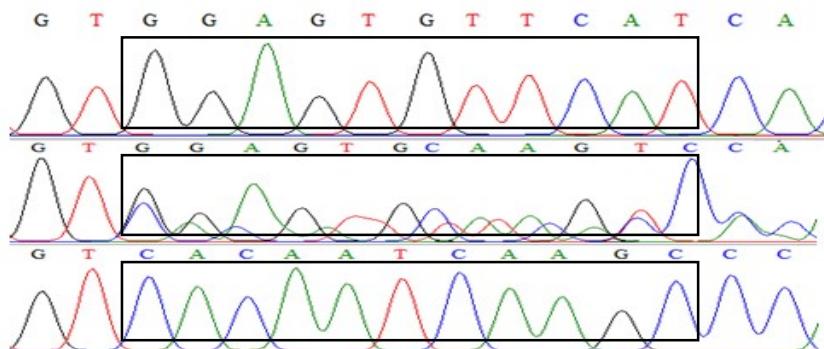


Figura 4. Fragmento de la secuencia del tercer exón del gen de la miostatina en el que se muestra la mutación *nt821(del11)* en homocigosis para el alelo nativo en la imagen superior, en heterocigosis en la central y en homocigosis para la delección en la imagen inferior.

Las mutaciones *C313Y* y *E291X* no fueron detectadas en las muestras analizadas, siendo por tanto la frecuencia para el alelo nativo de 1 en ambas mutaciones. *C313Y* solo ha sido detectada en las razas francesas Gasconne (Dunner et al., 2003; Grobet et al., 1998; Miranda et al., 2002a) e Inra 95(Dunner et al., 2003) y en la raza italiana Piedmontese (Grobet et al., 1998; McPherron and Lee, 1997). *E291X* ha sido detectada exclusivamente en la raza en la que fue descubierta por Cappuccio et al. en 1998, la raza italiana Marchigiana.

Respecto a las mutaciones silentes descritas en otras razas para el gen *MSTN*, se detectó la mutación *nt414(C→T)* en 9 de los 36 ejemplares analizados, siendo 7 de ellos

homocigotos para la mutación (Figura 5). Por tanto, *nt414(C→T)* se detectó en homocigosis en una frecuencia de 0,194 frente a una frecuencia de 0,056 en heterocigosis. Las frecuencias alélicas fueron 0,778 y 0,222 para el alelo nativo y el alelo mutado respectivamente. Esta mutación había sido detectada en Asturiana de los Valles, Asturiana de Montaña y Pirenaica (Dunner et al., 2003; Grobet et al., 1998; Miranda et al., 2002a).

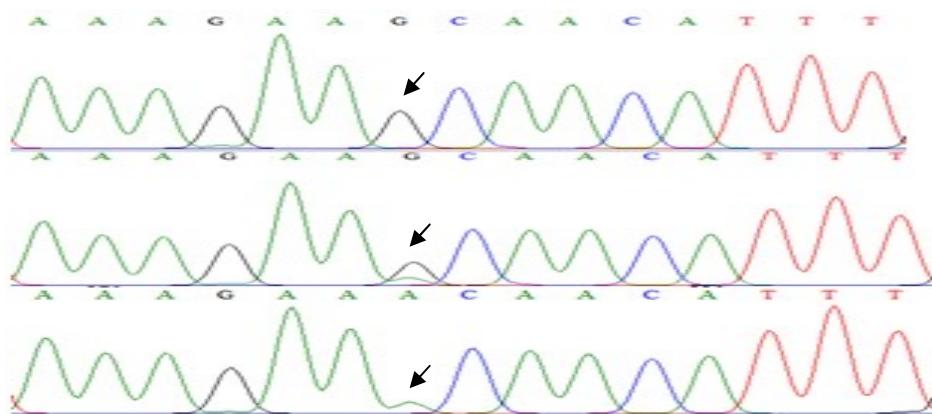


Figura 5. Fragmento de la secuencia del segundo exón del gen de la miostatina en el que se muestra en la imagen superior la secuencia nativa; en la imagen inferior la secuencia con la mutación *nt414(C→T)* en homocigosis; y en la imagen central una muestra en heterocigosis para la mutación.

El resto de las mutaciones silentes analizadas (*nt267(A→G)*, *nt324(C→T)* y *nt387(G→A)*) no presentaron variabilidad en la población analizada.

5.4. Descripción de nuevos polimorfismos en el gen *MSTN*

Se detectaron 2 nuevas variaciones en la secuencia del gen *MSTN* localizadas en el segundo y tercer exón. No se han encontrado referencias sobre ellas en la literatura, por lo que se pueden considerar nuevas mutaciones características de esta raza.

El polimorfismo localizado en el segundo exón corresponde a la posición 2994 en la secuencia del gen *MSTN* (GenBank acceso nº JQ700080.1) y se muestra en la Figura 6. En ella, se puede observar la sustitución de una guanina por una adenina. La sustitución de un nucleótido por otro conlleva el cambio de una serina por una fenilalanina en la secuencia de la proteína que podría suponer una modificación en el fenotipo. Este cambio se detectó en 4 muestras en heterocigosis y en 1 muestra en homocigosis, suponiendo una frecuencia alélica de 0,083 y una frecuencia genotípica para la mutación en homocigosis y en heterocigosis de 0,028 y 0,111 respectivamente.

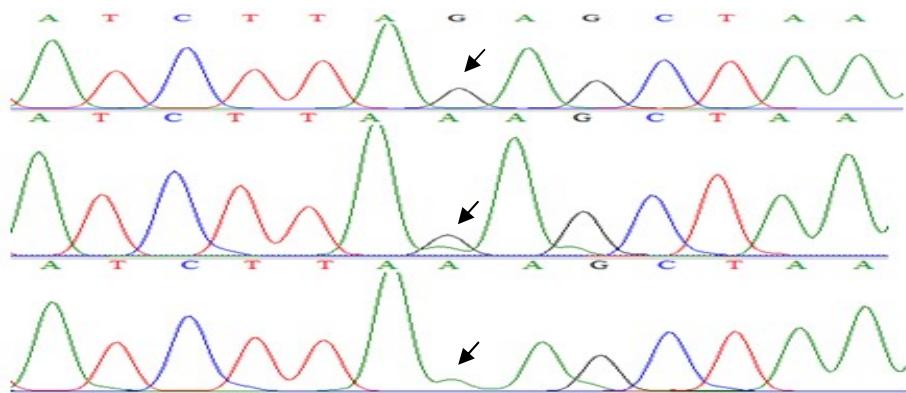


Figura 6. Fragmento de la secuencia del segundo exón del gen de la miostatina en el que se muestra en la imagen superior la secuencia nativa; en la imagen central una modificación de la secuencia en uno de los alelos; y en la imagen inferior una modificación de los dos alelos del gen.

En el tercer exón, se detectó un polimorfismo (Figura 7) en la posición 5564 en la secuencia del gen *MSTN* (GenBank acceso nº JQ700080.1). Consiste en una transversión T→A. Esta modificación en la secuencia del gen provoca el cambio en la proteína de una histidina por una leucina. La mutación se encontró solamente en 2 de las muestras analizadas, ambas en heterocigosis, suponiendo una frecuencia alélica de 0,042 y una frecuencia genotípica de 0,056.

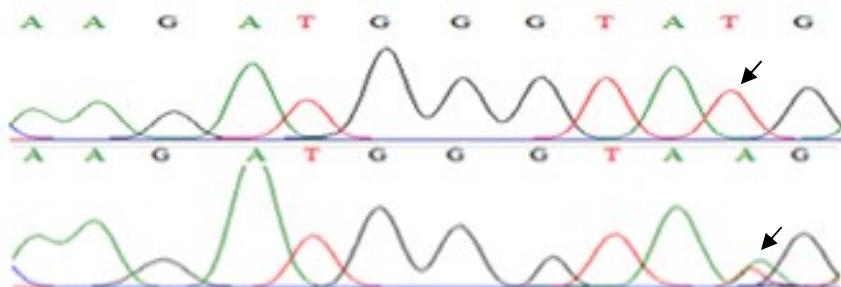


Figura 7. Fragmento de la secuencia del tercer exón del gen de la miostatina en el que se muestran polimorfismos en uno de los nucleótido. En la imagen superior se muestra la secuencia nativa del gen, mientras que en la imagen inferior se puede observar la modificación de uno de los alelos del gen.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y en las condiciones del presente Trabajo de Fin de Grado se han extraído las siguientes conclusiones:

1. Se detectaron un total de 4 mutaciones en los animales analizados: dos mutaciones en el exón 2 y dos mutaciones en el exón 3.
2. No se detectaron variaciones en el primer exón del gen respecto a la secuencia nativa en ninguno de los animales analizados.
3. De las mutaciones descritas anteriormente en otras razas bovinas se detectaron la mutación *nt414(C→T)* en el segundo exón y la mutación *nt821(del11)* en el tercero, siendo esta última una mutación disruptiva que causa el fenotipo culón característico.
4. La frecuencia de los alelos en la mutación *nt414(C→T)* fueron 0,778 para el alelo presente en la secuencia nativa y 0,222 para el alelo mutado. Las frecuencias para la mutación en homocigosis y en heterocigosis fueron 0,192 y 0,056 respectivamente.
5. En relación con la mutación *nt821(del11)*, el alelo mutado tuvo una frecuencia alélica de 0,500 y una frecuencia en homocigosis y heterocigosis de 0,235 y 0,529.
6. Se detectaron 2 nuevos polimorfismos no descritos con anterioridad, uno en el segundo exón y otro en el tercer exón, con una frecuencia alélica de 0,083 y 0,042 respectivamente. Con respecto a dichos polimorfismo, resultaría de gran interés realizar investigaciones posteriores para determinar el efecto de estas mutaciones en el gen y determinar si están implicadas en la aparición de la doble musculatura, ya que ambas mutaciones provocan un cambio aminoacídico en la secuencia de la miostatina.

CONCLUSIONS

Based on the obtained results and in the conditions of the present work, it was deduced the following conclusion:

1. A total of 4 mutations were detected in the animals analyzed: two mutations in exon 2 and two mutations in exon 3.

2. No variations were detected in the first exon of the gene relative to the native sequence in any of the animals analyzed.

3. From the mutations previously described in other bovine breeds, the mutation *nt414(C→T)* was detected in the second exon and the mutation *nt821(del11)* in the third, being the last one a disruptive mutation that causes the characteristic double-muscled phenotype.

4. The frequency of the alleles in the mutation *nt414(C→T)* were 0,778 for the allele present in the native sequence and 0,222 for the mutated allele. The frequencies for the mutation in homozygosis and heterozygosis were 0,192 and 0,056, respectively.

5. Regarding the mutation *nt821(del11)*, the mutated allele had a frequency of 0,500 and a frequency in homozygosis and heterozygosis of 0,235 y 0,529.

6. Two new polymorphisms not previously described were detected, one in the second exon and another in the third exon, with an allelic frequency of 0.083 and 0.042 respectively. With respect to such polymorphisms, it would be of great interest to carry out further research to determine the effect of these mutations on the gene and to determine if they are involved in the appearance of the double musculature, due to the fact that both mutation cause an aminoacid modification in the sequence of the myostatin.

7. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE

En primer lugar, la asignatura “Trabajo de Fin de Grado” me ha permitido mejorar mis habilidades en el laboratorio así como conocer nuevas técnicas de genética molecular utilizadas en proyectos de investigación.

La realización de este trabajo me ha hecho mejorar mis capacidades de organización y planificación en un laboratorio. Así mismo, he desarrollado mis habilidades de búsqueda de información científica, utilización de bases de datos de genética y redacción de un informe científico tanto en inglés como en español.

Además, me ha aportado autonomía en el manejo y utilización de equipos tales como el termociclador o el secuenciador automático, y ha impulsado mi capacidad para resolver los problemas que puedan ocurrir durante la realización de un experimento.

Por otro lado, me ha ayudado a comprender mejor los principios de la genética y la relación entre la calidad de los alimentos, más concretamente la calidad de la carne, y la genética, ampliando así mis conocimientos adquiridos en la asignatura “Biotecnología Alimentaria”, lo que valoro muy positivamente.

Concluyendo, considero que esta asignatura permite el desarrollo de las competencias personales, favoreciendo la autonomía y el aprendizaje de cara al ámbito laboral, gracias también a la colaboración del personal del laboratorio, investigadores y técnicos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aldai, N., Murray, B.E., Oliván, M., Martínez, A., Troy, D.J., Osoro, K., and Nájera, A.I. (2006). The influence of breed and mh-genotype on carcass conformation, meat physico-chemical characteristics, and the fatty acid profile of muscle from yearling bulls. *Meat Sci.* *72*, 486–495.
- Allais, S., Levéziel, H., Payet-Duprat, N., Hocquette, J.F., Lepetit, J., Rousset, S., Denoyelle, C., Bernard-Capel, C., Journaux, L., Bonnot, A., et al. (2010). The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds. *J. Anim. Sci.* *88*, 446–454.
- Arthur, P.F. (1995). Double muscling in cattle: a review. *Aust. J. Agric. Res.* *46*, 1493–1515.
- Asociación de criadores de raza Bovina Parda de Montaña (2012). Programa de mejora genética de la raza bovina Parda de Montaña.
- Burrow, H.M., Moore, S.S., Johnston, D.J., Barendse, W., and Bindon, B.M. (2001). Quantitative and molecular genetic influences on properties of beef: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* *41*, 893–919.
- Campo, M.M., Sañudo, C., Panea, B., Alberti, P., and Santolaria, P. (1999). Breed type and ageing time effects on sensory characteristics of beef strip loin steaks. *Meat Sci.* *51*, 383–390.
- Cappuccio, I., Marchitelli, C., Serracchioli, A., Nardone, A., Filippini, F., Ajmone-marsan, P., and Valentini, A. (1998). A G-t transversion introduces a stop codon at the mh locus in hypertrophic Marchigiana beef subjects. *Anim. Genet.* *29*, 51.
- Casas, E., White, S.N., Riley, D.G., Smith, T.P.L., Brenneman, R.A., Olson, T.A., Johnson, D.D., Coleman, S.W., Bennett, G.L., and Chase, C.C. (2005). Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in cattle. *J. Anim. Sci.* *83*, 13–19.
- Dunner, S., Eugenia Miranda, M., Amigues, Y., Cañón, J., Georges, M., Hanset, R., Williams, J., and Ménissier, F. (2003). Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds. *Genet. Sel. Evol.* *35*, 103–118.
- Fiems, L.O. (2012). Double Muscling in Cattle: Genes, Husbandry, Carcasses and Meat. *Animals* *2*, 472–506.
- Grobet, L., Martin, L.J.R., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Ménissier, F., Massabanda, J., et al. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double muscled phenotype in cattle. *Nat. Genet.* *17*, 71–74.

- Grobet, L., Poncelet, D., Royo, L.J., Brouwers, B., Pirottin, D., Michaux, C., Ménissier, F., Zanotti, M., Dunner, S., and Georges, M. (1998). Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm. Genome* *9*, 210–213.
- Jouliaekaza, D., and Cabello, G. (2007). The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. *Curr. Opin. Pharmacol.* *7*, 310–315.
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P., and Bass, J.J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* *7*, 910–915.
- Karim, L., Coppieters, W., Grobet, L., Georges, M., and Valentini, A. (2000). Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. *Anim. Genet.* *31*, 396–399.
- McPherron, A.C., and Lee, S.-J. (1996). The transforming growth factor β superfamily. *Growth Factors Cytokines Health Dis.* *1*, 357–393.
- McPherron, A.C., and Lee, S.-J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 12457–12461.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.-J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* *387*, 83–90.
- Miranda, M.E., Cañón, J., Ménissier, F., Hanset, R., Williams, J., and Dunner, S. (2001). Identificación de los distintos haplotipos del gen de la miostatina en razas bovinas europeas. *XXXIII-IX Jomadas Sobre Prod. Anim.* *22*.
- Miranda, M.E., Boscher, M.Y., Cañón, J., Ménissier, F., Vallejo, M., and Dunner, S. (2002a). Expresión de la Hipertrofia Muscular y polimorfismo del gen de la miostatina en razas bovinas de producción cárnica. *ITEA Prod. Anim.* *98A*, 233–238.
- Miranda, M.E., Amigues, Y., Boscher, M.Y., Ménissier, F., Cortés, O., and Dunner, S. (2002b). Simultaneous genotyping to detect myostatin gene polymorphism in beef cattle breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* *119*, 361–366.
- Oliván, M., Martínez, A., Osoro, K., Sañudo, C., Panea, B., Olleta, J.L., Campo, M.M., Oliver, M.À., Serra, X., Gil, M., et al. (2004). Effect of muscular hypertrophy on physico-chemical, biochemical and texture traits of meat from yearling bulls. *Meat Sci.* *68*, 567–575.
- Royo Martín, L.J. (2005). Secuenciación y análisis del gen de la miostatina bovina: memoria para optar al grado de doctor.
- Smith, J.A., Lewis, A.M., Wiener, P., and Williams, J.L. (2000). Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beef cattle: Allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon. *Anim. Genet.* *31*, 306–309.
- Soria, L.A., and Corva, P.M. (2004). Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne bovina. *Arch Latinoam Prod Anim* *12*, 73–88.

Warner, R.D., Greenwood, P.L., Pethick, D.W., and Ferguson, D.M. (2010). Genetic and environmental effects on meat quality. *Meat Sci.* 86, 171–183.

Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Casas, E., Cundiff, L.V., and Koohmaraie, M. (2001). The effects of Piedmontese inheritance and myostatin genotype on the palatability of longissimus thoracis, gluteus medius, semimembranosus, and biceps femoris. *J. Anim. Sci.* 79, 3069–3074.

9. ANEXOS

ANEXO 1. Secuencia completa del gen *MSTN* (Genbank acceso nº JQ700080.1). Los exones se muestran en negrita. La secuencia subrayada corresponde a los primers utilizados para la amplificación y las letras en rojo a los polimorfismos capaces de modificar el fenotipo.

1 ttaatatta aagtaggatt ttcattatgt gttaagaatt tattcaggga aacaagttc
61 tcaaattata gcagaaaatc ttactagt atcacagtct tttcattaa gtcttcctga
121 ataaatctgt attttcta atatacaagac taaaaataat ttaatataac aaataaaatt
181 attttactt caaatgctta cttaaatagt ataaaatcat tttatTTCT gagggaaaag
241 catabcaact tttaagtat gaagtgtaaa ttaagatttta ttcaattttaa ttataatttt
301 taaagttca catataaaga tgaataagat ctaagtgtat atgttattgt taataaagtt
361 tttaattttt cgaatgtcac atacagccctt tattattcat agatttattc cttttaagaa
421 gtagtcaa atcagcgtc acccttgact gtaacaaaat actgttttgt gacttgtgac
481 agacaggggtt ttaacctctg acagcgagat tcattgtgga gcaagagcca atcacagatc
541 ccgacgacac ttgtctcatc aaagttggaa tataaaaagc cacttggaaat acagtataaa
601 agattcactg gtgtggcaag ttgtctctca gactggcag gcattaaatgt ttggcttggc
661 gttactcaaa agcaaaagaa aagtaaaagg aagaagtaag aacaaggaa aagattgtat
721 tgattttaaa acc**atgc**aaa aactgcaa**at** ctctgtttat atttacctat **ttatgctgat**
781 tgttgc tgc ccagtggatc tgaatgagaa cagcgagcag aaggaaaatg tgaaaaaaga
841 ggggctgtgt aatgcattt tggggggaa aaacactaca tcctcaagac tagaagccat
901 aaaaatccaa atcctcagta aacttcgcct ggaaacagct cctaacatca gcaaagatgc
961 tatcagacaa cttttgccc aggctcctcc actcctggaa ctgattgatc agt**c**atgt
1021 ccagagagat gccagcagtg acggct**c**ttt ggaagacgt gactaccacg ccaggacgga
1081 aacggtcatt accatgccc cggagtgtga gtagtcctgc tggtgcagag caacgactct
1141 gctgactgct gttcttagtgt tcatgagaaa ccgatctatt ttcaggctct ttaacaagc
1201 tgctggcttg tatgtaagga ggagggggaa gagctttttt caagattca tgagaaatag
1261 accaatgaga ctgaaagctg ctactttatt tgttcctta gagagctaaa aagctaaaaa
1321 tcaaaaatga aatgcattgca tagcattcat gttatatagt ttagtatgac aactataaca
1381 tgtttatgtt ttcacagctt aatgctacca aggtaaagga ttggggagaca gtatcagcaa
1441 tgtgaaaaat ttacatcaaa tttcctaatt gcatttggtt gcctgaaata tgcatattata

1501 ataacaggtt tttttttttt ttcattaata aaagagaaaag gaagaaatct gtagaggttg
 1561 aaggcctatct gggcatttgc tgaacactta gaatgacttc tgttattcaa aactatttct
 1621 catagggttt ttatggcttt cacagagtat ctaatttga aagctatttag agtggaaagg
 1681 ataaaagaat attcttaata aacttaatgt attagtaaga gcaataagga agtaaacaca
 1741 gcatagtgaa aaatcatgag ctaatcagca gaaaattcta agaaataaac atttaattha
 1801 caaagttcca cttataccct gaccatggta ctattgttga gagtacctgg tctgcacata
 1861 tctaggaggc acatgcttaa taaccttcta aaatattatt ttattcctca taggagggag
 1921 aactattacc tatatgttagt acctatgttg tttctgaaag ataatatgtt tcataatatt
 1981 ctgttgcagt cacttcaaac ctatactcaa ggaaagggag acaggcacct caacagagaa
 2041 ggcatgacca gaaagagttt tgtgccatgt gtctgcgatc ttgctttata cagggctcta
 2101 cccactttaa actggactca aaacagtttc aaaatactgc ttttcttat taagtaacta
 2161 gtttataagg caacaaataa atttcctta agactgtgct atcagataat cctggaatag
 2221 atttgcctta cttataaaca atcttgagaa aacaaaaagg caagaaatttgc ctaagtgcatt
 2281 ctgcttacaa tgacagcctg gccctaaaga caatgtttc taagtttga aacagcttga
 2341 atacaacatc taagtttgg tgctaattac ctgctagttt ttttattttt ttcctttaaa
 2401 aggctgtccc agcgtcctaa cataacagat gcactatatt ttctgctaatt tcccgaggct
 2461 cagttagttg ctcactgtgt ctgtccccca ggtaattcag gcctggggga agggttcctt
 2521 cctccagact gattggtaca gctgctcagt aagtgtact actcagattc ccaaagaatt
 2581 ctaagtggat gttctccac agtgtctctt gttctctcta atcatcatca tttaaaatt
 2641 tcatccactt ttcattcctt aatagaattt tccttagtcc acagttctctt ggaaaggaag
 2701 taggctgctc ataacagctg aaaaaacata tacctaaaag attctgaaaa gctgtataaa
 2761 ctgttataact tgatattttg ctgttatgaa taaaatgcta catattttc cattttaaa
 2821 gactaaatat gcacacatta ttccaattaa aaaaatgttc atagattgtt atggaggtgt
 2881 tcgttcgttt ttcataaaaa tgatcttagt aactttttt tcttattcat ttatagctga
2941 tcttctaacg caagtggaaag gaaaacccaa atgttgcttc tttaaattta gctctaagat
 3001 acaatacaat aaactagtaa aggcccaact gtggatataat ctgaggcctg tcaagactcc
 3061 tgcgacagtg tttgtgcaaa tcctgagact catcaaaccc atgaaagacg gtacaaggta
 3121 tactggaatc cgatctctga aacttgacat gaacccaggc actggatattt ggcagagcat
 3181 tgatgtgaag acagtgttgc agaactggct caaacaacct gaatccaact taggcattga
 3241 aatcaaagct ttagatgaga atggccatga tcttgctgta accttcccag aaccaggaga

3301 **agatggactg** gtaagtgatt actgaaaata acatgctaaa aaccttgttata
3361 cataatgtga atgaatagta gtaaaaata actaccagtt tcctgtgctt ataagccaga
3421 caaaggtgcc ttacccagt ggtagccctg taccaataa aagtaggtgt cccatttcac
3481 atcctatgaa acactctctt gatactttga ctggcatga ggatttaaaa gaaaaaaaaagt
3541 tatactatgg tccttaagtt ttttagggaaat tctttggaaat tgagaatgaa atataaaatg
3601 ctggccattt atgtgctaca tgattatata cataaaaaca tgaagtcttc acagtggatt
3661 ctagtacaca cccaaacaaca catttttcc cccagaagag tgaccaattt gtaaaaattc
3721 ttttgcttaa taaagcagaa aaatgaactc tacaagttat aattaaaata aaatgcttt
3781 acttatagaa attaactaga tatatgttca ggtttatata ctattaaata tactatattt
3841 aagatctctc atgataaaata tgttccttgc tttatagact attgatgcac tgatgtatat
3901 gtggattact ttgtgaatta cccctggtaa aattaaaaat ttcaaggctag ttaacttgta
3961 ctacttagct attttctgaa ctgtcttact gttcttaac aggagttAAC ttaggtaatg
4021 tcaactaatt taatataaag tcaaacagaa aataatgcct tatatattat aaaaattaat
4081 aaaaaaccat tttaaaatct agtataagtt tagagctact cactcttctg gcttatctat
4141 gcttgttattt acttctgttt tcaaaaaattt ttttaatgtg accatacctt ttatccat
4201 ttattgatatt aatttacaac aaaagattat acttgcaagc tttatggttt ttaaatggtc
4261 tttttgttag tgaatatcat atctaaatga tatctaaatg taaagtaaat catacctaaa
4321 tgaaaacata ttcttaaga cattataaaa tttccaggt gatcaatttt tctttaaata
4381 tactacataa aatgttattt actccccaaa tgatgttattt ttgtataatc ttaaatacca
4441 ataattacca ggtcttattt ggtttagtg taggataaaa aagaatgtgt tctttttct
4501 aggttagcatt ttaatgatca aagttggta cgtgacagag gtcttaagta ttatcaaaca
4561 gatgattat aagatgttattt cctcagactt ttccatataa aaggaaaaat gtctcaaatt
4621 catggaaaga ttggcacagg aggaggatta gcaaattgtt gtttaatattt ctgaatggaa
4681 acatttttta gtgaaagaat aaaggaaata tcattgtatc ttcttctgag tctgtgcctc
4741 tctctcttgg agtttagtctt tccaaacccta tatacttacc actatcttca tccctcttacc
4801 ttcccttttc ccattacatc tgtgcagttac tgggtggcaa ctattgtgtt tcgggtttaa
4861 catccaagtt tccctgaata agaccaagtg aatggaggat gaatgagttt acctatccct
4921 ccaggagtca tcagacatattt ttagccacca tatttaatca ataagcagga agacataaagc
4981 tagccttgc cctcttcttt cctccctgct cctttcttctt ctcttcccccc tctcccttta
5041 ctgtcatcca tcagtatttt cacagcatct attatgtgtc aggcatttcag atactcaaac

5101 ggaggaaaaac aagaataaac aagacaaaga tctgaccaca gggaatccc tatggctact
5161 gtagactttt gagccataaa ggaagaatca agcctagtgt aaatgaaaat tccttaatgc
5221 tgtgccttt aaaaagaaat gtgacataag caaaatgatt agtttcttt cttaataat
5281 gagtccttga ggtaggagag tgtttgaaa tctattatta actcttcttt ccttccata
5341 **cagactcctt** **ttttagaagt** **caaggtAAC** **gacacacAA** **aaagatctAG** **gagagatTTT**
5401 **gggcttgatt** **gtgatGAACA** **ctccacAGAA** **tctcgatGCT** **gtcgTTACCC** **tctaactGTG**
5461 **gatTTTGAAg** **ctttggATG** **ggattggATT** **attgcACCTA** **aaagatATAA** **ggccaATTAC**
5521 **tgctctggag** **aatgtGAATT** **tgtatTTTG** **caaaAGTATC** **ctcataACCA** **tcttGTGCAC**
5581 **caagcaaACC** **ccagaggTTc** **agccggcccc** **tgctgtactc** **ctacAAAGAT** **gtctccaATT**
5641 **aatatgCTAT** **atTTTAATGG** **cgaaggACAA** **ataatatacG** **ggaagATTCC** **agccatggTA**
5701 **gtagatcgct** **gtgggtgtTC** **atgaggtcta** **tattggTTc** **atagcttcct** **caaACatggA**
5761 **aggtcttccc** **ctcaacaATT** **ttgaaACTGT** **gaaATTATGT** **accacaggCT** **ataAGCCTAG**
5821 **agtatgCTAC** **agtcaCTAA** **gcacaAGCTA** **cagtATATGA** **gctAAAAGA** **gagaATATAT**
5881 **gctatggTTG** **gcatttaACC** **atcaAAACAA** **atcgtATAAT** **aaaACgtTTT** **atgatttCCA**
5941 **gagTTTTGA** **actaggAGAT** **caaATTCCAT** **ttatgttCAA** **atataATCACA** **acacATgcAG**
6001 **gtgaatgAAA** **gcaattCTCC** **ttgtcttCTG** **gtgaattAA** **ggagtATGCT** **ttaAAATCTA**
6061 **tttctttACA** **gtttcactta** **atatttACAG** **aaaaatCTAT** **atgtatgtATT** **ggtaAAATGC**
6121 **agtattgtta** **tataccATTA** **tttggAAACAT** **ccttaAACAC** **ttgaattttAT** **attgtatgtAT**
6181 **agcataACTG** **gtaagatGAG** **attccACAAA** **ataggGATGG** **cacaccGTAC** **gcaagttacc**
6241 **attcctatac** **tgattgatac** **agtacattaa** **cagTTTTGC** **caatggTGCT** **aatacaATAG**
6301 **gctgaatggc** **tgatgttATC** **aggTTTATCA** **agcaAAAAAC** **gttcaggAAA** **gtaataAGTT**
6361 **tctcctttct** **tcaggtgcAT** **tttcacACTC** **ctccCTATGG** **gcaatggatG** **ttctatAGAG**
6421 **aaagAAAact** **catttcCCTA** **gaggTCTACA** **ttcaattCTG** **tagcataACTT** **ggagaAGCTG**
6481 **cattgAAAAG** **gcagtcaAAA** **agtattcATT** **ttggTCAAA** **tttcaAAATT** **atgcctGCC**
6541 **tttgcataAC** **tgcaGCTTT** **aggatgAAATG** **actgattCTA** **tcaatATTG**
6601 **ataAAAAGAT** **tttggAAATAG** **ttgcattttAT** **ataatATGTA** **tacaatATTG** **ttttgtAAAT**
6661 **aaatgtctcc** **ttttttatTT** **actttggat** **atTTTACAG** **taaggACATT** **tcaaATTAAG**
6721 **tattaaggca** **caaagacATG** **tcatgtAGGA** **cataAAAGCA** **aaagcCTATA** **ttttggAGCA**
6781 **aattagttGA** **ttaaatAGTG** **gtcttaAAAC** **tccatATGCT** **aatggTTAGA** **tggttatTTT**
6841 **acaatcattt** **tatTTTTT** **tacatttATA** **gcattcACTT** **atggattCAT** **gatggCTGTA**

6901 taatgtgaat gtgaaatttc aatggttac tgtcattgta ttcaa atctc aacgttccat
6961 tatttaata cttataaata ttaagcatac caaaatgatt taactctatt atctgaaatc
7021 agaataataa actgatgata tcttacaaat tgtaatttt atttataat ttgataatga
7081 atatatttct gcatastatattt actactattt tgtaaatcag gattttgtta atcaaataaa
7141 ttgtacttat gattaagtga aattatttct tacatccaaat gtgtagaaac aatttaagtt
7201 atattaaagt gtttcaccc ttttgaaag acaacagttt catgttataa tgattaactc
7261 tagatttctg gtttccactt tattataaaa gtttaatgac tgagcacaaa agtttggttt
7321 agaaatttta ggtctgctac tctagttct catgagtgaa attcctgtta aattgggtct
7381 ggtcaagttg cttaaacat acaaaagcaa ggacttagcta catctgttc atttctctt
7441 atcttgacct gaaaactatt tatatgtttt cttaggttca atttccaaat gcattgcagt
7501 tggcaagggt atatggcct agagttacaa gttctactga agccacaggg acacagggag
7561 gctgcacattt ttcccgagca cttaatgaga ctgacacact tatctgagtt tgggggata
7621 catttcaaa ttgaactgag aaataattag gaagtgccta gaatccttac gtgcaacact
7681 atttatacat gttttgaag tgagctctt tctccactcc tggccagttt aataacttag
7741 ctctaaagaa gtgactatgt ttaatttagca gtgactaatt ctctctggtg ttctgagtt
7801 taaataaata atttataagt atgataaata c

ANEXO 2. Tabla con los genotipos de los animales analizados para los 9 polimorfismos capaces de alterar la función de la miostatina presentes en los animales de raza Parda de montaña secuenciados.

	<i>F94L</i>	<i>S105C</i>	<i>Nt419</i>	<i>D182N</i>	<i>Q204X</i>	<i>E226X</i>	<i>Nt821</i>	<i>E291X</i>	<i>C313Y</i>
D-8386	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CC	GG	GG
D-8616	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CC	GG	GG
D-8617	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CC	GG	GG
D-8758	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
D-9662	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CC	GG	GG
E-0006	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CC	GG	GG
E-0140	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CC	GG	GG
E-0345	CC	CC	-	-	-	-	CT	GG	GG
E-0346	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-0356	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-0359	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-0360	CC	CC	TT	GG	CC	GG	-	-	-
E-0371	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-0376	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-0378	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-0385	-	-	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-0401	CC	CC	TT	GG	CC	GG	-	-	-
E-0402	CC	CC	TT	GG	CC	GG	TT	GG	GG
E-0403	CC	CC	TT	GG	CC	GG	TT	GG	GG
E-0404	CC	CC	TT	GG	CC	GG	TT	GG	GG
E-0405	CC	CC	TT	GG	CC	GG	TT	GG	GG
E-0406	CC	CC	TT	GG	CC	GG	TT	GG	GG
E-0407	CC	CC	TT	GG	CC	GG	TT	GG	GG
E-0408	CC	CC	TT	GG	CC	GG	TT	GG	GG
E-0417	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-0421	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-0426	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-0428	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-0430	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-0435	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-0437	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-0440	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-1661	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CT	GG	GG
E-1662	CC	CC	TT	GG	CC	GG	TT	GG	GG
E-1663	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CC	GG	GG
E-1667	CC	CC	TT	GG	CC	GG	CC	GG	GG

ANEXO 3. Tabla con los genotipos de los animales analizados para los 4 polimorfismos silentes estudiados en los animales de raza Parda de montaña secuenciados.

	<i>nt267(A → G)</i>	<i>nt324(C → T)</i> ,	<i>nt387(G → A)</i>	<i>nt414(C → T)</i>
D-8386	AA	CC	GG	CC
D-8616	AA	CC	GG	CC
D-8617	AA	CC	GG	CC
D-8758	AA	CC	GG	CC
D-9662	AA	CC	GG	CC
E-0006	AA	CC	GG	CC
E-0140	AA	CC	GG	CC
E-0345	AA	CC	-	-
E-0346	AA	CC	GG	CC
E-0356	AA	CC	GG	CC
E-0359	AA	CC	GG	CC
E-0360	AA	CC	GG	CC
E-0371	AA	CC	GG	CC
E-0376	AA	CC	GG	CT
E-0378	AA	CC	GG	CC
E-0385	-	-	GG	TT
E-0401	AA	CC	GG	CC
E-0402	AA	CC	GG	TT
E-0403	AA	CC	GG	CT
E-0404	AA	CC	GG	CC
E-0405	AA	CC	GG	TT
E-0406	AA	CC	GG	TT
E-0407	AA	CC	GG	CC
E-0408	AA	CC	GG	TT
E-0417	AA	CC	GG	CC
E-0421	AA	CC	GG	CC
E-0426	AA	CC	GG	CC
E-0428	AA	CC	GG	TT
E-0430	AA	CC	GG	CC
E-0435	AA	CC	GG	TT
E-0437	AA	CC	GG	CC
E-0440	AA	CC	GG	CC
E-1661	AA	CC	GG	CC
E-1662	AA	CC	GG	CC
E-1663	AA	CC	GG	CC
E-1667	AA	CC	GG	CC