

IMPLEMENTACIÓN DE *REAL TIME* PCR-HRM PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL ALELO MUTANTE DE CVM EN BOVINOS HOLANDO

Branda Sica A.¹, Nicolini P.², Federici M.T.¹, Llambí S.³

La malformación vertebral compleja (CVM, OMIA 001340-9913) es una enfermedad autosómica recesiva que causa abortos y problemas perinatales en bovinos de la raza Holando. El objetivo de este estudio fue optimizar e implementar un *screening* molecular confiable y económico para la detección del alelo mutante (T) de CVM (c.559G>T; *SLC35A3*) mediante el análisis de curvas de disociación de alta resolución (HRM); así como analizar su presencia en una muestra representativa de 279 vacas Holando, pertenecientes a 6 tambos comerciales de diferentes regiones de Uruguay. La amplificación de los productos PCR de 79 pb se realizó en el equipo *RotorGene™ 6000* (Corbett Life Science, Australia) con un par de *primers* descritos por ZhiLing *et al.* (2015). Las reacciones de PCR en tiempo real fueron llevadas a cabo sobre un volumen final de 25 ml conteniendo: 50 ng de ADN genómico, 1X *HRM-PCR Master Mix* (kit *Type-it® HRM-PCR*, QIAGEN, Hilden, Alemania) y 0.7 mM de cada primer. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C; 40 ciclos de: 5s a 95 °C, 25s a 60 °C y 20s a 72 °C; dos *holds* de 10s a 95 °C y 1 min a 45 °C, respectivamente; y la fase de HRM con incrementos de 2s a 0,1 °C, entre 74,5 y 84,5 °C. El análisis HRM permitió diferenciar claramente los dos genotipos: homocigota, tipo silvestre (GG), y heterocigota (GT), portadora para la mutación de CVM. La frecuencia del alelo mutante (T) para CVM fue alta (0.032), con una prevalencia de vacas portadoras de 6.45%. Se concluye que el análisis PCR-HRM es una técnica rápida, fácilmente interpretable, de bajo costo y altamente precisa para la detección de esta mutación en bovinos Holando, la cual podría ser implementada en programas de selección genética.

Fuente de financiamiento: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, POS_NAC_2017_1_141239).

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), INIA Las Brujas, Unidad de Biotecnología, Rincón del Colorado, Uruguay.

²Universidad de la República, Centro Universitario de Tacuarembó, Instituto Superior de la Carne, Área Biología Molecular, Tacuarembó, Uruguay.

³Universidad de La República. Facultad de Veterinaria, Área Genética, Montevideo, Uruguay.

*E-mail: abranda@inia.org.uy