

Universidad Autónoma de Barcelona
Facultad de Veterinaria

**DETECCIÓN DE QTLs DE
IMPORTANCIA ECONÓMICA Y
ANÁLISIS DE GENES CANDIDATOS
EN POBLACIONES PORCINAS
COMERCIALES ESPAÑOLAS.**

TESIS DOCTORAL
GUILLERMO DÁVALOS ARANDA
Bellaterra (Barcelona), octubre 2002.

Armand Sánchez Bonastre, catedrático del departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Certifica:

Que **Guillermo Dávalos Aranda** ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación “Detección de QTLs de importancia económica y análisis de genes candidatos en poblaciones porcinas comerciales españolas” para obtener el grado de Doctor en Veterinaria.

Este trabajo se ha desarrollado en el laboratorio de Genética y Mejora del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Bellaterra, 4 de octubre del 2002.

Dr. Armand Sánchez Bonastre

Agradecimientos.

Al Dr. Armand Sánchez Bonastre por haberme brindado la oportunidad de obtener la formación doctoral bajo su dirección en el laboratorio de genética molecular del departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Al Dr. José María Folch, Neus Jiménez, Natalia Bello y Oriol Vidal quienes participaron activamente en el desarrollo de este estudio.

A los Drs. Olga Francino, Laura Altet, Alex Clop, Atilio Aranguren y en especial a Marcel Amills por toda la ayuda desinteresada recibida de su parte.

A todos los demás compañeros de la unidad de genética con los cuales compartí parte de estos cuatro años de formación.

Al Dr. José Luis Noguera y a su equipo de trabajo del UdL-IRTA de Lleida quienes en coordinación con COPAGA proporcionaron las muestras sanguíneas y de tejidos además de las medidas fenotípicas de las poblaciones porcinas Pietrain y Large White involucradas en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Luis Varona por la realización del análisis estadístico del presente estudio.

A los Drs. Antonio Salinas y Rafael Ramírez de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México por el apoyo brindado para el desarrollo de mi formación doctoral.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, México y a PROMEP por haberme otorgado la beca para el desarrollo de mi formación doctoral.

Resumen

El presente estudio se desarrolló bajo el marco del proyecto europeo PigQTech cuyo objetivo es investigar si QTLs de importancia económica en la industria productora porcina, previamente descritos en cruces de razas divergentes, se encuentran segregando en poblaciones comerciales. En el presente estudio se analizaron dos poblaciones porcinas de tipo comercial Pietrain y Large White, donde fue analizada la presencia de QTLs, búsqueda y análisis de genes candidatos. La búsqueda de QTLs se efectuó mediante el análisis de la segregación alelica de microsatélites y su relación con los caracteres productivos medidos. Se analizaron 10 regiones de los cromosomas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 13, tres de las cuales fueron utilizadas como regiones control (1, 6, 9) por no haber QTLs descritos previamente en ellas. Los resultados muestran segregación de QTLs para los cromosomas 2, 3, 4, 7 y para las regiones control 1 y 9 en la población Large White, mientras en la población Pietrain se detectaron QTL en los cromosomas 7 y 8. En resumen, se observó que los QTLs descritos en cruces de razas divergentes están presentes en poblaciones comerciales, sin embargo no segregan por igual entre las distintas poblaciones.

Adicionalmente se realizó un estudio de asociación de los genes candidatos *H-FABP*, receptor de leptina (*LEPR*) y la piruvato carboxilasa (*PC*). El gen *H-FABP* reveló la existencia de asociación entre los distintos genotipos para los caracteres de grasa dorsal, longitud de canal y pH, sin embargo estas asociaciones no se presentan por igual en las distintas poblaciones. El análisis de asociación del gen receptor de leptina reveló la existencia de asociación entre sus distintos genotipos con un menor pH a las 24 horas postmortem, sin embargo esta asociación se presentó solo en la población Large White. La secuenciación del cDNA del gen de la piruvato carboxilasa reveló una alta similitud nucleotídica con la de otras especies de mamíferos, y que además es polimórfica. Así mismo el mapeo mediante el panel de células somáticas híbridas irradiadas reveló que el gen de la *PC* está localizado en el cromosoma 2 en el brazo p entre los microsatélites SW2623 (9.8 cM) y el SW256 (19 cM).

Detection of economically important QTLs and analysis of candidate genes in Spanish commercial pig populations.

Doctoral thesis

Guillermo Dávalos Aranda

Bellaterra (Barcelona), October 2002

Summary

The present study was developed under the framework of the European PigQTech project, whose objective was to investigate the segregation of economically important QTLs previously described in divergent pig crosses in commercial populations. In the present study, we analysed the segregation of QTL and candidate genes in Pietrain and Large White. The search of QTLs was made by the analysis of the microsatellite allelic segregation and its influence on the recorded commercial traits. Ten regions on chromosomes 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 and 13 were analysed. As no QTL had been previously described in the regions located in chromosomes 1, 6 and 9, we used these segments as control regions. In Large White, results showed segregation of QTLs in chromosomes 2, 3, 4 and 7 as well as in the Ssc1 and Ssc9 control regions. The analysis in Pietrain indicated the presence of QTL in chromosomes 7 and 8. In summary, we observed that QTLs described in experimental pig crosses are also present in commercial breeds. However these QTLs do not show the same segregation pattern among different populations.

Additionally, we carried out an association analysis of the heart fatty acid binding protein (H-FABP), leptin receptor (LEPR) and pyruvate carboxylase (PC) candidate genes. The association analysis between H-FABP and the recorded traits, revealed the influence of this gene on back fat thickness, carcass length and pH in some of our populations. Influence of LEPR on the pH at 24 hours postmortem was detected in Large White. The analysis of the nucleotidic sequence of the PC cDNA, revealed both a high similarity between other mammal species, and the existence of sequence polymorphism in our populations. Furthermore, we allocated PC in the short arm of chromosome 2 (2p), between the markers SW2623 (9.8 cM) and SW256 (19 cM) in an RH panel.

INDICE

I. Introducción.

I.1. Mejora genética porcina.	3
I.1.1. Objetivos y criterios de selección.	4
I.1.2. Razas porcinas europeas.	6
I.1.3. Factores que inciden en la mejora porcina.	7
I.2. Caracteres de calidad de la canal y de carne en porcinos.	7
I.2.1. Parámetros genéticos.	9
I.2.1.1. Heredabilidad.	9
I.2.1.2. Correlaciones genéticas.	10
I.3. Genes mayores y caracteres de calidad de carne en porcino.	11
I.3.1. Gen <i>RYS1</i> .	12
I.3.2. Gen <i>Protein quinasa</i> activada por AMP no catalítica gamma 3 (<i>PRKAG3</i>).	13
I.3.3. Otros genes involucrados en la calidad de carne porcina.	14
I.3.3.1. <i>Heart fatty acid binding protein (HFABP)</i> .	14
I.3.3.1.1. Funciones fisiológicas del gen <i>HFABP</i> .	15
I.3.3.1.2. Características estructurales y regulación de la expresión del gen	
<i>HFABP</i> .	15
I.3.3.2. Gen receptor de leptina.	18
I.3.3.2.1. Funciones fisiológicas del gen receptor de leptina.	18
I.3.3.2.2. Características estructurales y regulación de la expresión del gen	
receptor de leptina.	19
I.4. Gen de la piruvato carboxilasa (<i>PC</i>).	20
I.4.1. Funciones fisiológicas del gen de la piruvato carboxilasa.	20
I.4.2. Características estructurales y regulación de la expresión del gen de la	
piruvato carboxilasa.	21
I.5. Construcción de mapas físicos y genéticos en porcino.	23
I.5.1. El genoma nuclear porcino.	23
I.5.2. Mapas físicos.	24
I.5.3. Mapas genéticos o de ligamiento.	27
I.5.3.1. Marcadores genéticos.	27
I.5.3.2. Polimorfismos de proteínas.	29
I.5.3.3. RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).	29

I.5.3.4. RAPDs (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>).	30
I.5.3.5. AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>).	31
I.5.3.6. RDA (<i>Representational Diference Analysis</i>).	31
I.5.3.7. Microsatélites y minisatélites.	32
I.5.3.8. SSCP (<i>Single Strand Conformational Polymorphism</i>).	35
I.5.3.9. DGGE (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>).	36
I.5.3.10. SNP (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>).	36
I.6. Pedigrí familiar.	38
I.7. Mapa genético porcino.	38
I.7.1. PiGMaP <i>Consortium</i> .	39
I.7.2. Mapa Nórdico.	40
I.7.3. USDA-MARC.	40
I.8. Detección y localización de QTLs.	41
I.8.1. Métodos estadísticos para la detección de QTLs.	42
I.8.1.1. Aproximación con un solo marcador.	42
I.8.1.2. <i>Interval Mapping</i> .	42
I.8.1.3. Método de regresión con múltiples marcadores y mínimos cuadrados.	43
I.8.1.4 Factor Bayes para detección de QTLs.	43
I.9. QTLs detectados en porcinos.	44
I.9.1. QTLs asociados a caracteres de calidad de la canal.	44
I.9.2. QTLs asociados a caracteres de calidad de la carne.	46
I.10. <i>Imprinting</i> .	48
I.11. Alelos nulos y homoplasia.	48
I.11.1. Alelos nulos.	48
I.11.2. Homoplasia.	50
II. Objetivos.	51
II.1. Objetivo general.	53
II.2. Objetivos específicos del presente estudio.	53
III. Material y Métodos.	55
III.1. Material Animal.	58
III.1.1. Caracteres productivos valorados.	59

III.1.2. Transporte de los cerdos al matadero.	59
III.1.3. Caracteres de la canal.	59
III.1.4. Caracteres de la calidad de carne.	60
III.2. Análisis de microsatélites.	60
III.2.1. Extracción de ADN.	60
III.2.2. Cuantificación de ADN.	62
III.2.3. Selección de los marcadores moleculares microsatélites.	63
III.2.4. Condiciones de amplificación de PCR.	67
III.2.5. Análisis de los productos de PCR.	68
III.3. Genotipado del gen <i>RYR1</i> (<i>Ryanodine Receptor</i>).	71
III.4. Genotipado del gen <i>heart fatty acid-binding protein</i> (<i>H-FABP</i>).	73
III.5. Genotipado del gen receptor de leptina.	76
III.6. Métodos estadísticos.	79
III.7. Caracterización de genes candidato.	83
III.7.1. Extracción y purificación de RNA.	83
III.7.1.1. Consideraciones generales para una buena extracción de RNA.	83
III.7.1.2. Colección de biopsias para extracción de RNA.	84
III.7.1.3. Procedimiento para la extracción de RNA.	84
III.7.1.4. Cuantificación de RNA.	84
III.7.2. Procedimiento para la búsqueda de genes candidato.	85
III.7.3. Gen de la piruvato carboxilasa.	85
III.7.3.1. Diseño de cebadores para amplificar el gen de la piruvato carboxilasa.	85
III.7.3.2. Condiciones de amplificación por PCR del gen de la piruvato carboxilasa.	86
III.7.3.3. Valoración del producto amplificado del gen de la piruvato carboxilasa.	86
III.7.3.4. Purificación del producto de PCR del gen de la piruvato carboxilasa.	87
III.7.3.5. Valoración del producto de PCR purificado.	88
III.7.3.6. Condiciones de PCR para secuenciación.	88
III.7.3.7. Secuenciación del gen de la piruvato carboxilasa.	89

III.8. Panel de células híbridas irradiadas <i>IMpRH</i> .	89
III.8.1. Diseño de cebadores para posicionar el gen de la piruvato carboxilasa en el mapa del genoma porcino.	90
III.8.2. Amplificación del gen de la piruvato carboxilasa en el panel de células somáticas <i>RH</i> .	90
IV. Resultados.	93
IV.1. Elección de marcadores microsatélites.	95
IV.2. Contenido de información polimórfica.	95
IV.3. Elección de individuos de acuerdo al genotipado de los microsatélites.	99
IV.4. Caracteres de desarrollo, graso y de calidad de carne.	100
IV.4.1. Caracteres de crecimiento.	100
IV.4.2. Deposición de grasa.	102
IV.4.3. Caracteres de calidad de carne.	103
IV.5. Genes candidatos en la población de la raza Pietrain.	105
IV.5.1. Estudio de asociación del gen receptor de rianodina en la población Pietrain.	105
IV.5.2. Estudio de asociación del gen receptor de la leptina en la población Pietrain.	106
IV.5.3. Estudio de asociación del polimorfismo de restricción <i>Hae</i> III del gen <i>H-FABP</i> en la población Pietrain.	106
IV.5.3.1. Estudio de asociación del polimorfismo de restricción <i>Hinf</i> I del gen <i>H-FABP</i> en la población Pietrain.	106
IV.5.4. Estudio de asociación del gen receptor de rianodina en la población Large White.	107
IV.5.5. Estudio de asociación del gen receptor de leptina en la población Large White.	112
IV.5.6. Estudio de asociación del polimorfismo localizado en el intron 2 del gen <i>Heart Fatty Acid Binding Protein</i> en la población Large White.	112
IV.6. Resultado de la búsqueda de genes candidatos.	112
IV.6.1. Resultados de la secuenciación del gen de la piruvato carboxilasa.	113

IV.6.2. Mapeo del gen de la piruvato carboxilasa en porcino.	116
V. Discusión.	119
V.1. Identificación de QTLs.	123
V.2. Contenido de información polimórfica.	123
V.3. Regiones cromosómicas analizadas.	124
V.3.1. Cromosoma 1 (Región control).	124
V.3.2. Cromosoma 2.	126
V.3.3. Cromosoma 3.	129
V.3.4. Cromosoma 4.	131
V.3.5. Cromosoma 6 (Región control).	137
V.3.6. Cromosoma 7.	141
V.3.7. Cromosoma 8.	145
V.3.8. Cromosoma 9 (Región control).	148
V.3.9. Cromosoma 10.	150
V.3.10. Cromosoma 13.	151
V.4. Genes candidatos.	156
V.4.1. Gen del receptor de la rianodina (<i>RYR1</i>).	156
V.4.1.1 Caracteres del desarrollo influenciados por el gen <i>RYR1</i> .	156
V.4.1.2 Caracteres de deposición grasa influenciados por el gen <i>RYR1</i> .	157
V.4.1.3 Caracteres de calidad de la carne influenciados por el gen <i>RYR1</i> .	157
V.4.2. <i>Heart fatty acid binding protein (H-FABP)</i> .	163
V.4.2.1 Caracteres de desarrollo influenciados por el gen <i>H-FABP</i> .	163
V.4.2.2 Caracteres de deposición grasa influenciados por el gen <i>H-FABP</i> .	164
V.4.2.3 Caracteres de calidad de la carne influenciados por el gen <i>H-FABP</i> .	165
V.4.3 Gen receptor de leptina.	167
V.4.4 Gen de la piruvato carboxilasa.	168
VI. Conclusiones.	169
VII. Referencias bibliográficas.	173