



**Mapeo fino de QTL y análisis  
de genes candidatos  
relacionados con el  
metabolismo lipídico en un  
cruce de Ibérico x Landrace**

**Anna Mercadé Carceller**

Vull aprofitar per donar les gràcies a totes aquelles persones que han participat en aquest treball i que sense el seu ajut no hauria estat possible.

En primer lloc vull donar les gràcies al Dr. Armand Sánchez per dos motius: per donar-me l'oportunitat de poder treballar en el seu grup i realitzar aquesta tesi i per ser un dels meus directors de tesi.

Al Dr. Josep M. Folch per ser el meu director de tesi i per tot el seu ajut, coneixements i consells.

Al Dr. Miguel Pérez-Enciso per la seva implicació i ajuda en diferents treballs d'aquest projecte.

Al Dr. Marcel Amills pels seus consells i coneixements.

A la Dra. Olga Francino pels seus consells i perquè sempre troba un moment per solucionar problemes variis.

A la Dra. Anna Castelló pel seu ajut en resoldre dubtes, sobretot “quantitatius”.

A la Dra. Laura Altet pel seu ajut en resoldre dubtes tècnics.

A tots els companys del departament: a l'Abid pel seu optimisme incondicional, a l'Ana O. per la seva voluntat, a l'Anna T. perquè sempre pots comptar amb el seu ajut i per TOTS els moments de la “nostra estada parisenca...” que són molts!, , a la Betlem pel seu entusiasme, al David pel seu positivisme, a l'Elisenda per la seva constància, al Josep per la seva disposició, al Jordi pel seu ajut i suport inestimable, a la Maria B. per la seva amistat i pels seus consells i ajut sempre que els he necessitat, a la Maria S. per la seva empenta, a la Maribeli perquè sempre ha estat disposada a donar un cop de mà i per la seva amistat, ah! i pel CAP..., a la Marimar per la seva vessant “d'intèrpret”, a la Marta pel seu positivisme, a la Natàlia per la seva energia, a la Neus per estar pendent dels detalls i “pel subministre de material a França”, a l'Oriol pels seus consells, a l'Oscar pel seu art... marcial, al Quim C. pel seu bon humor, al Quim T. per les estones a Jouy, a la Yolanda pels bons moments.

Al Dr. Jesús Piedrafia i al Dr. Jordi Jordana pels seus coneixements.

A totes les persones del INIA, de la UdL-IRTA, de la UAB i d'altres institucions que han participat en aquest projecte.

Als meus pares per donar-me el seu suport i perquè sempre he pogut comptar amb ells, gràcies!

A l'Ivan per estar al meu costat, pel seu suport i ajuda en tots moments,... per TOT!

A la resta de la meva família i amics pels seus ànims.



---

|   |          |
|---|----------|
| <b>RESUMEN / SUMMARY</b>  | <b>1</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>  |          |
| 1.1. Sector porcino y mejora genética                           | 3        |
| 1.2. Marcadores moleculares                                     | 5        |
| 1.2.1. Microsatélites   | 6        |
| 1.2.2. SNP  | 7        |
| 1.2.2.1. PCR-RFLP   | 7        |
| 1.2.2.2. Primer extension analysis                              | 9        |
| 1.2.2.3. Pirosecuenciación                                      | 9        |
| 1.2.3. AFLP ( <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> )   | 10       |
| 1.2.4. RAPD ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> )         | 11       |
| 1.3. Cartografía del genoma porcino                             | 11       |
| 1.3.1. Mapas genómicos  | 11       |
| 1.3.1.1. Mapas genéticos o de ligamento                         | 11       |
| 1.3.1.2. Mapas físicos  | 13       |
| 1.3.2. Secuenciación del genoma porcino                         | 14       |
| 1.4. Identificación de QTL                                      | 15       |
| 1.4.1. Diseño experimental                                      | 16       |
| 1.4.2. Genotipado de la población                               | 18       |
| 1.4.3. Metodología estadística                                  | 18       |
| 1.5. Detección de QTL en porcino                                | 20       |
| 1.5.1. Caracteres de crecimiento y calidad de la canal          | 24       |
| 1.5.2. Caracteres de calidad de la carne                        | 27       |
| 1.5.3. QTL detectados por el proyecto IBMAP                     | 29       |
| 1.6. Identificación de la mutación causal del QTL               | 31       |
| 1.6.1. Clonación por posición                                   | 31       |
| 1.6.2. Genes candidatos   | 31       |
| 1.6.3. Genes candidatos por posición                            | 31       |
| 1.7. Análisis de genes candidatos porcinos                      | 33       |
| 1.7.1. Genes candidatos analizados en el proyecto IBMAP         | 34       |
| 1.7.2. <i>Acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGATI)</i> | 35       |
| 1.7.3. <i>Adipocyte fatty-acid binding protein (FABP4)</i>      | 39       |
| 1.7.4. <i>CDP-diacylglycerol synthase 1 (CDS1)</i>              | 43       |
| 1.7.5. <i>Acyl-CoA synthetase long-chain 4 (ACSL4)</i>          | 46       |

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>2. OBJETIVOS</b>   | <b>49</b>  |
| <br>  |            |
| <b>3. RESULTADOS</b>  |            |
| 1. <b>On growth, fatness and form: A further look at porcine's chromosome 4 in an Iberian x Landrace cross</b> en <i>Mammalian Genome</i> (2005a) 16(5):374-382   | <b>50</b>  |
| 2. <b>Large scale, multibreed multitrait analyses of QTL experiments: The case of porcine X chromosome</b> en <i>Journal of Animal Science</i> (2005) 83:2289-2296  | <b>59</b>  |
| 3. <b>Characterization of the porcine <i>acyl-CoA synthetase long-chain 4 (ACSL4)</i> gene and its association with growth and meat quality traits</b> aceptado en <i>Animal Genetics</i> (2006a)   | <b>67</b>  |
| 4. <b>Exclusion of the <i>acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1</i> gene (<i>DGAT1</i>) as a candidate for a fatty acid composition QTL on porcine chromosome 4</b> en <i>Journal of Animal Breeding and Genetics</i> (2005b) 122:161-164 | <b>89</b>  |
| 5. <b><i>Adipocyte fatty-acid binding protein 4</i> is closely associated to the porcine <i>FATI</i> locus on chromosome 4</b> enviado a <i>Journal of Animal Science</i> (2006b)   | <b>93</b>  |
| 6. <b>Characterization and physical mapping of the porcine <i>CDS1</i> and <i>CDS2</i> genes</b> aceptado en <i>Animal Biotechnology</i> (2006c)  | <b>114</b> |
| 7. <b>Assignment of the <i>acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4)</i> gene to porcine chromosome X</b> en <i>Animal Genetics</i> (2005c) 36:76  | <b>141</b> |
| <br>  |            |
| <b>4. DISCUSIÓN</b>   |            |
| 4.1. Mapeo fino de la posición de QTL   | <b>142</b> |
| 4.1.1. Mapeo fino del cromosoma 4   | <b>145</b> |
| 4.1.2. Mapeo fino del cromosoma 8   | <b>149</b> |
| 4.1.3. Mapeo fino del cromosoma X   | <b>151</b> |

---

|  |            |
|--|------------|
| 4.1.4. Mapeo fino del cromosoma 2  | 155        |
| 4.2. Análisis de genes candidatos  | 156        |
| 4.2.1. Genes candidatos analizados   | 157        |
| 4.2.1.1. <i>Acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1)</i>  | 158        |
| 4.2.1.2. <i>Adipocyte fatty-acid binding protein (FABP4)</i>   | 162        |
| 4.2.1.3. <i>CDP-diacylglycerol synthase 1 (CDS1)</i>   | 168        |
| 4.2.1.4. <i>Acyl-CoA synthetase long-chain 4 (ACSL4)</i>   | 172        |
| 4.3. Discusión general   | 177        |
| <b>5. CONCLUSIONES</b>   | <b>179</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>182</b> |
| <b>7. ANEXOS</b>   |            |
| 1. Marcadores excluidos del análisis de QTL por su baja informatividad o dificultad de amplificación y marcadores genotipados en la F <sub>3</sub> y RC  | 198        |
| 2. <b>Effect of the porcine <i>IGF2</i>-intron3-G3072A substitution in an outbred Large White population and in an Iberian by Landrace.</b> <i>Journal of Animal Science</i> (2005) 83(12):2723-2728 | 200        |
| 3. Alineamiento de la región homóloga de 374 aa de los genes <i>CDS1</i> y <i>CDS2</i> de diferentes especies mediante el programa Clustal X   | 205        |

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

- Figura 1.1:** Electroferograma de tres microsátélites obtenidos con el *software GeneMapper<sup>TM</sup>* (Applied Biosystems). El genotipo del primer microsátélite es heterocigoto 102-110, el segundo es heterocigoto 120-130 y el tercero, homocigoto 178. 7
- Figura 1.2:** Genotipado por PCR-RFLP de la mutación del gen *RYR1*. Los individuos homocigotos NN tienen un patrón de bandas de 135 y 524 pb (pozos 3, 4, 6). Los homocigotos nn presentan un patrón de bandas de 358, 166 y 135 (pozos 1, 2). Los heterocigotos Nn tienen las cuatro bandas (pozos 5, 7, 8). En el pozo 9 hay el control negativo. En el pozo 10 hay el fragmento de PCR sin digerir (659 pb). En el pozo 11 hay un marcador de tamaño. 8
- Figura 1.3:** Reacción de extensión y electroferograma. El primer SNP sería heterocigoto G/A (de color azul y verde) y el segundo, homocigoto T/T (de color rojo). Adaptada de Applied Biosystems. 9
- Figura 1.4:** **a)** Esquema de la reacción de pirosecuenciación (AB Pyrosequencing). **b)** Pirograma obtenido para un individuo heterocigoto G/- para un indel en el gen *FABP4*. 10
- Figura 1.5:** Mapa de ligamiento del cromosoma 4 porcino (USDA-MARC). 13
- Figura 1.6:** Cruce experimental IBMAP. 17
- Figura 1.7:** Mapa comparativo del cromosoma 4 del cerdo, que contiene regiones homologas con los cromosomas 8 y 1 humanos (<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare.htm>). 32
- Figura 1.8:** Reacción catalizada por el DGAT1 (Adaptada Buhman *et al.* 2001). 36
- Figura 1.9:** Representación de la función de los FABP en la captación y transporte intracelular de ácidos grasos. FA: *fatty acid*; VLDL: *very low density lipoprotein*; chylos: *chylomicrons*; LPL: *lipoprotein lipase*; ECF: *extracellular fluid*; M: *membrane-associated FA transport protein*; ER: *endoplasmic reticulum*; FAAR: *fatty acid-activated receptor*; FARE: *fatty acid-responsive element*. (Zimmermann y Veerkamp, 2002). 41



|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1.10:</b> Biosíntesis de los fosfolípidos a partir de glicerol-3-fosfato. ACS: acil-CoA sintetasa; CDS: CDP-diacilglicerol; CL: cardiolipina; DG: diacilglicerol; AG: ácido graso; G-3-P: glicerol-3-fosfato; GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferasa; AP: ácido fosfatídico; PAP: ácido fosfatídico fosfatasa; PC: fosfatidilcolina; PE; fosfatidiletanolamina; PG: fosfatidilglicerol; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina (Adaptada de Vance y Vance, 2004).   | <b>43</b> |
| <b>Figura 1.11:</b> Ciclo de los fosfoinosítidos. La fosfolipasa C (PLC) hidroliza fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP <sub>2</sub> ) para generar inositol trifosfato (IP <sub>3</sub> ) y diacilglicerol (DAG). Para regenerar PIP <sub>2</sub> , el DAG es fosforilado por la DAG quinasa para obtener ácido fosfatídico (PA). El CDS añade un CMP al PA. Este producto, CDP-diacilglicerol, es el proporciona el grupo fosfatidil al inositol. El fosfatidilinositol (PI) es fosforilado por la PI quinasa y PIP quinasa para generar PIP <sub>2</sub> (Wu <i>et al.</i> 1995). | <b>45</b> |
| <b>Figura 1.12:</b> Reacción catalizada por el ACSL para la síntesis de acil-CoA (Adaptada de Suzuki <i>et al.</i> 1990).   | <b>46</b> |
| <b>Tabla 1.1:</b> QTL detectados por diferentes grupos (Rothschild y Bidanel, 2002).  | <b>21</b> |
| <b>Tabla 1.2:</b> Caracteres con mayor número de QTL descritos (pigQTLdb).  | <b>22</b> |
| <b>Tabla 1.3:</b> Cronología de los QTL descritos (pigQTLdb).   | <b>23</b> |
| <b>Tabla 1.4:</b> QTL detectados por el proyecto IBMAP.   | <b>29</b> |
| <b>Tabla 1.5:</b> Miembros de la familia génica de los iLBP (Adaptada de Vogel Hertzell y Bernlohr, 2000 y Haunerland y Spener, 2004).  | <b>40</b> |
| <b>Tabla 1.6:</b> Nomenclatura revisada de la familia ACSL (Adaptada de Mashek <i>et al.</i> 2004).   | <b>47</b> |

## DISCUSIÓN

- Figura 4.1:** Informatividad de los 18 marcadores seleccionados para realizar el mapeo fino. 143
- Figura 4.2.** Mapa de ligamiento del cromosoma 4 porcino (SSC4). Los marcadores que flanquean el locus *FATI* están enmarcados en rojo. Adaptada de Moller *et al.* 2004. 147
- Figura 4.3:** Mapa comparativo del cromosoma 4 porcino (SSC4), cromosomas 1 y 8 humanos (HSA1/HSA8) y cromosomas de ratón. Las distancias en porcino están en Rays y en humano en Mbp. Los genes enmarcados indican una posible inversión del orden de los genes entre humano y porcino. La localización del *FATI* QTL está indicada con una barra roja (Moller *et al.* 2004). 148
- Figura 4.4:** Perfiles del  $-\log_{10}$  del valor de P de los QTL significativos descritos mediante en el análisis univariado. La línea horizontal en el valor 2 indica el nivel de significación del 0,01. LW: peso vivo; b\*: valor Minolta b\*; ph24h: pH a las 24h postmortem; %MF: % grasa muscular; C16:1: palmitoleico; ACL: longitud media de la cadena de los ácidos grasos; a\*: valor Minolta a\*. 151
- Figura 4.5.** Mapa comparativo humano-porcino del cromosoma 4 porcino (Fujishima-Kanaya *et al.* 2003). 161
- Figura 4.6.** Mapa comparativo cerdo-humano del cromosoma 4 porcino. ([http://www. ag.unr.edu/beattie/](http://www.ag.unr.edu/beattie/)). En este mapa aparece el mapa de ligamiento y físico (mapa RH) del cromosoma 4 porcino y su región de homología con los cromosomas 1 y 8 humano. 167
- Figura 4.7.** Mapa de ligamiento del cromosoma X porcino. A la derecha en rojo aparecen los 7 genes cartografiados por Cepica *et al.* 2004. Adaptada de USDA-MARC. 176
- Tabla 4.1:** Marcadores seleccionados para el mapeo fino. 144
- Tabla 4.2:** Resultados del análisis de QTL mediante un modelo univariado. 150
- Tabla 4.3:** Polimorfismos detectados en los tres machos Ibéricos y en las siete hembras Landrace secuenciadas. 163
- Tabla 4.4.** Estructura del gen *CDS1* porcino. 169
- Tabla 4.5.** P valor de los QTL y del análisis de asociación. 174

## RESUMEN

El objetivo principal de los proyectos IIBM-2 (MICYT AGF99-0284-C02) y de su continuación (INIA CPE03-010-C3) en los que se engloba el presente trabajo, es el refinamiento de la posición de los principales *quantitative trait loci* (QTL) detectados previamente en el cruce IIBM relacionados con caracteres de calidad de la canal, de la carne y metabolismo lipídico. Para llevar a cabo este objetivo se ha incrementado el número de marcadores dentro de la región de los QTL y también se ha aumentado el número de meiosis informativas al añadir una generación F<sub>3</sub> y un retrocruce.

En los cromosomas 4, 8 y X se ha reducido el intervalo de confianza de la mayoría de QTL descritos previamente y además, se han detectado QTL nuevos en los tres cromosomas. Asimismo, la metodología estadística aplicada ha permitido determinar la presencia de al menos dos QTL para los caracteres estudiados en los cromosomas 4 y X.

Paralelamente, otro objetivo de estos proyectos era el análisis de genes candidatos posicionales para los QTL de los cromosomas 4, 8 y X relacionados con el metabolismo lipídico. En el presente trabajo se han estudiado los genes *FABP4*, *DGATI*, *ACSL4*, *CDS1* y *CDS2*. Tres de ellos, el *ACSL4*, el *CDS1* y el *CDS2* han sido aislados y secuenciados por primera vez en porcino.

Se han identificado polimorfismos en todos los genes mediante secuenciación. Sin embargo, la mayoría de polimorfismos se localizan en intrones o en regiones no codificantes. Únicamente se han detectado dos polimorfismos en el gen *CDS1* que implican cambio aminoacídico. Además, para estos genes se ha analizado la distribución de las frecuencias alélicas en diferentes razas. También se ha determinado la localización cromosómica de los genes *DGATI*, *ACSL4*, *CDS1* y *CDS2* mediante el panel de células somáticas híbridas irradiadas IMpRH. Se ha analizado el patrón de expresión de los genes *ACSL4* y *CDS1* y se ha caracterizado un procesamiento alternativo en el ARNm del gen *ACSL4*. Finalmente, con los polimorfismos de los genes *FABP4* y *ACSL4* se han realizado estudios de asociación para determinar el efecto de estas variantes genéticas. Se han encontrado asociaciones significativas con la deposición de grasa dorsal y con el contenido de ácido oleico para el *FABP4* y *ACSL4*, respectivamente. Sin embargo, no podemos concluir que estos polimorfismos sean la mutación causal, únicamente se puede afirmar que ésta se encuentra en un locus próximo.

## SUMMARY

The main objective of the IBMAP-2 project (MCYT AGF99-0284-C02) and its extension (INIA CPE03-010-C3), in which the present work is included, is the fine mapping of the quantitative trait loci (QTL) previously detected in the IBMAP cross affecting carcass, meat quality and fatness traits. To achieve this objective a larger number of markers were added in the QTL regions and a F<sub>3</sub> generation and a backcross were included.

The confidence interval of the QTL previously described in the chromosomes 4, 8 and X has been narrowed and new QTL have been detected in these chromosomes by fine mapping. Moreover, at least two QTL have been determined for the traits studied in the chromosomes 4 and X by the statistics applied.

Another objective of these projects was the analysis of positional candidate genes for QTL affecting lipid metabolism detected in the chromosomes 4, 8 and X. In the present work, the *FABP4*, *DGATI*, *ACSL4*, *CDS1* and *CDS2* genes have been studied. Three of them, the *ACSL4*, *CDS1* and *CDS2* have been isolated and sequenced for first time in porcine.

Polymorphisms have been identified in these genes by sequencing. Nevertheless, most of these polymorphisms are in the introns or in noncoding regions. Only two polymorphisms detected in the *CDS1* gene imply aminoacid replacement. Moreover, the allele frequencies of these genes have been analysed in different breeds. The chromosomal location of the *DGATI*, *ACSL4*, *CDS1* and *CDS2* genes has been determined using the INRA-University of Minnesota porcine radiation hybrid panel (IMpRH). In addition to this, the expression of the *ACSL4* and *CDS1* has been analysed and an alternative splicing of the RNAm of the *ACSL4* gene has been characterized.

Finally, association studies have been performed to determine the effect of the *FABP4* and *ACSL4* genes. Significant associations with backfat and percentage of oleic fatty acid have been found for the *FABP4* and *ACSL4*, respectively. Nevertheless, we cannot conclude that these polymorphisms are the causal mutation of the QTL analysed, we only can state that the causal mutation is in a close locus.

# **INTRODUCCIÓN**

## **1.1.Sector porcino y mejora genética**

El sector porcino juega un papel importante dentro de la producción animal ya que representa casi el 50% de la carne consumida a nivel mundial (Aumaitre, 2001). La importancia del ganado porcino en nuestro país queda reflejada cuando se observan las estadísticas del sector ganadero. Con referencia al censo animal, España, precedido de China, Brasil y Alemania, es el cuarto país con mayor número cabezas. A nivel europeo, España es el segundo país seguido de Alemania con mayor censo de animales, con una tasa de crecimiento del 2,1% durante el período del 1999-2004 (GLiPHA; <http://www.fao.org/ag/aga/glipha>).

Con referencia a la producción, España, precedido de China, EUA y Alemania, es el cuarto país con una mayor producción, siendo de 3,3 millones de toneladas de carne y con un crecimiento del 2,9% durante el 1999-2004 (GLiPHA). Además, el sector porcino es el primer sector de la ganadería española con una producción anual que supone más de 4.000 millones de euros al año, lo que le coloca como el segundo productor de la Europa de los 25 tras Alemania y el segundo país tras Dinamarca con mayor consumo de este tipo de carne (66 kg por cápita en el año 2004) (MAPA; <http://www.mapya.es/>).

Dentro del territorio español, Cataluña es la comunidad autónoma con mayor censo de ganado porcino, seguido de Castilla y León y Aragón pero con un censo de la mitad de animales. Asimismo, un 67% de la producción ganadera catalana es de carne de porcino (DARP; <http://www.gencat.net/darp/>). Aquí también se debe considerar que en los últimos años Cataluña ha sufrido diferentes brotes de peste porcina clásica en los que se tuvieron de sacrificar miles de animales.

De forma general, para una óptima producción se requieren tasas de crecimiento eficientes, buenos índices de conversión y una buena conformación de la canal y calidad de la carne. Por otra parte, también se deben conseguir buenos índices reproductivos, elevada supervivencia de los lechones y resistencia a enfermedades. Además, los consumidores están cada vez más sensibilizados y exigen otras características como la ausencia de antibióticos en la carne o el bienestar animal. Como se irá presentando al largo del presente trabajo, la genética desempeña una labor importante para conseguir gran parte de estos objetivos.

La mejora genética se basa en la selección y en los cruzamientos para aprovechar la variabilidad existente entre las diferentes razas. Al establecer los objetivos de selección se debe tener en cuenta que sean limitados, fijados a medio-largo plazo, fácilmente medibles y correlacionados favorablemente entre ellos (Tibau, 1992), ya que se debe considerar que hay caracteres que presentan correlaciones negativas. Por ejemplo, los caracteres de calidad de la canal afectan negativamente a los de calidad de la carne o a la reproducción.

Los objetivos de selección han ido cambiando al largo de los años en función de la demanda. Durante los años 80 se centraban en caracteres de conformación de la canal, principalmente en el porcentaje de magro. Durante los 90, aparecieron los relacionados con calidad de la carne y crecimiento, disminuyendo la importancia de los anteriores y, ya en el 2000, los caracteres para calidad de la carne y de la grasa son los objetivos fundamentales. Sin embargo, la selección durante tantos años para reducir el contenido de grasa en la canal ha causado también una disminución del porcentaje de grasa intramuscular. Esta disminución no es un efecto deseado ya que la grasa intramuscular está relacionada con una carne tierna y gustosa (Cameron, 1990). Se ha determinado que hace falta un 2% de grasa intramuscular para que estos efectos se detecten en la carne (Fernández *et al.* 1999). Asimismo, la calidad de la carne también está influida por otros factores como el pH post-mortem, la composición de ácidos grasos, la capacidad de retención de agua o la estructura histoquímica de las fibras musculares (Cameron *et al.* 2000; van Laack *et al.* 2001; Paszek *et al.* 2001).

Por otro lado también se deben tener en cuenta la heredabilidades ( $h^2$ ) de los caracteres. La heredabilidad se define como la proporción de la variación fenotípica de un carácter atribuida a la variación genética aditiva. De este modo, caracteres con heredabilidades altas serán más fáciles de mejorar por selección (Falconer y McKay, 1996). De forma general, los caracteres reproductivos tienen  $h^2$  bajas, los productivos (crecimiento o índice de conversión) moderadas y los de calidad de la canal (longitud de la canal, deposición de grasa dorsal o % de magro) altas. Finalmente, los de calidad de la carne (pH, color, % grasa intramuscular o composición de ácidos grasos) presentan  $h^2$  moderadas-bajas, excepto el porcentaje de grasa intramuscular y algunos ácidos grasos que son más altas (Tibau, 1992; Webb *et al.* 1998; Cameron, 1990; Paszek *et al.* 2001).

El método empleado en mejora genética para escoger los mejores animales reproductores era el índice de selección. Sin embargo, este último se ha ido sustituyendo por la metodología BLUP (*Best Linear Unbiased Prediction*) que permite una mejor estima de los valores genéticos. Además, en la selección de caracteres cuantitativos se está introduciendo cada vez más la información obtenida por la genética molecular. Una muestra de ello sería la selección asistida por marcadores (MAS), que permite seleccionar los alelos de los marcadores que están asociados con los alelos favorables del QTL. Esta estrategia presenta una ventaja importante, el genotipo del marcador se puede determinar justo al nacimiento del animal sin tener que esperar a tener los registros fenotípicos (Haley y Visscher, 1998-1999). Por otro lado, este método es especialmente de utilidad en aquellos caracteres en los que el progreso genético es complicado de obtener por métodos tradicionales como son los de baja heredabilidad, los que sólo son medibles en un sexo, después del sacrificio del animal o cuando el animal tiene una edad avanzada (vida productiva) o aquellos en los que las medidas fenotípicas resultan muy caras. En estos caracteres se puede conseguir un incremento de la respuesta del 38-64% respecto a los métodos de selección tradicionales (Meuwissen y Goddard, 1996). Otro factor favorable es que los beneficios se obtienen en un plazo corto aunque, en algunos casos, puede causar una penalización a largo plazo. Finalmente, el uso de BLUP y MAS conjuntamente permiten un beneficio genético adicional de más del 50% (Rothschild y Plastow, 1999; Paszek *et al.* 1999).

Por otra parte, la información molecular también es de utilidad en programas de introgresión asistida por marcadores (MAI). Con esta estrategia un alelo beneficioso se puede introducir en una población en la cual no exista (Andersson, 2001; Haley y Visscher, 1998-1999).

## **1.2. Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares son regiones distribuidas a lo largo del genoma que generalmente, presentan polimorfismos. El genotipo de los marcadores debe poder ser identificado fácilmente y permiten identificar un organismo, especie o carácter fenotípico asociado al mismo. A pesar que se han descrito diferentes tipos de marcadores, los más utilizados en la actualidad son los que permiten realizar genotipados masivos de forma fiable y económica, como serían los microsatélites o los SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Sin embargo, existen otros marcadores como



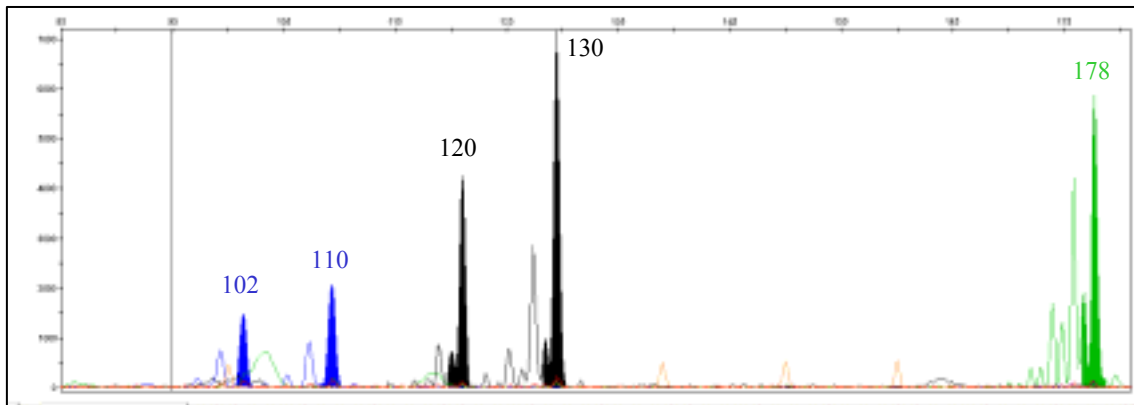
los AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

La importancia de los marcadores moleculares se centra en que su utilización es fundamental para la construcción de mapas genómicos, la detección de *Quantitative Trait Loci* (QTL) y para la realización de estudios de asociación con caracteres fenotípicos de interés.

### **1.2.1. Microsatélites**

Los microsatélites son repeticiones en tándem de secuencias de ADN de dos a seis pares de bases, con una longitud total generalmente inferior a 300 pb y que se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma.

Los microsatélites presentan una serie de características que los convierten en unos marcadores muy interesantes: presentan un gran polimorfismo en el número de repeticiones (son multialélicos), codominantes, se encuentran de forma muy abundante en todos los genomas analizados y además, su análisis es sencillo y automatizable. El genotipado se realiza por PCR usando cebadores marcados fluorescentemente para ser detectados mediante equipos de secuenciación. Los tamaños de los fragmentos amplificados por PCR variarán en función del número de repeticiones presentes en el microsatélite (Figura 1.1). Todas estas características son las que han hecho que los microsatélites hayan sido ampliamente utilizados en múltiples estrategias como la construcción de mapas genéticos y la posterior detección de QTL, análisis de parentesco, pruebas forenses, trabajos de biodiversidad y filogenia y estudios paleogenéticos (Chambers y MacAvoy, 2000).



**Figura 1.1.** Electroferograma de tres microsatélites obtenidos con el *software GeneMapper<sup>TM</sup>* (Applied Biosystems). El genotipo del primer microsatélite es heterocigoto 102-110, el segundo es heterocigoto 120-130 y el tercero, homocigoto 178.

### 1.2.2. SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)

Los SNP son sustituciones nucleotídicas puntuales, generalmente dialélicas, distribuidas por todo el genoma de forma muy abundante (Sachidanandam *et al.* 2001). En humano se puede encontrar, aproximadamente, un SNP cada 300 nucleótidos (<http://snp.cshl.org>). Información sobre el número de SNP descritos en diferentes especies se puede encontrar en la *SNP Database* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_summary.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_summary.cgi)). Hasta el momento en porcino se han detectado unos 6.400 SNP, mientras que en humano superan los 27 millones.

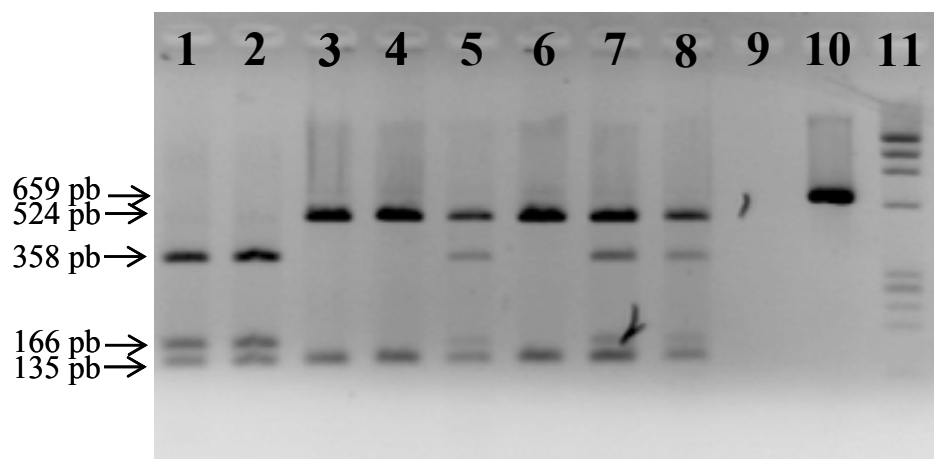
Para el genotipado de los SNP existen múltiples técnicas que permiten, en general, analizar un gran número de muestras de forma rápida y fiable. Algunos de estos métodos serían el *Primer Extension Analysis* (SNaPshot<sup>TM</sup>, Applied Biosystems), la pirosecuenciación y el SNplex<sup>TM</sup> (Applied Biosystems). Otros métodos se basan en la utilización de enzimas de restricción (PCR-RFLP), o en cambios de movilidad de las cadenas de ADN (PCR-SSCP), aunque estas dos técnicas no son aplicables para el genotipado a gran escala. Finalmente, otras técnicas de reciente implementación serían los chips de ADN y la espectrofotometría de masas.

#### 1.2.2.1. PCR-RFLP

Se basa en la utilización de enzimas de restricción que cortan el ADN en lugares específicos de reconocimiento o dianas de restricción, que son secuencias cortas de

ADN (generalmente de 4 a 8 pb). La presencia o ausencia de esta diana es la que determina el patrón de restricción, generando de esta forma, fragmentos de diferentes tamaños en función del genotipo del individuo. Los RFLP (*Restriccion Fragment Length Polymorphism*) son marcadores bialélicos y codominantes, por lo que se pueden determinar los tres genotipos posibles.

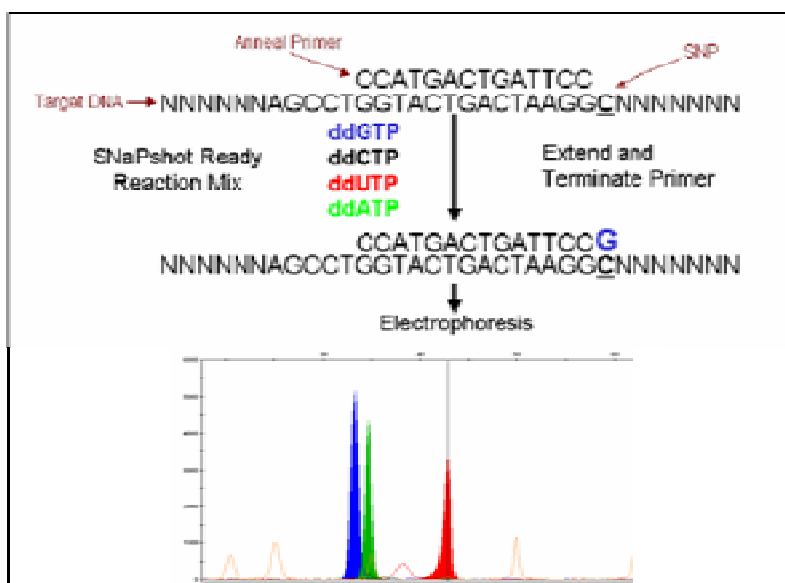
La aparición de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) facilitó en gran medida esta técnica ya que la amplificación previa a la digestión del fragmento que contiene el polimorfismo por PCR (PCR-RFLP) mejora su especificidad, sensibilidad y facilidad de análisis ya que el patrón de digestión se visualiza en geles de agarosa (Figura 1.2). Esta técnica es la que se utiliza, por ejemplo, para genotipar el gen del receptor de la rianodina (*RYR1*) o gen del halotano, responsable del síndrome del estrés porcino (Fujii *et al.* 1991). También se han empleado en otros estudios como el descrito por Gaboreanu *et al.* (2004) para detectar una asociación con grasa en el cromosoma X en un cruce entre Berkshire y Yorkshire.



**Figura 1.2.** Genotipado por PCR-RFLP de la mutación del gen *RYR1*. Los individuos homocigotos NN tienen un patrón de bandas de 135 y 524 pb (pozos 3, 4, 6). Los homocigotos nn presentan un patrón de bandas de 358, 166 y 135 (pozos 1, 2). Los heterocigotos Nn tienen las cuatro bandas (pozos 5, 7, 8). En el pozo 9 hay el control negativo. En el pozo 10 hay el fragmento de PCR sin digerir (659 pb). En el pozo 11 hay un marcador de tamaño.

### 1.2.2.2. Primer Extension Analysis (SNaPshot™, Applied Biosystems)

Esta técnica se basa en la amplificación por PCR de la región que contiene el polimorfismo, en la posterior hibridación de un cebador adyacente al SNP y en una reacción de extensión con dideoxinucleótidos que detienen la elongación, de modo que únicamente se incorpora el nucleótido complementario al de la cadena molde para la posición polimórfica (Figura 1.3). Debido a que se emplean dideoxinucleótidos marcados con diferentes fluorescencias, la identificación del nucleótido incorporado se realiza mediante un equipo de electroforesis capilar.



**Figura 1.3.** Reacción de extensión y electroferograma de dos SNP. El primer SNP es heterocigoto G/A (de color azul y verde) y el segundo, homocigoto T/T (de color rojo). Adaptada de Applied Biosystems.

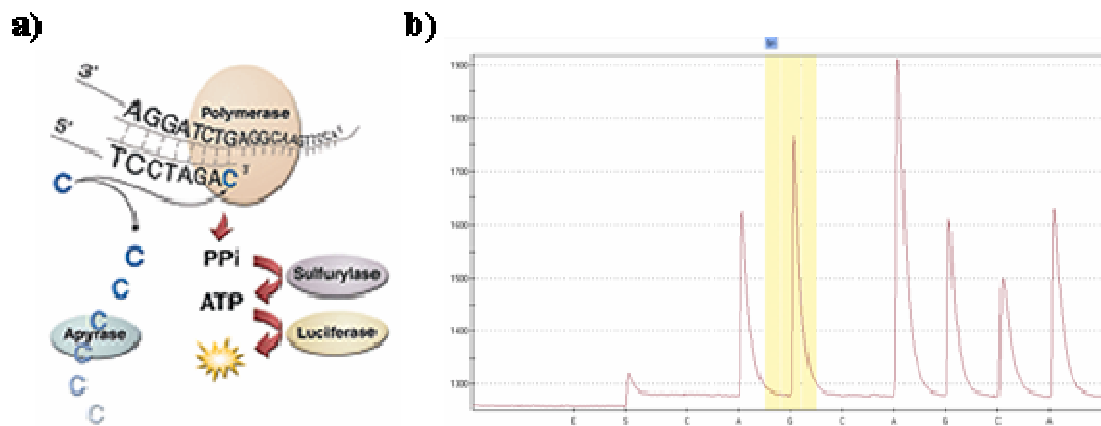
### 1.2.2.3. Pirosecuenciación (Pyrosequencing AB)

Esta técnica consiste en una minisequenciación en tiempo real donde la incorporación de cada nucleótido se detecta mediante una reacción luminosa producida por la enzima luciferasa (Ronaghi *et al.* 1998).

El requisito previo a la reacción de pirosecuenciación es obtener productos de PCR de cadena simple, para ello uno de los cebadores contiene biotina. La biotina permite capturar el producto de PCR mediante bolas de sefarosa que después de una purificación y desnaturalización se obtienen fragmentos de cadena simple.

En la reacción de pirosecuenciación un cebador se une a la cadena simple. A continuación, se produce la dispensación de los nucleótidos de forma secuencial. La incorporación de un nucleótido genera la liberación de un grupo pirofosfato (PPi) que es

usado por la enzima sulfurylase para producir una molécula de ATP, el cual a su vez es utilizado por la luciferasa para emitir luz. Por otra parte, los nucleótidos no incorporados son degradados por la enzima apirasa sin generar luz (Figura 1.4). Esta información se envía al ordenador convirtiéndola en pirogramas, siendo la altura del pico proporcional al número de nucleótidos incorporados (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** a) Esquema de la reacción de pirosecuenciación (AB Pyrosequencing). b) Pirograma obtenido para un individuo heterocigoto G/- para un indel en el gen *FABP4*.

### 1.2.3. AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

La técnica para detectar AFLP consiste en digerir el ADN y unirle cebadores que actúan como adaptadores. Los fragmentos se amplifican de forma selectiva por PCR empleando cebadores complementarios a los adaptadores pero que tienen una secuencia específica corta (1-3 nucleótidos) en el extremo 3'. De esta forma sólo se amplifican los fragmentos que son complementarios al extremo 3' del cebador. Actualmente, se está desarrollando un mapa con unos 2.300 AFLP que se añadirá al mapa de ligamiento del PiGMap (Rothschild, 2004). Además, este tipo de marcadores ya se han utilizado para estudios de análisis de QTL que han permitido detectar, entre otros, QTL para engrasamiento (Wimmers *et al.* 2002).

#### **1.2.4. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)**

Consisten en fragmentos aleatorios de ADN amplificados por PCR a partir de cebadores de secuencia también aleatoria. Son de naturaleza dominante. Estos marcadores fueron empleados sobre todo cuando los mapas de ligamiento contenían muy pocos marcadores o en especies en las que hay muy pocos marcadores descritos.

### **1.3. Cartografía del genoma porcino**

Una de las principales limitaciones en los estudios de genómica en porcino, y en el resto de especies domésticas, ha sido la falta de mapas de ligamiento de alta resolución (muchos marcadores posicionados por cM), de clones BAC ordenados a lo largo de todo el genoma y el desconocimiento de la secuencia del genoma. La falta de estas herramientas dificulta y enlentece el mapeo y caracterización de genes.

#### **1.3.1. Mapas genómicos**

##### **1.3.1.1. Mapas genéticos o de ligamiento**

Los mapas genéticos o de ligamiento muestran la distancia entre marcadores estimada a partir de la frecuencia de recombinación entre ellos. La construcción de estos mapas se basa en que la frecuencia de recombinación es directamente proporcional a la distancia entre dos loci de un mismo cromosoma. De esta forma, la probabilidad de que ocurra recombinación entre dos loci es menor cuanto más próximos estén localizados. Cuando la proporción de recombinantes es igual a la de no recombinantes, la frecuencia de recombinación es del 50%, indicando que no existe ligamento genético entre los dos loci y, por tanto, se transmiten de forma independiente. Valores inferiores indican que los dos loci están ligados.

Para la construcción de un mapa de ligamiento es necesario un pedigrí y marcadores polimórficos para este pedigrí. De este modo, a partir de la frecuencia de recombinación entre los marcadores se puede inferir su posición relativa y la distancia en cM entre sí. El centiMorgan (cM) es la unidad de distancia genética y equivale a una frecuencia de recombinación del 1%. Aproximadamente, un cM equivaldría a un millón

de pares de bases. El programa informático más comúnmente usado para la construcción de estos mapas es el CRI-MAP (Green *et al.* 1990).

Sin embargo, se debe tener en cuenta que existen diferentes factores que pueden distorsionar las frecuencias de recombinación y en consecuencia, las distancias obtenidas. Estos factores serían:

- Los múltiples recombinantes, los cuales aparecen como no recombinantes.
- El sexo homogamético (el femenino en mamíferos), en el cual las distancias inferidas son más grandes al producirse más fenómenos de recombinación que en el sexo heterogamético.
- La región cromosómica, en los centrómeros se producen menos recombinaciones que en los telómeros.
- Fenómenos de interferencia, la cual asume que la formación de un entrecruzamiento en una región reduce la probabilidad de que se produzca otro en una región adyacente. Según la interferencia que se asume existen diferentes funciones de mapa:

- Función de Morgan: si se considera interferencia completa y distancias pequeñas

$$d = r$$

siendo: 'd' la distancia entre dos marcadores

'r' su frecuencia de recombinación

- Función de mapa de Haldane: si no se considera interferencia

$$d = -\ln(1-2r)/2$$

- La función de Kosambi: cuando se considera un cierto grado de interferencia

$$d = \ln[(1+2r)/(1-2r)]/4$$

A lo largo de los últimos años se han ido posicionando un gran número de marcadores en los mapas genéticos de diferentes especies domésticas con la finalidad de conseguir mapas de alta densidad. Los mapas porcinos más importantes son el PIGMaP (Archibald *et al.* 1995), el NORDIC (Marklund *et al.* 1996) y el USDA-MARC (Rohrer *et al.* 1994, 1996). En la Figura 1.5 aparece el mapa de ligamiento correspondiente al cromosoma 4 porcino, estos mapas pueden ser consultados online: (<http://www.genome.iastate.edu/maps/marcmap/html>). Además, la información de

estos mapas se va actualizando continuamente. Según el *PigMap Annual Update* del 2005 se han mapeado, hasta el momento, un total de 1.588 genes y 2.493 marcadores.

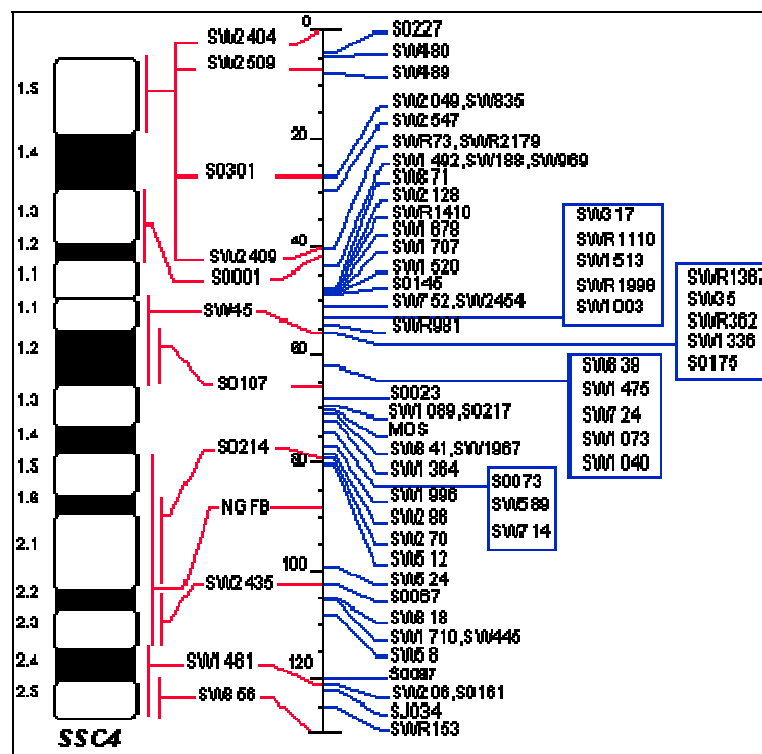


Figura 1.5. Mapa de ligamiento del cromosoma 4 porcino (USDA-MARC).

### 1.3.1.2. Mapas físicos

Para la construcción de mapas físicos en porcino se han utilizado principalmente los paneles de células somáticas híbridas irradiadas. Sin embargo, algunos genes o marcadores también han sido posicionados mediante la técnica FISH (hibridación *in situ* fluorescente), en la cual una sonda de ADN marcada con fluorescencia se hibrida con los cromosomas y posteriormente, se detecta el lugar de hibridación gracias al marcaje fluorescente de la sonda.

Los paneles de células somáticas híbridas irradiadas están constituidos por células, generalmente de hámster o ratón, que además de los cromosomas propios, contienen fragmentos de cromosomas de otra especie, en este caso cerdo. Estos paneles están formados por varios clones que contienen, en conjunto, todo el genoma porcino. Para la localización cromosómica de un marcador se realiza la amplificación específica de un fragmento del marcador por PCR usando cebadores especie-específicos en cada



clon. Los resultados obtenidos se analizan mediante programas que determinan la posición y la distancia entre los marcadores flanqueantes. En estos mapas la distancia se mide en centyRay (cR), calculada a partir de la probabilidad de que dos marcadores estén separados por una o más roturas cromosómicas. Las distancias obtenidas van acompañadas con un valor de *LOD score* que determina la fiabilidad del resultado.

En porcino se han generado tres paneles de células somáticas híbridas irradiadas diferentes: el IMpRH con una dosis de radiación de 7.000 rad (Yerle *et al.* 1998; Hawken *et al.* 1999), el panel IMNpRH2 de 12.000 rad (Yerle *et al.* 2002) y el SSRH de 5.000 rad (Hamashima *et al.* 2003) que se diferencian por tanto en la resolución, siendo de 35-37 kb/cR, 12-14 kb/cR y 0,49 Mb/cR, respectivamente. En los últimos años, la densidad de marcadores en los mapas físicos también ha ido aumentando. Según el *PigMap Annual Update* del 2005, hasta al momento se han mapeado unos 6.000 genes y marcadores.

Finalmente, la obtención de genotecas BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) del genoma porcino resulta también importante para la construcción de mapas físicos de alta resolución, para la caracterización de regiones cromosómicas concretas y es imprescindible para la secuenciación del genoma porcino (Rogel-Gaillard *et al.* 1999; Milan *et al.* 2000; Andersson *et al.* 2000; Fahrenkrug *et al.* 2001).

### 1.3.2. Secuenciación del genoma porcino

Después del proyecto genoma humano (Lander *et al.* 2001) se han completado otros proyectos de secuenciación de los genomas de especies de interés como modelo de enfermedades humanas o productivo. Cabe destacar la obtención de la secuencia completa del genoma del ratón, de la rata, del perro, del pollo y de la vaca.

En el año 2001, se creó un primer proyecto conjunto entre China y Dinamarca para llevar a cabo la secuenciación del genoma porcino. Los primeros resultados fruto de este proyecto han aparecido recientemente (Wernersson *et al.* 2005) con la publicación de las primeras secuencias obtenidas por *shotgun*. Se trata de secuencias cortas de ADN generadas al azar con una redundancia del 0,66X del genoma, aunque en un principio se esperaba del 1X (Andersson y Georges, 2004). Dos años más tarde apareció un segundo proyecto, el *Swine Genome Sequencing Consortium* (SGSC), con

el objetivo de obtener una redundancia del 6-7X (Rohrer *et al.* 2003; Schook *et al.* 2005). El departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) ha anunciado en enero de este año (2006) la financiación del proyecto de secuenciación del genoma porcino con 10 millones de dólares, que representan la mitad del coste total del proyecto. Además, se espera que se reciban fondos económicos de otras instituciones. Se calcula que, implementando la tecnología desarrollada para secuenciación del genoma humano, el primer borrador del genoma porcino estará terminado en dos años ([http://swinegenomics.com/news\\_detail.php?id=36](http://swinegenomics.com/news_detail.php?id=36)). De este modo, se dispondrá de un mayor número de marcadores y SNP que permitirán un mapeo fino. Además, también se podrá resecuenciar regiones en las que se han detectado QTL para la identificación de mutaciones causales. Por otra parte, se podrán generar microarrays más completos para la realización de estudios de expresión. Todo ello ayudará a descifrar, en parte, la base genética de diferentes caracteres de interés.

#### **1.4. Identificación de QTL**

Un QTL (*Quantitative Trait Locus*) es una región dentro el genoma que codifica para uno o más genes con efecto significativo sobre un carácter cuantitativo. Gran parte de la variabilidad fenotípica de estos caracteres puede estar causada por unos pocos genes con efecto importante, mientras que el resto de la variabilidad es debida a varios genes con efecto pequeño (de Vries *et al.* 1998; Andersson, 2001). Cabe destacar que la mayoría de caracteres de interés económico en especies domésticas son de tipo cuantitativo (por ejemplo: crecimiento, peso, calidad de la carne, calidad de la canal, composición de ácidos grasos, etc.) por tanto, la detección de QTL para la posterior determinación de los factores causales ha sido el objetivo principal en numerosos proyectos. Sin embargo, el poder de estos estudios para detectar y mapear QTL depende de la proporción de varianza fenotípica explicada por un locus dado, del tamaño de la población en que esté segregando y de la existencia de fenómenos de epistasia, es decir, interacciones entre diferentes loci que afectan a la expresión fenotípica del genotipo de un locus.

Aunque aparecieron algunos trabajos en los que se identificaron QTL, no fue hasta principios de los años 90 cuando aumentaron los estudios de detección de QTL en diferentes especies. Esto es debido en gran parte a los avances en las técnicas

moleculares, entre los cuales es imprescindible nombrar el descubrimiento de la PCR por sus múltiples aplicaciones (Saiki *et al.* 1985).

#### **1.4.1. Diseño experimental**

Para la identificación de QTL se requiere habitualmente de un pedigrí con varias generaciones. En este pedigrí se recogen medidas fenotípicas y se genotipan diferentes marcadores para establecer la transmisión de los alelos a los descendientes. Idealmente este pedigrí debería estar formado por dos líneas en que los individuos presenten diferencias fenotípicas importantes y que cada una fuera homocigota para diferentes alelos. De este modo, los marcadores y QTL estarían fijados en las dos líneas parentales. Sin embargo, este fenómeno únicamente se puede conseguir si se dispone de líneas consanguíneas obtenidas por el cruce sucesivo de individuos altamente emparentados. Debido a que en especies domésticas no es posible disponer de estas líneas, el cruce más habitual es entre razas divergentes para crear desequilibrio de ligamiento entre marcadores y QTL (Bovenhuis *et al.* 1997).

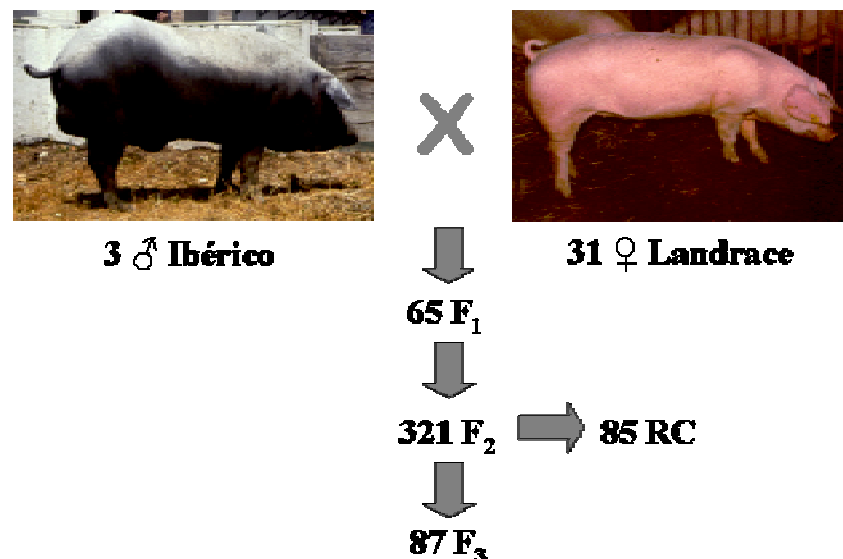
En porcino, los diseños más comunes en poblaciones experimentales son:

- Cruce  $F_2$ : está constituido por una población parental ( $F_0$ ) formada por dos líneas o razas divergentes con fenotipos suficientemente diferentes para los caracteres de interés. En esta generación se asume que uno de los dos alelos del QTL está fijado en cada población. La línea con fenotipo superior sería la homocigota  $QQ$  y la de fenotipo inferior, la  $qq$ . Del cruce de los animales parentales se obtiene la generación  $F_1$ , en la que se asume que todos los individuos serán heterocigotos para los marcadores y los QTL. Finalmente, se obtiene la generación  $F_2$  a partir de animales  $F_1$  que se han escogido como reproductores. En esta última generación se encontrarán todos los genotipos posibles y es en la que se recogen las medidas fenotípicas. Este diseño se puede extender creando sucesivas generaciones ( $F_3$ , etc.) que permitirán refinar la posición de QTL previamente detectados.

- Retrocruce o backcross (RC): consiste en que los animales  $F_1$  se cruzan con animales parentales para obtener la  $F_2$ . Este diseño no es tan utilizado como el anterior.

Se debe destacar que en poblaciones comerciales en las que no se puede llevar a cabo estos diseños se emplean otras estrategias como sería analizar toda la descendencia de un individuo escogido como parental. Aunque esta metodología presenta dificultades añadidas en los análisis estadísticos, existen trabajos que han confirmado la presencia de QTL previamente descritos en cruces experimentales (Evans *et al.* 2003; De Koning *et al.* 2003; Vidal *et al.* 2005).

Para el desarrollo del proyecto IBMAP, llevado a cabo en colaboración entre el INIA, la UdL-IRTA y la UAB, y en cuyo marco se incluye la presente tesis, se creó un cruce experimental entre cerdo Ibérico de la estirpe Guadyerbas (Dehesón del Encinar, Toledo) y Landrace (Nova Genètica S.A.) (Figura 1.6).



**Figura 1.6.** Cruce experimental IBMAP.

A grandes rasgos, el cerdo Ibérico se caracteriza por ser de capa oscura, tener un crecimiento lento, una canal corta, un alto contenido en grasa y una prolificidad baja. Por el contrario, los animales Landrace se han seleccionado por tamaño de la camada, grasa dorsal y crecimiento, siendo animales de buena conformación de la canal, bajo engrasamiento y buena prolificidad. Sin embargo, los animales Landrace presentan una gran incidencia del Síndrome del Estrés Porcino, por lo que se deben seleccionar los animales libres del alelo recesivo.

Serra *et al.* (1998) publicaron un estudio en el que se compararon, bajo condiciones intensivas y alimentación *ad libitum*, la calidad de la canal, de la carne y las

características histoquímicas entre ambas razas. Los resultados obtenidos demostraron que estas dos razas eran lo suficientemente distintas fenotípicamente para poder generar cruces experimentales.

#### 1.4.2. Genotipado de la población

Para poder determinar la transmisión de los alelos a lo largo de una población, todos los individuos del cruce se genotipan para una serie de marcadores. En los estudios de barrido genómico se emplean marcadores moleculares polimórficos distribuidos por todo el genoma con una distancia media entre ellos de unos 20 cM. Para el refinamiento de la posición de QTL previamente detectados se aumenta la densidad de marcadores en la región de interés. Debido a sus características, los marcadores mayoritariamente utilizados para estos estudios son los microsatélites. Por otro lado, gracias a su posible automatización se pueden realizar genotipados a gran escala usando placas de PCR de 96 pocillos y marcadores marcados con diferentes fluorescencias, los cuales son detectados por electroforesis capilar en secuenciadores automáticos (como el ABI PRISM 3100 o 3730 de Applied Biosystems). Los resultados de la electroforesis se pueden visualizar mediante un *software* de análisis (como el *GeneScan<sup>TM</sup>* o *GeneMapper<sup>TM</sup>* de Applied Biosystems) en el que se observan picos de tamaños y colores diferentes correspondientes a los alelos de cada marcador (Figura 1.1).

#### 1.4.3. Metodología estadística

Existen diferentes aproximaciones para la detección de QTL pero, seguramente, la más utilizada es la regresión lineal múltiple (Haley *et al.* 1994).

Entre las diferentes metodologías destacan:

- Mapeo por intervalos (*Interval mapping*, Lander y Botstein, 1989). Estima la existencia de un QTL a través de la información de los dos marcadores flanqueantes, siendo necesario por tanto, que los marcadores sean totalmente informativos. Utiliza el método de la Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*). Esta metodología fue utilizada en diferentes trabajos publicados como el de Casas-Carrillo *et al.* (1997) o Grindflek *et al.* (2001).

- Regresión lineal múltiple (Haley *et al.* 1994). Este método, a diferencia del anterior, utiliza la información de todos los marcadores. El modelo asume que la población parental tiene alelos alternativos para el QTL fijados (Q y q) y también requiere la existencia de desequilibrio de ligamiento entre el marcador y el QTL. La probabilidad de recibir uno u otro alelo se calcula a cada cM basándose en la probabilidad que un individuo presente un determinado genotipo en función de los marcadores flanqueantes y en el efecto de este genotipo sobre el fenotipo (Bovenhuis *et al.* 1997). El valor de F se obtiene comparando el modelo con el QTL con otro que no incluye QTL. La posición más probable del QTL es aquella que tenga un valor de F máximo. El programa *QTL Express* (<http://qtl.cap.ed.ac.uk/>) permite utilizar este método de forma *on-line*. Ésta es la metodología empleada en la mayoría de trabajos publicados.

- Otra metodología es la implementada por el programa Qxpak (Pérez-Enciso y Mitszta, 2004) basada en el modelo mixto, en el que se incluyen efectos fijos (por ejemplo: sexo, lote, etc.) y efectos aleatorios (los efectos genéticos). El modelo general sería:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \sum_{k=0}^{Nq} \mathbf{Z}\mathbf{g}_k + \mathbf{e},$$

siendo  $\mathbf{y}$  un vector que contiene los registros fenotípicos de los individuos,  $\mathbf{b}$  son los efectos fijos a estimar,  $\mathbf{g}_k$  los efectos genéticos para cada uno de los QTL que afectan el carácter ( $\mathbf{g}_0$  sería el efecto infinitesimal, es decir, el efecto genético no explicado por ningún QTL individual),  $\mathbf{X}$  y  $\mathbf{Z}$  son las matrices de incidencia que relacionan las observaciones con los vectores  $\mathbf{b}$  y  $\mathbf{g}$  y finalmente,  $\mathbf{e}$  es el vector de residuos. Este programa, además de los estudios clásicos de detección de QTL, permite realizar otros enfoques como modelizar situaciones en las que los alelos del QTL no estén fijados, estimar los efectos en poblaciones complejas, estudios multiQTL y/o multicarácter, etc. El programa se puede descargar gratuitamente (<http://www.icrea.es/pag.asp?id=Miguel.Pérez>).

### **1.5. Detección de QTL en porcino**

Los cambios en los objetivos de selección, debido en gran parte a las exigencias del mercado y a los avances en la genómica, se ven reflejados en los estudios de detección de QTL en porcino. Los primeros estudios se basaban mayoritariamente en la detección de QTL relacionados con caracteres de crecimiento y conformación de la canal, ya que los objetivos se centraban principalmente en obtener animales con crecimiento rápido y canales magras. Actualmente, cada vez aparecen más estudios relacionados con otros caracteres como la calidad de la carne, reproductivos, resistencia a enfermedades, capacidad inmunológica o características de comportamiento y neuroendocrinas, como se puede observar en la Tabla 1.1 (Bidanel y Rothschild, 2002).

**Tabla 1.1.** QTL detectados por diferentes grupos (Bidanel y Rothschild, 2002).

| <i>País</i> | <i>Institución</i>    | <i>Población*</i> | <i>Animales</i> | <i>Marcadores</i>              | <i>Caracteres</i>        | <i>Referencias</i>  |
|-------------|-----------------------|-------------------|-----------------|--------------------------------|--------------------------|---|
| Bélgica     | U Liège               | LW x PI           | 1.032           | 11 SSCr2                       | GR, CC                   | Nezer <i>et al.</i> ,1999   |
| Francia     | INRA                  | MS x LW           | 1.103           | 137                            | GR, CC,<br>MQ, RE,<br>BE | Bidanel <i>et al.</i> 2000,2001a,b,2002; Milan <i>et al.</i> 2002<br>Désautés <i>et al.</i> 2002; Quintanilla <i>et al.</i> 2002a,b                                 |
| Alemania    | U Hohenheim           | PI x (MS o WB)    | 979             | 121                            | GR, CC,<br>MQ            | Moser <i>et al.</i> 1998  |
| Japón       | U Saga                | MS x PM           | 215             | 318                            | GR, CC                   | Wada <i>et al.</i> , 2000   |
| Suiza       | U Wageningen          | MS x LW           | 800             | 127-132                        | GR, CC,<br>MQ            | De Koning <i>et al.</i> 1999,2000,2001a,b<br>Harlizius <i>et al.</i> 2000; Hirooka <i>et al.</i> 2001   |
| Noruega     | U Agricultural Norway | (DU x LR) x LW    | 305             | 11 SSCr4<br>9 SSCr6<br>9 SSCr7 | MQ                       | Grindflek <i>et al.</i> 2001  |
| Escocia     | Roslin Institute      | MS x LW           | 390             | 9 SSCr4                        | GR, CC                   | Walling <i>et al.</i> 1998a,b   |
| España      | IRTA-INIA-UAB         | LR x IB           | 500             | 7 SSCr6<br>7 SSCr4             | GR, CC,<br>MQ            | Óvilo <i>et al.</i> 2000<br>Pérez-Enciso <i>et al.</i> 2000   |
| Suecia      | U Uppsala             | WB x LW           | 191             | 117-236                        | GR, CC,<br>MQ, DR...     | Andersson <i>et al.</i> 1994; Knott <i>et al.</i> 1998<br>Andersson-Eklund <i>et al.</i> 1998,2000<br>Edfors-Lilja <i>et al.</i> 1998-2000; Jeon <i>et al.</i> 1999 |
| EUA         | U Iowa State          | CH x YO           | 294             | 5 SSCr4<br>10 SSCr7            | GR, CC<br>MQ             | Rothschild <i>et al.</i> 1995<br>Wang <i>et al.</i> 1998  |
| EUA         | U Iowa State          | BE x YO           | 500             | 125                            | GR, CC,<br>MQ            | Malek <i>et al.</i> 2001 a,b  |
| EUA         | U Minnesota           | MS x LW           | 298             | 119                            | GR, CC                   | Paskek <i>et al.</i> 1999; Wilkie <i>et al.</i> 1999  |
| EUA         | USDA                  | MS x SL           | 540             | 157                            | GR, CC,<br>RE            | Rohrer y Keele <i>et al.</i> 1998a,b<br>Rohrer <i>et al.</i> 1999,2000,2001   |
| EUA         | U Nebraska            | OEL x CL          | 306             | 151                            | RE                       | Rathje <i>et al.</i> 1997;Cassady <i>et al.</i> 2001  |
| EUA         | U Wisconsin           | HGL x LGL         | 240             | 75                             | GR                       | Casas-Carrillo <i>et al.</i> 1997   |

\* BE: Berkshire; CH: Chino; CL: línea control; HGL,LGL: línea seleccionada para alto y bajo crecimiento, respectivamente; IB: Ibérico; LR: Landrace; LW: Large White; MS: Meishan; OEL: línea seleccionada para ovulación y supervivencia embrionaria; PI: Pietrain; SL: línea seleccionada; WB: jabalí; YO: Yorkshire.

\*\* BE: Comportamiento; CC: Composición canal; DR: Resistencia enfermedades; GR: Crecimiento; MQ: calidad carne; RE: Reproducción



Recientemente se dispone de una base de datos que incluye información sobre los QTL publicados en porcino (<http://animalgenome.org/QTLdb/>, Hu *et al.* 2005). Hasta el momento en la base de datos pigQTLdb hay 1.263 QTL relacionados con 236 caracteres diferentes y procedentes de 93 publicaciones, en las que se han descrito QTL en todos los cromosomas. Sin embargo, en los cromosomas 1, 2, 4, 6 y 7 que se ha encontrado un mayor número de QTL, mientras que en los cromosomas 16, 17 y 18 hay pocos QTL descritos. En la Tabla 1.2 figuran los caracteres más estudiados.

**Tabla 1.2.** Caracteres con mayor número de QTL descritos (pigQTLdb).

| <i>Número de QTL</i> | <i>Caracteres</i>    |
|----------------------|----------------------|
| 54                   | Espesor grasa dorsal |
| 38                   | Área del músculo     |
| 35                   | Longitud de la canal |
| 33                   | Peso del jamón       |
| 29                   | pH 24h post-mortem   |
| 25                   | % de magro           |
| 24                   | Número de tetinas    |
| 23                   | Color (L)            |
| 23                   | Peso de la cabeza    |

El primer estudio de QTL en porcino fue el descrito por Andersson *et al.* (1994). Para este estudio se generó un cruce F<sub>2</sub> entre dos machos jabalíes y ocho hembras Large White de los que se obtuvieron 200 animales F<sub>2</sub>. Con el método estadístico descrito por Haley *et al.* (1994) detectaron un QTL en el cromosoma 4 con efecto sobre crecimiento, tamaño del intestino y deposición de grasa dorsal y abdominal. También encontraron un QTL en el cromosoma 13 relacionado con crecimiento.

A partir de este momento, el número de estudios de QTL fue aumentando, como se muestra en la Tabla 1.3, alcanzando el máximo durante el año 2003 (pigQTLdb).

**Tabla 1.3.** Cronología de los QTL descritos (pigQTLdb).

| <b>Año</b>  | <b>QTL detectados</b> |
|-------------|-----------------------|
| <b>1995</b> | 5                     |
| <b>1996</b> | 6                     |
| <b>1997</b> | 11                    |
| <b>1998</b> | 102                   |
| <b>1999</b> | 42                    |
| <b>2000</b> | 91                    |
| <b>2001</b> | 246                   |
| <b>2002</b> | 190                   |
| <b>2003</b> | 528                   |
| <b>2004</b> | 42                    |

Para llevar a cabo estos estudios se fueron generando cruces con diferentes razas divergentes. La mayoría de ellos consisten en cruces de razas comerciales europeas con razas chinas, principalmente Meishan, o jabalí, como se muestra en la Tabla 1.1. La utilización de diferentes cruces determina que no todos los QTL se puedan confirmar entre las diferentes razas y que no siempre sea posible extrapolar la posición de los QTL. Por un lado, las posiciones de los QTL son bastante imprecisas y además, cada cruce genera su propio mapa de ligamiento usando un grupo de marcadores determinados y las distancias entre marcadores establecidas por sus datos experimentales. Todo esto implica que dos QTL que difieran 20-30 cM pueden corresponder al mismo locus y al contrario, resultados coincidentes pueden no corresponder al mismo QTL (Bidanel y Rothschild, 2002).

A continuación se presenta una revisión de QTL publicados. Debido al gran número de resultados, la revisión se centra básicamente en los caracteres relacionados con la presente tesis y con el proyecto que la engloba, el proyecto IBMAP. Una recopilación de otros caracteres se puede encontrar en la base de datos *pigQTLdb* (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/>), en la base de datos *Obesity Gene Map*

*Database* en la que aparecen QTL relacionados con engrasamiento en diferentes especies (<http://obesitygene.pbrc.edu>) y en las publicaciones de Bidanel y Rothschild (2002) y Geldermann *et al.* (2003).

### 1.5.1. Caracteres de crecimiento y calidad de la canal

#### - Crecimiento:

Se han descrito 187 QTL relacionados con este carácter que se encuentran distribuidos en la mayoría de cromosomas, aunque se centran mayoritariamente en los cromosomas 1, 4 y 7.

**SSC1:** se han localizado QTL en el extremo del brazo q (Casas-Carillo *et al.* 1997; Paszek *et al.* 1999; Rohrer *et al.* 2000; Bidanel *et al.* 2001a; Quintanilla *et al.* 2002). También se han encontrado QTL en el brazo p y en ambas localizaciones (De Koning *et al.* 2001a; Beekmann *et al.* 2003a; Quintanilla *et al.* 2002).

**SSC4:** se localizó un primer QTL en la parte central del cromosoma (Andersson *et al.* 1994) que posteriormente se ha ido confirmando en otros cruces incluyendo razas chinas, europeas y jabalí (Knott *et al.* 1998; Walling *et al.* 1998; Wang *et al.* 1998; Marklund *et al.* 1999; Walling *et al.* 2000; Bidanel *et al.* 2001a; Knott *et al.* 2002; Cepica *et al.* 2003a; Beekmann *et al.* 2003a). También se han detectado QTL en el extremo del brazo p (Marklund *et al.* 1999; Bink *et al.* 2000; Malek *et al.* 2001a).

**SSC7:** en la mayoría de cruces los QTL se han posicionado dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (Rohrer *et al.* 2000; Bidanel *et al.* 2001a; De Koning *et al.* 2001a; Nezer *et al.* 2002; Sato *et al.* 2003; Yue *et al.* 2003c).

**SSC2:** en este cromosoma se han encontrado QTL en la parte proximal del brazo p dentro de la región del *IGF2*, y en regiones más centrales (Lee *et al.* 2003a).

**SSC3:** Malek *et al.* 2001a; Bidanel *et al.* 2001a; De Koning *et al.* 2001a; Beekmann *et al.* 2003b.

**SSC6:** Rohrer *et al.* 2000; Bidanel *et al.* 2001a; Yue *et al.* 2003a.

**SSC8:** Quintanilla *et al.* 2002; Beekmann *et al.* 2003c.

**SSC9:** Cepica *et al.* 2003b.

**SSC13:** Andersson *et al.* 1994; Knott *et al.* 1998; Yue *et al.* 2003b.

**SSCX:** Geldermann *et al.* 2003.

### - Deposición grasa dorsal:

Para los caracteres de grasa se han descrito 315 QTL, gran parte de los cuales son QTL para deposición de grasa dorsal.

**SSC1:** múltiples trabajos empleando razas de diferentes orígenes han encontrado QTL para este carácter distribuidos casi a lo largo de todo el cromosoma (Knott *et al.* 1998; Rohrer y Keele 1998a; De Koning *et al.* 1999; Rohrer, 2000; Bidanel *et al.* 2001a; Malek *et al.* 2001a; Beekmann *et al.* 2003a).

**SSC2:** la localización de QTL se centra en el brazo p y la región central del cromosoma (Knott *et al.* 1998; De Koning *et al.* 1999, 2000, 2001a; Jeon *et al.* 1999; Nezer *et al.* 1999; Rattink *et al.* 2000; Bidanel *et al.* 2001a; Milan *et al.* 2002; Lee *et al.* 2003a; Geldermann *et al.* 2003; Beekmann *et al.* 2003a).

**SSC4:** estos QTL se localizan principalmente en la región central del cromosoma, donde también se han detectado QTL para crecimiento empleando, en la mayoría de los casos, los mismos cruces (Knott *et al.* 1998; Wang *et al.* 1998; Rohrer y Keele 1998a; Walling *et al.* 2000; Bink *et al.* 2000; Wada *et al.* 2000; Bidanel *et al.* 2001a; De Koning *et al.* 2001a; Grindflek *et al.* 2001; Malek *et al.* 2001a; Milan *et al.* 2002; Cepica *et al.* 2003a).

**SSC7:** la mayor parte de QTL detectados empleando diferentes cruces se han posicionado en la región del complejo mayor de histocompatibilidad, al igual que los QTL para crecimiento (Wang *et al.* 1998; Rohrer y Keele 1998a; Malek *et al.* 2001a; Rattink *et al.* 2000; De Koning *et al.* 1999, 2000, 2001a; Bidanel *et al.* 2001a, Milan *et al.* 2002; Geldermann *et al.* 2003; Sato *et al.* 2003).

**SSC3:** Knott *et al.* 1998; Beekmann *et al.* 2003b.

**SSC5:** Knott *et al.* 1998; Malek *et al.* 2001a; De Koning *et al.* 2001a.

**SSC6:** De Koning *et al.* 2001a; Szyda *et al.* 2003; Yue *et al.* 2003a.

**SSC8:** Rohrer, 2000; Bidanel *et al.* 2001a.

**SSC13:** Yu *et al.* 1995; Malek *et al.* 2001a; Nezer *et al.* 2002.

**SSCX:** Knott *et al.* 1998; Rohrer y Keele 1998a; Harlizius *et al.* 2000; Rohrer, 2000; Bidanel *et al.* 2001a; De Koning *et al.* 2001a; Milan *et al.* 2002; Geldermann *et al.* 2003.

### - Caracteres de forma o anatómicos:

Para este tipo de caracteres se han descrito 399 QTL, entre los que figuran QTL relacionados con longitud de la canal, peso de la canal, área del lomo, longitud del

músculo *Longissimus*, espesor del magro dorsal, peso del jamón o peso de la paletillas, entre otros.

- Longitud de la canal:

**SSC1:** se sitúan próximos a la región central (Rohrer y Keele 1998b; Beekmann *et al.* 2003a).

**SSC2 y SSC5:** Lee *et al.* 2003a, 2003c.

**SSC3:** Beekmann *et al.* 2003b.

**SSC4:** al igual que en el cromosoma 1, estos QTL también se localizan en la región central del cromosoma (Rohrer y Keele 1998b; Knott *et al.* 2002; Wimmers *et al.* 2002; Marklund *et al.* 1999; Cepica *et al.* 2003a).

**SSC6:** Malek *et al.* 2001a.

**SSC7:** en este cromosoma diversos QTL se encuentran repartidos a lo largo de éste (Rohrer y Keele 1998b; Nezer *et al.* 2002; Sato *et al.* 2003; Yue *et al.* 2003c).

**SSC8:** Andersson-Eklund *et al.* 1998; Beekmann *et al.* 2003c.

**SSCX:** Rohrer y Keele 1998b; Malek *et al.* 2001a.

- Peso de los jamones y peso de las paletillas:

Para el peso de los jamones existen varios trabajos publicados en los que detectaron QTL en diferentes cromosomas.

**SSC1:** existen varios QTL distribuidos por el cromosoma (Milan *et al.* 2002; Beekmann *et al.* 2003a).

En los siguientes cromosomas los QTL se sitúan en su región central.

**SSC2:** Lee *et al.* 2003a.

**SSC3:** Beekmann *et al.* 2003b.

**SSC4:** Geldermann *et al.* 2003; Cepica *et al.* 2003a.

**SSC5 y SSCX:** Milan *et al.* 2002.

**SSC6:** Geldermann *et al.* 2003; Yue *et al.* 2003a; Malek *et al.* 2001a.

**SSC7:** Milan *et al.* 2002; Yue *et al.* 2003c.

**SSC8:** Milan *et al.* 2002; Beekmann *et al.* 2003c.

Para el peso de las paletillas Bidanel *et al.* (2001a) detectó QTL en los cromosomas 7, 9 y X.

- Área del lomo:

**SSC1:** se han encontrado QTL en dos regiones diferentes del cromosoma (Rohrer y Keele 1998b; Malek *et al.* 2001a; Beekmann *et al.* 2003a).

**SSC2:** Jeon *et al.* 1999; Lee *et al.* 2003a.

**SSC3:** Andersson-Eklund *et al.* 1998; Beekmann *et al.* 2003b.

En los cromosomas 4, 7 y 8 los QTL están prácticamente solapados en una misma región.

**SSC4:** Malek *et al.* 2001a; Wimmers *et al.* 2002; Cepica *et al.* 2003a.

**SSC7:** Sato *et al.* 2003; Yue *et al.* 2003c.

**SSC8:** Rohrer y Keele 1998b; Beekmann *et al.* 2003c.

**SSC11, SSC14 y SSCX:** Rohrer y Keele 1998b.

### 1.5.2. Caracteres de calidad de la carne

- **Grasa intramuscular:**

**SSC1:** Malek *et al.* 2001b.

**SSC4:** Rattink *et al.* 2000; De Koning *et al.* 1999; Su *et al.* 2004.

**SSC6:** Grindflek *et al.* 2001; De Koning *et al.* 1999, 2000; Szyda *et al.* 2003.

**SSC7:** Bidanel *et al.* 2001a.

**SSCX:** Harlizidius *et al.* 2000.

- **Color de la carne:**

Color Minolta a\*, este carácter está relacionado con el color rojo de la carne:

**SSC6:** Yue *et al.* 2003a.

**SSC8:** Beekmann *et al.* 2003c.

**SSC13, SSC14 y SSC15:** De Koning *et al.* 2001b.

Color Minolta L\*, relacionado con la luminosidad de la carne:

**SSC1:** De Koning *et al.* 2001b.

**SSC2, SSC5, SSC15, SSC17 y SSC18:** Malek *et al.* 2001b.

**SSC3:** De Koning *et al.* 2001b; Sato *et al.* 2003.

**SSC4 y SSC14:** Malek *et al.* 2001b; De Koning *et al.* 2001b.

**- pH de la carne 24h post-mortem:**

**SSC1:** Beekmann *et al.* 2003a.

**SSC2:** Lee *et al.* 2003a.

**SSC3:** Paszek *et al.* 1999; Beekmann *et al.* 2003b.

**SSC4, SSC9, SSC18 y SSCX:** De Koning *et al.* 2001b.

**SSC5 y SSC15:** Malek *et al.* 2001b

**SSC6:** Malek *et al.* 2001b; Yue *et al.* 2003a.

**- Composición de ácidos grasos:**

Hay unos 40 QTL descritos relacionados con ácidos grasos. La mayoría de ellos han sido detectados en el cruce IIBM, como veremos más adelante. Otros QTL posicionados serían:

**SSC1 y SSC18:** para el porcentaje de linoleico y mirístico, respectivamente (Lee *et al.* 2003b).

**SSC4:** para el % de heptadecanoico (Grindflek *et al.* 2001).

**SSC3, SSC4, SSC6, SSC7, SSC9 y SSC14:** para el nivel de androsterona en la grasa (Bidanel *et al.* 2001a; Quintanilla *et al.* 2003).

El siguiente paso para comprobar la relevancia de los efectos de estos QTL con respecto a los objetivos de selección es su verificación en poblaciones comerciales. De hecho, ya se han publicado diferentes trabajos que confirman la presencia de algunos QTL descritos anteriormente.

Para crecimiento y engrasamiento se han confirmado QTL en los cromosomas **SSC1** (De Koning *et al.* 2003), **SSC4** (De Koning *et al.* 2003), **SSC6** (De Koning *et al.* 2003; Stearns *et al.* 2005), **SSC7** (Nagamine *et al.* 2003; De Koning *et al.* 2003; Evans *et al.* 2003; Vidal *et al.* 2005), **SSC8** (De Koning *et al.* 2003), **SSC9** (Vidal *et al.* 2005) y **SSC 13** (Evans *et al.* 2003). Además, todos los trabajos coinciden en confirmar los QTL para diferentes caracteres de forma y grasa en la región del gen *IGF2* en el **SSC2** (De Koning *et al.* 2003; Evans *et al.* 2003; Thomsen *et al.* 2004; Stearns *et al.* 2005; Vidal *et al.* 2005).

La confirmación de la segregación de estos QTL es un requisito importante para hacer posible su incorporación en programas de selección asistida por marcadores (MAS).

### 1.5.3. QTL detectados por el proyecto IBMAP

El proyecto IBMAP se creó con el objetivo inicial de detectar QTL relacionados con caracteres de calidad de la canal, de la carne y grasa en una población experimental de tipo F<sub>2</sub>, obtenida del cruce de machos Ibéricos de la estirpe Guadyerbas con hembras Landrace. Posteriormente, también se marcaron como objetivos el refinamiento de la posición de los QTL de mayor interés y el análisis de genes candidatos. En Tabla 1.4 aparecen los trabajos publicados.

**Tabla 1.4.** QTL detectados por el proyecto IBMAP.

| <i>Carácter</i>     | <i>Cromosoma</i>                       | <i>Referencia</i>   |
|---------------------|--|---|
| Calidad de la canal | SSC4; SSC6                             | Pérez-Enciso <i>et al.</i> 2000<br>Óvilo <i>et al.</i> 2000, 2002a, 2005<br>Varona <i>et al.</i> 2002 |
| Calidad de la carne | SSC2; SSC4; SSC6;<br>SSC7; SSC13; SSCX | Pérez-Enciso <i>et al.</i> 2000<br>Óvilo <i>et al.</i> 2000, 2002a, 2005<br>Varona <i>et al.</i> 2002 |
| Calidad de la grasa | SSC4; SSC6, SSC8;<br>SSC10; SSC12      | Pérez-Enciso <i>et al.</i> 2000<br>Cloup <i>et al.</i> 2003   |

Como se puede observar en la Tabla 1.4 la divergencia de estas dos razas porcinas ha permitido detectar QTL en numerosos cromosomas:

**SSC2:** se detectó un QTL para la área del lomo (Varona *et al.* 2002).

**SSC4:** se han descrito QTL para crecimiento, espesor de grasa dorsal, longitud de la canal, área del músculo, contenido de pigmento hematina, color Minolta a\* y L\* y porcentaje de linoleico (Pérez-Enciso *et al.* 2000; Óvilo *et al.* 2000, 2002a; Varona *et al.* 2002; Cloup *et al.* 2003).

**SSC6:** en este cromosoma se localizaron QTL para espesor de grasa dorsal, porcentaje de grasa intramuscular, área del músculo e índice de insaturación de los ácidos grasos (Óvilo *et al.* 2000, 2002a, 2005; Varona *et al.* 2002; Cloup *et al.* 2003).

**SSC7:** se detectó un QTL para el contenido de pigmento hematina (Óvilo *et al.* 2002a).

**SSC8:** se posicionó un QTL para palmitoleico (C16:1(n-9)), palmítico (C16:0) y longitud de la cadena de los ácidos grasos (Cloup *et al.* 2003).



**SSC10:** se identificó un QTL para el porcentaje de mirístico (C18:3(n-3)) (Clop *et al.* 2003).

**SSC12:** se detectaron QTL con efecto sobre linoleico (C18:3(n-3)) y vaccénico (C18:1(n-7)) (Clop *et al.* 2003)

**SSCX:** se localizaron QTL para la grasa intramuscular y color Minolta a\* (Pérez-Enciso *et al.* 2002).

Los efectos de todos estos QTL van en la dirección esperada (Serra *et al.* 1998). Los alelos Ibéricos incrementan la deposición de grasa dorsal, el porcentaje de grasa intramuscular, el porcentaje de palmítico, palmitoleico y la pigmentación del músculo. En cambio, disminuyen el crecimiento, el área del lomo, el porcentaje de linoleico y la longitud de la canal. De los resultados obtenidos se deduce que el espesor de la grasa dorsal y el contenido de linoleico mantienen una fuerte correlación negativa.

## 1.6. Identificación de la mutación causal de los QTL

El siguiente paso después de la detección de QTL es la identificación de los genes causales. Como se puede desprender de la Tabla 1.3, la genómica porcina se encuentra básicamente en este estadio. En el año 2004 el número de estudios de detección de QTL ya fue muy inferior al de años anteriores. Por tanto, actualmente los esfuerzos se centran en la búsqueda de mutaciones causales y en el análisis de los efectos de los polimorfismos encontrados en estos genes candidatos. Sin embargo, identificar mutaciones posicionadas dentro de la región del QTL que sean al mismo tiempo responsables del efecto observado es un objetivo muy difícil y laborioso de conseguir. Se debe tener presente que los métodos utilizados para la detección de QTL, con una distancia media entre marcadores de unos 20 cM y un pedigrí que consta de tres o cuatro centenares de animales, dan una localización muy poco precisa del QTL con un intervalo de confianza muy amplio en el cual pueden existir centenares de genes. Aunque el refinamiento del mapa de ligamiento, incrementando el número de marcadores dentro de la región de interés y el número de meiosis informativas, permite afinar un poco más la posición de los QTL detectados, siguen siendo regiones amplias del genoma que pueden contener muchos genes. Además, genes poco caracterizados o no identificados en porcino tampoco pueden ser excluidos como posibles candidatos, por lo que la identificación del gen y de la mutación causal continua siendo complicada.

Como se ha comentado previamente, disponer de mapas de alta densidad puede ayudar a la identificación de genes candidatos. En ratón se han descrito experimentos que combinan la información del mapeo de QTL, la disposición de un mapa denso de SNP y eQTL para localizar mutaciones causales. Mediante esta estrategia se ha identificado el *Insig2* como gen candidato para los niveles de colesterol en plasma (Cervino *et al.* 2005).

Existen tres estrategias diferentes para la elección de genes candidatos que se detallan a continuación.

### **1.6.1. Clonación por posición**

Este método se basa en clonar un gen partiendo de la información de su localización cromosómica. Para llevarlo a cabo se debe tener una asociación entre el marcador y el carácter. A continuación, mediante genotecas de ADN se buscan los clones que contienen la región, se secuencian y se identifican los genes. Finalmente, se buscan polimorfismos en el gen para detectar la mutación causal. Este método se ha utilizado principalmente para la detección de genes relacionados con enfermedades hereditarias humanas antes de la obtención de la secuencia del genoma humano. Sin embargo, en especies domésticas no ha sido un método habitual.

### **1.6.2. Genes candidatos**

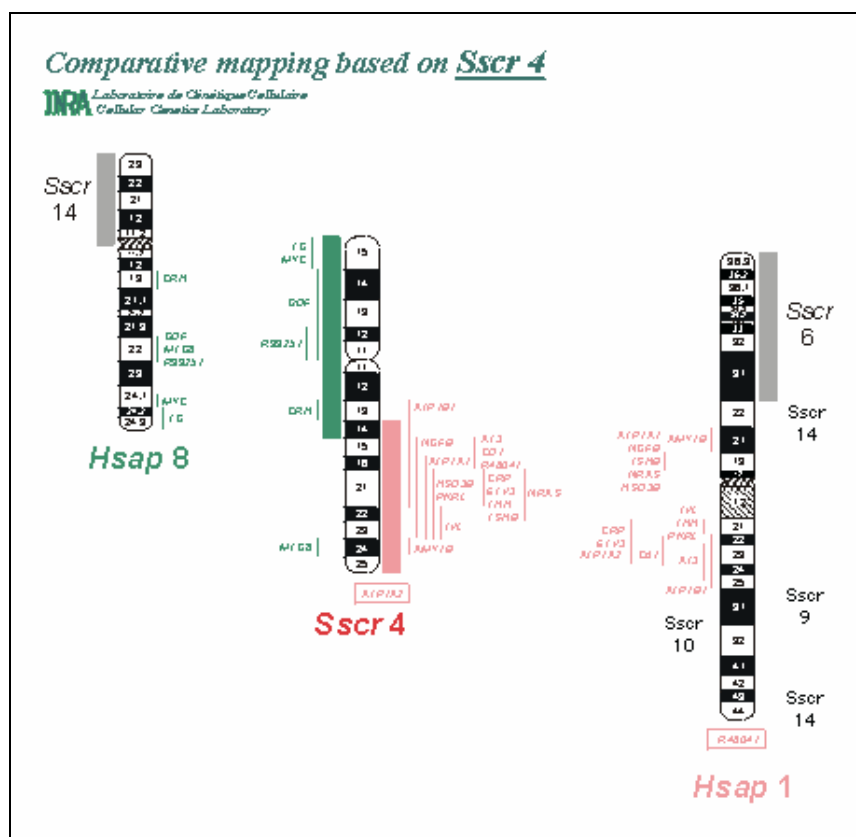
Se buscan genes relacionados con la fisiología del carácter sin conocer su localización cromosómica. Tampoco es necesaria la detección previa de QTL. Los genes que puedan estar relacionados con el fenotipo de interés y de los que se conozca su secuencia nucleotídica en la especie de interés o en otras especies se seleccionan, se buscan polimorfismos y finalmente, se realizan estudios de asociación con diferentes caracteres para comprobar su efecto.

### **1.6.3. Genes candidatos por posición**

Es la aproximación resultante de la combinación de los dos métodos anteriores y la más utilizada en las especies domésticas. La elección del gen se basa en su fisiología

y en la posición del gen descrita en la misma especie o por mapeo comparativo con especies de las que se dispone de mapas de alta resolución, como el humano o el ratón (Figura 1.7).

Recientemente se ha completado un mapa comparativo humano-cerdo 1.15 Mb compuesto por 2.274 loci (Meyers *et al.* 2005). El hecho de disponer de mapas comparativos finos permite establecer el orden de los genes y evitar errores de mapeo debido a reordenaciones cromosómicas o cambios en el orden de los genes en bloques conservados entre los genomas de diferentes especies. Para solventar estos problemas ya se habían ido realizando previamente trabajos para aumentar la resolución de los mapas comparativos en algunos cromosomas porcinos (Pinton *et al.* 2000; Sun *et al.* 2002; Lahbib-Mansais *et al.* 2003, 2005; Van Poucke *et al.* 2003; Robic *et al.* 2003).



**Figura 1.7.** Mapa comparativo del cromosoma 4 del cerdo, que contiene regiones homólogas con los cromosomas 8 y 1 humanos (<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare.htm>).

Finalmente, otra metodología aplicable para la búsqueda de genes candidatos sería combinar el mapeo de QTL con el uso de microarrays, los cuales permiten comparar patrones de expresión de cientos de genes. Aquellos genes que presenten diferencias significativas de expresión entre las líneas parentales serían escogidos como posibles genes candidatos posicionales para un fenotipo de interés. De esta manera se reduciría considerablemente el número de genes para analizar. Además, esta metodología permite la inclusión de genes de los que no se conoce su mecanismo de acción y que por tanto, no se considerarían con aproximaciones tradicionales (Wayne y McIntyre, 2002). En porcino, este tipo de aproximación combinando mapeo de QTL, análisis de expresión mediante microarrays y estudios de asociación fue empleado para la identificación de genes candidatos relacionados con conformación muscular y obesidad, entre los genes analizados se identificó el gen *TBG* (Ponsuksili *et al.* 2005).

### **1.7. Análisis de genes candidatos porcinos**

El número de genes cartografiados ha ido aumentando de forma importante en los últimos años. Además, en varios de ellos se han detectado polimorfismos asociados con algún carácter de interés. Sin embargo, son muy pocas las mutaciones causales identificadas (Andersson y Georges, 2004), siendo todavía necesario caracterizar múltiples genes o regiones cromosómicas localizadas dentro de los QTL.

Entre los genes descritos en la especie porcina aparecen genes relacionados con crecimiento, deposición de grasa, calidad de la carne, tamaño de la camada, resistencia a enfermedades o color de la capa (Rothschild, 2004). Sin embargo, sólo se destacarán algunos de ellos por sus implicaciones en la producción porcina:

- Gen del Receptor de la Rianodina 1 (*RYR1*) o gen del halotano (Fujii *et al.* 1991). Este gen se localiza en el cromosoma 6 y está asociado con un mayor contenido de magro en la carne y variabilidad de crecimiento (Geldermann *et al.* 1996). Sin embargo, los animales homocigotos *T* en la posición 1843 del ARNm son susceptibles a desarrollar el síndrome del estrés porcino. En condiciones de estrés, debido a su baja tolerancia, estos animales sufren un cuadro de taquipnea, fiebre y manchas que puede llegar a causar la muerte. Por otra parte, las carnes obtenidas sufren un descenso muy rápido del pH, generando carnes pálidas, blandas y exudativas (carnes PSE)

consideradas de baja calidad. Las razas porcinas más susceptibles son el Pietrain y el Landrace belga, que al mismo tiempo, se caracterizan por tener carnes magras y de muy buena conformación.

- Gen *Protein Kinase AMP-Activated Noncatalytic Gamma-3 (PRKAG3)* o también conocido por *RN*. Se encuentra en el cromosoma 15 y está asociado con un incremento del contenido en glicógeno del músculo esquelético, una disminución del pH de la carne, de la capacidad de retención de agua y del rendimiento del jamón cocido (Milan *et al.* 2000; Ciobanu *et al.* 2001; Lindahl *et al.* 2003).

- Gen *Insulin-like growth factor-2 (IGF2)*. Este gen se encuentra en el cromosoma 2 y afecta a la conformación muscular y al tamaño del corazón (Jeon *et al.* 1999; Nezer *et al.* 1999). Recientemente se ha detectado la mutación responsable del efecto observado. Se trata de una sustitución *G3072A* localizada en una región reguladora del intrón 3 y que además, presenta impresión genética materna, es decir, sólo se expresa el alelo paterno (Van Laere *et al.* 2003).

La industria porcina ya ha empezado a incluir estos genes en programas de selección asistida por marcadores (MAS). Concretamente en estos casos sería selección asistida por genes (GAS) y son genotipados en poblaciones sometidas a selección (Rothschild, 2003 y 2004).

### **1.7.1. Genes candidatos analizados en el proyecto IBMAP**

El proyecto IBMAP se centra actualmente en la búsqueda de genes candidatos posicionales para algunos de los QTL detectados previamente.

- Para el QTL del cromosoma 4 se eligió el gen *2,4-dienoyil-CoA reductase (DECR)* por su efecto en la oxidación de los ácidos grasos insaturados. El mapeo RH y el análisis de ligamiento lo posicionaron dentro del intervalo de confianza del QTL pero, a pesar de detectar un polimorfismo que causaba cambio aminoacídico, éste segregaba a frecuencias muy bajas en el pedigrí y no se realizó un estudio de asociación (Clop *et al.* 2002).

- Para el QTL del cromosoma 6 se estudiaron dos genes: el *Leptin receptor (LEPR)* y el *Heart fatty acid binding protein (FABP3)*.

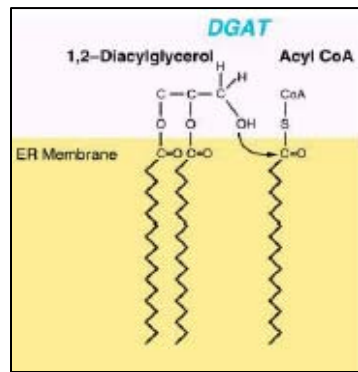
El gen *LEPR* está implicado con el control del hambre y en la regulación del balance energético. La asociación detectada entre este gen y la deposición de grasa dorsal lo convierten en un gen candidato interesante para caracteres de composición corporal (Óvilo *et al.* 2002b, 2005).

El gen *FABP3* codifica para una proteína relacionada con el transporte de ácidos grasos. Los resultados obtenidos varían en función del método estadístico. Si se aplica un modelo animal, este gen se asocia con el contenido de grasa intramuscular. Sin embargo, cuando el polimorfismo se incluye en el análisis de regresión del QTL, no se detecta ninguna asociación (Óvilo *et al.* 2002b).

- Para el cromosoma 2 se analizó el efecto del gen *IGF2*, aunque no se había detectado previamente ningún QTL en la región de este gen (Varona *et al.* 2002). La mutación está segregando sólo en una pequeña familia F<sub>2</sub>. Aún así, se detectó una asociación con grasa, área del lomo y peso de los jamones (Estellé *et al.* 2005).

### **1.7.2. Gen *Acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1)***

El *acil CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1)* es un enzima del retículo endoplasmático que juega un papel muy importante en el metabolismo de los glicerolípidos. Este enzima cataliza el último paso en la síntesis de triglicéridos. Esta reacción consiste en la unión de un acil-CoA con un diglicérido para obtener un triglicérido (Figura 1.8), los cuales constituyen las principales formas de almacenaje de energía (Buhman *et al.* 2001; Cheng *et al.* 2001). La síntesis de triglicéridos se puede llevar a cabo mediante tres rutas diferentes: vía del monoacilglicerol en el intestino, vía del ácido fosfatídico o glicerol-3-P presente en numerosos tejidos y vía del diacilglicerol aciltransferasa. El enzima DGAT actúa en las tres rutas (Lehner y Kuksis, 1996).



**Figura 1.8.** Reacción catalizada por el DGAT1 (Adaptada Buhman *et al.* 2001).

El gen *DGAT1* desempeña un papel fundamental en los procesos fisiológicos en los que intervienen los triglicéridos. De este modo, este gen está implicado en la absorción de grasa a nivel intestinal, ensamblaje de lipoproteínas, regulación plasmática de triglicéridos, almacenamiento de grasa en adipocitos, metabolismo energético muscular y en la producción de leche, huevos y ovocitos (Cases *et al.* 1998).

El gen *DGAT1* pertenece a la familia génica *acil-CoA:colesterol aciltransferasa* (*ACAT*), formada por tres aciltransferasas (*ACAT1*, *ACAT2* y *DGAT1*) que mantienen homología entre ellas (Oelkers *et al.* 1998; Buhman *et al.* 2000). El ARNm del gen *DGAT1* fue descrito en humano por Cases *et al.* (1998) y Oelkers *et al.* (1998) (GenBank NM\_012079). Posteriormente, se determinó la secuencia en ratón, rata y bovino (GenBank NM\_174693, NM\_174693 y NM\_174693, respectivamente).

En el año 2002 apareció la secuencia del gen *DGAT1* en porcino (GenBank AY116586). El gen consta de 9.303 pb y 17 exones, con una estructura génica similar a la de humano y bovino (Nonneman y Rohrer, 2002; Grisart *et al.* 2002). Este gen se transcribe a un ARNm de 1.935 pb (GenBank NM\_214051), cuya región codificante presenta un 83, 88 y 91% de similitud nucleotídica con el ARNm de ratón, humano y bovino, respectivamente. Asimismo, el gen codifica una proteína de 489 amino ácidos con una identidad del 85, 86 y 92% con ratón, humano y bovino, respectivamente (Nonneman y Rohrer, 2002).

El gen *DGAT1* se expresa en numerosos tejidos. En humano se ha detectado en corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, tejido adiposo, riñón, páncreas, bazo, próstata, testículo, ovario, intestino delgado, colon y sangre. Este

amplio patrón de expresión es coherente con el hecho de que el *DGATI* participa en la vía del glicerol-3-P, la cual se produce en la mayoría de células. Sin embargo, los niveles máximos de expresión se localizan en intestino delgado y tejido adiposo (Cases *et al.* 1998; Chen y Farese, 2000; Buhman *et al.* 2001). La detección de niveles relativamente bajos de expresión en hígado humano y de ratón, a pesar de tener actividad DGAT, podría ser atribuible a que el ARNm codifica para una proteína muy estable o a la presencia de un segundo *DGAT* (Cases *et al.* 1998).

En el año 2001, Cases *et al.* identificaron el gen *DGAT2*. Este gen pertenece a una familia génica diferente e independiente, la familia *MOGAT* (Meegalla *et al.* 2002; Winter *et al.* 2003) y no presenta homología con el *DGATI* (Lardizabal *et al.* 2001). El gen *DGAT2* también emplea acil-CoA y diacilglicerol para generar principalmente triglicéridos, pero sus niveles de expresión máximos se encuentran en hígado y tejido adiposo (Cases *et al.* 2001). Estas diferencias de expresión indican que el *DGATI*, al expresarse de forma mayoritaria en intestino delgado, participaría de forma más importante en la absorción de grasas de la dieta. Sin embargo, el *DGAT2*, con expresión abundante en hígado, sería más importante para el ensamblaje de VLDL con ácidos grasos sintetizados *de novo* (Meegalla *et al.* 2002).

Con la finalidad de estudiar de forma más detallada las funciones biológicas de este gen se generaron ratones *knock-out* (Smith *et al.* 2000). Hasta ese momento se pensaba que el gen *DGATI* era necesario para la síntesis de triglicéridos, formación de tejido adiposo y, por tanto, esencial para la vida. Sin embargo, Smith *et al.* (2000) demostraron que ratones deficientes de este gen eran viables, fértiles, habían reducido los depósitos de grasa corporal y eran resistentes a la obesidad inducida por la dieta. No obstante, el metabolismo de los triglicéridos estaba alterado en algunos tejidos como la piel, hígado, intestino delgado o glándula mamaria. Esta alteración causaba alopecia, ausencia de lactación (Chen y Farese, 2000) y modificaba la composición de ácidos grasos en el tejido adiposo y músculo esquelético, disminuyendo los ácidos grasos monoinsaturados y aumentando los saturados (Chen *et al.* 2002a). Sin embargo, estos animales deficientes de *DGATI* eran capaces de sintetizar triglicéridos. Posteriormente se pudo establecer que la falta de *DGATI* era compensada por los enzimas DGAT2 y diacilglicerol transacilasa, que eran los encargados de sintetizar triglicéridos (Buhman *et al.* 2002). Finalmente, este estudio con ratones *knock-out* sugirió que una inhibición parcial del gen podría ser útil para el tratamiento de la obesidad en humanos ya que la



reducción de tejido adiposo no causaba resistencia a la insulina y mejoraba el metabolismo de la glucosa (Smith *et al.* 2000; Chen y Farese, 2005).

Por otro lado, también se analizó el efecto contrario del gen. La sobreexpresión de *DGATI* en el tejido adiposo de ratón aumentaba el tamaño y la masa de los adipocitos y los animales eran más susceptibles a la obesidad inducida por la dieta. El nivel de sobreexpresión estaba correlacionado con el grado de engrasamiento. Sin embargo, este engrasamiento se limitaba al tejido adiposo y no afectaba ni al hígado ni al músculo esquelético, indicando que, al menos en el tejido adiposo, el *DGATI* tiene un efecto directo en el almacenaje de triglicéridos (Chen *et al.* 2002b).

De forma similar también se estudió el efecto de la sobreexpresión de este gen en músculo esquelético de rata. Esta sobreexpresión causaba un incremento del contenido de grasa intramuscular, por lo que se demostró que el *DGATI* también desempeña un papel importante en la síntesis de triglicéridos en este tejido (Roorda *et al.* 2005).

En bovino, de forma equivalente al porcino, también existen numerosos trabajos basados en la detección de QTL. Uno de ellos identificó un QTL con efecto sobre el contenido graso de la leche en el cromosoma 14. Para este QTL se propuso el gen *DGATI* como candidato posicional. A través de su análisis se identificó un polimorfismo que implicaba un cambio aminoacídico (K232A) y afectaba a la producción y composición de la leche (Grisart *et al.* 2002; Winter *et al.* 2002). En concreto, la presencia de la variante lisina incrementaba el contenido graso de la leche. Esta asociación fue confirmada en diferentes poblaciones y razas bovinas (Spelman *et al.* 2002; Thaller *et al.* 2003; Weller *et al.* 2003; Grisart *et al.* 2004; Pareek *et al.* 2005). Sin embargo, aunque existen evidencias que apuntan que la sustitución K232A es la mutación causal (Grisart *et al.* 2004), otros trabajos determinaron que esta mutación no era la responsable de toda la varianza genética del QTL para composición de leche ya que no se pudo excluir que el efecto observado sea causado por otra mutación en el mismo gen o en un locus próximo que estuviera en fuerte desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo K232A (Bennewitz *et al.* 2004; Kühn *et al.* 2004). Paralelamente, también se detectó que esta mutación en el *DGATI* afectaba a la deposición de grasa intramuscular (Thaller *et al.* 2003).

Finalmente, en humano se detectó un polimorfismo (*T79C*) en este gen asociado con un incremento de la masa corporal en mujeres turcas (Ludwig *et al.* 2002). Con la finalidad de validar este efecto se analizaron adultos y niños obesos franceses pero no se pudo confirmar la asociación de este SNP con caracteres relacionados con obesidad (Coudreau *et al.* 2003). Podría ser factible que otros genes, como el *DGAT2*, compensasen anomalías de funcionalidad del gen *DGAT1* y por tanto, no se observasen diferencias entre las dos variantes genéticas. De este modo, es necesario analizar estas enzimas para determinar su papel y posibles interacciones en la regulación del metabolismo energético.

El gen *DGAT1* se localizó en el cromosoma 8q24.3 humano (Cases *et al.* 1998). En porcino este gen se mapeó por ligamiento en el cromosoma 4 (Nonneman y Rohrer, 2002). Debido a la relación de este gen con el metabolismo de los ácidos grasos y a su localización, se eligió como candidato para los QTL del cromosoma 4 relacionados con grasa y composición de ácidos grasos.

### **1.7.3. Gen *adipocyte fatty-acid binding protein (FABP4)***

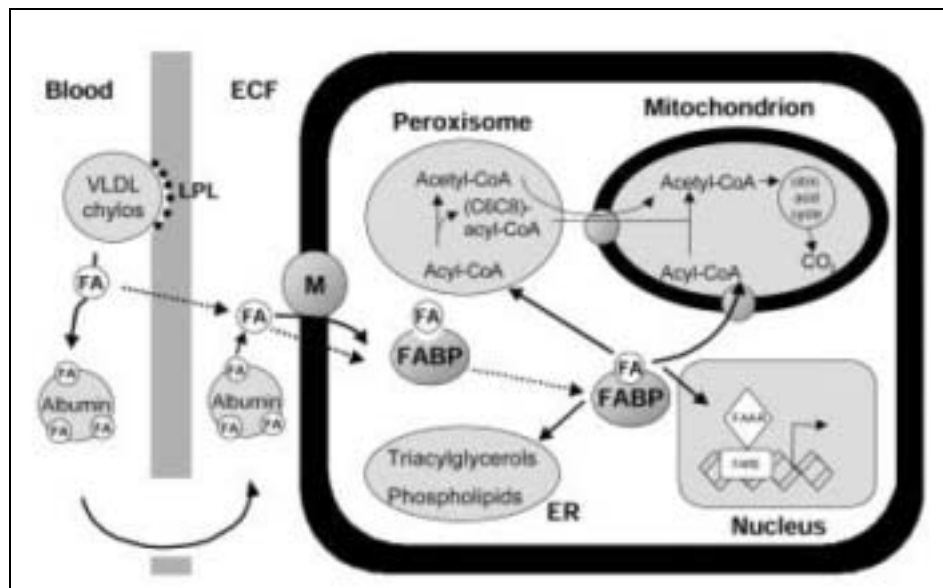
El gen *adipocyte fatty-acid binding protein (FABP4)* pertenece a la familia multigénica de los iLBP (*intracellular lipid-binding proteins*; Haunerland y Spener, 2004). Esta familia génica codifica proteínas intracelulares de bajo peso molecular. Hasta el momento se han descrito nueve genes diferentes en mamíferos (Tabla 1.5). Originalmente se pensaba que cada proteína se encontraba de forma específica en un solo tejido y fueron nombradas en función del tejido en que se detectaron. Sin embargo, posteriormente se observó que algunas de estas proteínas se expresaban en diferentes tejidos. De esta forma existen dos nomenclaturas, una numérica y otra que hace referencia al tejido en el cual se expresa preferencialmente o al tejido en el cual se descubrió (Hertzel y Bernlohr, 2000; Haunerland y Spener, 2004).

**Tabla 1.5.** Miembros de la familia génica de los iLBP (Adaptada de Hertzell y Bernlohr, 2000 y Haunerland y Spener, 2004).

| <i>Gen</i> |                | <i>Expresión tisular</i>   |
|------------|----------------|--|
| FABP1      | L-FABP         | Hígado, intestino, riñón, pulmón, páncreas   |
| FABP2      | I-FABP         | Intestino  |
| FABP3      | H-FABP         | Corazón, mamas, músculo esquelético, pulmón, placenta, testículo, ovario, cerebro, estómago                        |
| FABP4      | A-FABP         | Tejido adiposo, macrófagos   |
| FABP5      | E-FABP         | Piel, tejido adiposo, pulmón, cerebro, mamas, lengua, estómago, hígado, corazón, placenta, intestino, retina, etc. |
| FABP6      | I-BABP         | Íleo   |
| FABP7      | B-FABP         | Cerebro, bulbo olfativo, retina, glía  |
| FABP8      | M-FABP<br>PMP2 | Cerebro, células de Schwann  |
| FABP9      | T-FABP         | Testículo  |

La insolubilidad de los ácidos grasos dentro de la célula requiere mecanismos específicos de transporte. La función de los FABP es la de transportar ácidos grasos desde la membrana celular a los lugares de oxidación de éstos, hacia los lugares de síntesis de triglicéridos o fosfolípidos o hacia al núcleo para desempeñar posiblemente, funciones reguladoras (Figura 1.9). También pueden transportar ácidos grasos hacia la membrana una vez completada la lipólisis (Veerkamp y Maatman, 1995). Además de esta función de captación y transporte de ácidos grasos, los FABP también están involucrados en el crecimiento y en la diferenciación celular y en la expresión génica (Veerkamp y Maatman, 1995; Zimmerman y Veerkamp, 2002; Haunerland y Spener, 2004).

Todos los miembros de esta familia conservan la misma estructura génica. Estos genes están formados por cuatro exones de tamaño pequeño y tres intrones de tamaño más variable (Zimmerman y Veerkamp, 2002). Todos estos genes codifican proteínas de 126-134 aminoácidos, con una similitud entre ellas del 22-73% (Zimmerman y Veerkamp, 2002). En adipocitos, hepatocitos y miocitos, en los cuales los ácidos grasos son los sustratos principales para la síntesis de lípidos, almacenaje o lipólisis, los respectivos tipos de FABP representan entre el 1-5% de las proteínas del citosol, estas cantidades pueden aumentar después de periodos de mayor influjo de lípidos a la célula (Haunerland y Spener, 2004).



**Figura 1.9.** Representación de la función de los FABP en la captación y transporte intracelular de ácidos grasos. FA: *fatty acid*; VLDL: *very low density lipoprotein*; chylos: *chylomicrons*; LPL: *lipoprotein lipase*; ECF: *extracellular fluid*; M: *membrane-associated FA transport protein*; ER: *endoplasmic reticulum*; FAAR: *fatty acid-activated receptor*; FARE: *fatty acid-responsive element*. (Zimmermann y Veerkamp, 2002).

El ARNm del gen *FABP4* se ha descrito en humano (GenBank NM\_001442), ratón (NM\_024406), rata (NM\_053365), bovino (NM\_174314), porcino (AJ416020) y gallina (NM\_204290). Este gen se expresa casi exclusivamente y de forma abundante en los adipocitos, aunque también se ha detectado expresión en macrófagos. Este gen, al igual que los otros miembros de su familia, está altamente conservado entre mamíferos. Cabe destacar que la similitud de la región codificante entre mamíferos y gallina es del 73-74% (Wang *et al.* 2004).

Con la finalidad de determinar de forma más precisa la función del *FABP4*, se generaron ratones con una disrupción de este gen (Hotamisligil *et al.* 1995). Estos ratones eran aparentemente sanos y capaces de desarrollar adipocitos de forma normal. Además, cuando eran alimentados con una dieta con alto contenido de grasa, tanto los ratones deficientes como los que no lo eran ganaban peso de forma similar. Sin embargo, este *knock-out* produce cambios en dos procesos metabólicos: disminuye el eflujo de ácidos grasos (la lipólisis se reduce hasta un 40%) y se utiliza de forma preferencial glucosa en lugar de ácidos grasos (Coe *et al.* 1999; Baar *et al.* 2005). Por

otro lado, también se observó que la disrupción de este gen produce un incremento de expresión del gen *FABP5*, el cual compensa parcialmente la falta de *FABP4* (Hotamisligil *et al.* 1996). Finalmente, la disrupción del gen *FABP4* en los macrófagos causaba una disminución de las lesiones producidas por arteriosclerosis en un 50% aproximadamente (Makowski *et al.* 2001).

A parte de este gen, también se han realizado estudios de *knock-out* en otros miembros de esta familia con la finalidad de poder establecer su función fisiológica. En varios casos se ha visto que la expresión de diferentes FABP es interdependiente, es decir, la falta de un FABP en particular se compensa por la sobreexpresión de otro miembro de la familia o incluso, por otras proteínas no relacionadas (Hauerland y Spener, 2004).

El gen *FABP4* fue caracterizado y cartografiado en porcino por Gerbens *et al.* (1998). Este gen consta de 8.144 pb (GenBank Y16039) e incluye cuatro exones con un tamaño de 72, 172, 101 y 50 pb, respectivamente que codifican una proteína de 132 aminoácidos. La región codificante del gen muestra un 90, 83, 81 y 74% de similitud nucleotídica respecto a humano, ratón, rata y gallina, respectivamente.

A partir del análisis de la secuencia del gen *FABP4* porcino se encontró un microsatélite en el intrón 1 asociado con el contenido de grasa intramuscular y, posiblemente, con crecimiento en una población de Duroc (Gerbens *et al.* 1998). Sin embargo, esta asociación no se confirmó al analizar otras dos poblaciones diferentes, una de Meishan y otra formada por cerdos austriacos (Large White, Pietrain y Landrace). Por otro lado, en estas dos poblaciones se detectaron posibles asociaciones con deposición de grasa dorsal y crecimiento, respectivamente (Gerbens *et al.* 2000; Nechtelberger *et al.* 2001). Con la finalidad de validar la asociación de este polimorfismo con el contenido de grasa intramuscular, se analizó la expresión de este gen en una población generada por un cruce Large White x Landrace pero no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes genotipos. La ausencia de significación se atribuyó a la falta de asociación del *FABP4* con el contenido de grasa intramuscular en esta población y al reducido tamaño muestral (Gerbens *et al.* 2001).

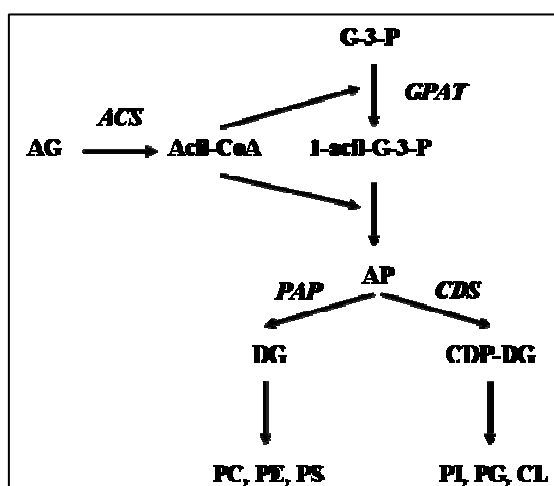
Finalmente, este gen fue mapeado en el cromosoma 4 (Gerbens *et al.* 1998) en una región donde se han descrito múltiples QTL relacionados con grasa y crecimiento

(Wang *et al.* 1998; Knott *et al.* 1998; Walling *et al.* 1998 y 2000; Paszek *et al.* 1999; Pérez-Enciso *et al.* 2000; Bidanel *et al.* 2001a, De Koning *et al.* 2001a; Milan *et al.* 2002).

Debido a su localización y a sus propiedades fisiológicas, el gen *FABP4* se convierte en un candidato posicional para los QTL relacionados con caracteres de crecimiento y metabolismo de ácidos grasos del cromosoma 4.

#### 1.7.4. Gen *CDP-diacylglycerol synthase 1 (CDS1)*

El enzima *CDP-diacylglycerol synthase 1 (CDS1)* cataliza la formación de citidina difosfatoglicerol (CDP-diacilglicerol) a partir de ácido fosfatídico y citidina trifosfato (CTP) (Heacock *et al.* 1996; Weeks *et al.* 1997). El ácido fosfatídico puede ser transformado en CDP-diacilglicerol mediante el CDS1 o en diacilglicerol por la fosfatasa (Figura 1.10). La partición del ácido fosfatídico entre diacilglicerol o CDP-diacilglicerol debe ser, por tanto, un punto importante en la regulación del metabolismo de los lípidos. El CDP-diacilglicerol participa en la síntesis de glicerolípidos como precursor del fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y cardioplipina (Ken, 1995; Shen *et al.* 1996; Halford *et al.* 1998; Volta *et al.* 1999).



**Figura 1.10.** Biosíntesis de los fosfolípidos a partir de glicerol-3-fosfato. ACS: acil-CoA sintetasa; CDS: CDP-diacilglicerol; CL: cardioplipina; DG: diacilglicerol; AG: ácido graso; G-3-P: glicerol-3-fosfato; GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferasa; AP: ácido fosfatídico; PAP: ácido fosfatídico fosfatasa; PC: fosfatidilcolina; PE; fosfatidiletanolamina; PG: fosfatidilglicerol; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina (Adaptada de Vance y Vance, 2004).

En mamíferos, el enzima CDS se localiza tanto en la mitocondria como en el retículo endoplasmático, aunque el 90-95% de su actividad la desempeña en el retículo endoplasmático (Vance y Vance, 2004). Esta doble localización es debida a que el CDP-diacilglicerol es necesario para la síntesis de fosfatidilglicerol y cardioplipina en la

mitocondria y para la síntesis de fosfoinosítidos en el retículo endoplasmático y posiblemente, en otros orgánulos (Shen *et al.* 1996; Heacock *et al.* 1997). De esta forma, el gen *CDS1* interviene en el metabolismo celular. Por un lado, forma parte del ciclo de los fosfoinosítidos, participando en la vía de transducción de la señal intracelular. Este ciclo genera segundos mensajeros implicados en el crecimiento celular, diferenciación, acción hormonal y de neurotransmisores y percepción sensorial (Wu *et al.* 1995; Saito *et al.* 1997). Por el otro lado, la cardiolipina es necesaria para la actividad de enzimas mitocondriales involucrados en el metabolismo energético (Hatch, 2004).

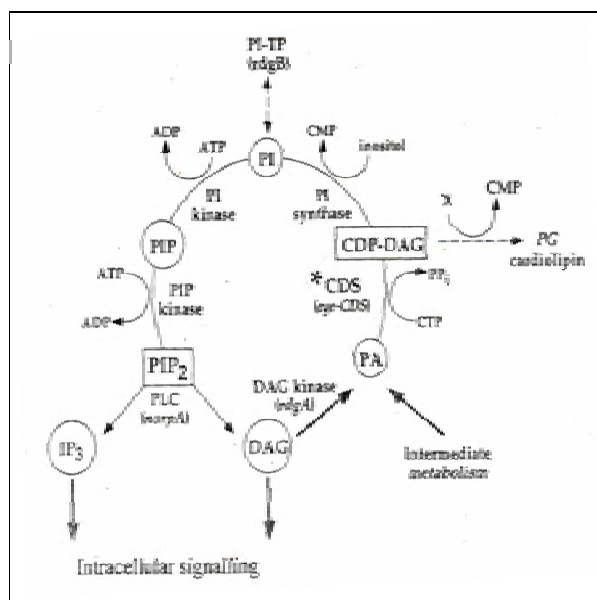
El ARNm del gen *CDS1* fue aislado y secuenciado en humano por diferentes grupos (Heacock *et al.* 1996; Lykidis *et al.* 1997; Weeks *et al.* 1997). En humano, este gen se transcribe en un ARNm de 2.374 pb (GenBank NM\_001263), de los cuales 1.385 pb son región codificante. En mamíferos también se describió la secuencia del ARNm en ratón y rata (GenBank AF533367 y NM\_031242, respectivamente) (Saito *et al.* 1997). La proteína resultante consta de 461 aminoácidos. Recientemente se ha caracterizado el gen *CDS1* en ratón, el cual tiene un tamaño de unas 55 kb y está compuesto por 13 exones (Inglis-Broadgate *et al.* 2005).

En humano, la expresión de este gen se detectó en cerebro, pulmón, músculo esquelético, riñón, corazón, hígado, páncreas, intestino delgado, ovario, testículo y placenta (Heacock *et al.* 1996; Lykidis *et al.* 1997). En rata, se detectó expresión en retina, cerebro y testículo y, de forma más débil, en riñón, intestino delgado, placenta, pulmón y timo. Sin embargo, no se detectó en corazón, hígado y ovario (Saito *et al.* 1997). En ratón, se encontró expresión en cerebro, ojo, testículo y riñón (Inglis-Broadgate *et al.* 2005).

Aunque en un principio se creía que solamente existía un gen *CDS* y que su regulación post-transcripcional era la que permitía la especialización de diferentes isoformas (Wu *et al.* 1995), en el año 1998 se describió la presencia del gen *CDS2* (Halford *et al.* 1998; Volta *et al.* 1999). En humano este ARNm codifica una proteína de 445 aminoácidos. La caracterización del gen *CDS2* ha sido descrita en humano y ratón (Halford *et al.* 2002; Inglis-Broadgate *et al.* 2005). Este gen es más pequeño, 43 kb, pero también consta de 13 exones (Inglis-Broadgate *et al.* 2005). La expresión de

este gen, a diferencia del *CDS1*, es ubicua (Volta *et al.* 1999; Inglis-Broadgate *et al.* 2005).

A pesar de que se ha sugerido que el gen *CDS1* desempeña un papel importante en el metabolismo de numerosos lípidos, no existen estudios que determinen la función exacta de este gen en mamíferos. En levaduras, por disrupción del gen, se demostró que el *CDS1* era esencial para el crecimiento celular y que codificaba para la mayor parte de la actividad sintasa (Shen *et al.* 1996). En procariontes, el CDP-diacilglicerol juega un papel central en la síntesis de lípidos (Heacock *et al.* 1997). En *Drosophila*, se detectó una isoforma específica de este enzima en el ojo que actúa como fotorreceptor. En esta especie la fototransducción está mediada por el ciclo de los fosfoinosítidos (Figura 1.11).



**Figura 1.11.** Ciclo de los fosfoinosítidos. La fosfolipasa C (PLC) hidroliza fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ) para generar inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). Para regenerar  $PIP_2$ , el DAG es fosforilado por la DAG quinasa para obtener ácido fosfatídico (PA). El CDS añade un CMP al PA. Este producto, CDP-diacilglicerol, es el que proporciona el grupo fosfatidil al inositol. El fosfatidilinositol (PI) es fosforilado por la PI quinasa y PIP quinasa para generar  $PIP_2$  (Wu *et al.* 1995).

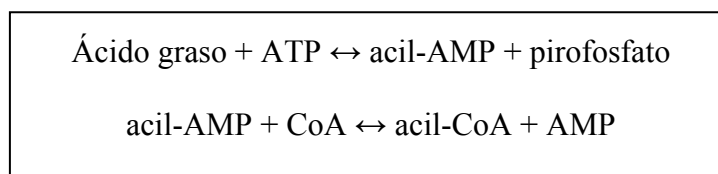
El fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ) tiene un papel central en este proceso y sus niveles están estrechamente regulados por esta isoforma específica del gen *CDS*. Una mutación en el gen causa degeneración de la retina dependiente de la luz, mientras que la sobreexpresión incrementa la amplitud de la respuesta lumínica (Wu *et al.*, 1995).

El gen *CDS1* porcino no había sido caracterizado. Además, este gen se localiza por mapeo comparativo en el cromosoma 8, en el cual se han detectado diferentes QTL relacionados con composición de ácidos grasos. Por estos dos motivos, se escogió el gen *CDS1* como candidato.



### 1.7.5. Gen *acyl-CoA synthetase long-chain 4 (ACSL4)*

El enzima *acyl-CoA synthetase long-chain* (ACSL) desempeña un papel importante en el metabolismo de los ácidos grasos en los mamíferos. Para que los ácidos grasos puedan ser utilizados en diferentes procesos bioquímicos se debe producir una reacción de activación previa. En esta reacción inicial de activación de los ácidos grasos interviene este enzima. De este modo, el ACSL cataliza la síntesis de acil-CoA de cadena larga a partir de ácidos grasos, ATP y CoA (Figura 1.12) (Suzuki *et al.* 1990). Después de esta activación, los acil-CoA pueden dirigirse hacia dos rutas metabólicas diferentes: una anabólica para la síntesis de lípidos o una catabólica basada en la  $\beta$ -oxidación (Suzuki *et al.* 1995; Coleman *et al.* 2002; Van Horn *et al.* 2005). A parte de su principal implicación en el metabolismo de los lípidos, los acil-CoA también intervienen en la regulación del transporte transmembranal, en la activación enzimática y en la regulación génica (Piccini *et al.* 1998).



**Figura 1.12.** Reacción catalizada por el ACSL para la síntesis de acil-CoA (Adaptada de Suzuki *et al.* 1990).

El gen *ACSL4* pertenece a la familia de los *ACSL*. Esta familia está formada por cinco isoformas que se diferencian por el tipo de ácidos grasos que utilizan como sustrato, la distribución tisular, la localización celular y su regulación. Sin embargo, se han producido inconsistencias en la nomenclatura de los diferentes miembros de esta familia que han conducido a confusiones en la literatura. Para solucionar esta confusión se ha realizado recientemente una revisión de su nomenclatura (Tabla 1.7) (Mashek *et al.* 2004). El error se produjo al describir los genes *FACLI* y *FACL2* en humano, ya que posteriormente se demostró que estos dos genes eran en realidad el mismo gen. Por tanto, la nomenclatura revisada identifica el *FACLI/FACL2* humano como *ACSL1*. En consecuencia, el previamente nombrado *FACL2* humano no es ortólogo al *ACSL2* en ratón. Para solucionar este problema, éste último pasó a nombrarse *ACSL6* debido a que presenta una mayor identidad con el *ACSL6* humano. La necesidad de unificar la

nomencultura es más evidente si se considera que el *ACSL3*, *ACSL4*, *ACSL5* y *ACSL6* presentan variantes que codifican proteínas diferentes y que además, no se descarta la presencia de nuevas variantes (Mashek *et al.* 2004).

**Tabla 1.7.** Nomenclatura revisada de la familia *ACSL* (Adaptada de Mashek *et al.* 2004).

| Nomenclatura<br>(Localización cromosómica) |                         |                              |  |  |  |   |
|--|-------------------------|------------------------------|--|--|--|---|
| Gen  |                         |                              | Nomenclatura<br>previa                       | Secuencias nucleotídicas   |  |   |
| Humano                                     | Rata                    | Ratón                        |  | Humano   | Rata   | Ratón   |
| <i>ACSL1</i><br>(4q34-35)                  | <i>ACSL1</i><br>(16q11) | <i>ACSL1</i><br>(8B1.1)      | FACL1, FACL2,<br>LACS, LACS1,<br>LACS2, ACS1 | NM_001995  | NM_012820  | NM_007981   |
| <i>ACSL3</i><br>(2q34-35)                  | <i>ACSL3</i><br>(9q33)  | <i>ACSL3</i><br>(1 C4)       | FACL3, ACS3,<br>PRO2194                      | Variante 1:<br>NM_004457<br>Variante 2:<br>NM_203372                             | NM_057107  | Variante 1:<br>NM_028817<br>Variante 2:<br>NM_001033606   |
| <i>ACSL4</i><br>(Xq22.3-<br>q23)           | <i>ACSL4</i><br>(Xq14)  | <i>ACSL4</i><br>(X F1)       | FACL4, ACS4,<br>LACS4, MRX63                 | Variante 1:<br>NM_004458<br>Variante 2:<br>NM_022977                             | NM_053607  | Variante 1:<br>NM_207625<br>Variante 2:<br>NM_019477<br>Variante 3:<br>NM_001033600                                   |
| <i>ACSL5</i><br>(10q25.1-<br>25.2)         | <i>ACSL5</i><br>(1q55)  | <i>ACSL5</i><br>(19 D2)      | FACL5, ACS2,<br>ACS5                         | Variante 1:<br>NM_016234<br>Variante 2:<br>NM_203379<br>Variante 3:<br>NM_203380 | NM_053607  | NM_027976   |
| <i>ACSL6</i><br>(5q31)                     | <i>ACSL6</i><br>(10q22) | <i>ACSL6</i><br>(11<br>B1.3) | FACL6, ACS2,<br>LACS2, LACS5,<br>KIAA0837    | Variante 1:<br>NM_015256<br>Variante 2:<br>NM_001009<br>185                      | Variante 1:<br>NM_130739<br>Variante 2:<br>AY_625254 | Variante 1:<br>NM_144823<br>Variante 2:<br>NM_001033597<br>Variante 3:<br>NM_001033598<br>Variante 4:<br>NM_001033599 |

Los miembros de la familia *ACSL* se dividen a su vez en dos subfamilias: la primera está constituida por los genes *ACSL1*, *ACSL5* y *ACSL6*, los cuales presentan una similitud aminoacídica del 60% aproximadamente entre ellos y un 30% de similitud con los miembros de la segunda subfamilia, formada por los genes *ACSL3* y *ACSL4* (Piccini *et al.* 1998; Vitelli *et al.* 2000; Coleman *et al.* 2002; Van Horn *et al.* 2005).

La secuencia del gen *ACSL4* ha sido descrita en humano, rata y ratón. En humano, el gen consta de 16 exones (Minekura *et al.* 2001) y se ha posicionado en el

cromosoma Xq22.3 (Cao *et al.* 1998; Piccini *et al.* 1998). Este gen se expresa en varios tejidos, sin embargo, no se detectó expresión en hígado (Cao *et al.* 1998). En rata y ratón también se expresa en diferentes tejidos pero a diferencia de humano, sí se detectó en hígado (Kang *et al.* 1997; Suzuki *et al.* 1990; Vitelli *et al.* 2000). A pesar de que los enzimas ACSL intervienen tanto en la síntesis como en la oxidación de ácidos grasos, algunas isoformas actúan preferencialmente en uno de los dos procesos. De este modo, se sugirió que el ACSL4 y el ACSL5 generan acil-CoA destinados principalmente para la  $\beta$ -oxidación debido a su localización en peroxisomas y mitocondrias (Coleman *et al.* 2002). Sin embargo, en situaciones de exceso de energía, el ACSL4 también los destinaría para la síntesis de triglicéridos (Lewin *et al.* 2002).

Se han realizado algunos estudios en humano y ratón para evaluar los efectos producidos por la alteración del gen *ACSL4*. Por un lado, hembras de ratón heterocigotas para la deficiencia de *ACSL4* presentaban una disminución de la fertilidad, alteraciones morfológicas en el útero y las camadas eran más pequeñas (Cho *et al.* 2001). Por otra parte, alteraciones en la expresión o mutaciones en el gen se han relacionado con la aparición de determinados tipos de cáncer o con alteraciones neurológicas y retraso mental (Cao *et al.* 2000; Meloni *et al.* 2002; Covault *et al.* 2004). Estas patologías son debidas principalmente a alteraciones en el metabolismo lipídico. En concreto, el gen *ACSL4* presenta preferencia por los ácidos grasos araquidónico (20:4) y eicosapentanoico (C20:5), los cuales intervienen en estas patologías.

La función de este gen en relación al metabolismo de los lípidos y su posición en el cromosoma X, donde previamente se han detectado QTL para grasa intramuscular y crecimiento (Pérez-Enciso *et al.* 2002, 2005), convierten el gen *ACSL4* en candidato posicional para estos caracteres.

# **OBJETIVOS**

El presente trabajo se engloba dentro del proyecto IBMAP-2 (MCYT AGF99-0284-C02) y de su continuación (INIA CPE03-010-C3) desarrollados en colaboración entre el INIA, la UdL-IRTA y la UAB. Este proyecto ha sido posible gracias a los resultados obtenidos previamente por el proyecto IBMAP (MCYT AGF96-2510-C05) en el cual, mediante barrido genómico, se detectaron QTL de interés económico en un cruce  $F_2$  entre Ibérico (línea Guadyerbas) y Landrace.

Los principales objetivos del proyecto IBMAP-2 consistieron en realizar el refinamiento de QTL y en el análisis de genes candidatos posicionales relacionados con el metabolismo lipídico.

Los objetivos específicos del presente trabajo fueron:

- 1.) Refinar la posición de los QTL detectados en los cromosomas 2, 4, 7, 8, 13 y X incrementando la densidad de marcadores en la  $F_2$ . Elegir y genotipar marcadores moleculares polimórficos e informativos posicionados en las regiones próximas de estos QTL.
- 2.) Refinar la posición de los QTL de los cromosomas 4, 8, y X aumentando el número de meiosis informativas. Genotipado de los marcadores disponibles en estos cromosomas en una generación  $F_3$  y un retrocruce.
- 3.) Analizar genes candidatos posicionales para los QTL relacionados con deposición de grasa y composición de ácidos grasos. Se eligieron los genes *DGATI* y *FABP4* para los QTL del cromosoma 4, el *CDS1* para el cromosoma 8 y el *ACSL4* para el cromosoma X. Caracterización del ARNm, identificación de polimorfismos, análisis de expresión, localización cromosómica y realización de estudios de asociación con caracteres relacionados con el metabolismo lipídico.

# **RESULTADOS**

***1. On growth, fatness and form: A further look at porcine's chromosome 4 in an Iberian x Landrace cross***

A. Mercadé, J. Estellé, J. L. Noguera, J. M. Folch, L. Varona, L. Silió, A. Sánchez, M. Pérez-Enciso

*Mammalian Genome* (2005) 16(5):374-382

***2. Large scale, multibreed multitrait analyses of QTL experiments: The case of porcine X chromosome***

M. Pérez-Enciso, A. Mercadé, J.P. Bidanel, H. Geldermann, S. Cepica, H. Bartenschlager, L. Varona, D. Milan, Josep M. Folch

*Journal of Animal Science* (2005) 83:2289-2296



***3. Characterization of the porcine acyl-CoA synthetase long-chain 4 (ACSL4) gene and its association with growth and meat quality traits***

A. Mercadé, J. Estellé, M. Pérez-Enciso, L. Varona, L. Silió, J. L. Noguera, A. Sánchez,  
J. M. Folch

Aceptado en *Animal Genetics*

**Characterization of the porcine *acyl-CoA synthetase long-chain 4 (ACSL4)* gene  
and its association with growth and meat quality traits**

Running title: Characterization and association study of the pig *ACSL4* gene

A. Mercadé<sup>\*</sup>, J. Estellé<sup>\*</sup>, M. Pérez-Enciso<sup>†,\*</sup>, L. Varona<sup>§</sup>, L. Silió<sup>\*\*</sup>, J. L. Noguera<sup>§</sup>, A.  
Sánchez<sup>\*</sup>, and J. M. Folch<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain.

<sup>†</sup> Institut Català de Recerca i Estudis Avançats, 08010, Barcelona, Spain.

<sup>§</sup> Àrea de Producció Animal, Centre UdL-IRTA, 25198, Lleida, Spain.

<sup>\*\*</sup> Departamento de Mejora Animal SGIT-INIA, 28040, Madrid, Spain

Correspondence to:

Anna Mercadé

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

08193, Bellaterra, Spain

email: [anna.mercader@uab.es](mailto:anna.mercader@uab.es)

Phone: + 34 93 581 4260

Fax: +34 93 581 2106

## Summary

Long-chain acyl-CoA synthetase (ACSL) catalyzes the formation of long-chain acyl-CoA from fatty acid, ATP and CoA, activating fatty acids for subsequent reactions. ACSL thus plays an essential role in both the lipid biosynthesis and the fatty acid degradation. The *ACSL4* gene was evaluated as a positional candidate gene for the QTL located between *SW2456* and *SW1943* on chromosome X. We have sequenced 4906 bp of the pig *ACSL4* mRNA. Sequence analysis allowed us to identify ten polymorphisms located in the 3'-UTR region and two *ACSL4* haplotypes. Furthermore, a QTL and an association study between polymorphisms of the *ACSL4* gene and traits of interest was carried out in an Iberian x Landrace cross. We report QTL that have not been identified previously and an association of the *ACSL4* polymorphisms with growth and percentage of oleic fatty acid. Finally, we have determined the allelic frequencies in 140 pigs belonging to the Iberian, Landrace, Large White, Meishan, Pietrain, Duroc, Vietnamese, Peccary and Babirusa.

**Keywords** pig, sequencing, polymorphisms, quantitative trait loci, association analysis, fatty acid, growth.

## Introduction

In mammals, long-chain acyl-CoA synthetase (ACSL) plays a key role in the metabolism of fatty acids and thus in the energy balance of the organism. ACSL catalyzes the formation of long-chain acyl-CoA from fatty acid, ATP and CoA (Suzuki *et al.* 1990). After this essential activation step, acyl-CoA is used in two major metabolic pathways: the pathway for anabolic conversion of fatty acids to cellular lipids and the pathway for catabolism of fatty acids via  $\beta$ -oxidation (Suzuki *et al.* 1995;

Coleman *et al.* 2002; Van Horn *et al.* 2005). Importantly, and in addition to fatty acid metabolism, long-chain acyl-CoAs are involved in cell signal transduction by regulating membrane trafficking, ion fluxes, protein kinase C, and gene expression (Piccini *et al.* 1998). The porcine *ACSL4* gene belongs to the *ACSL* family that consists of five isoforms based on differences in fatty acid substrate, tissue distribution, subcellular location, and regulation. These members form two subfamilies: *ACSL1*, *ACSL5* and *ACSL6* share approximately 60% sequence identity and about 30% with the two members of the second subfamily, *ACSL3* and *ACSL4* (Piccini *et al.* 1998; Vitelli *et al.* 2000; Coleman *et al.* 2002; Van Horn *et al.* 2005).

The human *ACSL4* gene is located on Xq22.3 (Cao *et al.* 1998; Piccini *et al.* 1998). We previously mapped the pig *ACSL4* gene to the chromosome X (SSCX) at 53 cR from *SW1426* using the IMpRH panel (Mercadé *et al.* 2005a). Comparative mapping between pig and human revealed that the assignment of the pig *ACSL4* gene was consistent with the position of the *ACSL4* gene in human (McCoard *et al.* 2001). The location of the pig *ACSL4* gene was close to a QTL for intramuscular fat detected in an Iberian x Landrace F<sub>2</sub> intercross between *SW2476* and *SW1608* markers (Pérez-Enciso *et al.* 2002) and within a QTL affecting growth in the same cross (Pérez-Enciso *et al.* 2005). More recently, we have reported a multibreed multitrait QTL analysis of SSCX that involved five different crosses. In this study QTL affecting backfat, ham weight, shoulder weight, growth and carcass length were detected between *SW2456* and *SW1943* (Pérez-Enciso *et al.* 2005). Thus, the *ACSL4* gene is a potential positional candidate gene given its role in the metabolism of fatty acids.

The objectives of this work were the characterization of the nucleotide sequence of the pig *ACSL4* mRNA, the detection of polymorphisms and to perform a QTL analysis and

an association study between polymorphisms of this gene and traits of interest in an Iberian x Landrace intercross.

## **Material and methods**

### Amplification and sequencing of the pig *ACSL4* mRNA

Total RNA was isolated from liver samples corresponding to twelve pigs belonging to the Iberian, Landrace, Large White, Pietrain, Duroc and Meishan breeds using the Trizol reagent (Gibco BRL, Life Technologies SA) and reverse transcribed into cDNA with the ThermoScript™ RT-PCR system (Invitrogen), following the manufacturer's instructions.

### mRNA expression of the *ACSL4* gene

Total RNA extraction and cDNA synthesis were carried out as previously described using heart, lungs, spleen, stomach, brain, skeletal muscle, backfat, uterus, ovarian and testis samples. A fragment was amplified with primers F1 and R1 (Supplemental Table 1) and electrophoresed in a 1.5 % agarose gel stained with ethidium bromide.

### Animal material and traits analyzed

The population used in the QTL analysis consisted of a cross between Iberian Guadyerbas and Landrace. Full details of the cross are given in (Varona *et al.* 2002; Mercadé *et al.* 2005b). The pedigree was formed by 321 F<sub>2</sub>, 87 F<sub>3</sub> and 85 backcross (BC) animals.

Traits analyzed here were those resulted significant in this cross in previous reports (Pérez-Enciso *et al.* 2002; Pérez-Enciso *et al.* 2005) and traits related to fatty acid composition. Thus, they were backfat thickness at the shoulder level (BF1), backfat thickness at the last rib (BF2), live weight at slaughter (LW), intramuscular fat (IMF), muscle color Minolta measurements ( $a^*$  for redness) and percentage of pigment content (% Haem) measured in the *Longissimus thoracis* muscle, percentage of fatty acids (details are in Clop *et al.* 2003), % of monounsaturated fatty acids (MUFA). IMF, % of fatty acids, color and % Haem content measurements were only available in the F<sub>2</sub> individuals. The measures of these phenotypic traits are described elsewhere (Óvilo *et al.* 2000, Pérez-Enciso *et al.* 2000).

#### Genotyping

Genotyping of a SNP found at position 2645 of the pig *ACSL4* mRNA sequence (GenBank accession no. DQ14454) was performed using pyrosequencing (Ronaghi *et al.* 1998). A 181 bp-long fragment of the 3'-UTR region was amplified with primers ACSL4pyroFW and ACSL4pyroRV (Supplemental Table 1).

In addition, eight microsatellites (*SW949*, *SW2126*, *SW2470*, *SW2456*, *SW2476*, *SW1943*, *SW1608* and *SW2059*) were also genotyped in the F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> and BC population. Three of these markers (*SW2470*, *SW1943* and *SW2059*) were new with respect to Pérez-Enciso *et al.* (2002).

#### Statistical analyses

Linkage mapping was performed using the 'Build' option of the CRI-MAP software version 2.4 (Green *et al.* 1990). The theory for the genetic analysis of sex chromosomes

has been presented in detail by Pérez-Enciso et al (2002); here we used a simplified model with no dominance (dominance is only applicable in females), and we assumed that the effect of each allele is halved in females (a dosage compensation parameter of 0.5). We applied a usual QTL model, an association model and a combined QTL – association model:

$$y_i = sex_i + batch_i + \beta_c c_i + P_{ai} a + u_i + e_i, \quad (1)$$

$$y_i = sex_i + batch_i + \beta_c c_i + \lambda_{ik} g + u_i + e_i, \quad \text{and} \quad (2)$$

$$y_i = sex_i + batch_i + \beta_c c_i + \lambda_{ik} g_k + P_{ai} a + u_i + e_i, \quad (3)$$

respectively; where  $y_i$  is the  $i$ -th individual record,  $batch$  is the slaughter batch (14 in total),  $\beta_c$  is a covariate coefficient with  $c$  being carcass weight (except for LW, that was corrected by age at slaughter),  $a$  is the QTL additive effect,  $P_a$  is the additive coefficient, respectively, i.e.,  $P_a$  is the probability of the individual being homozygous for alleles of Iberian origin minus the probability of being homozygous for alleles of Landrace origin. In (2) and (3),  $\lambda$  is a -1 / 1 indicator variable depending on whether the individual is homozygous for alleles 1 or 2 at the polymorphism (heterozygous females are given a value of 0, i.e., no dominance is accounted for), and  $g$  represents the allele effect. Finally,  $u$  is the infinitesimal genetic effect and  $e$ , the residual. Models (1) and (3) were fitted every cM across SSCX, and models (2) and (3) included the *ACSL4* polymorphism effect ( $g$ ). Nominal P-values were obtained via likelihood ratio tests and the Chi-squared approximation. All statistical analyses were carried out with software Qxpak (Pérez-Enciso & Misztal 2004), which is freely available for download at <http://www.icrea.es/pag.asp?id=Miguel.Perez>.

## ***Results and Discussion***

### Sequencing and tissue expression of the pig *ACSL4* mRNA

A total of 4906 bp of the *ACSL4* mRNA was sequenced, which is the near complete mRNA sequence; it contained 124 bp of the 5'-UTR region, 2013 bp of coding sequence and the complete 3'-UTR region, including a polyadenylation site (AATAAA) (GenBank accession no. DQ144454). The pig mRNA displayed 93, 90 and 89% similarity in the coding region with human, mouse and rat orthologous sequences, respectively. In accordance with other species, the pig *ACSL4* mRNA codes for a protein of 670 amino acids with 97% identity to human, mouse and rat.

In humans, alternative splicing of this gene generates two transcript variants. Variant 1 encodes the more predominant isoform of 670 amino acids, which is 97% identical to the rat homolog. Variant 2 contains an additional 313 nt 5' exon which introduces an earlier in-frame start codon. The resulting protein has a 41 amino acids longer N-terminus, as compared to variant 1. This peptide brings a highly hydrophobic domain to the N-terminus of the molecule which may change the anchoring of the enzyme to the membrane and fatty acid specificity and may impact localization (Kang *et al.* 1997; Piccini *et al.* 1998). This longer transcript was detected in brain of human and mouse, suggesting the presence of a brain-specific isoform (Cao *et al.* 2000; Vitelli *et al.* 2000; Meloni *et al.* 2002).

In pig, we analyzed the expression of these two variants in liver, heart, lungs, spleen, stomach, brain, skeletal muscle, backfat, uterus, ovarian and testis. Variant 1 was ubiquitously expressed in all tissues analyzed but variant 2 was only found in brain tissue (GenBank accession no. DQ144455). The PCR product was 730 bp-long, adding



291 nt to the mRNA in relation to the pig variant 1. As in humans, the pig variant 2 introduces an earlier start codon which causes a 41 amino acid longer N-terminus peptide. Splice variants have also been described in the *ACSL3*, *ACSL5*, and *ACSL6* genes (Mashek *et al.* 2004; Van Horn *et al.* 2005).

#### Polymorphism analyses and allelic frequencies

The 4906 bp-long almost complete *ACSL4* mRNA was re-sequenced in twelve pigs from the Iberian, Landrace, Large White, Pietrain, Meishan and Duroc breeds. The comparative sequence analysis allowed us to identify ten polymorphisms within the 3'-UTR region (Table 1), all were in complete linkage disequilibrium and thus only two haplotypes were found.

We examined the allelic frequencies of the G/A polymorphism located at position 2645 (GenBank accession no. DQ14454) in 140 pigs from eight different breeds, and babirusa (*Babyrousa babyrussa*) and collared peccary (*Pecari tajacu*) as outgroups (Table 2). Outgroup genotypes determined unambiguously that the mutant allele was the A allele. The wild type G allele was the most frequent in all breeds except in wild boar. The fact that Asiatic breeds show very high frequencies of the wild type allele, would suggest that the mutant was originated in the European distribution area, which would explain that it appears at intermediate frequencies in European wild boar and unselected native breeds like Iberian. The high frequency in Large White might be due to its partial Asiatic origin. The rest of the breeds analyzed were intermediate between wild boar and Meishan. Regarding the reference IBMAP cross, the allelic frequencies of the haplotype 1 (allele G at position 2645) in the founder population were 67% and 14% for the Iberian boars and Landrace sows, respectively.

## Statistical Analyses

Test profiles of the QTL analyses (model 1) are shown in Figure 1. The positions in cM of the markers obtained with CRI-MAP v2.4 (Green *et al.* 1990) were: *SW949* (0.0) – *SW2126* (47.6) – *SW2470* (53.8) – *SW2456* (60.8) – *SW2476* (64.3) – *ACSL4* (70.4) – *SW1943* (76.7) – *SW1608* (85.0) – *SW2059* (97.1). Linkage mapping agrees with physical mapping (Mercadé *et al.* 2005a), and the *ACSL4* gene falls within the most interesting region (between markers *SW2476* and *SW1943*) (Pérez-Enciso *et al.* 2005), reinforcing the interest of the *ACSL4* as a positional candidate gene.

The most significant QTL found in the present study was that affecting growth (LW) at position 73 cM, between *ACSL4* gene and *SW1943* marker ( $P = 5 \times 10^{-5}$ ), confirming a previous result (Pérez-Enciso *et al.* 2005). In this interval, QTL affecting percentage of oleic fatty acid [C18:1(n-9)] ( $P = 5 \times 10^{-3}$ ) and percentage of monounsaturated fatty acids ( $P = 6 \times 10^{-3}$ ) were also detected. Another fatty acid QTL but affecting percentage of gadoleic [C20:1(n-9)] was positioned at 52 cM ( $P = 2 \times 10^{-3}$ ). Nevertheless, no significant QTL effects on the rest of fatty acids were found (data not shown). Finally, the estimated positions for the color related QTL ( $a^*$  and % Haem) were 80-82 cM ( $P = 3 \times 10^{-3}$  and  $4 \times 10^{-4}$ , respectively). A QTL affecting intramuscular fat was previously reported in this Iberian x Landrace cross with less markers and animals (Pérez-Enciso *et al.* 2002) but could not be confirmed here.

Although QTL related to backfat have been reported in other experiments (Rohrer & Keele 1998a & 1998b; Harlizius *et al.* 2000; Malek *et al.* 2001; de Koning *et al.* 2001a & 2001b; Bidanel *et al.* 2001; Milan *et al.* 2002; Sato *et al.* 2003), we did not find a significant result for this trait in the present study (data not shown). We have argued

elsewhere that the allele increasing fatness is of Asiatic origin (Pérez-Enciso *et al.* 2005), which would explain the absence of significance in our cross.

The QTL (eq. 1) and association (eq. 2) models are equivalent when the marker has alternative alleles fixed in each breed. Because the frequencies for the SNP in position 2645 are extreme but not fixed, the association model allows us to gain some insight. However, it should be considered that association is highly confounded with disequilibrium in F2 populations. With all these cautions in mind, we applied model (2) to those traits where the QTL mapped in or nearby the *ACSL4* gene: LW, MUFA and C18:1%. It can be seen for LW that the QTL effect is more significant than the SNP ( $P = 5 \times 10^{-5}$  versus  $1 \times 10^{-3}$ ), which favors the QTL model and would suggest that the *ACSL4* is not the causal gene. The opposite occurs with the fatty acid traits (C18:1(n-9) and MUFA), although P-values are comparable. In order to elucidate these results, we applied model (3) and as expected, fatty acid QTL were not significant after fitting *ACSL4* polymorphisms ( $P = 0.17$  and  $0.15$ ) whereas the SNP was more significant for these traits ( $P = 7 \times 10^{-4}$  and  $9 \times 10^{-4}$ ). This would support that *ACSL4* is an interesting positional candidate gene for these traits. Biologically, it also makes more sense that *ACSL4* is related more directly to acid metabolism than to growth.

So far, several QTL affecting fatty acid composition had been reported, but in autosomes; effects were described for linolenic acid (SSC1), linolenic, oleic and margaric acids (SSC4), palmitoleic and palmitic acids (SSC8), myristic acid (SSC10), linolenic and gadoleic acids (SSC12) and myristic acid (SSC18) (Grindflek *et al.* 2001; Clop *et al.* 2003; Lee *et al.* 2003).

The effects of the QTL and the *ACSL4* polymorphisms are shown in Table 3. All effects were in agreement with phenotypic differences between breeds (Serra *et al.* 1998), with Iberian alleles decreasing growth but increasing concentration of pigments, percentage of oleic fatty acid as well as the percentage of monounsaturated fatty acids in back fat.

Although the *ACSL4* polymorphisms are associated with the content of monounsaturated fatty acids, we cannot conclude that these polymorphisms are responsible for the effects observed. Significant results might also be obtained with association studies when the polymorphisms of the candidate gene are in linkage disequilibrium with the causal mutation. Furthermore, breed crosses complicate the analysis of positional candidate gene due to the extensive linkage disequilibrium created.

### **Acknowledgements**

In addition to the IBMAP cross, carried out in Nova Genètica facilities (Lleida, Spain), many people and institutions provided samples: we would like to thank specially C. Talavera (Madrid's zoo), Copaga, CIA *Dehesón del Encinar*, E. v Eckhardt, C. Renard (*Institut National de la Recherche Agronomique*), M. Cumbreiras (*Diputación de Huelva*), J. Garrido and *Diputación de Córdoba*, P. Martínez, J. Jaume. A. Mercadé is funded by a *Formació Personal Investigador* (FI) fellowship from the *Generalitat de Catalunya*, and J. Estellé by a *Formación de Personal Univeritario* (FPU) fellowship from the *Ministerio de Educación y Ciencia* (MEC). Work funded by INIA *acción especial* (CPE03-010-C3) and in part by grant AGF2004-00103/GAN (*Ministerio de Educación y Ciencia*, Spain).

## References

- Bidanel J.P., Milan D., Iannuccelli N., Amigues Y., Boscher M.Y., Bourgeois F., Caritez J.C., Gruand J., Le Roy P., Lagant H., Quintanilla R., Renard C., Gellin J., Ollivier L. & Chevalet C. (2001) Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Genetics Selection Evolution* **33**, 289-309.
- Cao Y., Traer E., Zimmerman G.A., McIntyre T.M. & Prescott S.M. (1998) Cloning, expression, and chromosomal localization of human long-chain fatty acid-CoA ligase 4 (FACL4). *Genomics* **49**, 327-330.
- Cao Y., Murphy K.J., McIntyre T.M., Zimmerman G.A. & Prescott S.M. (2000) Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **467**, 263-267.
- Clop A., Óvilo C., Pérez-Enciso M., Cercos A., Tomas A., Fernández A., Coll A., Folch J.M., Barragán C., Diaz I., Oliver M.A., Varona L., Silió L., Sánchez A. & Noguera J.L. (2003) Detection of QTL affecting fatty acid composition in the pig. *Mammalian Genome* **14**, 650-656.
- Coleman R.A., Lewin T.M., Van Horn C.G. & Gonzalez-Baro M.R. (2002) Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *The Journal of nutrition* **132**, 2123-2126.
- De Koning D.J., Rattink A.P., Harlizius B., Groenen M.A.M., Brascamp E.W. & van Arendonk J.A.M. (2001a) Detection and characterization of quantitative trait loci for growth and reproduction traits in pigs. *Livestock Production Science* **72**, 185-198.
- De Koning D.J., Harlizius B., Rattink A.P., Groenen M.A.M., Brascamp E.W. & van Arendonk J.A.M. (2001b) Detection and characterization of quantitative trait loci for meat quality traits in pigs. *Journal of Animal Science* **79**, 2812-2819.

- Green P., Falls K. & Crooks S. (1990) Documentation for CRI-MAP, version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis, MO.
- Grindflek E., Szyda J., Liu Z. & Lien S. (2001) Detection of quantitative trait loci for meat quality in a commercial slaughter pig cross. *Mammalian Genome* **12**, 299-304.
- Harlizius B., Rattink A.P., de Koning D.J., Faivre M., Joosten R. G., van Arendonk J. A. & Groenen M.A. (2000) The X chromosome harbors quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs. *Mammalian Genome* **11**, 800-802.
- Hesketh J. (2004) 3'-Untranslated regions are important in mRNA localization and translation: lessons from selenium and metallothionein. *Biochemical Society Transactions* **32**, 990-993.
- Kang M.J., Fujino T., Sasano H., Minekura H., Yabuki N., Nagura H., Iijima H. & Yamamoto T.T. (1997) A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 2880-2884.
- Lee C., Chung Y. & Kim J.H. (2003) Quantitative trait loci mapping for fatty acid contents in the backfat on porcine chromosomes 1, 13, and 18. *Molecules and Cells* **15**, 62-67.
- Malek M., Dekkers J.C., Lee H.K., Baas T.J. & Rothschild M.F. (2001) A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. I. Growth and body composition. *Mammalian Genome* **12**, 630-636.

- Mashek D.G., Bornfeldt K.E., Coleman R.A., Berger J., Bernlohr D.A., Black P., DiRusso C.C., Farber S.A., Guo W., Hashimoto N., Khodiyar V., Kuypers F.A., Maltais L.J., Nebert D.W., Renieri A., Schaffer J.E., Stahl A., Watkins P.A., Vasiliou V. & Yamamoto T.T. (2004) Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family. *Journal of Lipid Research* **45**, 1958-1961.
- McCoard S.A., Fahrenkrug S.C., Alexander L.J., Freking B.A., Rohrer G.A., Wise T.H., & Ford J.J. (2002) An integrated comparative map of the porcine X chromosome. *Animal Genetics* **33**, 178-185.
- Meloni I., Muscettola M., Raynaud M., Longo I., Bruttini M., Moizard M.P., Gomot M., Chelly J., des Portes., Fryns J.P., Ropers H.H., Magi B., Bellan C., Volpi N., Yntema H.G., Lewis S.E., Schaffer J.E. & Renieri A. (2002) *FACL4*, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation. *Nature Genetics* **30**, 436-440.
- Mercadé A., Sánchez A. & Folch J.M. (2005a) Assignment of the acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (*ACSL4*) gene to porcine chromosome X. *Animal Genetics* **36**, 76.
- Mercadé, A., Estellé J., Noguera J.L., Folch J.M., Varona L., Silió L., Sánchez A. & Pérez-Enciso M. (2005b) On growth, fatness and form: A further look at porcine chromosome 4 in an Iberian x Landrace cross. *Mammalian Genome* **16**, 374-382.
- Milan D., Bidanel J.P., Iannuccelli N., Riquet J., Amigues Y., Gruand J., Le Roy P., Renard C. & Chevalet C. (2002) Detection of quantitative trait loci for carcass composition traits in pigs. *Genetics Selection Evolution* **34**, 705-728.

- Minekura H., Kang M.J., Inagaki Y., Cho Y.Y., Suzuki H., Fujino T. & Yamamoto T.T. (2001) Exon/intron organization and transcription units of the human acyl-CoA synthetase 4 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **286**, 80-86.
- Óvilo C., Pérez-Enciso M., Barragán C., Clop A., Rodríguez C., Oliver M.A., Toro M. & Noguera J.L. (2000) A QTL for intramuscular fat and backfat thickness is located on porcine chromosome 6. *Mammalian Genome* **11**, 344-346
- Pérez-Enciso M., Clop A., Noguera J.L., Óvilo C., Coll A., Folch J.M., Babot D., Estany J., Oliver M.A., Díaz I. & Sánchez A. (2000) A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: Evidence from an Iberian by Landrace intercross. *Journal of Animal Science* **78**, 2525-2531.
- Pérez-Enciso M., Clop A., Folch J.M., Sánchez A., Oliver M.A., Óvilo C., Barragán C., Varona L. & Noguera J.L. (2002) Exploring alternative models for sex-linked quantitative trait loci in outbred populations: application to an iberian x landrace pig intercross. *Genetics* **161**, 1625-1632.
- Pérez-Enciso M. & Misztal I. (2004) QxpaK: a versatile mixed model application for genetical genomics and QTL analyses. *Bioinformatics* **20**, 2792-2798.
- Pérez-Enciso M., Mercadé A., Bidanel J.P., Geldermann H., Cepica S., Bartenschlager H., Varona L., Milan D. & Folch J.M. (2005) Large-scale, multibreed, multitrait analyses of quantitative trait loci experiments: The case of porcine X chromosome. *Journal of Animal Science* **83**, 2289-2296.
- Piccini M., Vitelli F., Bruttini M., Pober B.R., Jonsson J.J., Villanova M., Zollo M., Borsani G., Ballabio A. & Renieri A. (1998) *FACL4*, a new gene encoding long-chain acyl-CoA synthetase 4, is deleted in a family with Alport syndrome, elliptocytosis, and mental retardation. *Genomics* **47**, 350-358.



- Rohrer G.A. & Keele J.W. (1998a) Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: I. Fat deposition traits. *Journal of Animal Science* **76**, 2247-2254.
- Rohrer G.A. & Keele J.W. (1998b) Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: II. Muscling and Wholesale Product Yield Traits *Journal of Animal Science* **76**, 2255-2262.
- Ronaghi M., Uhlen M. & Nyren P. (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* **281**, 363-365
- Sato S., Oyamada Y., Atsuji K., Nade T., Sato S., Kobayashi E., Mitsuhashi T., Nirasawa K., Komatsuda A., Saito Y., Terai S., Hayashi T. & Sugimoto Y. (2003) Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a Meishan x Duroc F2 resource population. *Journal of Animal Science* **81**, 2938-2949.
- Serra X., Gil F., Pérez-Enciso M., Oliver M.A., Vázquez J.M., Gispert M., Díaz I., Moreno F., Latorre R. & Noguera J.L. (1998) A comparison of carcass, meat quality and histochemical characteristics of Iberian and Landrace pigs. *Livestock Production Science* **56**, 215-223.
- Suzuki H., Kawarabayasi Y., Kondo J., Abe T., Nishikawa K., Kimura S., Hashimoto T. & Yamamoto T. (1990) Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 8681-8685.
- Suzuki H., Watanabe M., Fujino T. & Yamamoto T. (1995) Multiple promoters in rat acyl-CoA synthetase gene mediate differential expression of multiple transcripts with 5'-end heterogeneity. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 9676-9682.
- Van Horn C.G., Caviglia J.M., Li L.O., Wang S., Granger D.A. & Coleman R.A. (2005) Characterization of recombinant long-chain rat acyl-CoA synthetase isoforms 3 and 6: identification of a novel variant of isoform 6. *Biochemistry* **8**, 1635-1642.

- Varona L., Óvilo C., Clop A., Noguera J.L., Pérez-Enciso M., Coll A., Folch J.M., Barragán C., Toro M.A., Babot D. & Sánchez A. (2002) QTL mapping for growth and carcass traits in an Iberian by Landrace pig intercross: additive, dominant and epistatic effects. *Genetical research* **80**, 145-154.
- Vitelli F., Meloni I., Fineschi S., Favara F., Tiziana Storlazzi C., Rocchi M. & Renieri A. (2000) Identification and characterization of mouse orthologs of the AMMECR1 and FAFL4 genes deleted in AMME syndrome: orthology of Xq22.3 and MmuXF1-F3. *Cytogenetics and Cell Genetics* **88**, 259-263.

**Table 1.** Haplotypes of the pig *ACSL4* mRNA

| <b>Position<sup>1</sup></b> | <b>Haplotype 1<sup>2</sup></b> | <b>Haplotype 2<sup>2</sup></b> |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 2274                        | A                              | T                              |
| 2645 <sup>3</sup>           | G                              | A                              |
| 2782                        | G                              | A                              |
| 2933                        | -                              | A                              |
| 2934                        | -                              | A                              |
| 3272                        | C                              | T                              |
| 3590                        | G                              | -                              |
| 3591                        | T                              | -                              |
| 3862                        | T                              | C                              |
| 4074                        | A                              | G                              |

<sup>1</sup>Positions using as reference the GenBank DQ144454 sequence.

<sup>2</sup>The nucleotide differences between the two haplotypes found are shown. -: indicates a single nucleotide deletion in this position.

<sup>3</sup>Position genotyped.

**Table 2.** Allelic frequencies of the G allele at position 2645 in the porcine *ACSL4* gene

| <b>Breed / Species</b> | <b>n</b> | <b>Frequency</b> |
|------------------------|----------|------------------|
| <i>P. Tajacu</i>       | 2        | 1.00             |
| <i>B. Babyrussa</i>    | 1        | 1.00             |
| Meishan                | 19       | 1.00             |
| Large White            | 19       | 0.95             |
| Vietnamese pig         | 4        | 0.88             |
| Duroc                  | 18       | 0.78             |
| Landrace               | 20       | 0.62             |
| Pietrain               | 20       | 0.60             |
| Iberian                | 21       | 0.52             |
| Wild boar              | 16       | 0.47             |

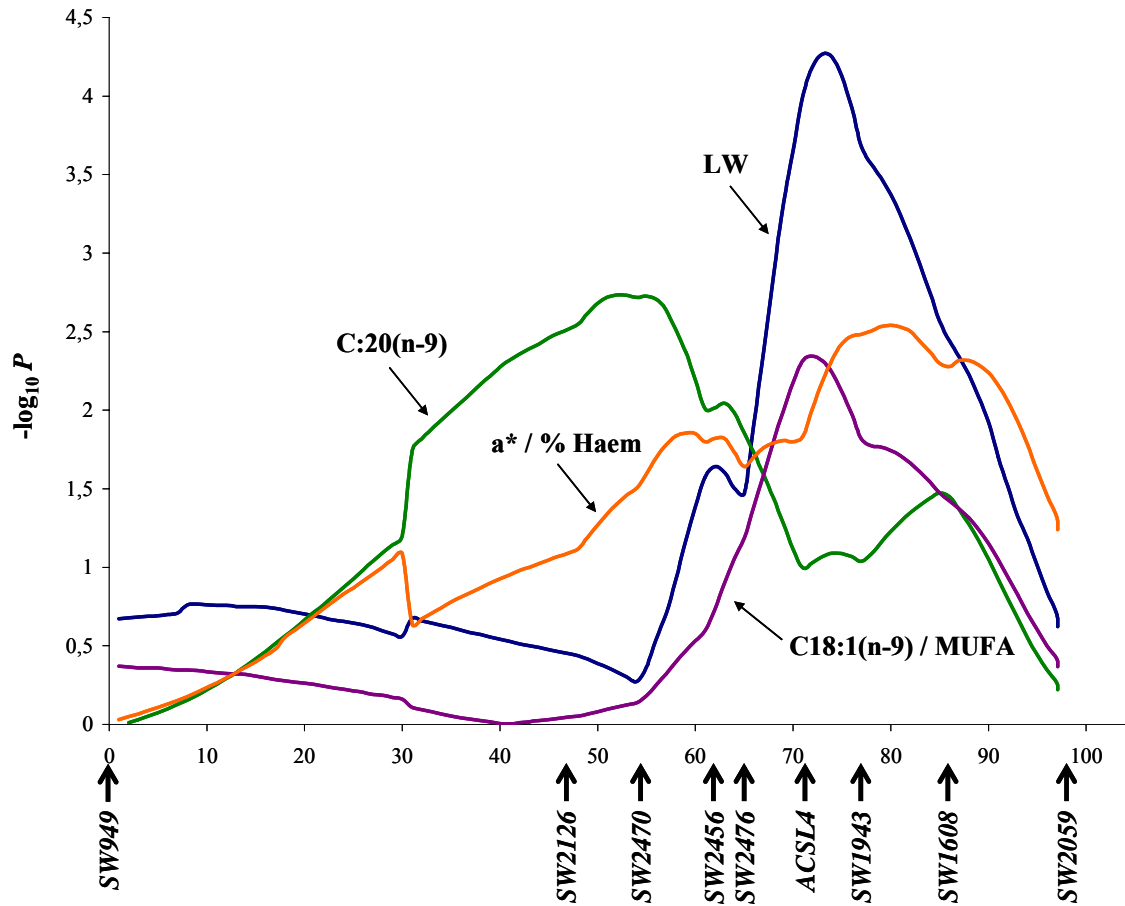
---

n: number of individuals genotyped

**Table 3.** Effects of the QTL and of the *ACSL4* polymorphism

| Trait      | Model | a ± SE     | g ± SE    |
|------------|-------|------------|-----------|
| LW         | 1     | -2.79±0.69 | -         |
| C20:1(n-9) | 1     | 0.05±0.01  | -         |
| C18:1(n-9) | 3     | -          | 0.35±0.10 |
| MUFA       | 3     | -          | 0.39±0.12 |
| %Haem      | 1     | 1.66±0.46  | -         |
| a*         | 1     | 0.36±0.12  | -         |

LW: live weight; C20:1(n-9): gadoleic fatty acid; C18:1(n-9): oleic fatty acid; MUFA: monounsaturated fatty acids; %Haem: pigment content; a\*: Minolta a color component  
a: QTL additive effect (Iberian minus Landrace); g: *ACSL4* polymorphisms additive effect



**Figure 1.** P-value profiles. The null hypothesis consists of no QTL.

LW: live weight; C20:1(n-9): gadoleic fatty acid; C18:1(n-9): oleic fatty acid; MUFA: monounsaturated fatty acids; %Haem: pigment content; a\*: Minolta a color component

**Supplemental Table 1.** Primers used for the mRNA amplification, sequencing and pyrosequencing of the pig *ACSL4* gene

| Primers   | Sequence (5'→3')                             | Location <sup>1</sup> | Tm<br>(°C) | Size<br>(pb) |
|-----------|--|-----------------------|------------|--------------|
| F1        | AGAGCTAGCGGGCACGC                            |                       | 62.5       | 439/730      |
| R1        | TATTCACTCTGAGGTTCACTTCGAGA                   | 422                   |            |              |
| F2        | CAAAGAGAATAAAAGCTAAGCCCACT                   | 141                   | 58         | 1259         |
| R2        | AATTGGGCAGCAGAAGCAGAC                        | 1399                  |            |              |
| SeqF2R2rv | CACATTGTCCAGTCATTCCAGC                       | 923                   |            |              |
| SeqF2R2fw | AACTCTGTTCAAGATAGGGTATGATTACAA               | 1204                  |            |              |
| F3        | ATGTCCGTATGATGCTGTCTGG                       | 1317                  | 58         | 834          |
| R3        | TTTATTTGCCCCCATACATTCG                       | 2150                  |            |              |
| F4        | TCTGCAATAACCCTGCCATG                         | 1929                  | 58         | 1142         |
| R4        | TCTCTTTCCCAGGTTCAAGTCT                       | 3070                  |            |              |
| SeqF4R4   | AGGAAGACAAGAGGCATTGGAAG                      | 2099                  |            |              |
| F5        | TGTGAAAAATTACAGTGCCTGGA                      | 2737                  | 58         | 1533         |
| R5        | TCACTATGGATATGGAAAGATTTGTTTAC                | 4269                  |            |              |
| SeqF5R5fw | TTCAGAAAGCATTTCACCTTGC                       | 3187                  |            |              |
| SeqF5R5rv | TCTTTACAAAAACCTTCATTCTTGCTTA                 | 3788                  |            |              |
| F6        | AATATGTGATCTTTCCCTCCT                        | 3978                  | 56         | 929          |
| UAP       | GGCCACGCGTCGACTAGTAC                         |                       |            |              |
| Oligo(dT) | GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T) <sub>30</sub> G/A/CN |                       |            |              |
| SeqF6UAP  | CAGATGAATGGTGCAAAAAGTCA                      | 4527                  |            |              |
| PyroFw    | CAGAAGATGCTTAAATATTAAGCATGACA                | 2539                  |            |              |
| PyroRv    | biotine-<br>TGTCTAACCTACACAACAATTATGAATCC    | 2719                  | 62         | 181          |
| PyroSeq   | TCCAACCAATTATTTTGAA                          | 2624                  |            |              |

<sup>1</sup>: Positions of primers using as reference the GenBank DQ144454 sequence

***4. Exclusion of the acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 gene (DGAT1) as a candidate for a fatty acid composition QTL on porcine chromosome 4***

A. Mercadé, A. Sánchez, J. M. Folch

*Journal of Animal Breeding and Genetics* (2005) 122:161-164



***5. Adipocyte fatty-acid binding protein 4 is closely associated to the porcine FAT1 locus on chromosome 4***

A. Mercadé, A. Sánchez, J. M. Folch

Enviado a *Journal of Animal Science*

Running Head: *FABP4* association with fatness of SSC4

## **Adipocyte fatty-acid binding protein is closely associated to the porcine**

### ***FAT1* locus on chromosome 4<sup>1</sup>**

A. Mercadé\*, M. Pérez-Enciso<sup>†,\*</sup>, L. Varona<sup>§</sup>, E. Alves\*\*, J. L. Noguera<sup>§</sup>, A. Sánchez\*, J. M. Folch\*

\* Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain.

† Institut Català de Recerca i Estudis Avançats, 08010, Barcelona, Spain.

§ Àrea de Producció Animal, Centre UdL-IRTA, 25198, Lleida, Spain.

\*\* Departamento de Mejora Genética Animal SGIT-INIA, 28040, Madrid, Spain

<sup>1</sup>In addition to the IBMAP cross, carried out in Nova Genètica facilities (Lleida, Spain), many people and institutions provided samples: we would like to thank specially C. Talavera (Madrid's zoo), Copaga, L. Silió (*Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias*), E. v Eckhardt, C. Renard (*Institut National de la Recherche Agronomique*), M. Cumbreiras (*Diputación de Huelva*), A. Angiolillo, J. Garrido and *Diputación de Córdoba*, Paulino Martínez, J. Jaume (*Instituto de Biología Animal de Baleares*) and *Asociació de Criadors del Porc Negre*, C. Lemús (Mexico), and E. Grinflek (Norway). A. Mercadé is funded by a *Formació Personal Investigador* (FI) fellowship from the *Generalitat de Catalunya*. Work funded by INIA *acción especial* (CPE03-010-C3) and in part by grant AGF2004-00103/GAN (*Ministerio de Educación y Ciencia*, Spain).

Corresponding author: Anna.mercader@uab.es

## **ABSTRACT**

We have identified 22 polymorphisms in the *adipocyte fatty-acid binding protein (FABP4)* gene, a strong positional candidate gene for the *FATI* locus in porcine chromosome 4. The most informative polymorphism, an insertion/deletion in intron 1, together with a single nucleotide polymorphism in intron 3 have been genotyped in a cross between Iberian and Landrace pigs. After QTL, single marker and haplotype analyses, we show that there exist at least two quantitative trait genes in the *FATI* region, with the *FABP4* polymorphism tightly associated to that with a main effect on fatness. A comparison of allelic frequencies in a panel of pig breeds suggests that the *Del2634C* polymorphism is under indirect selection. Haplotype analysis suggests genetic heterogeneity at *the FATI locus* within the Landrace breed.

Key words: *FABP4*, fatness, pig, QTL, *FATI*

## **Introduction**

The first highly significant quantitative trait locus (QTL) in animals was reported by Andersson et al. (1994). It was located on chromosome 4 and had an important effect on fatness and on growth. This locus was named *FATI* after Marklund et al. (1999) and has been confirmed in a large number of crosses involving different breeds (Paszek et al. 1999, De Koning et al. 2001, Milan et al. 2002). But despite the high repeatability across experiments and that it is the ‘oldest’ QTL identified in animals, its precise molecular nature has remained elusive. This situation is in stark contrast with other loci that have been cloned already, like *RN* (Milan et al. 2000) or *IGF2* (Van Laere et al. 2003). Why *FATI* is still unidentified is not clear at this moment but one reasonable explanation is that there are at least two loci involved, complicating the search of causal mutations. Recently, we have obtained additional statistical

evidence in the IBCMAP experiment that reinforces the two-locus hypothesis (Mercadé et al. 2005), with one of the QTL mapping on top of *adipocyte fatty-acid binding protein (FABP4)* gene. FABP4 facilitates transport of fatty acids from the plasma membrane to sites of oxidation or esterification (Hauerland and Spener, 2004). A previous report described that a microsatellite within the first intron of the pig *FABP4* gene was associated with differences in intramuscular fat content in a Duroc population (Gerbens et al. 1998). To our knowledge, no further associations between *FABP4* and pig fatness have been reported.

Thus, the recent results of Mercadé et al. (2005) and the fact that, due to its physiological properties, the *FABP4* gene is a logical candidate gene for fat metabolism and motivated us to further analyze *FABP4* polymorphism in the IBCMAP cross. Here we show that *FABP4* is tightly associated to fatness, but not growth; furthermore, a haplotype analysis suggests that there is genetic heterogeneity within the Landrace breed.

## **Materials and Methods**

### *Animal material and traits analyzed*

The population used consisted of a cross between Iberian Guadyerbas and Landrace. Full details of the cross are given in Varona et al. (2002) and Mercadé et al. (2005). In short, the pedigree was formed by 321 F<sub>2</sub>, 87 F<sub>3</sub> and 85 backcross (BC) animals.

We analyzed the traits with largest QTL effects in the *FATI* region: back fat thickness at the shoulder level (BF1), back fat thickness at the last rib (BF2), live weight at slaughter (LW), carcass length (CL) and shoulder weight (SW). The measures of these phenotypic traits are described elsewhere (Óvilo et al. 2000, Pérez-Enciso et al. 2000).

### *Amplification and sequencing of the pig FABP4 gene*

All four exons and intron 3, as well as fragments of the promoter region, intron 1, 2, and 3'-UTR region were amplified and sequenced in the three Iberian Guadyerbas boars and seven Landrace sows (primers in the Table 1). PCRs were performed in a 25 µl final volume containing 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 300 nM of each primer, 60 ng of genomic DNA and 1.3 U Expand High Fidelity PCR (Roche Molecular Biochemicals). Thermocycling was 95 °C for 3 min., followed by 10 cycles (95 °C for 30 s, 56 °C 1 min, and 72 °C 2.5 min) and by 25 cycles with increasing the extension step by 20 s in each cycle, and a final extension (72 °C for 10 min). The amplified products were sequenced using the BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit in an ABI PRISM 3100 Avant sequencer (Applied Biosystems). The sequences obtained were analyzed using the SeqScape v2.1 software (Applied Biosystems).

### *Genotyping*

We implemented a pyrosequencing protocol to genotype the majority of the IBMAP pedigree for loci 2634 and 6252. For the insertion/deletion polymorphism at locus *Del2634C*, a 186 bp-long fragment of intron 1 was amplified by PCR using FABPpyroFw and FABP4in1R primers (Table 1). For the *C6252T* locus, a 197 bp-long fragment of intron 3 was amplified by PCR using FABPpyro2Fw and FABPpyro2Rv primers (Table 1). The PCR were performed in a 25 µl final volume containing 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 500 nM of each primer, 45 ng ADN and 0.6 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). Thermocycling was 95 °C for 3 min, 45 cycles of 95 °C for 1 min, 60 °C for the *Del2634C* or 64°C for the *C6252T* for 1 min, and 72 °C for 1.5 min, and a final extension of 72 °C for 5 min. The genotyping of these polymorphisms was done in a PSQ HS 96 system (Pyrosequencing AB) using FABPpyroRv and FABPpyro2seq as the sequencing primers for the *Del2634C* and the *C6252T*

polymorphism, respectively (Table 1). Microsatellite genotyping was carried out as detailed (Mercadé et al. 2005). A total of 54 founders, 65 F<sub>1</sub>, 321 F<sub>2</sub>, 87 F<sub>3</sub> and 85 backcross (F<sub>2</sub> x Landrace) pigs were genotyped.

### Statistical Analyses

We employed three models to analyze the data: a QTL model, an association model, and a QTL + association model, i.e.,

$$y_i = sex_i + batch_i + \beta_c c_i + P_{ai} a + P_{di} d + u_i + e_i, \quad (1)$$

$$y_i = sex_i + batch_i + \beta_c c_i + \sum_k \sum_h \lambda_{ikh} g_k + u_i + e_i, \quad \text{and} \quad (2)$$

$$y_i = sex_i + batch_i + \beta_c c_i + \sum_k \sum_h \lambda_{ikh} g_k + P_{ai} a + P_{di} d + u_i + e_i, \quad (3)$$

respectively; where  $y_i$  is the  $i$ -th individual record,  $batch$  is the slaughter batch (14 in total),  $\beta_c$  is a covariate coefficient with  $c$  being carcass weight (except for LW, that was corrected by age at slaughter),  $a$  is the QTL additive effect,  $d$ , the dominant effect,  $P_a$  and  $P_d$  are the additive and dominant coefficients, respectively, i.e.,  $P_a$  is the probability of the individual being homozygous for alleles of Iberian origin minus the probability of being homozygous for alleles of Landrace origin, while  $P_d$  is the probability of the individual being heterozygous. Finally,  $u$  is the infinitesimal genetic effect and  $e$ , the residual. In (2) and (3)  $\lambda_{ikh}$  is a zero - one indicator variable, one when the allele at  $h$ -th haplotype ( $h = 1, 2$ ) of  $i$ -th individual is  $k$ , zero otherwise,  $g$  represents each allelic effect. A dominant effect ( $d$ ) was included when significant (P-value < 0.05), i.e., only for BF2 and LW. Model (2) was fitted at the *Del2634C* and the *C6252T* polymorphisms and the *FAT1* region markers, while models (1) and (3) were fitted every cM across SSC4, model (3) included the *Del2634C* locus.

In order to gain more insight, we studied the haplotypic effects of the polymorphisms in *FABP4* and *SW35* using model (2); herein after, we concentrated on BF1 for the sake of concision and because it was the QTL with highest significance. First, we considered loci *Del2634C* and *C6252T* and next, the haplotypes that included the *Del2634C* and the *FABP4* and *SW35* microsatellites. A disadvantage of haplotype analyses is that it can reduce power and difficult interpretation when the number of haplotypes is large. To improve upon this, we devised a sequential pooling strategy where the goal was to find an allele partition with minimum P-value. Initially, we fitted all haplotypes, next we identified the two haplotypes that had the most similar effects and we pooled them. We computed the P-value associated to the newly pooled haplotypes. We repeated the pooling strategy until the P-value could not be decreased.

Finally, we confirmed the haplotype analysis using a transmission test. We selected the four heterozygous F<sub>2</sub> boars that sired the F<sub>3</sub> and back cross generation, and we applied model (2), excluding batch and infinitesimal effect only to the offspring where the allele origin could be unambiguously determined. We computed the P-value of the transmitted effect of one or the other haplotype to the offspring.

Nominal P-values were obtained via likelihood ratio tests and the Chi-squared approximation. All statistical analyses were carried with software Qxpak (Pérez-Enciso and Misztal, 2004), which is freely available for download at <http://www.icrea.es/pag.asp?id=Miguel.Perez>.

## Results and Discussion

### *Polymorphisms*

After sequencing the three Iberian founder boars and seven Landrace sows, 22 polymorphisms were found (Table 2). Nevertheless, none of these polymorphisms were in the exons. All Landrace sows were homozygous and identical to the reference sequence GenBank Y16039, while one Iberian Guadyerbas boar was homozygous for the polymorphic alleles found (fourth column of Table 2), and the two remaining boars were heterozygous for all positions except 2634, where all boars were homozygous for the C allele. Thus, the only polymorphism that showed extreme frequencies between the parental lines (Iberian Guadyerbas and Landrace) was in position *Del2634C*.

### *QTL and association analysis*

A linkage reanalysis showed that *SW35* was wrongly positioned in our current map, the new order was *SW317 – FABP4 – SW35*, whereas the order used in Mercadé et al. (2005) was *SW317 - SW35 – FABP4*. This new order coincides with RH mapping data.

The classical QTL analysis (model 1) is shown in Table 3; these analyses have already been reported (Mercadé et al. 2005), except that the new marker order was used here. The only difference with Mercadé et al. (2005) is that here we also included the *Del2634C* locus as a simple marker. Regarding the association study (models 2 and 3), the first remarkable result is that the *Del2634C* locus is tightly associated with fatness and shape traits (SW and CL) but not with growth. Note that the growth QTL maps to a shifted position relative to the fatness QTL and that the growth QTL is significant after fitting the *Del2634C* locus ( $P = 5 \times 10^{-3}$ ), while the QTL significance decreases dramatically for the remaining traits. This would confirm that there are at least two quantitative trait genes in the *FATI* region, one affecting



fatness and shape, the other with an effect on growth. It is interesting to recall that the *FATI* locus is located between *S0073* and *S0214* (Moller et al. 2004), which falls outside of the strongest association with the fatness QTL detected here. Although the QTL for BF2 showed dominance, we did not find any significant dominant effect for the *Del2634C* locus itself (results not presented). It is not clear whether *Del2634C* locus explains all variability for fatness and growth.

Linkage disequilibrium measures in the overall population were not very illustrative (shown in Table 4 for selected markers). Values for the correlation ( $r$ ) were relatively small because a high  $r$  is only possible if disequilibrium is high and allele frequencies are similar (Ardlie et al. 2002) whereas  $D'$ , computed as in Farnir et al. (2000), was higher than  $r$ . In order to gain more insight, we studied the haplotypic effects of the polymorphisms in *FABP4* and *SW35* using model (2). First, we considered *Del2634C* and *C6252T*. Only three haplotypes were found in the parental population. Effects between haplotypes 'CC' and 'CT' were not significantly different and it follows that a haplotype analysis is not necessary here because all variability was explained by the *Del2634C* polymorphism. This can also be inferred by noticing that P-values for the haplotype models are not more significant than the single marker analyses (Table 5). Next, we considered the *Del2634C*, *FABP4* and *SW35* microsatellites. A total of 14 haplotypes were found in the founder animals, Iberian boars had two haplotypes. Using the pooling strategy described, we ended up with 4 haplotypes, named A, B, C and D in Table 6. This final pooled haplotype had a P-value of  $1 \times 10^{-12}$ , better than any of the markers taken individually (Table 3). Two relevant facts appear: 1) there is genetic heterogeneity within haplotypes segregating exclusively in Landrace (all Iberian boars were 'C-19-20' and 'C-20-22'), and 2) there exists an interaction in the statistical sense between the three markers, and it was uncovered only after allele pooling. One must be cautious,

though, in raising genetic interpretations from this interaction: it does not follow that epistasis exists (although it cannot be ruled out), it can be due simply to incomplete linkage disequilibrium between the haplotype and the causal mutations or to several causal mutations. Finally, we repeated model 3 analysis including the haplotype partition instead: now the  $P_{QTL}$  was 0.24, i.e., adding a QTL does not improve model fitting significantly and the haplotype explains all variability for BF1.

#### *Transmission test (Half sib analysis)*

Additional evidence about the effect of a given allele can be obtained by comparing the phenotypes of offspring that have received alternative alleles from heterozygous parents, i.e., equivalent to a half sib analysis because we considered only paternal haplotypes. Results are in Table 7. It can be seen that all estimates were in the expected direction, with the haplotype ‘A’ increasing fatness, in agreement with results in Table 6. Although not all were significant at the 5% level, this was probably because of the small size of each family. The combined estimate across boars was  $0.32 \pm 0.08$  ( $P < 0.001$ ) and  $0.36 \pm 0.10$  considering the last three boars. This confirms that the haplotype partition reported in Table 6 is associated with fatness.

#### *Allelic frequencies in pig breeds*

A panel of different pig breeds was also genotyped for the *Del2634C* locus (Table 8), we also included wild boar of European and Tunisian origin, Iberian from 6 different strains, plus babirusa (*Babirusa babyrussa*) and collared peccary (*Pecari tajacu*) as outgroups. Outgroup genotypes permit us to conclude unambiguously that the mutant allele is actually the deletion, i.e., the reference sequence GenBank Y16039 contains the derived allele. But the most interesting result from Table 8 is that there is a clear gradient in allele frequencies: intermediate in wild boar and ‘unimproved’ breeds of both Asiatic (Meishan) and European

(Iberian) origin, through extreme for the mutant allele in breeds selected for leanness and growth (Pietrain, Landrace and Large White). Although the wild type allele seems to be fixed in the Vietnamese pig, these results are not conclusive because of the small sample size. The fact that the deletion is segregating at intermediate frequencies in wild boar and is common in both Meishan and Iberian pigs suggests that this is a very ancient mutation. It should be recalled that there is substantial evidence that the Iberian breed has not been introgressed with Asiatic alleles, as supported by analysis of mtDNA (Alves et al. 2003).

### **Implications**

We have shown that *FABP4*, or a nearby gene, is tightly linked to the *FAT1* locus. The haplotype association model is able to explain all variability for BF1. Also importantly, we have demonstrated that there exist at least two functional mutations: one, close or within the *FABP4* gene with a strong effect on fatness; the second, about 20 cM away, with an effect – smaller – on growth. Moreover, there is evidence of genetic heterogeneity for fatness within the *FABP4* region itself and further studies will be needed to disentangle its exact genetic nature.

### **Literature cited**

Alves E., C. Óvilo, M. C. Rodriguez, and L. Sileo. 2003. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. *Anim. Genet.* 34:319-324.

Andersson, L., C. S. Haley, H. Ellegren, S. A. Knott, M. Johansson, K. Andersson, L. Andersson-Eklund, I. Edfors-Lilja, M. Fredholm, I. Hansson et al. 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* 263:1771-1774.

Ardlie, K. G., L. Kruglyak, and M. Seielstad. 2002. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 3:299-309.

De Koning, D. J., A. P. Rattink, B. Harlizius, M. A. M. Groenen, E. W. Brascamp, and J.A. van Arendonk. 2001 Detection and characterization of quantitative trait loci for growth and reproduction traits in pigs. *Livest. Prod. Sci.* 72:185-198.

Farnir, F., W. Coppieters, J. J. Arranz, P. Berzi, N. Cambisano, B. Grisart, L. Karim, F. Marcq, L. Moreau, M. Mni, C. Nezer, P. Simon, P. Vanmanshoven, D. Wagenaar, and M. Georges. 2000. Extensive genome-wide linkage disequilibrium in cattle. *Genome Res* 10:220-227.

Gerbens, F., A. Jansen, A. J. van Erp, F. Harders, T. H. Meuwissen, G. Rettenberger, J. H. Veerkamp, and M.F. te Pas. 1998. The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs. *Mamm. Genome* 9:1022-1026.

Hauerland, N. H. and F. Spener, 2004 Fatty acid-binding proteins--insights from genetic manipulations. *Prog. Lipid. Res.* 43:328-349.

Marklund, L., P. E. Nystrom, S. Stern, L. Andersson-Eklund, and L. Andersson. 1999. Confirmed quantitative trait loci for fatness and growth on pig chromosome 4. *Heredity* 82:134-141.

Mercadé, A., J. Estellé, J. L. Noguera, J. M. Folch, L. Varona, L. Silio, A. Sanchez, and M. Perez-Enciso. 2005. On growth, fatness and form: A further look at porcine's chromosome 4 in an Iberian x Landrace cross. *Mamm. Genome* 16:374-382.

Milan, D., J. T. Jeon, C. Looft, V. Amarger, A. Robic, M. Thelander, C. Rogel-Gaillard, S. Paul, N. Iannuccelli, L. Rask, H. Ronne, K. Lundstrom, N. Reinsch, J. Gellin, E. Kalm, P. L. Roy, P. Chardon, and L. Andersson. 2000. A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science* 19:1248-1251.

Milan, D., J. P. Bidanel, N. Iannuccelli, J. Riquet, Y. Amigues, J. Gruand, P. Le Roy, C. Renard, and C. Chevalet. 2002. Detection of quantitative trait loci for carcass composition traits in pigs. *Genet. Sel. Evol.* 34:705-728.

Moller, M., F. Berg, J. Riquet, D. Pomp, A. Archibald, S. Anderson, K. Feve, Y. Zhang, M. Rothschild, D. Milan, L. Andersson, and C. K. Tuggle. 2004. High-resolution comparative mapping of pig Chromosome 4, emphasizing the FAT1 region. *Mamm. Genome* 15:717-731.

Óvilo C., M. Pérez-Enciso, C. Barragán, A. Clop, C. Rodriguez, M.A. Oliver, M.A. Toro, J.L. Noguera. 2000. A QTL for intramuscular fat and back fat thickness is located on porcine chromosome 6. *Mamm. Genome* 11:344-346.

Paszek, A. A., P. J. Wilkie, G. H. Flickinger, G. A. Rohrer, L. J. Alexander, C.W. Beattie, and L. B. Schook. 1999. Interval mapping of growth in divergent swine cross. *Mamm. Genome* 10:117-122.

Pérez-Enciso, M., A. Clop, J. L. Noguera, C. Óvilo, A. Coll, J. M. Folch, D. Babot, J. Estany, M. A. Oliver, I. Diaz, and A. Sanchez. 2000. A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: evidence from an Iberian by Landrace intercross. *J. Anim. Sci.* 78:2525-2531.

Pérez-Enciso, M., and I. Misztal. 2004. Qxpak: a versatile mixed model application for genetical genomics and QTL analyses. *Bioinformatics* 20:2792-2798.

Van Laere A. S., M. Nguyen, M. Braunschweig, C. Nezer, C. Collette, L. Moreau, A. L. Archibald, C. S. Haley, N. Buys, M. Tally, G. Andersson, M. Georges, and L. Andersson. 2003. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature* 23:832-836.

Varona L., C. Óvilo, A. Clop, J.L. Noguera, M. Pérez-Enciso, A. Coll, J.M. Folch, C. Barragan, M.A. Toro, D. Babot, and A. Sanchez. 2002. QTL mapping for growth and carcass traits in an Iberian by Landrace pig intercross: additive, dominant and epistatic effects. *Genet Res.* 80:145-154

Table 1. Primers used for DNA amplification, sequencing and pyrosequencing

| <b>Primers</b> | <b>Sequence<sup>1</sup></b>                       | <b>Amplified length</b> |
|----------------|---|-------------------------|
| FABP4proF      | 5'-GCT CAG TTG AAT ACA TGG TGT AGA GAT T-3'       | 1499 bp                 |
| FABP4in1R      | 5'-GTT ACT GCT TAG TTT ATA TGC AAA AGG AAT-3'     |                         |
| FABP4in2F      | 5'-AGA AGA GTT TTC CAT TTA AGT GAT TGG-3'         | 1303 bp                 |
| FABP4R2        | 5'-CAG ATC TAG AAG TCA GGG ATC TTT GG-3'          |                         |
| FABP4F3        | 5'-TTG TGT ATG CTG TTG CTT TTG G-3'               | 1055 bp                 |
| FABP4R3        | 5'-AAA AAT CAT ATT CTA CTG GAA ACA AAG-3'         |                         |
| FABP4seqF      | 5'-CTA AGA AGT TGT TTC TGA AAC C-3'               |                         |
| FABP4seqR      | 5'-GGA GTA ACC AAT TAG GAA CAA-3'                 |                         |
| FABPpyroFw     | 5'-biotine-TTC TAG ACC AAA GTC ACA ACT AAT GC -3' |                         |
| FABPpyroRv     | 5'-TTC ATA TCA GTT CAC CTT TA-3'                  |                         |
| FABPpyro2Fw    | 5'- TGA TAA GTT GGT GGT GGT GAG T-3'              | 197 bp                  |
| FABPpyro2RV    | 5'-biotine-GGG ATA GTA TGC CTG GGC TAA-3'         |                         |
| FABPpyro2seq   | 5'-GGT CCT CTC ATA ATG ATA TA-3'                  |                         |

<sup>1</sup>: Primers were designed from GenBank Y16039 sequence

Table 2. Polymorphisms detected in the *FABP4* gene

| Region   | Position <sup>a</sup> | Ref <sup>b</sup> | Pol <sup>c</sup> | Region   | Position <sup>a</sup> | Ref <sup>b</sup> | Pol <sup>c</sup> |
|----------|-----------------------|------------------|------------------|----------|-----------------------|------------------|------------------|
| Promoter | 1381 <sup>1</sup>     | T                | -                |          | 4789                  | T                | G                |
|          | 1412 <sup>1</sup>     | A                | G                | Intron 1 | 5000 <sup>2</sup>     | T                | C                |
|          | 2634 <sup>3</sup>     | -                | C                |          | 5005 <sup>2</sup>     | G                | A                |
|          | 4205                  | G                | A                |          | 5069                  | G                | A                |
|          | 4217                  | CAT              | -                |          | 6252 <sup>3</sup>     | C                | T                |
|          | 4466                  | T                | G                |          | 6367                  | C                | A                |
| Intron 1 | 4555                  | T                | C                | Intron 3 | 6553                  | G                | T                |
|          | 4629 <sup>1</sup>     | G                | -                |          | 6611 <sup>1</sup>     | C                | T                |
|          | 4750                  | A                | C                |          | 6627                  | A                | G                |
|          | 4782                  | T                | C                | 3'UTR    | 6723 <sup>2</sup>     | R <sup>4</sup>   | R <sup>4</sup>   |
|          | 4788                  | A                | C                |          | 6845 <sup>2</sup>     | R <sup>4</sup>   | R <sup>4</sup>   |

<sup>a</sup>: position using as reference the GenBank Y16039 sequence

<sup>b</sup> Ref: nucleotide in the reference sequence.

<sup>c</sup> Pol: polymorphisms found

<sup>1</sup>: polymorphisms respect to the reference sequence (Y16039). All animals analyzed (3 Iberian boars and 7 Landrace sows) were homozygous for the polymorphic nucleotide

<sup>2</sup>: polymorphisms previously detected in the reference sequence

<sup>3</sup> These were the loci genotyped

<sup>4</sup> The reference sequence contains an 'R', our 7 Landrace sows were 'G' whereas the Iberian boars were 'A/G' or 'A'.



Table 3. Likelihood ratio tests

| Trait | Model            |                               |                              |                           |                            |                          |                           |                           |                           |                                  |                    |                              |
|-------|------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------------|--------------------|------------------------------|
|       | 1 (QTL)          |                               | 2 (Association) <sup>c</sup> |                           |                            |                          |                           |                           | 3 (QTL+ <i>Del2634C</i> ) |                                  |                    |                              |
|       | Pos <sup>a</sup> | P <sub>QTL</sub> <sup>b</sup> | P <sub><i>Del2634C</i></sub> | P <sub><i>FABP4</i></sub> | P <sub><i>C6252T</i></sub> | P <sub><i>SW35</i></sub> | P <sub><i>SW839</i></sub> | P <sub><i>S0073</i></sub> | Pos                       | P <sub>QTL+<i>Del2634C</i></sub> | P <sub>QTL</sub>   | P <sub><i>Del2634C</i></sub> |
| BF1   | 69               | 5×10 <sup>-11</sup>           | 1×10 <sup>-10</sup>          | 2×10 <sup>-8</sup>        | 1×10 <sup>-5</sup>         | 4×10 <sup>-10</sup>      | 2×10 <sup>-9</sup>        | 6×10 <sup>-5</sup>        | 75                        | 9×10 <sup>-11</sup>              | 0.03               | 6×10 <sup>-11</sup>          |
| BF2   | 78               | 4×10 <sup>-8</sup>            | 4×10 <sup>-9</sup>           | 1×10 <sup>-9</sup>        | 4×10 <sup>-7</sup>         | 5×10 <sup>-10</sup>      | 1×10 <sup>-7</sup>        | 4×10 <sup>-3</sup>        | 79                        | 8×10 <sup>-9</sup>               | 0.05               | 1×10 <sup>-9</sup>           |
| SW    | 68               | 6×10 <sup>-9</sup>            | 5×10 <sup>-8</sup>           | 2×10 <sup>-3</sup>        | 0.27                       | 5×10 <sup>-8</sup>       | 5×10 <sup>-7</sup>        | 4×10 <sup>-5</sup>        | 99                        | 3×10 <sup>-8</sup>               | 0.02               | 6×10 <sup>-8</sup>           |
| CL    | 65               | 2×10 <sup>-8</sup>            | 4×10 <sup>-8</sup>           | 1×10 <sup>-3</sup>        | 0.03                       | 1×10 <sup>-6</sup>       | 8×10 <sup>-7</sup>        | 2×10 <sup>-5</sup>        | 91                        | 5×10 <sup>-8</sup>               | 0,05               | 4×10 <sup>-8</sup>           |
| LW    | 92               | 7×10 <sup>-4</sup>            | 0.07                         | 0.33                      | 0.41                       | 0.02                     | 7×10 <sup>-3</sup>        | 0.06                      | 92                        | 3×10 <sup>-3</sup>               | 5×10 <sup>-3</sup> | 0,04                         |

BF1: back fat thickness at the shoulder level; BF2: back fat thickness at the last rib; SW: shoulder weight; CL: carcass length; LW: live weight;

<sup>a</sup> QTL position in cM obtained with model 1; *FABP4 Del2634C* is located in position 70

<sup>b</sup> Nominal P-value found when removing the appropriate effect(s) in the current model.

<sup>c</sup> The marker positions (cM) were *Del2634C* (70), *FABP4* microsatellite (70), *C6252T* (70), *SW35* (69.6), *SW839* (74.2), *S0073* (91).

Table 4. Linkage disequilibrium measures

|                 | <i>Del2634C</i> | <i>FABP4</i> | <i>C6252T</i> | <i>SW35</i> | <i>SW839</i> | <i>S0073</i> |
|-----------------|-----------------|--------------|---------------|-------------|--------------|--------------|
| <i>Del2634C</i> | -               | 0.31         | 0.22          | 0.65        | 0.67         | 0.30         |
| <i>FABP4</i>    | 0.50            | -            | 0.11          | 0.49        | 0.50         | 0.33         |
| <i>C6252T</i>   | 0.31            | 0.57         | -             | 0.02        | 0.24         | 0.01         |
| <i>SW35</i>     | 0.80            | 0.81         | 0.55          | -           | 0.69         | 0.25         |
| <i>SW839</i>    | 0.80            | 0.69         | 0.34          | 0.85        | -            | 0.05         |
| <i>S0073</i>    | 0.85            | 0.54         | 0.03          | 0.63        | 0.90         | -            |

Upper diagonal,  $\sqrt{r^2}$  ; lower diagonal, D'

Table 5. Haplotype analyses

| Haplotype       |               | Freq % |    |     | Effects             |                    |
|-----------------|---------------|--------|----|-----|---------------------|--------------------|
| <i>Del2634C</i> | <i>C6252T</i> | IB     | LD | ALL | g <sub>BF1</sub>    | g <sub>BF2</sub>   |
| <i>C</i>        | <i>C</i>      | 33     | 3  | 20  | 1.49±0.14           | 0.73±0.11          |
| <i>C</i>        | <i>T</i>      | 67     | 7  | 30  | 1.48±0.14           | 0.80±0.11          |
| <i>Del</i>      | <i>C</i>      | 0      | 90 | 50  | 1.22±0.14           | 0.58±0.10          |
| <i>Del</i>      | <i>T</i>      | 0      | 0  | <1  | -                   | -                  |
| P-value         |               |        |    |     | 1×10 <sup>-10</sup> | 7×10 <sup>-9</sup> |

IB: Iberian boars; LD: Landrace sows; BF1: back fat thickness at the shoulder level;

BF2: back fat thickness at the last rib

Table 6. Haplotype group analysis

| Haplotype | Alleles         |              |             | Freq %    |           |            | Effect                 |
|-----------|-----------------|--------------|-------------|-----------|-----------|------------|------------------------|
|           | <i>Del2634C</i> | <i>FABP4</i> | <i>SW35</i> | <i>IB</i> | <i>LD</i> | <i>ALL</i> | <i>g<sub>BF1</sub></i> |
| <b>A</b>  | <i>C</i>        | 28           | 19          |           |           |            |                        |
|           | <i>C</i>        | 28           | 18          |           |           |            |                        |
|           | <i>C</i>        | 19           | 20          |           |           |            |                        |
|           | <i>C</i>        | 20           | 22          | 100       | 2         | 47         | 0.16±0.05              |
|           | <i>C*</i>       | 19           | 18          |           |           |            |                        |
|           | <i>Del*</i>     | 17           | 20          |           |           |            |                        |
|           | <i>Del*</i>     | 20           | 20          |           |           |            |                        |
| <b>B</b>  | <i>Del</i>      | 20           | 19          |           |           |            |                        |
|           | <i>Del</i>      | 27           | 19          |           |           |            |                        |
|           | <i>Del</i>      | 27           | 18          | 0         | 20        | 25         | -(Reference)           |
|           | <i>Del</i>      | 22           | 16          |           |           |            |                        |
|           | <i>Del</i>      | 22           | 19          |           |           |            |                        |
| <b>C</b>  | <i>C</i>        | 18           | 16          |           |           |            |                        |
|           | <i>C</i>        | 18           | 19          |           |           |            |                        |
|           | <i>Del</i>      | 21           | 19          | 0         | 68        | 23         | -0.13±0.06             |
|           | <i>Del</i>      | 20           | 18          |           |           |            |                        |
| <b>D</b>  | <i>Del</i>      | 17           | 18          | 0         | 10        | 5          | -0.37±0.12             |

IB: Iberian boars; LD: Landrace sows; BF1: back fat thickness at the shoulder level.

\* Recombinant haplotype (not found in the parental populations)

Table 7. Transmission test

| <b>Boar</b> | <b>Haplotype</b>   | <b>n</b> | <b>g<sub>BF1</sub></b> | <b>P-value</b> |
|-------------|--|----------|------------------------|----------------|
| 1           | $\frac{C \ 20 \ 22}{\text{Del } 20 \ 19} \begin{pmatrix} A \\ B \end{pmatrix}$ | 36       | 0.21±0.18              | 0.23           |
| 2           | $\frac{C \ 19 \ 20}{\text{Del } 21 \ 19} \begin{pmatrix} A \\ C \end{pmatrix}$ | 20       | 0.26±0.20              | 0.19           |
| 3           | $\frac{C \ 19 \ 20}{\text{Del } 21 \ 19} \begin{pmatrix} A \\ C \end{pmatrix}$ | 42       | 0.38 ±0.16             | 0.03           |
| 4           | $\frac{C \ 19 \ 20}{\text{Del } 21 \ 19} \begin{pmatrix} A \\ C \end{pmatrix}$ | 36       | 0.40± 0.15             | 0.01           |

Boars are the four heterozygous F<sub>2</sub> boars that sired the F<sub>3</sub> and back cross generation, haplotype letter as in Table 3; n: number of offspring, BF1: back fat thickness at the shoulder level. Haplotype codes (A, B or C) as in Table 6.

Table 8. Allelic frequencies of the deletion in the porcine *FABP4* gene

| <b>Breed / Species</b> | <b>n</b> | <b>Freq</b> |
|------------------------|----------|-------------|
| <i>P. Tajacu</i>       | 2        | 0.00        |
| <i>B. Babyrussa</i>    | 1        | 0.00        |
| Vietnamese pig         | 3        | 0.00        |
| Meishan                | 22       | 0.50        |
| Wild boar              | 15       | 0.57        |
| Iberian                | 21       | 0.60        |
| Duroc                  | 23       | 0.65        |
| Pietrain               | 20       | 0.87        |
| Landrace               | 20       | 0.92        |
| Large White            | 20       | 1.00        |

n: number of individuals genotyped; Freq: frequency of the deletion in *FABP4* gene

## ***6. Characterization and physical mapping of the porcine CDS1 and CDS2 genes***

A. Mercadé, A. Sánchez, J. M. Folch

Aceptado en *Animal Biotechnology*

**Characterization and physical mapping of the porcine *CDS1* and  
*CDS2* genes**

**Running title: pig *CDS1* and *CDS2* genes**

**A. Mercadé, A. Sánchez, J. M. Folch**

*Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat*

*Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra*

Correspondence to:

Anna Mercadé

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

08193, Bellaterra, Spain

email: [anna.mercader@uab.es](mailto:anna.mercader@uab.es)

Phone: + 34 93 581 4260

Fax: +34 93 581 2106



## **Abstract**

CDP-diacylglycerol synthase (*CDS*) catalyzes the conversion of phosphatidic acid to CDP-diacylglycerol, an important precursor for the synthesis of phosphatidylinositol, phosphatidylglycerol, and cardiolipin. We amplified and sequenced 2053 bp of the pig *CDS1* mRNA. The structure of the pig *CDS1* gene was determined, being very similar to that of the human, rat, and mouse genes with respect size and organization of the 13 exons. In addition, we identified three polymorphic positions in exons 10 and 11. One of them, the A/C<sub>1006</sub> was genotyped in samples belonging to Iberian, Landrace, Large White, Pietrain, and Meishan pig breeds. Expression of this gene was also analysed by real-time PCR in different tissues showing a high *CDS1* expression in testis. Moreover, a 1240-bp fragment of the pig *CDS2* mRNA was amplified and sequenced. Finally, the *CDS1* and *CDS2* genes were physically mapped to porcine chromosomes 8 and 17, respectively by using the INRA, University of Minnesota porcine Radiation Hybrid panel (IMpRH).

Keywords: pig, sequencing, expression, *CDS1*, *CDS2*

## Introduction

CDP-diacylglycerol synthase (CDS) catalyzes the conversion of phosphatidic acid to CDP-diacylglycerol (CDP-DAG) (1-5). CDS resides at branch point of glycerolipid biosynthesis where phosphatidic acid is partitioned between diacylglycerol or CDP-DAG. In eukaryotic cells, CDP-DAG is the precursor of phosphoinositides, phosphatidylglycerol, and cardiolipin, and is therefore an important regulatory point in the phospholipid metabolism (6,7). Mammalian CDS is present in both mitochondrial and microsomal fractions. In the mitochondria, CDS appears to be involved in the synthesis of phosphatidylglycerol and cardiolipin, whereas in the endoplasmic reticulum and possibly other organelles is thought to operate in the phosphoinositide pathway (7,9,10). Phosphoinositide cycle mediates one of the intracellular signal transduction pathways and produces a class of second messengers that are involved in cell growth, differentiation, development, action of hormones and sensory perception (11,2). Cardiolipin is required for the activity of mitochondrial enzymes involved in cellular energy metabolism (12). Nevertheless, CDS is crucial for the lipid synthesis in prokaryotes (8).

Two genes encoding CDS have been reported in human, mouse and rat (1-5,9). In addition, *CDS1* and *CDS2* genes have been predicted in other species, i.e. cow, dog, chicken or zebra fish. Both genes split in 13 exons and the resulting coding region encompasses 1.4 kb. The human *CDS1* and *CDS2* genes span approximately 65 kb of genomic DNA.

The main objectives of the present work were the characterization of the nucleotide sequence, genomic organization, physical mapping, polymorphism analysis and mRNA expression of the *CDS1* gene. In addition, we reported the partial characterization and

physical mapping of the *CDS2* gene and the phylogenetic analysis of the two genes, as a first step to elucidate their role in porcine lipid metabolism.

## Material and methods

### *Amplification and sequencing of the pig CDS1 mRNA*

Total RNA was extracted from testis samples corresponding to Iberian, Landrace, Large White, Pietrain, and Meishan pigs by using the Trizol reagent (Gibco BRL, Life Technologies SA, Barcelona, Spain) and reverse transcribed into cDNA with the ThermoScript™ RT-PCR system (Invitrogen SA, Barcelona, Spain), following the manufacturer's instructions.

In order to characterize the *CDS1* mRNA sequence we designed a set of primers (CDSF2 and CDSR3) derived from human (GenBank accession number NM\_001263), rat (GenBank accession number NM\_031242) and mouse (GenBank accession number NM\_173370) *CDS1* mRNA sequences. The polymerase chain reaction (PCR) contained 2 µl of cDNA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.3 µM of each primer, and 2.6 U Expand High Fidelity PCR (Roche, Barcelona, Spain) in a 50 µl final volume. Thermocycling involved an initial denaturation (95 °C for 3 min) followed by 10 cycles (95 °C for 30 s, annealing temperature for 1 min, and 72 °C for 2.5 min) and by 25 cycles (95 °C for 30 s, annealing temperature for 1 min and 72 °C for 2.5 min) increasing the extension step by 20 s in each cycle and a final extension (72 °C for 10 min). Primer combinations and thermal conditions are shown in Table 1 and Figure 1.

The mRNA 3' end was reverse transcribed using a modified oligo(dT) primer and amplified using CDS1F3 and UAP primers (Table 1) following the same PCR conditions described above.

The mRNA 5' end was amplified by using 5'-RACE approach described (14,15). First-strand cDNA was transcribed from 1µg of testis RNA with a porcine *CDS1* exon 3-specific primer, CDSrr2 (Table 1). Nevertheless, 5'-RACE approach did not work efficiently and we designed a set of primers (CDS1pFw and CDS1pRv) (Table 1) to amplify a fragment of the 5'UTR region by aligning human (GenBank accession number NC\_000004) and mouse (GenBank accession number NC\_000071) sequences of *CDS1* gene. The PCR was performed with the GC-Rich PCR System (Roche, Barcelona, Spain) using 75 ng of genomic DNA in a final volume of 25 µl. The thermal profile was as follows: 95 °C for 3 min, 39 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 2.5 min, with a final extension at 72 °C for 7 min.

All these overlapping fragments were sequenced by using BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit in an ABI PRISM 3100 Avant sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Comparative sequence analysis of the CDSF2-CDSR3 and CDS1F3-UAP mRNA fragments from eight pigs belonging to Iberian, Landrace, Large White, Pietrain and Meishan breeds to detect polymorphisms was carried out using the SeqScape™ v1.1 software (Applied Biosystems).

#### *Amplification and sequencing of the pig CDS2 mRNA*

We amplified two overlapping fragments of the pig *CDS2* mRNA from testis samples by using two sets of oligonucleotides: CDSF2 and CDSR3; CDS2F1 and UAP (Table 1; Figure 1). The first set of primers coamplified either the *CDS1* or *CDS2* mRNA. The second set of primers, CDS2F1 and UAP, was used to amplify specifically the 3' end of the *CDS2* mRNA. PCR and thermal conditions were performed as previously described. The CDSF2-CDSR3 PCR product was cloned into the pCR®2.1-TOPO® vector

(Invitrogen). The cDNA inserts were sequenced (Applied Biosystems) to discern between *CDS1* and *CDS2* mRNA. Sequence analysis was carried out using the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

In order to characterize a fragment of the 5'UTR region we designed another set of primers (CDS2pFw and CDS2pRv) (Table 1), by aligning human (GenBank accession number NC\_000020), mouse (GenBank accession number NC\_000068) and rat (GenBank accession number NC\_005102) sequences of the *CDS2* gene. The PCR was performed with the GC-Rich PCR System (Roche) in the same conditions previously described and sequenced.

#### *Genomic organization of the pig CDS1 gene*

In order to characterize the structure of the *CDS1* gene, we designed primers (Table 2) from the pig *CDS1* mRNA sequence previously obtained (GenBank accession number DQ105588). PCR were performed by using Expand Long Template PCR System kit (Roche) following the manufacturer's instructions. The PCR products ends were sequenced in order to determine the sequence flanking the exons.

#### *Allele frequencies of the pig CDS1 gene*

A primer extension protocol was used for genotyping the A/C polymorphism at position 1006 of the *CDS1* mRNA in 99 pigs from five different breeds (Iberian, Landrace, Large White, Pietrian and Meishan). CDS1rhFw and CDS1rhRv primers (Table 1) were used for amplifying exon 10. The PCR contained 30 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μM of each primer, 0.2 mM dNTPs, and 0.6 U Taq DNA polymerase (Invitrogen) in a final 25-μl volume. The thermal profile was 95 °C for 3 min, 35 cycles of 95 °C for 1 min, 58 °C for 1 min, 72 °C for 2.5 min, and a final extension time of 7

min at 72 °C. The PCR products were purified with the ExoSAP-IT kit (Amersham Biosciences Europe GmbH) and genotyped by using the SNaPshot ddNTP<sup>TM</sup> Primer Extension kit (Applied Biosystems) with the CDS1-1491 primer (Table 1). Genotypes were analyzed in an ABI 3100 sequencer (Applied Biosystems).

#### *Physical mapping of the CDS1 and CDS2 genes*

Radiation hybrid mapping was performed with the INRA, University of Minnesota porcine Radiation Hybrid panel (IMpRH). Primers used were CDS1rhFw-CDS1rhRv and CDS2rhFw-CDS2rhRv (Table 1) for *CDS1* and *CDS2* genes, respectively. The amplified fragments from the two genes were sequenced to verify their specificity. The PCR included 25 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μM of each primer, 0.2 mM dNTPs, and 0.6 U Taq DNA polymerase (Invitrogen) in a final 25 μl reaction. The cycling profile was 95 °C for 3 min, 35 cycles of 95 °C for 1 min, annealing temperature (Table 1) for 1 min, 72 °C for 2.5 min, and a final extension time of 7 min at 72 °C. The PCR products were analyzed on 2.5% agarose gels stained with ethidium bromide. Results were analyzed using the IMpRH mapping tool (16).

#### *mRNA expression of the CDS1 gene*

Total RNA isolation and cDNA synthesis were performed as previously described from liver, stomach, backfat, testis, pancreas and *longissimus dorsi* muscle samples. All the samples were diluted 1:50 with sterile water and 4μl of these dilutions were used for each PCR assay. Quantitative Real-time PCR was performed using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions in an ABI PRISM 7700 HT Sequence Detection system (Applied Biosystems). All the samples were tested in triplicate with the reference *beta-2-microglobulin (B2M)*, a

housekeeping gene for normalization of data. In our conditions, the *B2M* gene was expressed at the same level in all tissues (Ct were between 16-18). For each assay, a standard curve was prepared by serial dilutions of cDNA to quantify the mRNA expression levels. The data were analyzed with the SDS v2.1 software (Applied Biosystems). Two intron-spanning primers pairs, CDS1rtFw-CDS1rtRv and BmglobFw-BmglobRv (Table 1), were applied to exclude the possibility of genomic DNA coamplification.

#### *Phylogenetic analysis*

A phylogenetic analysis of *CDS1* and *CDS2* genes was performed. The analyzed sequences were the porcine *CDS1* and *CDS2* proteins translated from the nucleotide sequences obtained in this work (GenBank accession number DQ105588 and DQ105590, respectively); the human *CDS1* (NM\_001263) and *CDS2* (NM\_003818); the chimp *CDS1* (XM\_517179) and *CDS2* (XP\_525257); the murine *CDS1* (NM\_173370) and *CDS2* (NM\_138651); the rat *CDS1* (NM\_031242) and *CDS2* (NM\_053643); the dog *CDS1* (XP\_544962) and *CDS2* (XP\_542903); the cow *CDS2* (XP\_870767); the chicken *CDS1* (ENSGALP00000018293) and *CDS2* (XP\_417669); the zebra fish *CDS1* (XM\_680662) and *CDS2* (NM\_201186); *Drosophila* *CDS* (NM\_079922) and the yeast (NP\_009585). The *Arabidopsis* (X94306) was used as outgroup. The alignment of a 374 amino acids homologous region was performed using the ClustalX software (17) and a Neighbor-Joining tree was constructed with the Mega v3 software by using bootstrap resampling (10000 replicates) (18).

## Results and Discussion

### *Characterization of the porcine CDS1 mRNA*

We have sequenced a 2464 bp-long pig *CDS1* mRNA containing 949 bp of the 5'-UTR, the 1383 bp of coding sequence and 133 bp of the 3'-UTR region. This nucleotide sequence was submitted to GenBank with accession number DQ105588. The porcine *CDS1* mRNA has 92, 86 and 85% nucleotide similarity in the coding region with the human, mouse and rat counterparts, respectively. In accordance with the other species, the pig *CDS1* mRNA codes for a protein of 461 amino acids with 96, 95 and 94% identity to human, mouse and rat orthologs, respectively. Thus, both nucleotide and the predicted protein sequences share high sequence similarity between these species, indicating the conservation of this gene during evolution. Transmembrane domains have been predicted in the pig *CDS1* protein with the NPS@: Network Protein Sequence Analysis (19). This program indicated the presence of seven transmembrane domains that are conserved between pig, human, mouse and rat proteins (data not shown). Pig amino acid sequence also contained a conserved sequence element (aa 375-401) belonging to the phosphatidate cytidylyltransferase signature motif, which is found in several other enzymes involved in the transfer of CTP (20).

### *Genomic organization of the porcine CDS1 gene*

Primers to determine the genomic organization of the pig *CDS1* gene were positioned in contiguous exons according to the human *CDS1* gene structure. Each intron was amplified independently and sequenced. The pig *CDS1* gene is composed of 13 exons and 12 introns, in agreement with the human, mouse and rat orthologs (<http://www.ensembl.org>). The alignment of these genomic sequences with the pig *CDS1* mRNA enabled the determination of exon and intron sizes and the splice



junctions (Figure 2). The coding exons are relatively small, ranging from 59 to 153 bp, and their lengths are well conserved among human, mouse and rat *CDS1* genes, being identical in size, with the exception of exons 1 and 13 that are longer and more variable between species. The pig exon 1 contains the ATG start codon and the exon 13 contains the TAA stop codon and the whole 3'-UTR region. All exon/intron boundaries were shown to follow the canonical AG-GT rule of splicing (21). The length of the introns was estimated from agarose gel electrophoresis of the corresponding PCR products and approximately 500 bp-long sequences were obtained at both 5'- and 3'- intronic ends. However, we could not amplify introns 1 and 5, possibly due to their bigger size. In humans, the introns 1 and 5 are approximately 21 and 13 kb-long, respectively, according to the genome organization described in the Ensembl genome browser (<http://www.ensembl.org/index.html>). Recently, the organization of the murine *CDS1* gene has been published (22), consisting in 13 exons and spanning 55 kb. In humans, the intron-exon organization and sequence for the human *CDS2* gene has been described (23). This gene also consists of 13 exons and spans approximately 65 kb.

#### *Polymorphisms in the porcine CDS1 mRNA and allele frequencies*

The *CDS1* mRNA was sequenced from the exon 2 to the 3'-UTR region in two animals from five different breeds: Iberian, Landrace, Large White, Pietrain and Meishan. The comparative analysis revealed three polymorphic positions in exons 10 and 11: A/C<sub>1006</sub>, C/T<sub>1037</sub>, G/T<sub>1038</sub> (positions are indicated respect the start codon). The A/C<sub>1006</sub> polymorphism (exon 10) causes a Proline (C) → Threonine (A) amino acid replacement at position 336 of the CDS1 protein. This substitution implies the change of a hydrophobic and aliphatic amino acid (Proline) to a polar amino acid (Threonine). The C/T<sub>1037</sub> polymorphism (exon 11) produces an Alanine (C) → Valine (T) conservative

amino acid replacement at position 346 of the CDS1 protein. Finally, the G/T<sub>1038</sub> (exon 11) polymorphism is silent.

We decided to genotype the A/C<sub>1006</sub> polymorphism in a panel of five different pig breeds as it was the only that caused a non conservative amino acid substitution. A primer extension protocol was designed to perform the *CDS1* genotyping of 99 animals including the Iberian, Landrace, Large White, Pietrain and Meishan breeds in order to determine the distribution of allele frequencies among breeds. Our analysis showed that the SNP segregated in every population analyzed (Table 3). Nevertheless, the allele C was shown at higher frequencies than the allele A in all breeds, with the exception of Iberian in which both alleles were observed at intermediate frequencies. The allele C encodes Proline as is found in the human, mouse and rat homologous proteins in the corresponding position. The highest frequency of the allele C was found in Pietrain (95%).

#### *Expression of the CDS1 gene*

For the analysis of the pig *CDS1* gene expression, we designed two primers, CDS1rtFw and CDS1rtRv (Table 1), from the pig *CDS1* mRNA sequence previously reported in this study (GenBank accession number DQ105588) to amplify a 127 bp-fragment by Real-time RT-PCR. We performed a SYBR Green assay to measure the relative *CDS1* mRNA expression levels to the endogenous *B2M* gene using the standard curve method. This approach is based on the expression levels of a target gene versus a reference gene and avoids the problems currently associated with PCR efficiency assessment (24). Six tissues of two Iberian boars were analyzed: liver, *longissimus dorsi* muscle, backfat, stomach, testis and pancreas. Analyses of the Real-time PCR data showed that results were similar between the two animals for each tissue except for testis, in which values

were more different. Real-time PCR results indicated that the expression of the *CDS1* gene is very low in all tissues analyzed except in testis, showing the highest expression value as we expected. Liver and muscle had the same level of expression whereas expression was not detected in stomach, backfat and pancreas (Figure 3). The expression of the human, rat and mouse *CDS1* gene was previously analyzed by Northern blotting and some discrepancies exist between experiments. Expression of the human *CDS1* was found in brain, skeletal muscle, kidney, pancreas and placenta. Nevertheless, it was particularly prominent in heart and liver (1). In contrast, a different expression pattern was obtained in a posterior study (9), in which no expression was found in kidney, skeletal muscle, liver and heart. However, expression was detected in small intestine, ovary, testis, prostate, placenta and brain. A possible explanation of these differences may be the cross-hybridization of the *CDS1* probes with the *CDS2* mRNA. In rat, expression of *CDS1* was found in retina and brain, but unexpectedly the highest expression was also detected in testis; being weak in kidney, small intestine and placenta and not detectable in heart, liver and ovary (2). Recently, mouse *CDS1* expression was described in brain, kidney and testis (22). The functional significance of the highest expression of the pig, rat and mouse *CDS1* mRNA in testis remains to be elucidated. Further studies are necessary to know the regulation of expression and biological function of the *CDS1* gene.

#### *Isolation of the porcine CDS2 mRNA*

We have amplified and sequenced a 1240-bp fragment of the pig *CDS2* mRNA. This sequence was submitted to GenBank with accession number DQ105590. A BLAT analysis of the pig mRNA against the UCSC human genome browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) and comparison with the

mouse *CDS2* gene organization (22) suggest that the size of exons in the pig *CDS2* gene is conserved. As in the *CDS1* gene, exons are relatively small whereas introns are large. The pig *CDS2* mRNA obtained encompasses exons 3 and 13, and included 1125 bp of an almost complete coding region and 115 bp of the 3'-UTR region. This sequence displayed a 93, 89 and 89% nucleotide similarity with their human, mouse and rat *CDS2* orthologs, respectively. In contrast, the pig *CDS2* mRNA showed a 70% similarity with the pig *CDS1*. Furthermore, primers CDS2pFw and CDS2pRv were designed to amplify a distal fragment of the 5'UTR region of the pig *CDS2* mRNA until the start codon. The sequencing of this fragment allowed us to determine a 505 bp of this region. This nucleotide sequence was also deposited into GenBank with accession number DQ105589.

The deduced partial protein sequence had 375 amino acids and revealed a 97, 97 and 96% of identity to the human, mouse and rat *CDS2* proteins, respectively. At amino acid level, the identity between pig *CDS1* and *CDS2* was of 75%. Transmembrane domains have also been predicted in the pig *CDS2* protein as we described above for the *CDS1* gene, showing also seven transmembrane domains that were conserved between pig, human, mouse, and rat proteins. As expected, the porcine *CDS2* protein contained a conserved sequence element (aa 358-384) belonging to the phosphatidate cytidyltransferase signature motif.

Comparative alignment of the *CDS* gene sequences used in the phylogenetic analysis from mammals, chicken, zebra fish, *Drosophila*, yeast and *Arabidopsis* showed two notable regions of homology. These regions have been previously reported (9) and it was suggested that they probably correspond to the active sites of the protein.

*Physical mapping of CDS1 and CDS2 genes*

Radiation hybrid mapping was performed with the INRA, University of Minnesota porcine Radiation Hybrid panel (IMpRH) (25,26). Two sets of pig-specific primers, CDS1rhFw-CDS1rhRv and CDS2rhFw-CDS2rhRv (Table 1), were designed to amplify a 151 bp and 139 bp fragments of the exon 10 of the *CDS1* and *CDS2* genes, respectively.

Analysis of the data with the IMpRH mapping tool (16) revealed that the *CDS1* gene was linked to the SW1980 microsatellite (distance = 26 cR; LOD = 12.51) on the porcine chromosome 8 (SSC8). This position fits the *CDS1* gene at the end of the q arm of this chromosome (Figure 4).

With reference to the pig *CDS2* gene, RH mapping results demonstrated that this gene is physically mapped to the porcine chromosome 17 (SSC17) between SWR1120 (LOD = 10.7) and SWR1133 (LOD = 10.52) markers at 36 and 37 cR, respectively (Figure 4).

Comparative mapping between pig and human revealed that the assignment of the pig *CDS1* and *CDS2* genes was consistent with the position of the human orthologs genes. The human *CDS1* gene was mapped to HSA4q21-22, whereas the human *CDS2* gene was located to HSA20p13 (4,5). These two human chromosomes share homology with pig chromosomes 8 and 17, respectively (27,28). No fat QTL have been described in either the *CDS1* or the *CDS2* loci. Nevertheless, QTL affecting reproductive traits, i.e. prenatal survival, litter size, weight of the ovary and age of puberty, were detected near the *CDS1* locus in the SSC8 (29, 30, 31). In the SSC17, we found a suggestive QTL related to sensory evaluation traits, i.e. juiciness score, in an interval including the *CDS2* locus (32). Although these genes may not be responsible of the QTL, further analyses would be necessary in order to elucidate the genes underlying these QTL and a possible effect of the *CDS1* and *CDS2* genes.

### *Phylogenetic analysis*

Alignment of the homologous 374 aa region between the CDS1 and CDS2 proteins and a phylogenetic analysis by the Neighbor-Joining method were performed. *Arabidopsis* CDS sequence was used as outgroup. The Neighbour-Joining tree (Figure 5) shows clearly two different clades for the CDS1 and CDS2 sequences. Both clades cluster in a node that includes mammals, birds and fishes. This pattern is consistent with the fact that the *CDS1* and *CDS2* genes were originated by gene duplication from an ancestral *CDS* gene before the divergence of the vertebrate clade.

### **Acknowledgements**

We are grateful to D. Milan for providing the INRA, University of Minnesota porcine Radiation Hybrid panel. This project was funded by the *Ministerio de Educación y Ciencia* (AGF99-0284-CO2-02). A. Mercadé was funded by a *Formació Personal Investigador* (FI) fellowship from the *Generalitat de Catalunya*.

### **References**

1. Heacock AM, Uhler MD, Agranoff BW. Cloning of CDP-diacylglycerol synthase from a Human Neuronal Cell line. *J. Neurochem* 1996;67:2200-2203.
2. Saito S, Goto K, Tonosaki A, Kondo H. Gene Cloning and Characterization of CDP diacylglycerol Synthase from Rat Brain. *J Biol Chem* 1997;272:9503-9509.
3. Weeks R, Dowhan W, Shen H, Balantac N, Meengs B, Nudelman E, Leung DW. Isolation and expression of an isoform of human CDP-diacylglycerol synthase cDNA. *DNA Cell Biol* 1997;16:281-289.

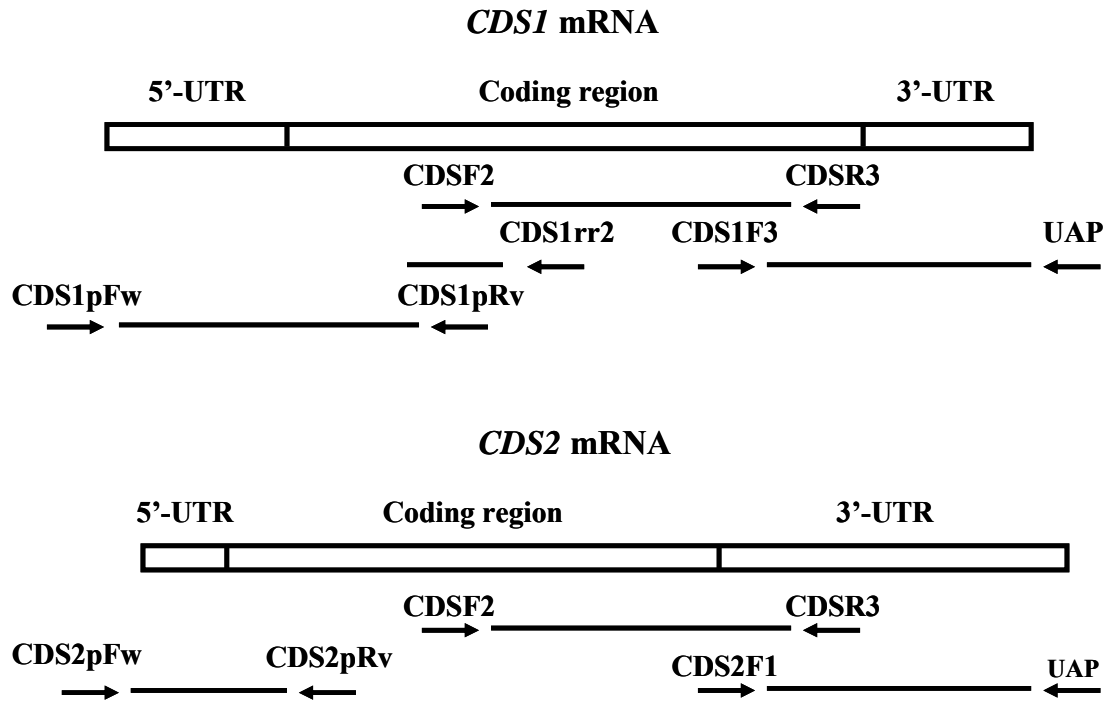
4. Halford S, Dulai KS, Daw SC, Fitzgibbon J, Hunt DM Isolation and Chromosomal Localization of Two human CDP-diacylglycerol Synthase (CDS) Genes. *Genomics* 1998;54:140-144.
5. Volta M, Bulfone A, Gattuso C, Rossi E, Mariani M, Consalez GG, Zuffardi O, Ballabio A, Banfi S, Franco B. Identification and Characterization of CDS2, a Mammalian Homolog of the *Drosophila* CDP-diacylglycerol Synthase Gene. *Genomics* 1999;55:68-77.
6. Kent C. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 1995;64:315-343.
7. Shen H, Heacock PN, Clancey CJ, Dowhan W. The CDS1 gene encoding CDP-diacylglycerol synthase in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for cell growth. *J Biol Chem*. 1996;271:789-795.
8. Heacock AM, Agranoff BW. CDP-diacylglycerol synthase from mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1348:166-172.
9. Lykidis A, Jackson PD, Rock CO, Jackowski S. The role of CDP-diacylglycerol synthetase and phosphatidylinositol synthase activity levels in the regulation of cellular phosphatidylinositol content. *J Biol Chem*. 1997;272:33402-33409.
10. Vance JE, Vance DE. Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem Cell Biol*. 2004;82:113-128.
11. Wu L, Niemeyer B, Colley N, Socolich M, Zuker CS. Regulation of PLC-mediated signalling in vivo by CDP-diacylglycerol synthase. *Nature* 1995;373: 216-222.
12. Hatch GM. Cell biology of cardiac mitochondrial phospholipids. *Biochem Cell Biol*. 2004;82:99-112.
13. Vance JE. Eukaryotic lipid-biosynthetic enzymes: the same but not the same. *Trends Biochem Sci*. 1998;23:423-428.

14. Matz M, Shagin D, Bogdanova E, Britanova O, Lukyanov S, Diatchenko L, Chenchik A. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:1558-1560.
15. Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Siebert PD. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques* 2001;30:892-897.
16. Milan D, Hawken R, Cabau C, Leroux S, Genet C, Lahbib Y, Tosser G, Robic A, Hatey F, Alexander L, Beattie C, Schook L, Yerle M, Gellin J. IMpRH server: an RH mapping server available on the Web. *Bioinformatics* 2000;16:558-559.
17. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:4876-82.
18. Kumar S., Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics* 2004;5:150-163.
19. Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deleage G. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci.* 2000;25:147-150.
20. Martin D, Gannoun-Zaki L, Bonnefoy S, Eldin P, Wengelnik K, Vial H. Characterization of *Plasmodium falciparum* CDP-diacylglycerol synthase, a proteolytically cleaved enzyme. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;110:93-105.
21. Mount SM. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* 1982;10:459-472.
22. Inglis-Broadgate SL, Ocaka L, Banerjee R, Gaasenbeek M, Chapple JP, Cheetham ME, Clark BJ, Hunt DM, Halford S. Isolation and characterization of murine Cds (CDP-diacylglycerol synthase) 1 and 2. *Gene.* 2005;356:19-31.



23. Halford S, Inglis S, Gwilliam R, Spencer P, Mohamed M, Ebenezer ND, Hunt DM. Genomic organization of human CDS2 and evaluation as a candidate gene for corneal hereditary endothelial dystrophy 2 on chromosome 20p13. *Exp Eye Res.* 2002;75:619-623.
24. Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics.* 2005;6:62.
25. Yerle M, Pinton P, Robic A, Alfonso A, Palvadeau Y, Delcros C, Hawken R, Alexander L, Beattie C, Schook L, Milan D, Gellin J. Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs. *Cytogenet Cell Genet.* 1998;82:182-188.
26. Hawken RJ, Murtaugh J, Flickinger GH, Yerle M, Robic A, Milan D, Gellin J, Beattie CW, Schook LB, Alexander LJ. A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map. *Mamm Genome.* 1999;10:824-830.
27. Goureau A, Yerle M, Schmitz A, Riquet J, Milan D, Pinton P, Frelat G, Gellin J. Human and porcine correspondence of chromosome segments using bidirectional chromosome painting. *Genomics.* 1996;36:252-262.
28. Jiang Z, He H, Hamasima N, Suzuki H, Verrinder G. Comparative mapping of *Homo sapiens* chromosome 4 (HSA4) and *Sus scrofa* chromosome 8 (SSC8) using orthologous genes representing different cytogenetic bands as landmarks. *Genome.* 2002;45:147-156.
29. Rohrer GA, Ford JJ, Wise TH, Vallet JL, Christenson RK. Identification of quantitative trait loci affecting female reproductive traits in a multigeneration Meishan-White composite swine population. *J Anim Sci.* 1999;77:1385-1391.

30. Cassady JP, Johnson RK, Pomp D, Rohrer GA, Van Vleck LD, Spiegel EK, Gilson KM. Identification of quantitative trait loci affecting reproduction in pigs. *J Anim Sci.* 2001;79:623-633.
31. King AH, Jiang Z, Gibson JP, Haley CS, Archibald AL. Mapping quantitative trait loci affecting female reproductive traits on porcine chromosome 8. *Biol Reprod.* 2003;68:2172-2179.
32. Malek M, Dekkers JC, Lee HK, Baas TJ, Prusa K, Huff-Lonergan E, Rothschild MF. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. *Mamm. Genome.* 2001;12:637-645.



**Figure 1.** Primers used to amplify and sequence the porcine *CDS1* and *CDS2* genes. Design of the primers was derived from human *CDS1* and *CDS2* mRNA.

**Table 1.** Primer sequences and conditions used for PCR amplifications

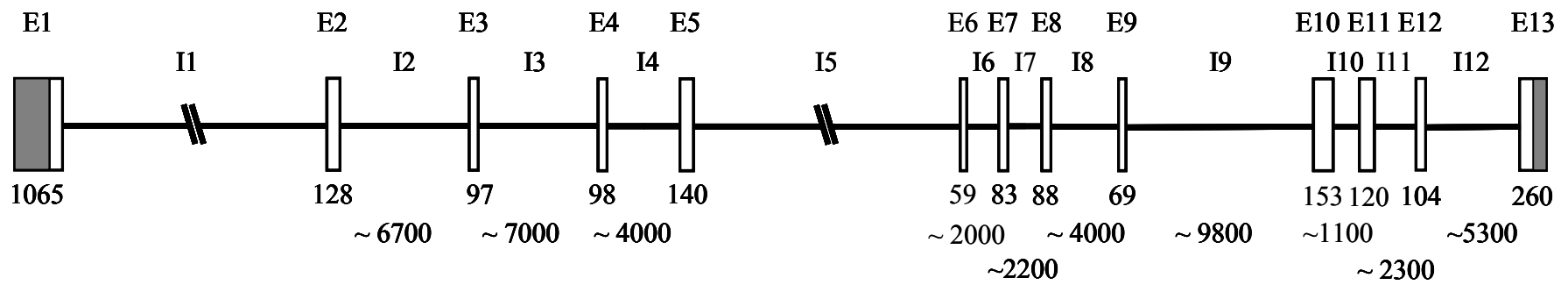
| <b>Primers</b> | <b>Sequence 5' → 3'</b>                        | <b>Temp.</b> |
|----------------|--|--------------|
| CDSF2          | TCTTCAAGGTGGAAAACTGGTGG                        | 60 °C        |
| CDSR3          | TGAATCCACTAGCAAAGAAGCCTCC                      |              |
| CDS1pFw        | GCCAACCAGTCCGTCCTGCC                           | 60 °C        |
| CDS1pRv        | GCTCTCGGTTTCGTGGTTCGC                          |              |
| CDS1rtFw       | AGTGGAATATCGCAGTGACATCAA                       | 60 °C        |
| CDS1rtRv       | CAAGCTCACAGCTTCCTGTCTTAAC                      |              |
| CDS1F3         | GTGAACCCTCAGAACTTTTCCAGC                       | 62 °C        |
| CDS1rr2        | TGCCTAGAACAAGAAGCATCAG                         |              |
| CDS1-1491      | TCAGAGCTACTCACTGCCT                            |              |
| CDS1rhFw       | GCCGCCTACGTGTTATCC                             | 58 °C        |
| CDS1rhRv       | GTCTTAACACGGCCTTCAGC                           |              |
| CDS2F1         | GAGTACAACATTCCTGGGGTC                          | 60 °C        |
| CDS2pFw        | GCCCTCAGTAACCGGTTACCT-3'                       | 58 °C        |
| CDS2pRv        | CCTCTGCCTCAGCTCKGTCAT                          |              |
| CDS2rhFw       | GTGATGTCCGGGTACAGATG                           | 62 °C        |
| CDS2rhRv       | CAATGAGAGACTGGATGACC                           |              |
| BmglobFw       | GTCAGACCTGTCTTTCAGCAAGG                        | 60 °C        |
| BmglobRv       | GTTAGTGGTCTCGATCCCCTTAAC                       |              |
| UAP            | GGCCACGCGTCGACTAGTAC                           |              |
| Oligo(dT)      | GGCCACGCGTCGACTAGTAC (T) <sub>30</sub> G/A/C N |              |

Temp : annealing temperature for each PCR

**Table 2.** Primers used for determining the genomic organization of the pig *CDS1* gene

| Exons      | Primers | Sequence 5' → 3'              | Temp. |
|------------|---------|-------------------------------|-------|
| Exon 1/2   | E1F     | GGAGAGTGGGAGCTCAGGC           | 58 °C |
|            | E2R     | TCCGAGGATGGTGGGAATGTC         |       |
| Exon 2/3   | E2F     | GATATGGAGATTTGGATCCCAGAA      | 56 °C |
|            | E3R     | GCATCAGCATAAAGGATCCCA         |       |
| Exon 3/4   | E3F     | GAAAAACTGGTGGATTCGTGG         | 56 °C |
|            | E4R     | TCTAAACCAAGGTAGGTCATAAGAACG   |       |
| Exon 4/5   | E4F     | CTAGGCATCCAAGTGAAATGCTT       | 56 °C |
|            | E5R     | AGGATATAAATCTGTGGTAGCGAATGA   |       |
| Exon 5/6   | E5F     | GCTGATTACTTTGCTACATTTGTTCAA   | 58 °C |
|            | E6R     | TGACTACAGAATAATGGTTAATACGGACC |       |
| Exon 6/7   | E6F     | GCATGTTTGTGCTAAGAATTGT        | 58 °C |
|            | E7R     | CATATCATGCCTTCAAACAGATTTTG    |       |
| Exon 7/8   | E7F     | ATGGACTCATGTCACTTTACTGATAACA  | 56 °C |
|            | E8R     | AATTAGTGGCGTTCTCCCAAAA        |       |
| Exon 8/9   | E8F     | G TTCCTTGTTC CATATCAAGTGTT    | 58 °C |
|            | E9R     | AACTGTGGAAAAGAAACCGCC         |       |
| Exon 9/10  | E9F     | TTGTCTCCTAAGAAGACTTGGGAAG     | 56 °C |
|            | E10R    | CGAGGGAGGCAGTGAGTAGCT         |       |
| Exon 10/11 | CDS1F3  | GTGAACCCTCAGA ACTTTTCCAGC     | 62 °C |
|            | CDS1R3  | TGAATCCACTAGCAAAGAAGCCTCC     |       |
| Exon 11/12 | E11F    | CTGTGAGCTTGTATCCTTTCCAGATA    | 58 °C |
|            | E12R    | CACAAAAGTCGCCATCAAATACTG      |       |
| Exon 12/13 | E12F    | TTTTGCGAACACCATTCTG           | 56 °C |
|            | E13R    | AGGTTGGCTGTAGGATTCCTTTCT      |       |

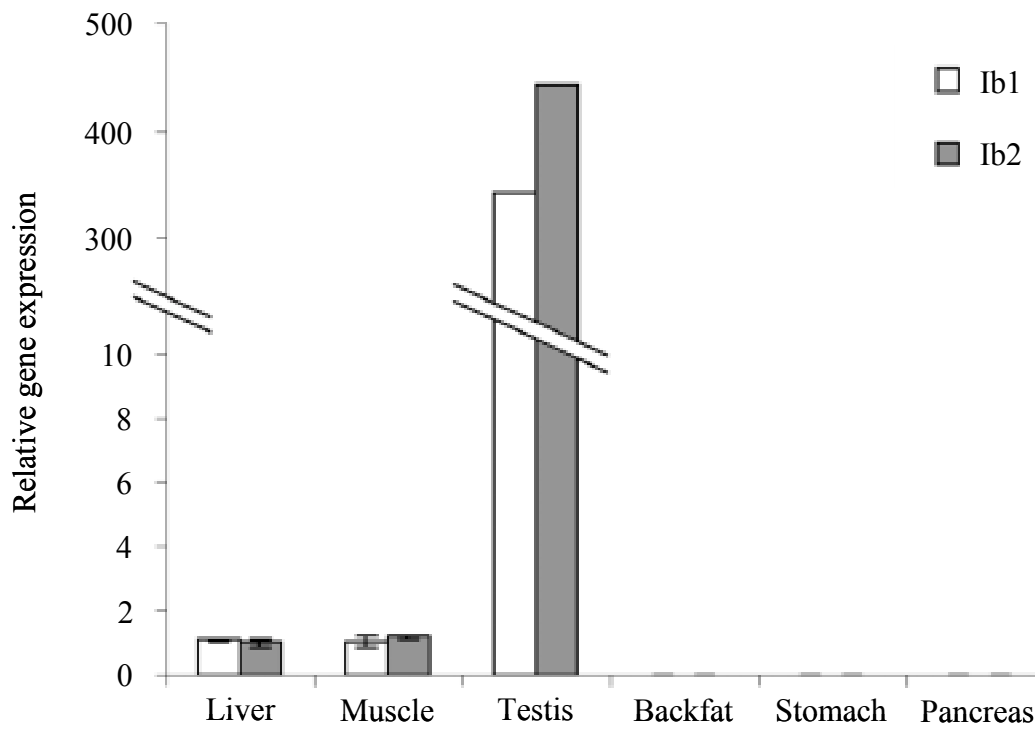
Temp: annealing temperature for each PCR



**Figure 2.** Pig *CDS1* gene organization. Solid boxes indicate exons (E); black lines: introns (I); White boxes represent the coding region. Exons and introns sizes are indicated in bp. Introns sizes were approximated.

**Table 3.** Allele frequencies of the A/C<sub>1006</sub> polymorphism in the porcine *CDS1* gene genotyped by primer extension analysis. Allele frequencies were calculated in 99 pigs belonging to Iberian, Landrace, Large White, Meishan and Pietrain breeds.

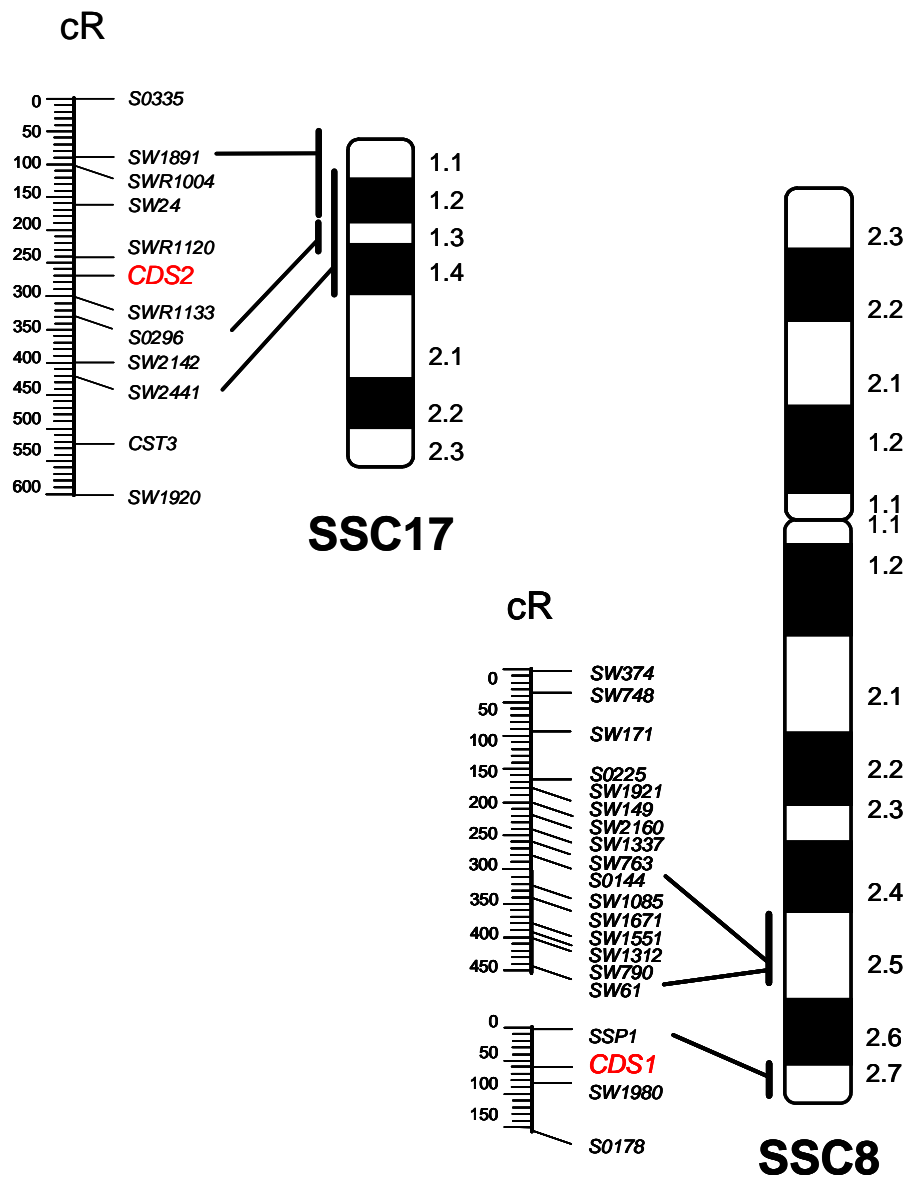
| <b>Breed</b>   | <b>n</b> | <b>Allele frequencies</b> |          |
|----------------|----------|---------------------------|----------|
|                |          | <b>A</b>                  | <b>C</b> |
| Iberian        | 23       | 0.52                      | 0.48     |
| Landrace       | 19       | 0.34                      | 0.66     |
| Meishan        | 17       | 0.12                      | 0.88     |
| Large<br>White | 18       | 0.11                      | 0.89     |
| Pietrain       | 22       | 0.05                      | 0.95     |



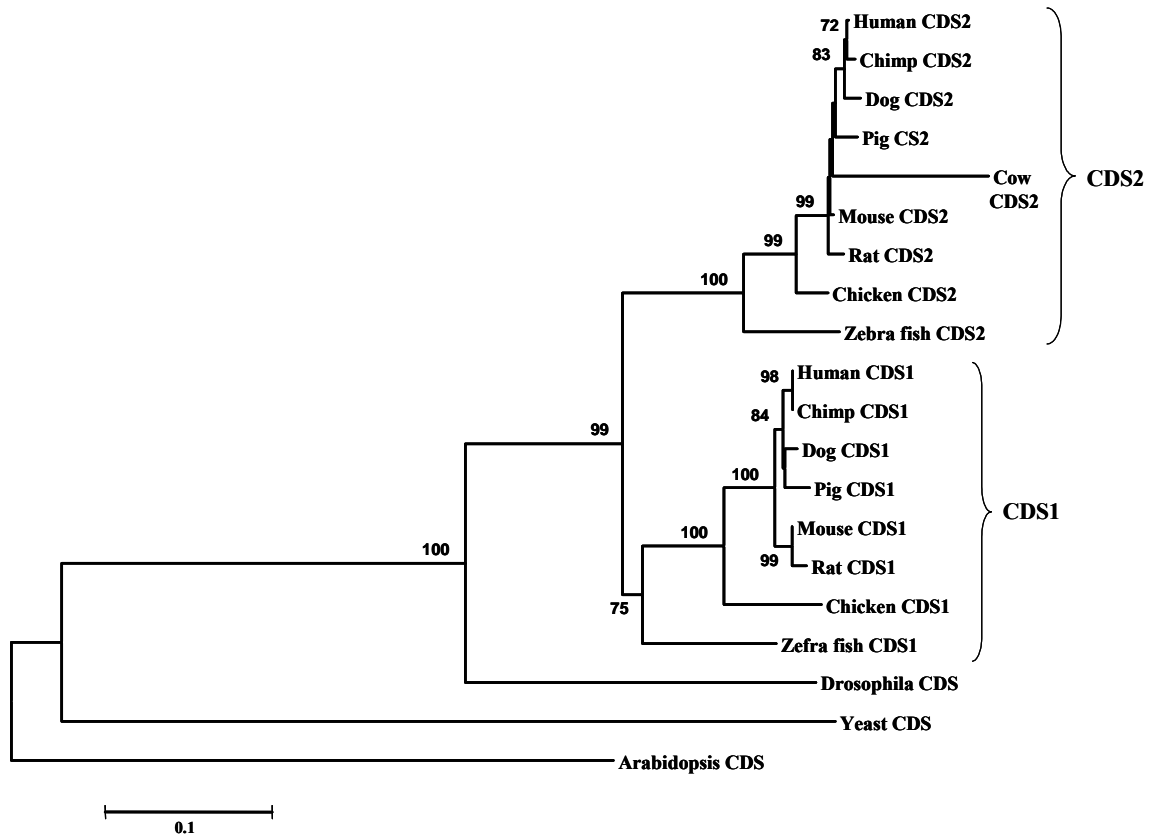
**Figure 3.** Quantitative Real-time PCR analysis of the pig *CDS1* mRNA expression.

Ib1, Ib2: Are two Iberian pig males. The relative gene expression of the *CDS1* mRNA is indicated using liver Ib2 as calibrator. Gene expression of the *CDS1* was normalized respect to the *B2M* gene using the standard curve method.





**Figure 4.** Chromosomal location of the *CDS1* and *CDS2* genes on the SSC8 and SSC17, respectively



**Figure 5.** Phylogenetic tree of the CDS1 and CDS2 proteins produced by the Neighbour-Joining method. Numbers at the branch points in the tree are the bootstrap values indicating the percentages of 10,000 replications. Only bootstrap values higher than 70 % are shown. A homologous 374 amino acids region was analyzed.

***7. Assignment of the acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) gene to porcine chromosome X***

A. Mercadé, A. Sánchez, J. M. Folch

*Animal Genetics* (2005) 36:76

# **DISCUSIÓN**

#### 4.1. Mapeo fino de la posición de QTL

El primer objetivo del presente trabajo era llevar a cabo el mapeo fino de la posición de QTL detectados previamente por el proyecto IBMAP. Como se ha descrito en la introducción, los estudios de barrido genómico detectan QTL pero con unos intervalos de confianza muy amplios, en los que se pueden localizar centenares de genes. Por tanto, es necesario disponer de estrategias que reduzcan estos intervalos para incrementar la probabilidad de encontrar el gen candidato posicional para un determinado carácter de interés. En este punto, disponer de la secuencia del genoma porcino o de mapas de alta densidad facilitarían en gran medida la búsqueda de genes. Una estrategia muy útil para el mapeo fino es la utilización de líneas congénitas. Estas líneas difieren de las líneas parentales únicamente en una región cromosómica específica y bien delimitada. Este método se ha desarrollado en algunos estudios como en el que se realizó el mapeo fino de QTL en una región con efectos significativos para grasa y crecimiento en el cromosoma 2 del ratón (Jerez-Timaure *et al.* 2005). Desafortunadamente, esta estrategia no es aplicable en especies domésticas, por lo que se deben aplicar otros métodos para realizar el mapeo fino. La finalidad de estos estudios es verificar el número de QTL, mejorar la estimación de los efectos de los QTL para diferentes caracteres y obtener la posición del QTL con unos intervalos de confianza lo más estrechos posibles para facilitar la búsqueda de genes candidatos y llevar a cabo selección asistida por marcadores (MAS).

Mediante el cruce IBMAP se detectaron QTL en la mayoría de cromosomas (Pérez-Enciso *et al.* 2000, 2002; Varona *et al.* 2002; Óvilo *et al.* 2002, 2005; Clop *et al.* 2003). Para realizar el mapeo fino se escogieron los QTL más significativos implicados en caracteres de crecimiento, engrasamiento, calidad de la carne y metabolismo lipídico, debido a la importancia económica de estos caracteres y a su repercusión en los objetivos de selección actuales. Como el IBMAP es un proyecto de colaboración entre el INIA, la UdL-IRTA y la UAB, el trabajo se repartió por cromosomas. En nuestro caso debíamos refinar la posición de los QTL previamente detectados en los cromosomas 2, 4, 7, 8, 13 y X.

Para llevar a cabo el mapeo fino de los QTL se obtuvieron dos generaciones adicionales, para así aumentar el número de meiosis informativas (Darvasi, 1998): una

F<sub>3</sub> y un retrocruce (RC). Este último obtenido mediante el cruce de machos F<sub>2</sub> con hembras Landrace,

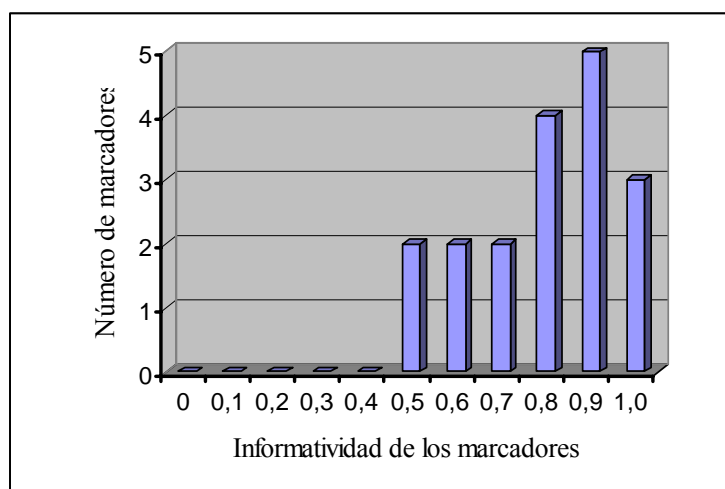
Paralelamente también se incrementó el número de marcadores moleculares en las regiones en las que se detectaron QTL. Estos marcadores fueron genotipados para todos los individuos del pedigrí. Los marcadores fueron elegidos en función de su localización en mapas de ligamiento disponibles (<http://www.genome.iastate.edu/maps.marcmmap/html>), de su facilidad de amplificación y de interpretación de los resultados y de su informatividad, calculada a través del Índice de Ron (Ie) (Ron *et al.* 1995; Clop *et al.* 1998):

$$Ie = 1 - \frac{1}{2} (P_i + P_j)$$

P<sub>i</sub> y P<sub>j</sub> son las frecuencias de los alelos A<sub>i</sub> y A<sub>j</sub>, respectivamente en las hembras Landrace. Siendo A<sub>i</sub> y A<sub>j</sub> los genotipos de cada macho Ibérico.

Probamos un total de 46 microsatélites, de los cuales seleccionamos 18 (Tabla 4.1). Los marcadores con valores de Ie inferior a 0,5 fueron descartados (Anexo 1). En la Figura 4.1 se muestra los valores de informatividad global de estos 18 marcadores.

La generación F<sub>2</sub> fue genotipada para estos marcadores. Sin embargo, para la generación F<sub>3</sub> y el retrocruce se priorizaron los QTL con efecto más significativo o destacable. Se escogieron los cromosomas 4, 8 y X y estas dos generaciones fueron genotipadas para todos los marcadores disponibles en estos cromosomas, es decir, los que se presentan en la Tabla 4.1 más los que se utilizaron previamente para el barrido genómico, siendo un total de 29 marcadores (Anexo 1).



**Figura 4.1.** Informatividad de los 18 marcadores seleccionados para realizar el mapeo fino.

**Tabla 4.1.** Marcadores seleccionados para el mapeo fino.

| <i>Cr.</i> | <i>Marcador</i> | <i>Secuencia de los cebadores 5'→3'</i>              | <i>Ie</i> | <i>Tamaño alelos (pb)</i> | <i>Núm. alelos</i> |
|------------|-----------------|--|-----------|---------------------------|--------------------|
| <b>2</b>   | <i>SW1201</i>   | CCAACCAACCAACAGAAAAC<br>CGGCACTGGTAACTCCAATT         | 0,73      | 198-214                   | 6                  |
|            | <i>SW1517</i>   | CAAATGATTTTATCCATCCTTGC<br>TCTTAGTGATGCATTCTTAAGCTG  | 0,93      | 126-146                   | 8                  |
|            | <i>SW1695</i>   | ATAAGGGAAATCAGGCTGAGC<br>TCCCAGGAGCTACCATATGC        | 0,60      | 165-186                   | 6                  |
| <b>4</b>   | <i>α-FABP</i>   | GGTACTTTCTGATCTAATGGTG<br>GGGAACTCTTGAAGTCTTTCTC     | 0,77      | 249-252                   | 9                  |
|            | <i>S0073</i>    | ACTGAAACAGGAATTCAGATCC<br>TGAAGTATTATGGCATCATGGA     | 0,87      | 102-111                   | 7                  |
|            | <i>SW317</i>    | GGGATGCTAAAGTTGGAGGG<br>TTAGTGTCTGGGCAAGGAG          | 0,60      | 154-166                   | 5                  |
|            | <i>SW35</i>     | TCAAGTTGGAGAGTCTGAGGC<br>AAGACTGCCACCAAATGAG         | 1,00      | 136-142                   | 5                  |
|            | <i>SW524</i>    | ACCAGGTTGAGTCACATCTGC<br>AGGTCTGGTACCCGTCCTG         | 0,80      | 147-213                   | 4                  |
|            | <i>SW58</i>     | TCCTACCAGAAATCCTACCACA<br>ATGGGAAGAGAATCTGACAAGG     | 0,87      | 205-219                   | 6                  |
| <b>7</b>   | <i>S0115</i>    | TGATGCACTGTGTGGGCCACACCA<br>ACCATGGCTTGAGCTTGAGCCAGC | 0,90      | 191-207                   | 8                  |
|            | <i>SW1701</i>   | AGGTAACCTCAGGTGTCAGATAGC<br>TCTAGTTTAAAAAGCCTGAATGC  | 1,00      | 107-128                   | 6                  |
|            | <i>SWr2036</i>  | TGGGAAATTAAGTGTGTGCTACC<br>AGCTCTGATTAGACCCCAAGC     | 0,93      | 158-176                   | 4                  |
| <b>8</b>   | <i>S0069</i>    | TGCAAAACTAATGTTTGTGTTGCC<br>CATATGCCACAGGTGTGACCTAAA | 0,53      | 160-175                   | 7                  |
|            | <i>S0144</i>    | ATTAGAGCCACCTGAAGGCT<br>CGTTGGTCGGCAGCTATAGC         | 0,83      | 209-216                   | 6                  |
| <b>13</b>  | <i>SW452</i>    | ACAGGAAAGTGACCCTGCC<br>TGGAACATGATGGAGGATAATG        | 0,53      | 82-91                     | 5                  |
| <b>X</b>   | <i>SW1943</i>   | ATTCCCCTTGACACATTAATGG<br>TATGGCTGAGTAGTATTCCATTTG   | 0,77      | 98-104                    | 5                  |
|            | <i>SW2059</i>   | GCTGTCTGGCTTTGGACAG<br>ACTAAGTTCAGGCACTCAGAC         | 1,00      | 172-186                   | 6                  |
|            | <i>SW2470</i>   | TAGTACCTAGGCTTCCCCAGG<br>CTTTGTCTCTCCCTCTCCATAC      | 0,73      | 162-170                   | 6                  |

Cr: cromosoma; Ie: informatividad; Núm. alelos: número de alelos detectados en el marcador.

#### 4.1.1. Mapeo fino del cromosoma 4

La importancia de este cromosoma queda patente al observar que desde el primer estudio de detección de QTL en porcino (Andersson *et al.* 1994) en el que se encontraron QTL en este cromosoma, numerosos estudios posteriores con diferentes cruces han detectado QTL en el cromosoma 4 relacionados con grasa, crecimiento y caracteres de calidad de la canal y de la carne (ver apartado 1.5 de la introducción). No obstante, el principal efecto descrito en este cromosoma es para grasa. Concretamente, el locus responsable de este efecto fue nombrado *FAT1* por Marklund *et al.* (1999). Sin embargo, otros estudios encontraron que este locus afectaba a crecimiento (De Koning *et al.* 1999; Rattink *et al.* 2000), lo que indica que se trata de un cromosoma complejo. A pesar de los esfuerzos realizados por diferentes grupos de investigación para localizar QTL, todavía no se ha encontrado el gen responsable del efecto observado, lo que sugiere que la base genética de este QTL es complicada. Además, la falta de mapas comparativos densos en porcino añade limitaciones a la caracterización de posibles genes candidatos.

Previamente, en el proyecto IBMAP se detectaron QTL en el cromosoma 4 relacionados con grasa, crecimiento, área del músculo, peso de las paletillas, longitud de la canal, composición de ácidos grasos y color de la carne (Pérez-Enciso *et al.* 2000; Varona *et al.* 2002; Óvilo *et al.* 2002a; Clop *et al.* 2003). Con el objetivo de precisar la posición de estos QTL y determinar si hay más de un locus segregando en el cromosoma 4 porcino, añadimos seis marcadores adicionales, un mayor número de animales (87 F<sub>3</sub> y 85 RC) y utilizamos la metodología estadística implementada por el programa QxPak (Pérez-Enciso y Mitszal, 2004). Mediante este programa se realizaron, además de análisis univariados, análisis multicarácter y multi QTL con técnicas de modelo mixto que permiten incrementar la potencia de detección de QTL respecto a los modelos univariados.

A través del análisis univariado se detectaron múltiples QTL (como se puede observar en la Figura 1 de la página 54), pudiendo confirmar la presencia de QTL ya descritos y detectar nuevos QTL. A partir de estos resultados se diseñaron modelos multicarácter con la intención de elucidar el número y posición de estos QTL. A continuación se comentan los resultados obtenidos para cada carácter.



### **- Deposición de grasa dorsal**

La inclusión de un mayor número de marcadores y animales permitió detectar QTL relacionados con este carácter en dos loci diferentes: el primero en la región próxima al gen *FABP4* y el segundo entre los marcadores DECR y S0073. Sin embargo, al aplicar modelos incluyendo dos QTL y modelos multicarácter se determinó que existe únicamente un QTL, posicionado muy próximo al gen *FABP4*. De este modo, mediante el mapeo fino se redujo prácticamente a la mitad el intervalo de confianza del QTL previamente detectado (Pérez-Enciso *et al.* 2002; Varona *et al.* 2002).

### **- Crecimiento**

A pesar de que este QTL había sido descrito en diferentes estudios, en el proyecto IBMAP sólo se encontró un QTL sugestivo (Varona *et al.* 2002). A partir del refinamiento de QTL se detectó a nivel significativo y se acotó su posición entre los marcadores S0073 y S0214.

### **- Caracteres de forma**

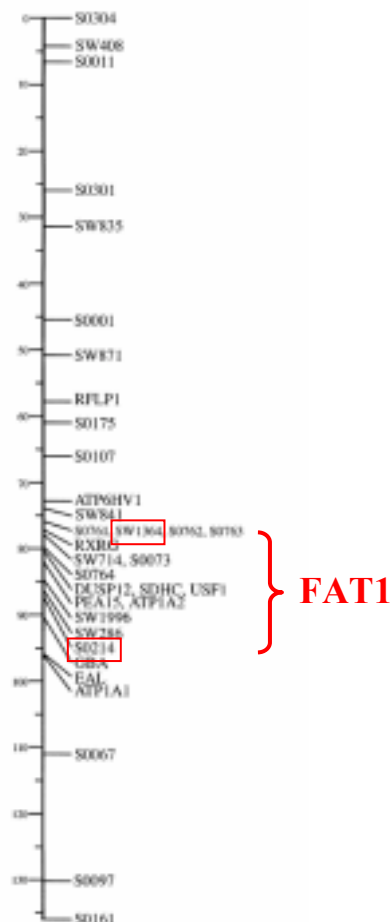
Dentro de estos caracteres se incluyen la longitud de la canal y el peso de las paletillas. Previamente se detectaron QTL para cada uno de estos caracteres (Varona *et al.* 2002). Sin embargo, mediante el mapeo fino se detectaron dos máximos: uno situado en la misma posición que el QTL de grasa (locus del *FABP4*) y el otro coincidente con el QTL de crecimiento (intervalo S0073-S0214). Aplicando modelos multicarácter multi QTL se determinó que posiblemente los QTL de grasa y crecimiento afectaban también a estos caracteres, existiendo efecto pleiotrópico entre ambos.

### **- Caracteres de calidad de la carne**

Se detectaron QTL relacionados con el color de la carne (Minolta a\*, Minolta L\* y contenido de hematina) entre los marcadores S0214 y SW445, posiciones coherentes con las previamente descritas (Óvilo *et al.* 2002a). A pesar de que se testaron modelos multicarácter y multi QTL para estos caracteres, no se pudo rechazar el modelo univariado.

Por otro lado, también se detectó un QTL relacionado con el pH 24h post-mortem, entre los marcadores SW445 y S0097, que no había sido encontrado previamente empleando un menor número de animales y marcadores.

De forma general, los resultados más destacados son que existen al menos dos loci importantes en el cromosoma 4 porcino. Uno de ellos está situado en la región del gen *FABP4* y afecta a la deposición de grasa dorsal y, en menor medida, a los caracteres de forma. El otro locus, situado alrededor de los marcadores S0073 y S0214, afecta a los caracteres de forma pero mantiene un efecto pleiotrópico sobre el crecimiento. Esta segunda región se sitúa dentro del QTL *FAT1*, limitado por los marcadores SW1364 y S0214 (Figura 4.2) (Moller *et al.* 2004).



**Figura 4.2.** Mapa de ligamiento del cromosoma 4 porcino (SSC4). Los marcadores que flanquean el locus *FAT1* están enmarcados en rojo. Adaptada de Moller *et al.* 2004.

Los resultados obtenidos del mapeo fino del cromosoma 4 dieron lugar a una publicación en *Mammalian Genome* (Mercadé *et al.* 2005a).

Aunque se han descrito diferentes genes candidatos en la región del *FAT1* relacionados con obesidad, diabetes o grasa, todavía no se ha determinado la mutación causal responsable de este locus. Una posible explicación podría ser que el *FAT1* estuviera localizado en el punto donde la homología del cromosoma 4 porcino se divide entre los cromosomas 8 y 1 humanos (Figura 4.3), dificultando la búsqueda de genes.

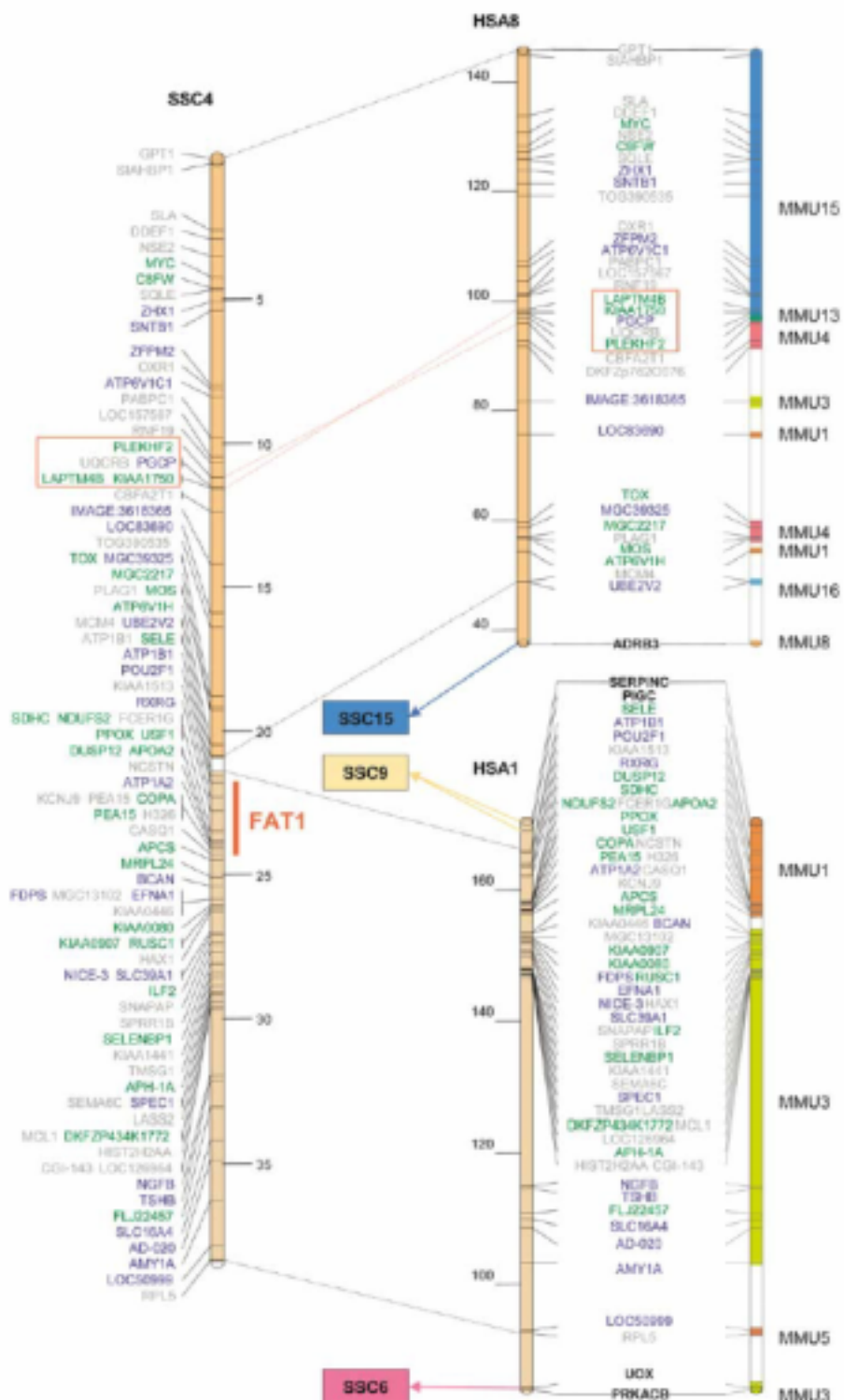


Figura 4.3. Mapa comparativo del cromosoma 4 porcino (SSC4), cromosomas 1 y 8 humanos (HSA1/HSA8) y cromosomas de ratón. Las distancias en porcino están en Rays y en humano en Mpb. Los genes enmarcados indican una posible inversión del orden de los genes entre humano y porcino. La localización del QTL *FATI* está indicada con una barra roja (Moller *et al.* 2004).

Para la búsqueda de genes candidatos nos hemos centrado en la región del cromosoma 4 ortóloga al cromosoma 8 humano, debido a que los resultados obtenidos indican, como se ha comentado anteriormente, que el QTL relacionado con grasa se encuentra en la región del gen *FABP4*, en una posición diferente a la del locus *FAT1*.

#### 4.1.2. Mapeo fino del cromosoma 8

Previamente en el cruce IBCMAP se habían descrito QTL relacionados con el porcentaje de palmítico, palmitoleico, longitud media de la cadena de los ácidos grasos y valor Minolta a\* (Óvilo *et al.* 2002a; Clop *et al.* 2003). También se detectaron QTL sugestivos para el valor Minolta b\*, peso de la canal, peso de las paletillas y espesor de la grasa dorsal en la última costilla (Clop, 2001; Varona *et al.* 2002).

Para el refinamiento de estos QTL aumentamos, como en el cromosoma 4, el número de meiosis informativas y de marcadores. El mapa de ligamiento obtenido fue el siguiente: SW2410 (0,0) – SW905 (21,6) – SWr1101 (42,9) – S0017 (67,1) – S0069 (79,8) – S0225 (87,0) - S0144 (93,5) – SW61 (109,5) (Figura 4.4). Los números entre paréntesis indican las posiciones en cM obtenidas con la opción *build* del programa CRI-MAP (Green *et al.* 1990). Para el análisis preliminar de los resultados utilizamos el programa Qxpak (Pérez-Enciso y Mitszal, 2004).

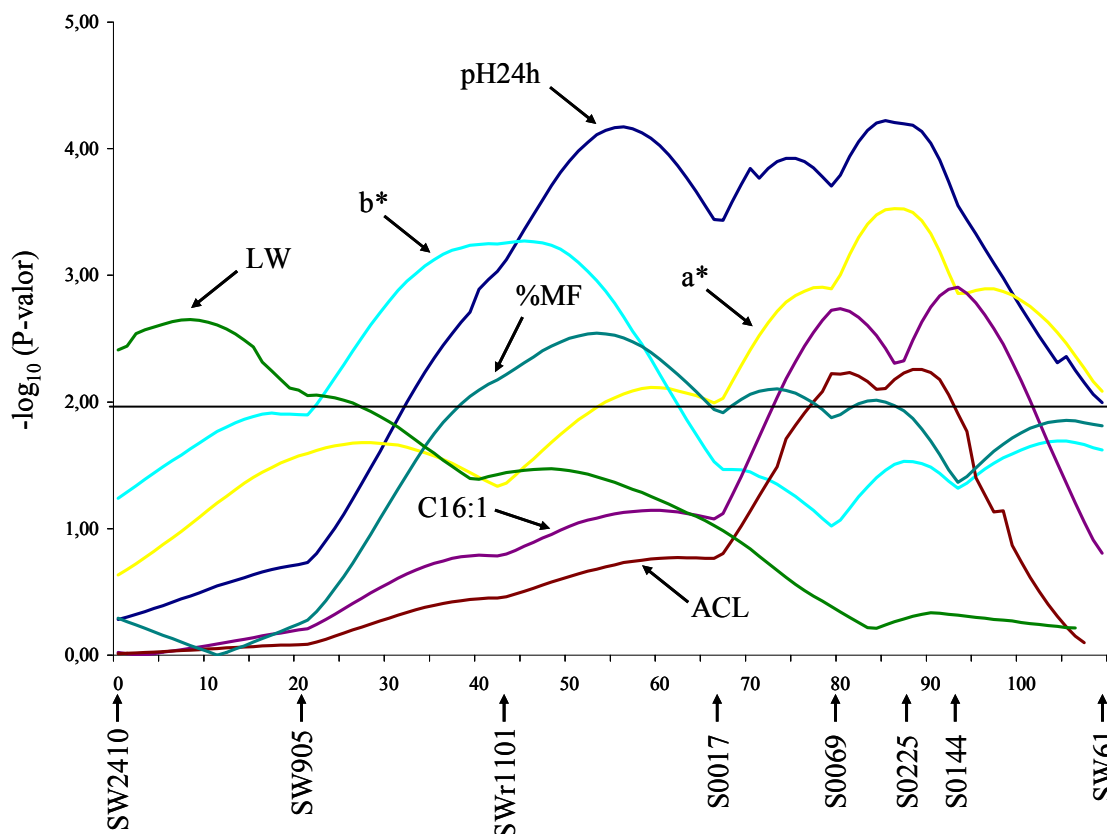
Mediante un modelo univariado detectamos diferentes QTL (Tabla 4.2). Los QTL más significativos fueron los relacionados con el pH 24h post-mortem y con el color de la carne (Minolta a\* y b\*). Los QTL para el pH 24h y a\* se localizan en una misma región, mientras que el QTL relacionado con el valor b\* se encuentra en una posición diferente. De forma similar, los QTL relacionados con composición de ácidos grasos (PA, PAL y ACL) se sitúan en la parte distal del cromosoma, entre los marcadores S0069 y SW61. También detectamos QTL sugestivos para los caracteres de crecimiento, % de grasa muscular y peso de las paletillas. Los perfiles de estos QTL se muestran en la Figura 4.4. Respecto a los resultados obtenidos previamente en el cruce IBCMAP, se han confirmado los QTL para palmítico, ACL, a\*, b\* y peso de las paletillas. Además, para los caracteres de composición de ácidos grasos y a\* se ha reducido el intervalo de los QTL al añadir dos marcadores adicionales en esta región. Finalmente, se han detectado dos nuevos QTL, para crecimiento y % grasa muscular, y se ha incrementado la significación del QTL para b\*.

**Tabla 4.2.** Resultados del análisis de QTL mediante un modelo univariado.

| Carácter                    | Símbolo <sup>a</sup> | Posición <sup>b</sup>            | P-valor <sup>c</sup>    | a ± s.e. <sup>d</sup> |
|-----------------------------|----------------------|----------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Peso vivo (kg)              | LW <sub>esac</sub>   | 9 (SW2410-SW905)                 | 0,22 x 10 <sup>-2</sup> | 2,65 ± 0,86           |
| Peso paletillas (kg)        | SW                   | 33 (SW905-SW <sub>r</sub> 1101)  | 0,39 x 10 <sup>-2</sup> | 0,08 ± 0,03           |
| % grasa muscular            | MF                   | 54 (SW <sub>r</sub> 1101-S0017)  | 0,29 x 10 <sup>-2</sup> | 0,14 ± 0,05           |
| pH 24 h sm <sup>e</sup>     | pH <sub>24</sub>     | 86 (S0069-S0144)                 | 0,60 x 10 <sup>-4</sup> | 0,07 ± 0,02           |
| Minolta a*                  | a*                   | 87 (S0069-S0144)                 | 0,30 x 10 <sup>-3</sup> | -0,48 ± 0,13          |
| Minolta b*                  | b*                   | 46 (SW <sub>r</sub> 1101- S0017) | 0,54 x 10 <sup>-3</sup> | -0,37 ± 0,10          |
| % palmítico (C16:0)         | PA                   | 82 (S0069-S0225)                 | 0,43 x 10 <sup>-1</sup> | 0,23 ± 0,11           |
| % palmitoleico (C16:1)      | PAL                  | 94 (S0225-SW61)                  | 0,12 x 10 <sup>-2</sup> | 0,11 ± 0,03           |
| Longitud media de la cadena | ACL                  | 92 (S0225-SW61)                  | 0,56 x 10 <sup>-2</sup> | -0,87 ± 0,32          |

<sup>a</sup>: los caracteres están corregidos para peso vivo, excepto para peso vivo que está corregido por edad al sacrificio (esac). <sup>b</sup>: las posiciones se muestran en cM. <sup>c</sup>: valor de P nominal, el modelo nulo no incluye el QTL. El QTL se considerada significativo para valores de P inferiores a 10<sup>-3</sup>. <sup>d</sup>: a: efecto aditivo del QTL (efecto del Ibérico – Landrace); s.e.: error standard. <sup>e</sup>: pH 24h post-mortem en el músculo semimembranoso.

Todos estos caracteres tienen un efecto aditivo, el efecto dominante no resultó significativo para ningún carácter. Los alelos Ibéricos incrementan el peso de las paletillas, el % de grasa muscular, el pH 24h post-mortem, el contenido de los ácidos grasos palmítico y palmitoleico, y disminuyen la longitud media de los ácidos grasos y los valores Minolta a\* y b\*. Estos resultados están de acuerdo con las diferencias descritas entre estas dos razas (Serra *et al.* 1998) y con los efectos descritos previamente en este cromosoma (Óvilo *et al.* 2002a; Varona *et al.* 2002; Clop *et al.* 2003). Sin embargo, para el peso de las paletillas el efecto observado en este cromosoma es contrario al que aparece en los cromosomas 2 y 4 (Estellé *et al.* 2005; Mercadé *et al.* 2005a). Cabe destacar que el no detectar QTL relacionados con la deposición de grasa indicaría que el QTL afecta directamente a los caracteres de composición de ácidos grasos.



**Figura 4.4.** Perfiles del  $-\log_{10}$  del valor de P de los QTL significativos descritos mediante el análisis univariado. La línea horizontal en el valor 2 indica el nivel de significación del  $10^{-2}$ . LW: peso vivo; b\*: valor Minolta b\*; pH24h: pH a las 24h post-mortem; %MF: % grasa muscular; C16:1: palmitoleico; ACL: longitud media de la cadena de los ácidos grasos; a\*: valor Minolta a\*.

De los resultados obtenidos en el cruce IBMAP, únicamente el QTL para el carácter de crecimiento o peso vivo coincide con QTL descritos en otros cruces (De Koning *et al.* 2001a; Quintanilla *et al.* 2002). Para el resto de caracteres no se han descrito QTL en otras poblaciones. En cambio, sí se han encontrado QTL para caracteres como deposición de grasa (Rohrer 2000; Bidanel *et al.* 2001a), longitud de la canal (Andersson-Eklund *et al.* 1998) o peso de los jamones (Milan *et al.* 2002) que no han resultado significativos en nuestro cruce.

#### 4.1.3. Mapeo fino del cromosoma X

En este cromosoma se han realizado dos tipos de trabajos diferentes. Por un lado se ha realizado un análisis de QTL añadiendo, como en los cromosomas 4 y 8, un mayor

número de marcadores y animales. Por el otro lado, también se ha realizado un análisis conjunto de QTL con diferentes cruces experimentales.

En el cruce IIBM se habían detectado QTL relacionados con el porcentaje de grasa intramuscular y con el color de la carne (Pérez-Enciso *et al.* 2002). Con la finalidad de obtener un mayor poder de detección de QTL, ya que se dispone de un mayor número de animales, se realizó un estudio conjunto con diferentes cruces. De este modo, se analizaron unos 3.000 animales de seis razas diferentes y procedentes de cinco cruces independientes: Ibérico x Landrace, Large White x Meishan, Meishan x Pietrain, jabalí x Meishan y jabalí x Pietrain.

En primer lugar se analizó cada cruce de forma independiente. El QTL más significativo fue el relacionado con deposición de grasa dorsal, entre los marcadores SW1994 y SW1943, en el cruce de Meishan x Large White. Este QTL fue confirmado en los otros cruces que incluían Meishan en posiciones similares. Otros QTL significativos fueron para peso de los jamones entre los marcadores SW2456 y SW1994 en el mismo cruce de Meishan x Large White, para crecimiento en el cruce IIBM entre los marcadores SW2476 y SW1943 y para longitud de la canal y peso de las paletillas entre los marcadores SERPINA7 y SLC25A5 en el cruce Meishan x Pietrain.

Posteriormente se analizaron todos los datos conjuntamente. El QTL más significativo continuó siendo el relacionado con deposición de grasa dorsal. Para este QTL, el alelo de origen asiático es el que posee un mayor efecto, lo que explicaría la ausencia de significación del QTL en el cruce IIBM. De hecho, este QTL ha sido detectado en diferentes cruces con animales Meishan (Cepica *et al.* 2004). Además, también resultaron significativos los QTL para peso de los jamones, peso de las paletillas y longitud de la canal. Para todos ellos aumentó la significación respecto al análisis individual, demostrando que el análisis conjunto incrementa el poder de detección de QTL. Para el carácter de longitud de la canal, el alelo de origen asiático vuelve a ser el de mayor efecto. No obstante, para los otros dos caracteres, peso de los jamones y de las paletillas, las diferencias alélicas más importantes se observaron entre Pietrain y Large White. Del análisis multicarácter cabe destacar que para grasa y peso de los jamones es muy probable que exista un efecto pleiotrópico, aunque no se puede descartar que se trate de dos QTL ligados.

Mediante este estudio se ha podido determinar que en el cromosoma X existen al menos 2 QTL para los caracteres estudiados. Uno de ellos relacionado con peso de los jamones y longitud de la canal entre los marcadores SW259 y SW1994 y un segundo locus más distal, entre los marcadores SW2476 y SW1943, relacionado con grasa y peso de las paletillas.

De forma general, este estudio ha demostrado la eficacia de estos análisis para la detección de QTL, en el cual se han obtenido valores de P más significativos respecto a los análisis incluyendo un solo cruce. Además, la metodología estadística aplicada en este estudio mediante el programa Qxpak (Pérez-Enciso y Miształ, 2004) permite estimar un efecto global por raza y tiene en cuenta si hay orígenes comunes entre los diferentes cruces.

Los resultados de este estudio generaron una publicación en *Journal of Animal Science* (Pérez-Enciso *et al.* 2005).

Algunos problemas que generalmente aparecen en este tipo de estudios conjuntos son que los marcadores empleados no coinciden entre los diferentes cruces y que los registros fenotípicos no siempre miden un carácter del mismo modo o a la misma edad del animal, por lo que se deberían unificar criterios para poder incrementar al máximo el poder de detección de QTL. También puede ocurrir que los intervalos de confianza sean mayores en el análisis conjunto, esto aparece si las posiciones estimadas de los QTL en las poblaciones individuales son muy distintas.

Además del estudio descrito previamente, existen otros dos trabajos que emplean la información de diferentes cruces para analizarla conjuntamente. Walling *et al.* (2000) analizaron conjuntamente siete cruces F<sub>2</sub> para detectar QTL en el cromosoma 4 relacionados con crecimiento y grasa. Cabe destacar que en el caso del QTL para crecimiento, los análisis para cada población individual no resultaron significativos. Por el contrario, el análisis conjunto detectó un QTL altamente significativo. Sin embargo, este estudio empleó el método de mínimos cuadrados (Haley *et al.* 1994) asumiendo que las razas tenían los alelos del QTL fijados y que por tanto, no había segregación intraracial. Posteriormente, Kim *et al.* (2005) detectaron QTL relacionados con crecimiento, composición de la canal y calidad de la carne en los cromosomas 2, 6, 13 y



18 analizando conjuntamente dos cruces. Mediante este análisis detectaron QTL que previamente no se habían encontrado analizando cada cruce de forma individual. Como era de esperar, el análisis conjunto obtuvo, de forma general, una mayor significación y precisión en la localización de los QTL. No obstante, QTL detectados en el análisis individual no pudieron ser confirmados en el análisis conjunto, esto puede ser debido a que en una de las poblaciones no estén segregando estos QTL.

El segundo trabajo realizado en el cromosoma X fue un análisis de QTL utilizando únicamente el cruce IIBM. Para este trabajo se analizaron los caracteres en los cuales se habían detectado QTL previamente (Pérez-Enciso *et al.* 2002; Pérez-Enciso *et al.* 2005) y también se añadieron los caracteres de composición de ácidos grasos, debido a que no habían sido analizados previamente.

Como era de esperar con los resultados descritos previamente (Pérez-Enciso *et al.* 2005), el QTL más significativo fue el relacionado con crecimiento. Sin embargo, este QTL no fue detectado cuando se analizó por primera vez con un menor número de animales y la mitad de marcadores (Pérez-Enciso *et al.* 2002). En la misma región del QTL para crecimiento se detectaron también QTL para composición de ácidos grasos, concretamente para el porcentaje de oleico y porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados. También se detectó un QTL para porcentaje de gadoleico pero en una posición más central en el cromosoma, entre los marcadores SW2126 y SW2470. Finalmente, en la parte más distal del cromosoma se detectaron QTL relacionados con el color de la carne, entre los marcadores SW1943 y SW1608. Estos QTL afectan al porcentaje del pigmento hematina y a la coloración roja de la carne (color Minolta a\*). Para este último carácter (a\*) se había encontrado previamente un QTL (Pérez-Enciso *et al.* 2002), pero para el porcentaje de hematina no se había detectado ningún QTL.

Sin embargo, en este estudio no se han detectado los QTL relacionados con grasa y caracteres de forma (longitud de la canal, peso de los jamones y de las paletillas) descritos en el análisis conjunto que incluía el cruce IIBM (Pérez-Enciso *et al.* 2005). Esto es debido posiblemente a que estos QTL no están segregando en nuestro pedigrí. Como se ha comentado previamente algunos alelos de estos QTL son de origen asiático. Por otro lado, tampoco se ha confirmado la presencia del QTL para grasa intramuscular descrito previamente en el cruce IIBM. En la literatura únicamente se ha descrito un QTL para este carácter en el cromosoma X (Harlizius *et al.* 2000), pero con un efecto secundario ya que el principal efecto descrito es para grasa.

Con los resultados del análisis de QTL del cromosoma X en el cruce IBMAP, juntamente con la caracterización del *ACSL4* como gen candidato, se ha preparado un artículo que ha sido aceptado en *Animal Genetics* (Mercadé *et al.* 2006a).

#### 4.1.4. Mapeo fino del cromosoma 2

De forma paralela a los otros trabajos, en el cromosoma 2 también se han añadido más marcadores, en este caso tres marcadores adicionales, para confirmar y refinar la posición de los QTL previamente detectados (Varona *et al.* 2002) y/o encontrar nuevos QTL. Sin embargo, ni la F<sub>3</sub> ni el retrocruce han sido genotipados ya que este cromosoma no había sido considerado prioritario inicialmente. El interés por el cromosoma 2 surgió después de que una mutación en el gen *IGF2* fuera identificada como la mutación causal para un QTL relacionado con deposición de grasa, crecimiento muscular y tamaño del corazón (Van Laere *et al.* 2003). De este modo, quisimos analizar el efecto de este polimorfismo de gen *IGF2* en el cruce IBMAP y paralelamente, realizar el análisis de QTL en este cromosoma.

A pesar de que el polimorfismo está segregando únicamente en una pequeña familia F<sub>2</sub>, el efecto de la sustitución en el gen *IGF2* resultó significativo para el espesor de la grasa dorsal, peso de los jamones y área del músculo, siendo coherente con los resultados descritos por Van Laere *et al.* (2003).

Por otro lado, se han detectado QTL para peso de la canal, área del lomo y pH 24h post-mortem entre los marcadores SW395 y SW1695. El QTL relacionado con el peso de la canal había sido detectado previamente pero a nivel sugestivo (Varona *et al.* 2002). Sin embargo, el QTL para pH 24h no había sido descrito anteriormente. Además, se han encontrado dos QTL, pero con valores de significación menor, para el peso de los jamones y para el peso de las paletillas entre los marcadores SW240 y SW395 que no habían sido detectados previamente.

Los resultados de este estudio han sido publicados recientemente en *Journal of Animal Science* (Estellé *et al.* 2005, anexo 2).

## 4.2. Análisis de genes candidatos

El siguiente paso después de la detección de QTL y su mapeo fino es intentar explicar la base genética que hay detrás del QTL. Como se ha ido comentando a lo largo del presente trabajo, el problema principal es la poca precisión en la localización de QTL sumada a la baja resolución de los mapas disponibles, los cuales están constituidos básicamente por marcadores de tipo microsatélite que no siempre pueden ser usados para el mapeo comparativo con otras especies. Además, se le debe añadir que las poblaciones empleadas para el análisis de genes candidatos son de tipo  $F_2$ , por lo que el desequilibrio de ligamiento presente puede generar fácilmente falsas asociaciones con SNP de genes candidatos próximos ligados (Zhao *et al.* 2003). Una aproximación para mejorar la eficacia de detección de genes candidatos es combinar análisis de QTL y expresión, ya que se reduce considerablemente el número de genes candidatos. Las limitaciones de esta metodología son que todavía no se dispone de *microarrays* que contengan todos los transcritos de una región de interés y que se asume la existencia de diferencias de expresión en los niveles de ARNm para unas coordenadas de tiempo y espacio elegidas para el estudio. Además, se le debe añadir la necesidad de disponer de ARNm de elevada calidad. No obstante, esta aproximación se ha llevado a cabo con éxito en varios estudios, como en el que se analizaron genes implicados en la regulación de los niveles de colesterol en babuinos (Cox *et al.* 2002). Otro tipo de estudio es combinar expresión y análisis de ligamiento para detectar loci que regulen la expresión de estos genes (Morley *et al.* 2004).

Sin embargo, como se ha comentado en la introducción, la estrategia más común para la identificación de genes es la búsqueda de genes candidatos posicionales. Estos genes se eligen teniendo en cuenta su función biológica y su posición cromosómica, muchas veces obtenida a partir de la información disponible en humano o ratón ya que hay muchos más genes descritos. En estos casos, la posición de estos genes en porcino se extrapola a partir de los mapas comparativos. No obstante, hay dos factores que provocan que el éxito de esta aproximación sea limitado: la falta de mapas de alta resolución en porcino y que no todos los genes en humano y ratón se han caracterizado, muchos de ellos se han identificado mediante programas informáticos y aparecen como predecidos o similares a otro gen y por tanto, no se conoce su función biológica.

Una vez escogido el posible candidato, el gen se secuencia en diferentes animales para obtener polimorfismos. Estos polimorfismos se genotipan en un pedigrí y finalmente, si los polimorfismos están segregando, se realizan estudios de asociación para determinar su efecto. Cabe recordar que encontrar asociación entre un SNP y un carácter no implica necesariamente que se trate de la mutación causal, esto es debido, principalmente, al tipo de material animal del que se dispone. En general consiste en cruces experimentales de tipo F<sub>2</sub> en los cuales el desequilibrio de ligamiento existente es elevado.

Sin embargo, cuando se disponga de la secuencia del genoma porcino en los próximos años, será posible aplicar otros métodos para identificar la mutación causal responsable del efecto de un QTL. Uno de estos métodos consistiría en secuenciar el fragmento genómico que contiene el QTL. Esta metodología también se puede llevar a cabo actualmente mediante librerías BAC, aunque obtener la secuencia de estos BAC es una tarea complicada y tediosa. Además, los métodos de secuenciación permiten obtener secuencias de 600-800 pb, por lo que obtener fragmentos de varias kb supone un coste económico y de tiempo considerable, siendo por tanto muy importante conseguir localizaciones precisas de los QTL y perfeccionar estas técnicas para que se puedan llevar a cabo de una forma más eficaz y rápida.

#### **4.2.1. Genes candidatos analizados**

El segundo objetivo del proyecto IBCMAP era identificar genes candidatos relacionados con el metabolismo lipídico por su implicación en la calidad de la carne. En los últimos años, la importancia de los caracteres relacionados con la calidad de la carne ha aumentado debido a varios factores. Uno de ellos sería que la propia selección ha generado la existencia de animales con crecimiento muy rápido y muy magros, cuyas carnes son de baja calidad organoléptica y tecnológica. Otros factores son la presencia de un mercado cada vez más exigente, el cual requiere productos de calidad y está sensibilizado con las enfermedades cardiovasculares asociadas al consumo de determinadas grasas.

De forma directa, los lípidos son los responsables de la deposición de grasa en la canal, del contenido de grasa intramuscular y de la composición de los ácidos grasos de la carne. Además, estos caracteres están correlacionados entre ellos. De esta forma,

un incremento de la deposición de grasa dorsal está correlacionado positivamente con el contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Cameron *et al.* 2000). Asimismo, la calidad de los productos curados, de gran interés en razas como el Ibérico, está relacionada positivamente con los ácidos grasos monoinsaturados, mientras que el grado de insaturación de los ácidos grasos está correlacionado positivamente con la susceptibilidad al enranciamiento y con carnes de características tecnológicas y organolépticas inferiores. De forma más indirecta, o menos evidente, los lípidos también participan en numerosos procesos metabólicos a nivel celular. Además de los lípidos, hay otros factores que también intervienen en la calidad de la carne; como el pH post-mortem de la carne, la capacidad de retención de agua o la estructura histoquímica de las fibras musculares (Cameron *et al.* 2000; Van Laack *et al.* 2001; Paszek *et al.* 2001). Todo esto implica que pueden existir interacciones entre diferentes genes o loci que pueden dificultar aún más la identificación de genes responsables de caracteres complejos.

Por otro lado, la especie porcina ha sido empleada de forma importante en modelos de investigación biomédica debido a que comparte numerosas similitudes fisiológicas con los humanos. De este modo, el estudio de genes implicados en el metabolismo lipídico en porcino puede generar información de interés para genes candidatos para la obesidad en humano y viceversa (Kim *et al.* 2004).

Los genes que fueron escogidos como candidatos posicionales y que se discuten a continuación son el *acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGATI)* y el *adipocyte fatty-acid binding protein (FABP4)* para el QTL del cromosoma 4, el *CDP-diacylglycerol synthase 1 (CDS1)* para el cromosoma 8 y el *acyl-CoA synthetase long-chain 4 (ACSL4)* para el cromosoma X.

#### **4.2.1.1. *Acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGATI)***

El gen *DGATI* participa en la fase final de la síntesis de triglicéridos, los cuales son las principales formas de almacenaje de energía y además, también participan en diferentes procesos biológicos (Cases *et al.* 1998). Escogimos el gen *DGATI* como candidato por su implicación en el metabolismo lipídico y por su posición en el cromosoma 4 obtenida por mapeo comparativo entre humano y porcino. No obstante, al

poco tiempo de empezar a analizar este gen apareció un trabajo en porcino que describía la secuencia, la presencia de SNP y el mapeo por ligamiento del gen (Nonneman y Rohrer, 2002).

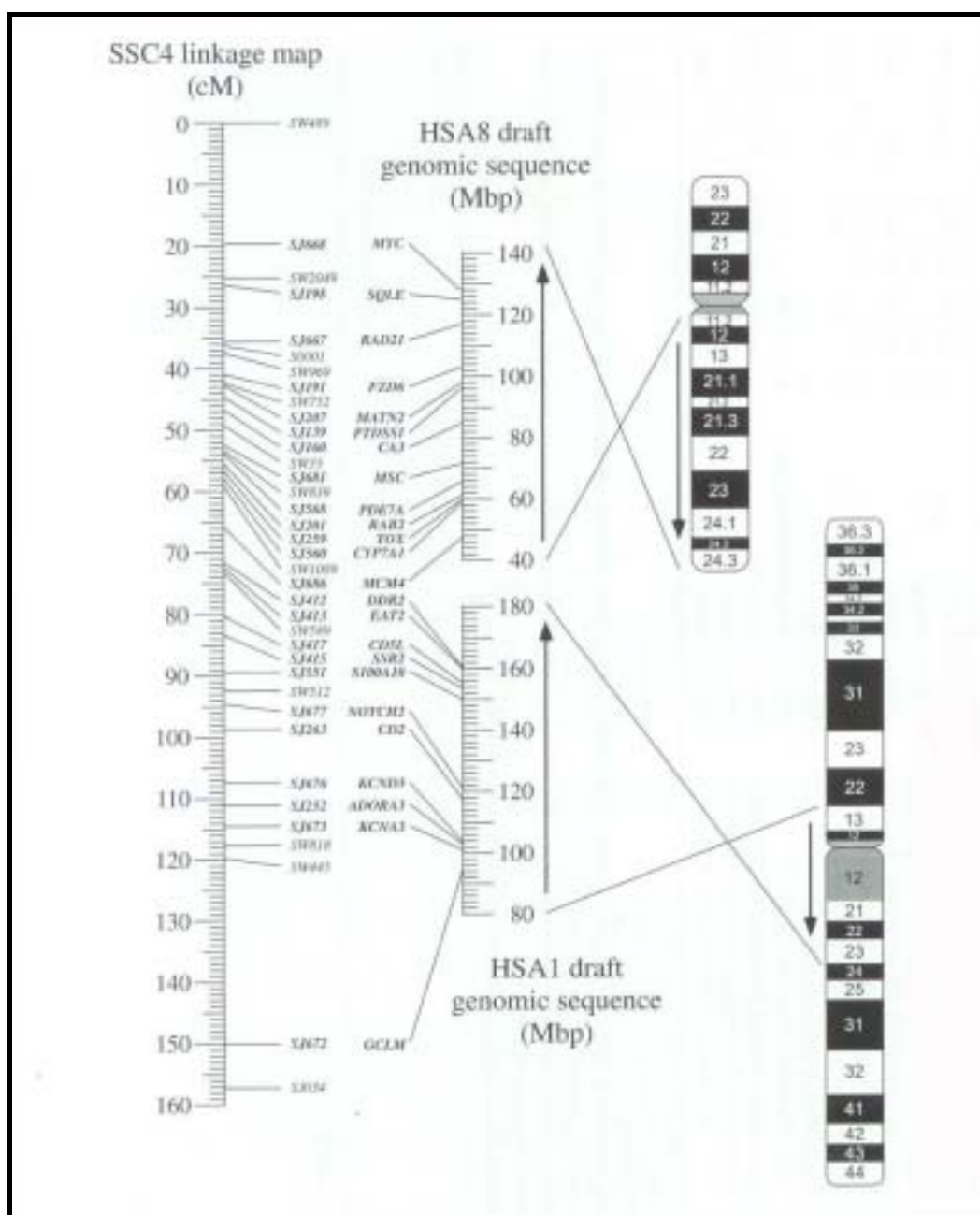
Con la finalidad de detectar polimorfismos, secuenciamos toda la región codificante y una parte de la región 5'-UTR y 3'-UTR del ARNm del gen *DGATI* en dos animales de cada una de las siguientes razas: Ibérico, Landrace, Large White, Pietrain y Meishan. Tras el análisis de las secuencias obtenidas detectamos cuatro SNP. Tres de ellos se encuentran en la región codificante pero no implican cambio aminoacídico. Se trata de una transversión *C933G* en el exón 8 y dos transiciones *G978A* y *C1230T* en los exones 9 y 13, respectivamente. El cuarto polimorfismo es una transición *C1676T* en el exón 17 pero en la región no codificante. Las posiciones indicadas son respecto a la secuencia de referencia GenBank AY093657. Los SNP de las posiciones 933, 1230 y 1676 fueron también descritos en un estudio previo (Nonneman y Rohrer, 2002). En este estudio secuenciaron el ADN genómico y detectaron quince polimorfismos: diez se localizan en intrones o en la región 3'-UTR y los cinco restantes son SNP sinónimos detectados en los aminoácidos 173, 197, 245, 321 y 344.

Los cuatro polimorfismos detectados fueron genotipados en el cruce Ibérico x Landrace para comprobar si estaban segregando. Uno de ellos, el *G978A*, tenía fijado el mismo alelo en ambas razas. Los otros tres estaban segregando únicamente en las hembras Landrace pero con unas frecuencias muy bajas por lo que descartamos realizar un estudio de asociación. Además, cuatro de los polimorfismos descritos previamente, los SNP *321I*, *30M*, *223Y* y *256M* (Nonneman y Rohrer, 2002), fueron también genotipados y todos resultaron ser monomórficos. Los resultados obtenidos con el gen *DGATI* son muy parecidos con los obtenidos previamente con el gen *DECR* en este mismo cruce. El SNP detectado en el gen *DECR* segregaba con unas frecuencias muy bajas a pesar de estar posicionado dentro del QTL del cromosoma 4 (Clop *et al.* 2002).

Paralelamente, también realizamos la localización cromosómica de este gen mediante el panel de células somáticas híbridas irradiadas IMpRH (Yerle *et al.* 1998). Los resultados posicionaron el gen *DGATI* entre los marcadores SW2404 y S0227 (Figura 1, pág. 91). Esta localización es coherente con los resultados obtenidos por el

mapa de ligamiento realizado por Nonneman y Rohrer (2002). Sin embargo, este locus mapea fuera del intervalo de confianza de los QTL descritos en el cromosoma 4 de nuestro cruce entre Ibérico x Landrace.

Descartamos el *DGATI* como gen candidato debido a la baja segregación de los polimorfismos detectados en nuestro cruce y a su localización fuera de los QTL descritos. Cabe destacar que la localización cromosómica obtenida del gen no fue la que se esperaba inicialmente por mapeo comparativo. Por tanto, para poder intercambiar información de forma precisa entre mapas de diferentes especies es muy importante disponer de mapas comparativos densos para poder identificar correctamente las pequeñas reordenaciones cromosómicas entre especies. El cromosoma 4 porcino (SSC4) comparte homología con los cromosomas 1 y 8 humanos (HSA1 y HSA8, respectivamente). Sin embargo, el punto de rotura del SSC4 entre el HSA1 y el HSA8 no está bien definido (Goureau *et al.* 1996; Sun *et al.* 2002; Lahbib-Mansais *et al.* 2003). Todo el brazo p y la parte proximal del brazo q (SSC4q15-16) es homólogo al brazo q del cromosoma 8 humano, mientras que el resto del brazo q comparte homología con el cromosoma 1 humano, del HSA1p22 al HSA1q25. El orden de los genes en estos dos bloques se conserva pero en sentido inverso (Figura 4.5) (Fujishima-Kanaya *et al.* 2003). Este hecho explica que el gen *DGATI* se encuentre en el otro extremo del que se había esperado inicialmente al seleccionarlo como candidato. Aunque no existen reordenaciones importantes entre los dos bloques conservados, es posible que exista una pequeña inversión en el orden de los genes comparado con el HSA8 alrededor del centrómero del SSC4 (Moller *et al.* 2004). Aun así, existen genes que han sido localizados en regiones distintas a las esperadas. Este sería el caso del *MGT8* que está en HSA8q22 y mapea en el SSC4q24 (Lahbib-Mansais *et al.* 1999) o el *F13B* que está en el HSA1q31, región homóloga al SSC9, y se posicionó en el SSC4 (Marklund *et al.* 1996).



**Figura 4.5.** Mapa comparativo humano-porcino del cromosoma 4 porcino (Fujishima-Kanaya *et al.* 2003).

Finalmente, para determinar la distribución y las frecuencias alélicas del SNP G978A se analizó un panel de 111 animales formado por cinco razas porcinas diferentes. Se escogió este SNP porque contenía una diana de restricción y podía ser genotipado por PCR-RFLP. El alelo G estaba fijado en Ibérico, Landrace, Large White y Pietrain. Únicamente se encontró a frecuencia intermedia en los animales Meishan. Aunque no existen evidencias suficientes, estos resultados sugerirían que esta mutación podría ser de origen asiático. De Koning *et al.* (1999) detectaron un QTL con efecto



sugestivo para el contenido de grasa intramuscular en la región de este gen en una población F<sub>2</sub> de Meishan x líneas holandesas comerciales. Posteriormente, en el mismo cruce detectaron un QTL sexo-específico relacionado con el crecimiento hasta los 25 kg en esta región (De Koning *et al.* 2001a). De este modo, el efecto del gen *DGAT1* se podría analizar en cruces con Meishan para determinar su posible implicación como gen candidato.

Los resultados de este estudio han sido publicados en *Journal of Animal Breeding and Genetics* (Mercadé *et al.* 2005b).

#### **4.2.1.2. Adipocyte fatty-acid binding protein (FABP4)**

El gen *Fatty acid binding protein (FABP4)* participa en el transporte de los ácidos grasos hacia los lugares de síntesis o de oxidación de los lípidos (Veerkamp y Maatman, 1995). Este gen fue escogido como candidato debido a su implicación en el metabolismo de los lípidos y porque se sitúa muy próximo a la posición con el valor de P máximo de un QTL relacionado con deposición de grasa dorsal en el cromosoma 4 porcino (Mercadé *et al.* 2005a). Además, un estudio previo detectó una asociación entre un microsatélite en el intrón 1 de este gen y el contenido de grasa intramuscular en una población Duroc en la que se analizaron 992 animales. Los animales heterocigotos A1A3 (A1 y A3 representan 22 y 19 unidades de repetición del microsatélite, respectivamente) tenían hasta un 1% más de grasa intramuscular que el resto de animales. Paralelamente, los animales A1A2 (A2 son 33 unidades de repetición) presentaban una diferencia significativa en el peso a los 180 días (Gerbens *et al.* 1998). También se ha descrito una posible asociación de este microsatélite con el espesor de la grasa dorsal en una población Meishan x razas europeas (Large White y Landrace) (Gerbens *et al.* 2000). Todas estas evidencias indican que el gen *FABP4* es un candidato lógico para este QTL detectado en el cromosoma 4.

La secuencia del gen *FABP4* porcino fue descrita por Gerbens *et al.* (1998). En esta secuencia se detectaron tres polimorfismos: el microsatélite previamente mencionado en el intrón 1 y dos SNP en las posiciones 6723 y 6845 del gen (GenBank Y16039). Con el objetivo de encontrar polimorfismos que segreguen en el cruce de Ibérico x Landrace secuenciamos diferentes fragmentos de este gen. Concretamente se

secuenciaron tres fragmentos que incluían la secuencia completa de los exones con la intención de encontrar polimorfismos que determinaran cambio aminoacídico. Se secuenciaron los tres machos Ibéricos y siete hembras Landrace del cruce Ibérico x Landrace y en total se detectaron 22 SNP, todos ellos se encuentran dentro de los fragmentos de intrones secuenciados (Tabla 4.3). La existencia de este elevado número de polimorfismos es debido a que los intrones están menos conservados que las regiones codificantes y por tanto, la tasa de mutación es más elevada. Además, es de esperar que aparezcan más SNP al secuenciar las regiones intrónicas que no se incluyeron en este estudio. Los SNP localizados en las posiciones 1381, 1412, 4629 y 6611 son diferencias nucleotídicas con respecto a la secuencia de referencia, es decir, todos los animales secuenciados presentan el mismo alelo que es diferente al de la secuencia de referencia (GenBank Y16039). Esto puede ser debido a un error en la secuencia de referencia o a la existencia del alelo polimórfico en ésta última.

**Tabla 4.3.** Polimorfismos detectados en los tres machos Ibéricos y en las siete hembras Landrace secuenciadas.

| <i>Animales</i> | <i>Posiciones (GenBank Y16039)</i> |                   |                   |      |       |      |      |                   |      |      |      |
|-----------------|------------------------------------|-------------------|-------------------|------|-------|------|------|-------------------|------|------|------|
|                 | 1381 <sup>1</sup>                  | 1412 <sup>1</sup> | 2634 <sup>3</sup> | 4205 | 4217  | 4466 | 4555 | 4629 <sup>1</sup> | 4750 | 4782 | 4788 |
| Ref.            | T                                  | A                 | -                 | G    | CAT   | T    | T    | G                 | A    | T    | A    |
| i10/Tier*       | -                                  | G                 | C                 | G/A  | CAT/- | T/G  | T/C  | -                 | A/C  | T/C  | A/C  |
| i20*            | -                                  | G                 | C                 | A    | -     | G    | C    | -                 | C    | C    | C    |
| LD**            | -                                  | G                 | -                 | G    | CAT   | T    | T    | -                 | A    | T    | A    |

| <i>Animales</i> | <i>Posiciones (GenBank Y16039)</i> |                   |                   |      |                   |      |      |                   |      |                   |                   |
|-----------------|------------------------------------|-------------------|-------------------|------|-------------------|------|------|-------------------|------|-------------------|-------------------|
|                 | 4789                               | 5000 <sup>2</sup> | 5005 <sup>2</sup> | 5069 | 6252 <sup>3</sup> | 6367 | 6553 | 6611 <sup>1</sup> | 6627 | 6723 <sup>2</sup> | 6845 <sup>2</sup> |
| Ref.            | T                                  | T                 | G                 | G    | C                 | C    | G    | C                 | A    | A/G               | A/G               |
| i10/Tier*       | T/G                                | T/C               | G/A               | G/A  | T/C               | A/C  | T/G  | T                 | G/A  | A/G               | A/G               |
| i20*            | G                                  | C                 | A                 | A    | T                 | A    | T    | T                 | G    | G                 | A                 |
| LD**            | T                                  | T                 | G                 | G    | C                 | C    | G    | T                 | A    | A                 | G                 |

<sup>1</sup>: Polimorfismos respecto a la secuencia de referencia (GenBank Y16039). <sup>2</sup>: Polimorfismos descritos en la secuencia de referencia. <sup>3</sup>: Polimorfismos genotipados en el cruce IBMAP. \*: machos Ibéricos parentales. \*\*: hembras Landrace parentales, todos los individuos secuenciados presentaban el mismo genotipo.

De los 22 SNP detectados, el más informativo es la inserción/delección (indel) en la posición 2634. Todos los machos Ibéricos eran homocigotos para el alelo *C* mientras que ninguna hembra presentaba este alelo. Esta posición fue genotipada en toda la población IBMAP mediante pirosecuenciación. Los resultados del estudio de asociación mostraron que este polimorfismo estaba altamente asociado con el espesor de la grasa dorsal y caracteres de forma (peso de las paletillas y longitud de la canal) pero no estaba asociado con el crecimiento. Estos resultados son coherentes con los obtenidos previamente con el análisis de QTL del cromosoma 4 (Mercadé *et al.* 2005a). El QTL para crecimiento estaba localizado dentro del locus *FATI* (Moller *et al.* 2004), mientras que el gen *FABP4* estaba localizado en la región del QTL para grasa. No obstante, no podemos asegurar que la indel sea la responsable de toda la variabilidad para grasa y caracteres de forma. Los valores de P varían entre 0,02 y 0,05 (Tabla 3, pág. 108) al testar el efecto del QTL considerando la existencia de la indel, por lo que no se puede descartar la presencia de otro locus adicional segregando.

Por otro lado, los resultados obtenidos no confirmaron la asociación del *FABP4* con el contenido de grasa intramuscular previamente descrita (Gerbens *et al.* 1998). Cabe destacar que esta asociación tampoco fue detectada ni en una población formada por cerdos austriacos (Landrace, Large White y Pietrain) (Nechtelberger *et al.* 2001) ni en un cruce de Meishan x cerdas europeas (Landrace y Large White) (Gerbens *et al.* 2000).

Con la intención de comprender mejor la base genética de estos caracteres realizamos un análisis con haplotipos, por lo que analizamos un SNP adicional. En un principio quisimos genotipar conjuntamente los polimorfismos de las posiciones 4205 y 4217, pero su genotipado por pirosecuenciación no funcionó correctamente. De este modo, escogimos la transición *C/T* en la posición 6252 porque era la única que nos permitía aplicar esta metodología. Considerando únicamente la indel y la transición existen tres haplotipos diferentes (*CC*, *CT* y *DelC*). Sin embargo, este análisis no nos aportó ninguna información adicional debido a que toda la variabilidad era explicada por la indel, los efectos entre *CC* y *CT* no eran significativamente diferentes.

Debido a la falta de significación de la transición, analizamos mediante haplotipos la indel, el microsatélite del intrón 1 del *FABP4* y el SW35. El microsatélite del *FABP4* es muy polimórfico, en nuestra población hemos detectado nueve alelos, siete de los cuales están segregando en Landrace y dos en Ibérico. La elevada diversidad

de alelos de este microsatélite también ha sido descrita en otros estudios (Gerbens *et al.* 1998; Nechtelberger *et al.* 2001). Para no perder poder estadístico debido a la presencia de múltiples alelos y para poder interpretar mejor los resultados, agrupamos los alelos en *pools* diferentes en función de sus efectos y de su valor de verosimilitud, por lo que obtuvimos cuatro haplotipos. Para no complicar excesivamente el modelo sólo analizamos un carácter relacionado con grasa, el BF1 por ser más significativo que el BF2 (Tabla 3, pág. 108). Los resultados obtenidos de este análisis indican que existe heterogenicidad entre los animales Landrace y que hay una interacción entre la indel y los microsatélites FABP4 y SW35, este hecho podría ser debido a la presencia de desequilibrio de ligamiento parcial entre el haplotipo y la mutación causal.

Este estudio nos ha permitido obtener dos conclusiones. Por un lado, el análisis de haplotipos indica que este modelo explica toda la variabilidad para grasa asociada al QTL del cromosoma 4, por lo que una mutación en el gen *FABP4* o en un locus próximo es la responsable del efecto para grasa. Por este motivo, resultaría de gran interés continuar buscando polimorfismos en esta región y realizar estudios de expresión génica y de funcionalidad proteica con estas variantes alélicas, así como analizar estos SNP en poblaciones distintas, tanto en poblaciones de origen diferente, como Meishan, o en poblaciones comerciales. Por otro lado, este estudio también indica que la mutación responsable del QTL de crecimiento se debería buscar dentro de la región limitada por los marcadores S0073 y S0214, dentro del locus *FATI* (Moller *et al.* 2004).

La posición por RH del gen *FABP4* en el cromosoma 4 fue descrita por primera vez por Gerbens *et al.* (1998). Con la finalidad de realizar el mapeo fino de los QTL de este cromosoma añadimos, entre otros marcadores, el microsatélite de este gen. El mapa de ligamiento obtenido con el CRI-MAP (Green *et al.* 1990) situó el *FABP4* entre los marcadores SW35 y SW839 (Mercadé *et al.* 2005a). Posteriormente, al añadir dos polimorfismos adicionales en el análisis del gen *FABP4*, repetimos el mapa de ligamiento obteniendo un orden ligeramente diferente. El nuevo orden sitúa el *FABP4* entre los marcadores SW317 y SW35. Esta nueva localización coincide con la descrita en el mapa comparativo entre cerdo y humano para el cromosoma 4 porcino disponible en la página web de Beattie (<http://www.ag.unr.edu/beattie/>) (Figura 4.6). En este mapa comparativo aparece la posición cromosómica (mapa RH) de diferentes marcadores y

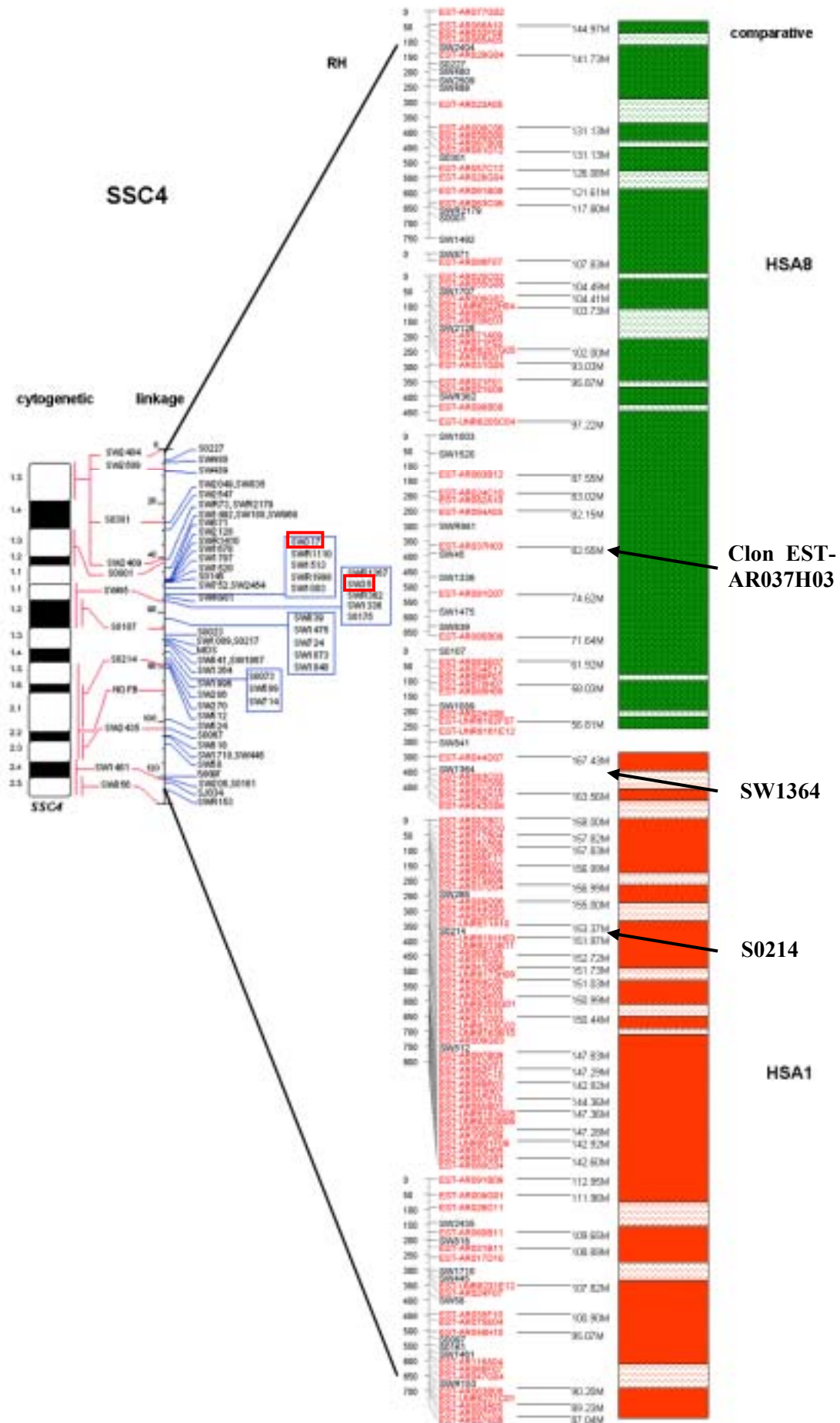
clones. Uno de estos, el EST-AR037H03 contiene el gen *FABP4* y como se puede observar en la Figura 4.6, se sitúa entre los marcadores SWr981 y SW45. Estos marcadores se sitúan próximos al SW317 y SW35, como aparece en el mapa de ligamiento de esta figura.

Finalmente, analizamos las frecuencias alélicas de la indel en un panel de 147 animales correspondientes a diez razas diferentes (Tabla 8, pág 113). Babirusa y Pecarí fueron utilizados como *outgroup* y permitieron determinar que el alelo *C* es, probablemente, el más ancestral y que la delección de esta *C* originó el alelo mutante. Asimismo, se observó que la delección segregaba a frecuencias intermedias en razas no seleccionadas como Ibérico, Meishan y jabalí, lo que indicaría que se trata de una mutación antigua. Por el contrario, la delección se encontró a frecuencias elevadas en razas altamente seleccionadas para crecimiento y bajo contenido en grasa, sugiriendo que se ha producido una selección indirecta de esta mutación.

Los resultados del análisis del gen *FABP4* como candidato y su asociación con grasa han generado un manuscrito que se encuentra bajo revisión en *Journal of Animal Science* (Mercadé *et al.* 2006b).

---

**Figura 4.6.** Mapa comparativo porcino-humano del cromosoma 4 del cerdo (<http://www.ag.unr.edu/beattie/>). En este mapa aparece el mapa de ligamiento y físico (mapa RH) del cromosoma 4 porcino y su región de homología con los cromosomas 1 y 8 humanos. El clon EST-AR037H03, los marcadores SW1364 y S0214 que limitan el locus *FAT1* y los marcadores SW317 y SW35 están señalados.



#### 4.2.1.3. *CDP-diacylglycerol synthase 1 (CDS1)*

El enzima CDS1 genera CDP-diacilglicerol a partir de ácido fosfatídico. De este modo, el gen *CDS1* interviene en el metabolismo de los fosfolípidos y en otros procesos celulares, aunque sus funciones biológicas no están del todo establecidas (Kent *et al.* 1995; Heacock *et al.* 1996). Este gen no había sido caracterizado ni localizado en porcino y fue escogido como posible candidato para un QTL relacionado con la composición de ácidos grasos detectado en el cruce IBMAP en el cromosoma 8.

En primer lugar, diseñamos cebadores en las regiones más conservadas del ARNm de humano, rata y ratón que permitieron amplificar y secuenciar 2.464 pb del ARNm de este gen en porcino, el cual contiene 949 pb de región 5'-UTR, 1.383 pb de región codificante y 133 de región 3'-UTR y codifica para una proteína de 461 aminoácidos. Esta secuencia fue depositada en el GenBank con número de acceso DQ105588. La similitud a nivel nucleotídico y aminoacídico es elevada, del 85-92% y del 94-96%, respectivamente entre porcino, humano, ratón y rata. Mediante el programa *NPS@: Network Protein Sequence Analysis* (Combet *et al.* 2000) predecimos los dominios. Encontramos siete dominios transmembranales y el motivo *phosphatidate cytidyltransferase* que están conservados entre las diferentes especies.

Otro objetivo de este trabajo era determinar la estructura del gen *CDS1*. La organización de este gen no había sido descrita en ningún trabajo hasta que, muy recientemente, se ha publicado en ratón (Inglis-Broadgate *et al.* 2005). Para determinar la estructura del gen en porcino nos basamos en la organización de su ortólogo humano que aparece en el *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org>). Los resultados obtenidos nos indicaron que el gen estaba constituido por 13 exones y 12 intrones (Figura 2, pág. 136). De forma general, los exones son de tamaño pequeño y los intrones son mayores (Tabla 4.4). Estos resultados concuerdan con la estructura de los genes *CDS1* de humano y ratón.

**Tabla 4.4.** Estructura del gen *CDS1* porcino.

| Exón | Intrón 3'  | Exón 5'    | Exón<br>(bp) | Exón 3'    | Intrón 5'  | Intrón<br>(bp) |
|------|------------|------------|--------------|------------|------------|----------------|
| 1    |            | ACCTGCTGCG | 654          | CAGTGACAAA | -          | -              |
| 2    | -          | GAAACAGATA | 128          | TGTCTTCAAG | GTATGAGTTG | ~6000          |
| 3    | TCCCTTGTAG | GTGGAAAAAC | 97           | GATGCTTCTT | GTAAGTGTTT | ~7000          |
| 4    | TTGGTTTCAG | GTTCTAGGCA | 98           | CACTCAGCTG | GTAAGTGACA | ~4000          |
| 5    | TAAATTATAG | GTATTTTCTA | 140          | TATCTGGCAG | -          | -              |
| 6    | -          | GTTTCTGCAT | 59           | GTTTTATATG | GTACGTATTA | ~2000          |
| 7    | CTATTAACAG | TTCGCATGGA | 83           | GCATGATATG | GTAAGCCGAC | ~2200          |
| 8    | CTTTTTTAAG | GTTTCTTGTT | 88           | ACTAATTAAG | GTCACGGAGA | ~4000          |
| 9    | CCTGTGTCAG | TTGTCTCCTA | 69           | TGGATTCATT | GTGAGTTTTA | ~9000          |
| 10   | TGCGATTTAG | GCCGCCTACG | 153          | GTAAAGACAG | GTAAGATGCA | ~1100          |
| 11   | TCCTCTTCAG | GAAGCTGTGA | 120          | CAAAATCAAG | GTGTGTATTT | ~2300          |
| 12   | TTTCTGAAG  | GATTTTGCGA | 104          | GTTTTATAAG | GTAAGTGTTC | ~5300          |
| 13   | CTGTTATCAG | GGGTCCAAAT | 260          | TTTTACAGAC |            |                |

La secuencia y el tamaño de los intrones 1 y 5 no se pudieron determinar

Una vez conocida la secuencia del ARNm del *CDS1*, buscamos polimorfismos mediante la comparación de las secuencias obtenidas en dos animales de cada una de las siguientes razas: Ibérico, Landrace, Large White, Pietrain y Meishan. Encontramos tres SNP en los exones 10 y 11, dos de los cuales implican cambio aminoacídico. El primer SNP es una transversión *A1006C* que causa un cambio de prolina por treonina en la posición 336 de la proteína. La prolina es un aminoácido hidrofóbico con un grupo  $\alpha$ -amino en la cadena lateral, mientras que la treonina es polar y contiene un grupo alcoholico en la cadena lateral. A pesar de que estos dos aminoácidos presentan características diferentes, no disponemos de evidencias suficientes para suponer que un único cambio aminoacídico pueda afectar a la estructura de la proteína y por extensión, a su funcionalidad. Los otros dos SNP se localizan en el exón 11. Uno de ellos es una transición *C1037T* que produce un cambio aminoacídico de una alanina por una valina en la posición 346 de la proteína, al ser un cambio conservativo, en principio no tendrá ninguna repercusión ni en la expresión del gen ni en funcionalidad de la proteína. El último SNP es una transversión *G1038T* que no implica cambio aminoacídico. De estos SNP elegimos el que causaba un cambio aminoacídico no conservativo para calcular sus



frecuencias alélicas en cinco razas porcinas diferentes (Tabla 3, pág. 137). El alelo *C* es el más frecuente en todas las razas, excepto en Ibérico, y posiblemente se trata del alelo ancestral ya que éste es el nucleótido que presentan, en esta posición, los genes ortólogos en humano, rata y ratón.

La expresión de este gen se ha detectado en diferentes tejidos humanos, de rata y ratón pero no tiene una expresión ubicua. De forma general se expresa en cerebro, intestino delgado y testículo, aunque en cada especie presenta particularidades (Heacock *et al.* 1996; Lykidis *et al.* 1997; Saito *et al.* 1997; Inglis-Broadgate *et al.* 2005). La expresión del gen en porcino no se conocía, para analizarla hemos empleado PCR cuantitativa. Debido a las exigencias de esta técnica y del material animal que disponíamos, analizamos la expresión del gen en siete tejidos de dos machos Ibéricos comparables. Estos tejidos fueron: hígado, músculo esquelético, grasa dorsal, estómago, páncreas y testículo. Los resultados indicaron que la expresión de este gen es muy baja en todos estos tejidos, excepto en testículo (Figura 3, pág. 138). Este patrón de expresión es coherente con los obtenidos en las otras especies. Hasta el momento no se ha determinado porqué en testículo se expresa de forma abundante, no obstante, conocer el motivo de esta expresión diferencial ayudaría a entender mejor la función del gen.

Al caracterizar el gen *CDS1* amplificamos de forma simultánea un fragmento del gen *CDS2*. Como tampoco se había descrito este gen en porcino, intentamos amplificar todo su ARNm. Obtuvimos una secuencia de 1.240 pb que contiene de forma casi completa la región codificante y 115 pb de la región 3'-UTR. Esta secuencia también ha sido depositada en el GenBank con número de acceso DQ105590. Al igual que el gen *CDS1*, el *CDS2* porcino mantiene una elevada similitud nucleotídica respecto a sus ortólogos en humano, rata y ratón, siendo del 89-93%. En cambio, la similitud entre los dos genes porcinos es del 70%. Sin embargo, cabe destacar que los porcentajes están calculados considerando la región codificante común de secuencia, es decir, no se ha incluido los dos primeros exones de ambos genes. De la secuencia del gen *CDS2* obtenida hemos deducido una proteína parcial de 375 aminoácidos, la cual mantiene una identidad del 75% respecto a la proteína *CDS1* porcina. En el anexo 3 se muestra el alineamiento de la región homóloga de ambas proteínas con las secuencias disponibles. Finalmente, obtuvimos un fragmento de 505 pb del gen *CDS2* que contiene el fragmento distal de la región 5'-UTR hasta el codón de inicio. Esta secuencia fue

depositada en el GenBank con número de acceso DQ105589.

Como era de esperar, en este gen también hemos detectado siete dominios transmembranales y el motivo *phosphatidate cytidyltransferase* ya que se encuentran conservados en todos los miembros de esta familia génica.

Debido a que estos dos genes no habían sido caracterizados previamente en porcino ni tampoco se había realizado ningún estudio para determinar su origen, realizamos un estudio filogenético mediante el método Neighbor-Joining empleando las secuencias de proteína disponibles e incluyendo *Arabidopsis* como *outgroup*. Los resultados obtenidos muestran dos agrupaciones diferentes, una con las secuencias del gen *CDS1* y la otra con las secuencias del gen *CDS2*. Sin embargo, todas estas secuencias parten de un nodo que incluye los mamíferos, peces y aves, lo que indicaría que la duplicación del gen ancestral *CDS* fue anterior a la divergencia de los vertebrados (Figura 5, pág. 140).

Finalmente, hemos llevado a cabo la localización cromosómica de los dos genes en porcino mediante el panel de células somáticas híbridas irradiadas IMpRH (Yerle *et al.* 1998). El gen *CDS1* porcino se localizó en el cromosoma 8 a 26 cR del marcador SW1980. Esta región mantiene homología con el cromosoma 4 humano. El gen *CDS2* porcino se mapeó en el cromosoma 17 entre los marcadores SWR1120 y SWR1133, región homóloga al cromosoma 20 humano (Figura 4, pág. 139). Estos dos genes fueron posicionados en humano en el HSA4q21-22 y HSA20p13, respectivamente (Halford *et al.* 1998; Volta *et al.* 1999), por lo que las posiciones obtenidas en estos dos genes porcinos son coherentes con las localizaciones descritas en humano. Sin embargo, la posición obtenida del gen *CDS1* porcino lo sitúa fuera del intervalo de confianza de los QTL relacionados con caracteres de composición de ácidos grasos detectados en el cromosoma 8.

Con los resultados obtenidos de la caracterización de los genes *CDS1* y *CDS2* porcinos se ha generado un manuscrito, el cual ha sido aceptado en *Animal Biotechnology* (Mercadé *et al.* 2006c).

#### 4.2.1.4. *Acyl-CoA synthetase long-chain 4 (ACSL4)*

El gen *ACSL4* participa en la reacción de activación de los ácidos grasos para que estos puedan participar en diferentes rutas metabólicas. De este modo, el *ACSL4* es imprescindible tanto para síntesis de lípidos como para su catabolismo (Suzuki *et al.* 1995). Los estudios previos realizados en el cruce Ibérico x Landrace han detectado varios QTL para caracteres de grasa, crecimiento y composición de ácidos grasos en el cromosoma X. Escogimos el gen *ACSL4* tanto por su posición obtenida por el mapa comparativo humano-cerdo como por su función en el metabolismo de los lípidos.

El primer objetivo fue mapear físicamente el gen *ACSL4* para determinar su posición en el cromosoma X porcino. Mediante el panel de células somáticas híbridas irradiadas IMpRH (Yerle *et al.* 1998) este gen se localizó a 53 cR del microsatélite SW1426. Esta posición obtenida era coherente con la esperada por el mapa comparativo (McCoard *et al.* 2002).

Los resultados del mapeo físico por RH han sido publicados en *Animal Genetics* (Mercadé *et al.* 2005c).

El gen *ACSL4* no había sido caracterizado previamente en porcino. Por tanto, el segundo objetivo fue secuenciarlo y detectar polimorfismos. Para amplificar el ARNm del *ACSL4* porcino diseñamos cebadores en las regiones más conservadas del ARNm de humano, rata y ratón. Mediante la secuenciación de los fragmentos amplificados obtuvimos la secuencia casi completa del ARNm. Esta secuencia consta de 4.906 pb, de los cuales 124 pb son región 5'-UTR, 2.013 pb región codificante y 2.769 pb región 3'-UTR. Esta secuencia fue depositada en el GenBank con número de acceso DQ144454. La región codificante del gen mantiene una elevada identidad tanto a nivel nucleotídico (89-93%) como a nivel aminoacídico (97%) con sus ortólogos en humano, rata y ratón.

En humano y ratón se han descrito dos variantes del ARNm del gen *ACSL4*. La variante 2 contiene 313 nucleótidos adicionales que determinan a que el codón de inicio se sitúe antes. En porcino también hemos detectado esta segunda variante, en este caso el fragmento es de 291 nucleótidos pero, al igual que en humano y ratón, la proteína resultante contiene 41 aminoácidos adicionales. Esta secuencia fue también depositada en el GenBank con número de acceso DQ144455.

Con la finalidad de determinar la expresión de estas dos variantes analizamos, mediante RT-PCR, diferentes tejidos disponibles: hígado, corazón, pulmón, bazo, estómago, cerebro, músculo, grasa, útero, ovario y testículo. La variante 1 se expresa en todos los tejidos analizados, mientras que para la variante 2 únicamente se detectó expresión en cerebro. Estos resultados concuerdan con los descritos en humano y ratón. El hecho de que la variante 2 se exprese sólo en cerebro ha sugerido que se trata de una isoforma específica de este tejido (Cao *et al.* 2000; Meloni *et al.* 2002).

Paralelamente predecimos los dominios más conservados de la proteína mediante el programa *NPS@: Network Protein Sequence Analysis* (Combet *et al.* 2000). El resultado de este análisis reveló dos dominios ATP/AMP-binding (aminoácidos 234-245 y 424-429, respectivamente), que se encuentran conservados en todos los enzimas de esta superfamilia, y un motivo acil-CoA sintasa (aminoácidos 506-531), que es esencial para la actividad catalítica del enzima y determina la especificidad para el ácido graso (Kee *et al.* 2003; Weimar *et al.* 2002).

Por otra parte, para detectar polimorfismos secuenciamos el ARNm del *ACSL4* en dos animales de cada una de las razas siguientes: Ibérico, Landrace, Large White, Pietrain, Meishan y Duroc. Encontramos un total de diez SNP, todos ellos situados en la región 3'-UTR que se agrupan en dos haplotipos, al menos en los animales secuenciados (Tabla 1, pág 84). Los polimorfismos en la región 3' no codificante, a pesar de que no implican un cambio aminoacídico, pueden tener un efecto funcional, en otros genes se ha descrito que son importantes para la estabilidad del ARNm y para la regulación de la expresión génica (Hesketh, 2004).

Para evaluar el efecto de estos polimorfismos y analizar su segregación en el cruce IIBM, desarrollamos un método de genotipado por pirosecuenciación para la transición G/A en la posición 2645. La frecuencia del alelo G en la población parental es del 67% en los machos Ibéricos y del 14% en las hembras Landrace. Al no estar fijadas, realizamos un estudio de asociación con diferentes caracteres para determinar el efecto de estos polimorfismos. En primer lugar realizamos el mapa de ligamiento con el programa CRI-MAP (Green *et al.* 1996), localizando el gen *ACSL4* entre los marcadores SW2476 y SW1943. Esta posición coincide con los resultados obtenidos previamente con el mapeo por RH (Mercadé *et al.* 2005c).

Detectamos asociación de este gen con el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados y en concreto, con el porcentaje de oleico. Además, cuando testamos el efecto del gen considerando la presencia de un QTL, éste último no resultó significativo, en cambio, el SNP aumentó su significación (Tabla 4.5), por lo que nos aporta mayores evidencias de la implicación de este gen en el metabolismo de los ácidos grasos.

**Tabla 4.5.** P valor de los QTL y del análisis de asociación.

| Carácter   | Modelo           |                                 |                |                    |                        |                  |                    |  |
|------------|------------------|---------------------------------|----------------|--------------------|------------------------|------------------|--------------------|--|
|            | 1 (QTL)          |                                 |                | 2 (Asociación)     | 3 (QTL+SNP)            |                  |                    |  |
|            | Pos <sup>a</sup> | P <sup>b</sup> <sub>ACSL4</sub> | h <sup>2</sup> | P <sub>ACSL4</sub> | P <sub>QTL+ACSL4</sub> | P <sub>QTL</sub> | P <sub>ACSL4</sub> |  |
| LW         | 73               | 5×10 <sup>-5</sup>              | 0.60           | 1×10 <sup>-3</sup> | -                      | -                | -                  |  |
| C20:1(n-9) | 52               | 2×10 <sup>-3</sup>              | 0.04           | -                  | -                      | -                | -                  |  |
| C18:1(n-9) | 72               | 5×10 <sup>-3</sup>              | 0.22           | 3×10 <sup>-3</sup> | 3×10 <sup>-3</sup>     | 0.17             | 7×10 <sup>-4</sup> |  |
| MUFA       | 73               | 6×10 <sup>-3</sup>              | 0.15           | 3×10 <sup>-3</sup> | 3×10 <sup>-3</sup>     | 0.15             | 9×10 <sup>-4</sup> |  |
| % Haem     | 82               | 4×10 <sup>-4</sup>              | 0.24           | -                  | -                      | -                | -                  |  |
| a*         | 80               | 3×10 <sup>-3</sup>              | 0.14           | -                  | -                      | -                | -                  |  |

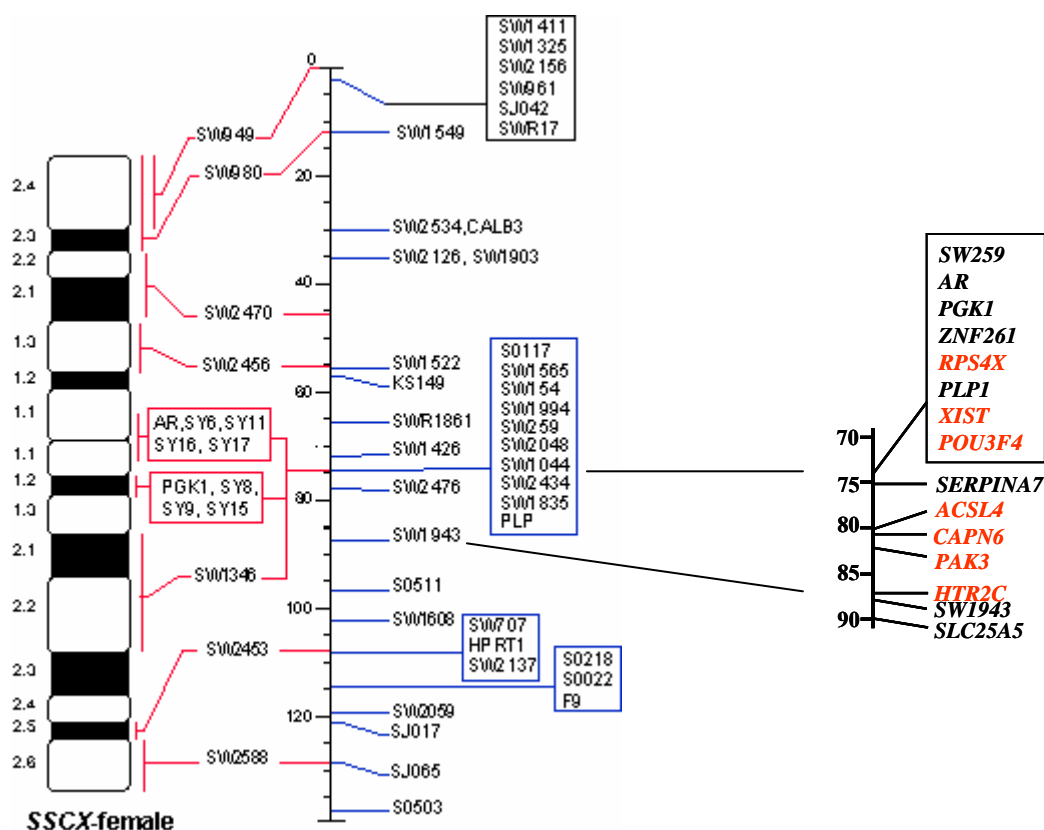
LW: peso vivo; C20:1(n-9): gadoleico; C18:1(n-9): oleico; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; % Haem: hematina; a\*: valor Minolta a. <sup>a</sup>: posición del QTL en cM; el gen *ACSL4* se localizó a 70.4 cM. <sup>b</sup> P valor nominal

Sin embargo, estos resultados se deben interpretar con precaución debido a que se trata de un cruce experimental, en el cual el desequilibrio de ligamiento existente es importante. Por tanto, es probable que los efectos significativos detectados sean causados en realidad por genes más o menos próximos al QTL y no por el polimorfismo analizado (Zhao *et al.* 2003; Varona *et al.* 2005). Además, el gen *ACSL4* se encuentra en una región del cromosoma en la que se ha descrito la existencia de bajas tasas de recombinación (Stumpf, 2002; Cepica *et al.* 2004). En teoría, los estudios de asociación dan resultados significativos cuando los polimorfismos son la mutación causal, pero en la mayoría de los casos, debido al desequilibrio de ligamiento, únicamente podemos afirmar que los efectos significativos son debidos a que la mutación causal se encuentra en un locus próximo. Para disminuir parcialmente el efecto del desequilibrio de ligamiento hemos incluido, tanto en el caso del gen *ACSL4* como en el *FABP4*, un modelo que testa el efecto del SNP considerando la presencia de un QTL (última

columna tabla 4.5) (Zhao *et al.* 2003). Sin embargo, para evitar esta problemática, los estudios de asociación se deberían realizar idealmente en poblaciones comerciales en las cuales los polimorfismos estén segregando y no haya alelos alternativos fijados. De este modo, a pesar de detectar asociaciones significativas del gen *ACSL4* con el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados, no podemos concluir que este gen sea el responsable de los efectos observados.

Como ya se ha apuntado en la introducción, la importancia de detectar genes candidatos relacionados con la composición de los ácidos grasos es debida a que estos caracteres afectan a la calidad de la carne. La calidad de la carne en porcino no sólo es importante para el consumo de ésta, sino también es importante para la industria de los productos curados, cuyo consumo ha aumentado en los últimos años y se exigen productos de mayor calidad. Para esta industria, un alto contenido en grasa intramuscular y dorsal son características interesantes ya que estos productos tienen una deshidratación más lenta y el proceso de curado puede ser más largo, el cual favorece las reacciones producidas por proteínas y lípidos generadores de compuestos volátiles responsables del gusto y aroma. Estas reacciones están influidas por la composición de ácidos grasos, un alto contenido en oleico es el responsable de un aroma agradable, mientras que un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, como el linoleico, pueden causar procesos de enranciamiento (Silió y Rodríguez, 2002).

De forma general, todos los trabajos de barrido genómico en este cromosoma posicionan la mayoría de QTL dentro de un intervalo más o menos amplio flanqueado por los marcadores SW259 y SW1943. A pesar de que se han ido cartografiando diferentes genes en el cromosoma X porcino (McCoard *et al.* 2002; Mikawa *et al.* 2004), pocos se sitúan en este intervalo concreto. Con la finalidad de obtener un mapa más fino de esta región, Cepica *et al.* (2004) posicionaron siete genes adicionales dentro de este intervalo (Figura 4.7) que nos pueden ayudar a afinar un poco más en la búsqueda de genes candidatos en esta región.



**Figura 4.7.** Mapa de ligamiento del cromosoma X porcino. A la derecha en rojo aparecen los 7 genes cartografiados por Cepica *et al.* 2004. Adaptada de USDA-MARC.

Finalmente, analizamos las frecuencias alélicas del SNP de la posición 2645 para evaluar su distribución en diez razas porcinas (Tabla 2, pág. 85). Mediante la secuencia obtenida en Babirusa determinamos que el alelo *G* era probablemente el ancestral. Este alelo se encuentra a frecuencias intermedias en las razas europeas, tanto en razas altamente seleccionadas, como Landrace o Pietrain, como en razas rústicas, como Ibérico o jabalí, mientras que este alelo se encuentra casi fijado en razas de origen asiático.

Con los resultados de este estudio se ha elaborado un manuscrito que ha sido aceptado en *Animal Genetics* (Mercadé *et al.* 2006a).

### 4.3. Discusión general

Actualmente se conoce un elevado número de QTL en la especie porcina, generalmente obtenidos por el cruce experimental de razas o poblaciones fenotípicamente divergentes. La mayoría de estos QTL están relacionados con el crecimiento y con caracteres grasa. Además, algunos de ellos han podido ser confirmados en poblaciones comerciales. El siguiente paso es identificar los genes candidatos posicionales para estos QTL. En este punto, disponer de la máxima información genómica es importante para elegir los genes candidatos. Actualmente existen algunas bases de datos de las cuales se puede extraer información, como sería el *Obesity Gene Map Database* (<http://obesitygene.pbrc.edu>) donde aparece una revisión de genes candidatos relacionados con el engrasamiento. En esta base de datos se presentan resultados de estudios de asociación realizados en humano, estudios de *knockout* en ratones para determinar la función biológica de los genes y QTL descritos en diferentes especies, entre otros. Este tipo de información se debe considerar en el momento de seleccionar los genes candidatos en las diferentes especies domésticas. De hecho, muchos genes previamente descritos en humano se han analizado en otras especies y al contrario, genes asociados con caracteres de interés en otras especies pueden aportar información valiosa para la salud humana. Por otro lado, disponer de la secuencia completa del genoma humano, ratón y otras especies modelo, así como la secuencia en porcino y de la información obtenida de estudios de expresión génica nos puede ayudar en gran medida a seleccionar el gen de interés.

Además de tener en cuenta la información disponible en otras especies, para incrementar en cierta medida las posibilidades de detectar la mutación causal se necesitan localizaciones de QTL más precisas. Mediante el mapeo fino de los QTL se puede aumentar el poder de detección del estudio y reducir el intervalo de confianza. Otra estrategia es añadir información obtenida por estudios de expresión (eQTL), en estos estudios los niveles de expresión de un gen o locus se tratan como un carácter cuantitativo. Mediante estas aproximaciones se obtienen loci más delimitados en los que se buscan polimorfismos y se realizan estudios de asociación con caracteres de interés. Sin embargo, como se ha ido comentando a lo largo de este trabajo, el éxito en la detección de mutaciones causales es muy bajo, en parte debido a la importante presencia de desequilibrio de ligamiento en los cruces utilizados. Aunque estos resultados no nos



permitan detectar la mutación causal, algunos de los polimorfismos pueden ser empleados en modelos de selección asistida por marcadores (MAS).

El éxito de la aplicación de la MAS depende de varios factores. Entre los cuales hay la capacidad de identificar genes o marcadores ligados a los genes que explican el efecto del QTL, la capacidad de testar si la variabilidad alélica está segregando en la población y en entender como estos genes interaccionan con el ambiente o con otros genes que afectan a estos caracteres de interés económico. Además, todo ello debe llevar a cabo de una manera eficiente y económica para que esta tecnología pueda ser aplicada en las granjas de selección. Sin embargo, se debe tener cuidado al implementar métodos MAS cuando sólo se consideran uno o pocos marcadores, la selección con un marcador puede tener efectos negativos en otros caracteres debido a efectos pleiotrópicos del gen o debido a genes próximos ligados al marcador que afectan a otros caracteres.

De forma general, hemos realizado el mapeo fino de QTL previamente detectados en el cruce IIBM en los cromosomas 4, 8 y X. Además de incrementar el nivel de significación y delimitar la localización de estos QTL, hemos podido detectar nuevos QTL. Por otro lado, hemos analizado cuatro genes candidatos (*FABP4*, *DGATI*, *ACSL4* y *CDSI*), para el *ACSL4* y el *CDSI* no se conocía la secuencia nucleotídica del gen, ni del ARNm ni tampoco su localización cromosómica en la especie porcina. En los cuatro genes hemos detectado polimorfismos, aunque la mayoría se localizan en regiones no codificantes o no determinan cambio aminoacídico. Este hecho no es de extrañar ya que la mayoría de variaciones dentro de regiones codificantes generan sustituciones silenciosas o cambios conservativos con efecto pequeño o no aparente sobre la función de la proteína (Kim *et al.* 2001). Finalmente, para los genes *FABP4* y *ACSL4* hemos realizado estudios de asociación con caracteres de grasa y calidad de la carne. A pesar de detectar asociaciones significativas no se puede asegurar que se ha encontrado la mutación causal. Por tanto, sería de gran interés realizar estudios de expresión o testar estas asociaciones en otras poblaciones.

# **CONCLUSIONES**

- 1.) Se ha realizado el mapeo fino de QTL previamente detectados incrementando la densidad de marcadores y el número de meiosis informativas. Para los cromosomas 2, 4, 7, 8, 13 y X se han genotipado 18 marcadores adicionales en los 321 animales F<sub>2</sub>. Para los cromosomas 4, 8 y X se han genotipado 29 marcadores en 87 animales F<sub>3</sub> y 85 animales procedentes del retrocruce.
- 2.) En el cromosoma 4 se han identificado al menos dos QTL. El primero se sitúa próximo al gen *FABP4* y afecta a la deposición de grasa dorsal. El segundo se localiza dentro de la región del *FATI* y está relacionado con el crecimiento. Ambos QTL mantienen efecto pleiotrópico con caracteres de forma (peso de las paletillas y longitud de la canal). También se ha detectado un QTL para el pH 24h post-mortem que no había sido descrito previamente en este cruce.
- 3.) En el cromosoma 8 se ha reducido el intervalo de confianza de los QTL que afectan al porcentaje de ácido palmítico, longitud media de la cadena de los ácidos grasos y valor Minolta a\*, detectados previamente. Asimismo, se han identificado dos nuevos QTL para crecimiento y porcentaje de grasa muscular y se ha aumentado la significación del QTL con efecto sobre el valor Minolta b\*.
- 4.) El análisis conjunto de unos 3.000 animales procedentes de cinco cruces diferentes ha permitido incrementar el poder de detección de QTL en el cromosoma X. Se han identificado dos loci. Uno entre los marcadores SW259 y SW1994 relacionado con el peso de los jamones y longitud de la canal y el segundo, entre los marcadores SW2476 y SW1943, que afecta a la deposición de grasa dorsal y al peso de las paletillas.
- 5.) Al analizar el cromosoma X considerando únicamente el cruce IIBM, se han detectado diferentes QTL que no habían sido descritos previamente. Se han encontrado QTL para crecimiento, porcentaje de ácidos oleico y gadoleico, porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados y contenido de hematina.
- 6.) Se han identificado cuatro polimorfismos en el ARNm del gen *DGATI*, pero ninguno implica cambio aminoacídico. Además, todos ellos segregan a frecuencias muy bajas en la población IIBM. Este gen se ha posicionado por RH en el

- 
- cromosoma 4 entre los marcadores SW2404 y S0227, situándolo fuera del intervalo de confianza del QTL para deposición de grasa dorsal.
- 7.) La secuenciación del gen *FABP4* ha permitido identificar 22 polimorfismos, todos ellos situados dentro de intrones. Para uno de ellos, la inserción/delección en la posición 2634, se detectó una asociación altamente significativa con la deposición de grasa dorsal y con caracteres de forma.
  - 8.) El análisis por haplotipos de los polimorfismos del gen *FABP4* determinó que toda la variabilidad estaba explicada por la indel. Se realizó un segundo análisis por haplotipos con la indel, el microsatélite del *FABP4* y el SW35, el cual indicó la presencia de heterogenicidad dentro de las hembras Landrace y una interacción entre estos tres marcadores.
  - 9.) Se ha obtenido una secuencia de 2.464 pb del ARNm del gen *CDS1* y se ha determinado la estructura de este gen, el cual consta de 13 exones. También se han identificado tres polimorfismos, dos de ellos producen cambio aminoacídico. Se ha observado una reducida expresión de este gen en todos los tejidos analizados, excepto en testículo. Este gen se ha posicionado en el cromosoma 8 a 26 cR del marcador SW1980, fuera del intervalo de confianza de los QTL detectados en este cromosoma.
  - 10.) Se han aislado y secuenciado dos fragmentos del ARNm del gen *CDS2*, uno de 1.240 pb que incluye prácticamente la totalidad de la región codificante y otro de 505 pb que contiene la parte distal de la región 5'-UTR. Este gen se ha localizado en el cromosoma 17 entre los marcadores SWR1120 y SWR1133.
  - 11.) En el estudio filogenético de los genes *CDS1* y *CDS2* se observa una clara diferenciación entre las secuencias del gen *CDS1* y las del gen *CDS2*, sugiriendo que la duplicación del gen ancestral *CDS* fue anterior a la divergencia de los vertebrados.

- 12.) Se ha determinado una secuencia de 4.906 pb del ARNm del gen *ACSL4* y se han observado dos formas de este ARNm, una de ellas contiene 313 nt adicionales y se expresa únicamente en cerebro. Este gen ha sido localizado por RH en el cromosoma X a 53 cR del marcador SW1426, situándose dentro del QTL para el porcentaje de oleico.
- 13.) El análisis comparativo de la secuencia del ARNm del gen *ACSL4* en diferentes razas porcinas ha permitido encontrar 10 polimorfismos, todos ellos situados en la región 3'-UTR, que determinan dos haplotipos. Mediante el análisis estadístico se ha detectado una asociación significativa de este gen con el porcentaje de ácido oleico y el contenido de ácidos grasos monoinsaturados.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Anderson, S.I., N.L. Lopez-Corrales, B. Gorick y A.L. Archibald (2000) A large-fragment porcine genomic library resource in a BAC vector. *Mammalian Genome*, 11(9):811-814.
- Andersson, L., I. Edfords-lilja, H. Ellegren, M. Johansson y L. Marklund (1994) Mapping trait loci by crossbreeding genetically divergent population of domestic animals. *Animal Biotechnology*, 5(2):225-231.
- Andersson, L. (2001) Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nature*, 2:130-138.
- Andersson, L., y M. Georges (2004) Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nature Reviews, Genetics*, 5(3):202-212.
- Andersson-Eklund, L., L. Marklund, K. Lundström, C.S. Haley, K. Andersson, Hansson, M. Moller y L. Andersson (1998) Mapping Quantitative Trait Loci for Carcass and Meat Quality Traits in a Wild Boar x Large White Intercross. *Journal of Animal Science*, 76:694 – 700.
- Archibald, A.L., C.S. Haley, J.F. Brown, S. Couperwhite, H.A. McQueen, D. Nicholson, W. Coppieters, A. Van de Weghe, A. Stratil, A.K. Wintero, *et al.* (1995) The PiGMAP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mammalian Genome*, 6:157-175.
- Aumaitre, A.L. (2001) Technical and economic changes in pig production in the European Union: past, present and future trends. *Pig News and Information*, 22(1):11-20.
- Baar, R.A., C.S. Dingfelder, L.A. Smith, D.A. Bernlohr, C. Wu, A.J. Lange y E.J. Parks (2005) Investigaton of in vivo fatty acid metabolism in AFABP/aP2<sup>-/-</sup> mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 288:187-193.
- Beeckmann, P., J. Schröffel Jr, G. Moser, H. Bartenschlager, G. Reiner y H. Geldermann (2003a) Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 1. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(1):1-10.
- Beeckmann, P., J. Schröffel Jr., G. Moser, H. Bartenschlager, G. Reiner y H. Geldermann (2003b) Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* Chromosome 3. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(1):20-27.
- Beeckmann, P., G. Moser, H. Bartenschlager, G. Reiner y H. Geldermann (2003c) Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 8. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 102(1):66-73.
- Bennewitz, J., N. Reinsch, S. Paul, C. Looft, B. Kaupe, C. Weimann, G. Erhardt, G. Thaller, C.H. Kuhn, M. Schwerin, H. Thomsen, F. Reinhardt, R. Reents y E. Kalm (2004) The DGAT1 K232A mutation is not solely responsible for the milk production quantitative trait locus on the bovine chromosome 14. *Journal of Dairy Science*, 87(2):431-442.
- Bidanel, J.P., D. Milan, N. Iannucelli, Y. Amigues, M.Y. Boscher, F. Bourgeois, J.C. Caritez, J. Gruand, P. Le Roy, H. Lagant, R. Quintanilla, C. Renard, J. Gellin, L. Ollivier y C. Chevalet (2001a) Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Genetics Selection Evolution*, 33:289-309.
- Bidanel, J.P., A. Prunier, N. Iannucelli y D. Milan (2001b) Detection of quantitative trait loci for male and female reproductive traits in Meishan x Large White F2 pigs. 52<sup>nd</sup> EAAP Meeting Proceedings, Budapest, pàg. 54.
- Bidanel, J.P. y M.F. Rothschild (2002) Current status of quantitative trait locus mapping in pigs. *Pig News and Information*, 23:39N-54N.

- Bink, M.C., M.F. Te Pas, F.L. Harders y L.L. Janss (2000) A transmission/disequilibrium test approach to screen for quantitative trait loci in two selected lines of large white pigs. *Genetical Research*, 75(1):115-121.
- Bovenhuis, H., J.A.M. van Arendonk, G. Davis, J.M. Elsen, C.S. Haley, W.G. Hill, P.V. Baret, D.J.S. Hetzel y F.W. Nicholas (1997). Detection and mapping of quantitative trait loci in farm animals. *Livestock Production Science*, 52:135-144.
- Brookes, A.J. (1999) The essence of SNPs. *Gene*, 234:177-186.
- Buhman, K.K., M. Accad y R.V. Farese Jr (2000) Mammalian acyl-CoA: cholesterol acyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1529:142-154.
- Buhman, K.K., H.C. Chen y R.V. Farese Jr (2001) The Enzymes of Neutral Lipid Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44):40369-40372.
- Buhman, K.K., S.J. Smith, S.J. Stone, J.J. Repa, J.S. Wong, F.F. Knapp, B.J. Burri, R.L. Hamilton, N.A. Abumrad y R.V. Farese Jr (2002) DGAT1 Is Not Essential for Intestinal Triacylglycerol Absorption or Chylomicron Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(28):25474-25479.
- Cameron, N.D. (1990) Genetic and phenotypic parameters for carcass traits, meat ad eating quality traits in pigs. *Livestock Production Science*, 26:119-135.
- Cameron, N.D., M. Ensen, G.R. Nute, F.M. Whittington, J.C. Penman, A.C. Fisker, A.M. Perry y J.D. Wood (2000) Genotype with nutrition interaction on fatty acid composition of intramuscular fat and the relationship with flavour of pig meat. *Meat Science*, 55:187-195.
- Cao, Y., K.J. Murphy, T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman y S.M. Prescott (2000) Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 467, 263-267.
- Casas-Carrillo, E., A. Prill-Adams, S.G. Price, A.C. Clutter y B.W. Kirkpatrick (1997) Mapping genomic regions associated with growth rate in pigs. *Journal of Animal Sciences* 75, 2047-2053.
- Cases, S., S.J. Smith, Y. Zheng, H.M. Myers, S.R. Lear, E. Sande, S. Novak, C. Collins, C.B. Welch, A.J. Lusis y S.K. Erickson (1998) Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 95:13018-13023.
- Cases, S., S.J. Stone, P. Zhou, E. Yen, B. Tow, K.D. Lardizabal, T. Voelker y R.V. Farese Jr (2001) Cloning of DGAT2, a Second Mammalian Diacylglycerol Acyltransferase, and Related Family Member. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(42):38870-38876.
- Cepica, S., A. Stratil, M. Kopečný, P. Blazkova, J. Schröffel Jr, R. Davoli, L. Fontanesi, G. Reiner, H. Bartenschlager, y G. Moser (2003a) Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 4. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(1):28-37.
- Cepica, S., J. Schröffel Jr, A. Stratil, J. Hojny, M. Pierzchala, K. Kuryl, C. Brunsh, I. Sternstein, R. Davoli, L. Fontanesi, G. Reiner, H. Bartenschlager, G. Moser y H. Geldermann (2003b) Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 9. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(1):74-81.
- Cepica, S., H. Bartenschlager, M. Masopust, G. Rohrer, M. Yerle, H. Geldermann (2004) Detailed mapping of the porcine chromosome X region harbouring QTL for fat deposition. 29th ISAG Meeting Proceedings, Tokyo, pág. 124.
- Cervino, A.C., G. Li, S. Edwards, J. Zhu, C. Laurie, G. Tokiwa, P.Y. Lum, S. Wang, L.W. Castellini, A.J. Lusis, S. Carlson, A.B. Sachs y E.E. Schadt (2005)



- Integrating QTL and high-density SNP analyses in mice to identify *Insig2* as a susceptibility gene for plasma cholesterol levels. *Genomics*, 86(5):505-517.
- Chambers, G.K. y E.S. MacAvoy (2000) Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 126(4):455-476.
- Chen, H.C. y R.V. Farese Jr (2000) DGAT and Triglyceride Synthesis: A New Target for Obesity Treatment?. *Trends in cardiovascular medicine*, 10(5):188-192.
- Chen, H.C., S.J. Smith, Z. Ladha, D.R. Jensen, L.D. Ferreira, L.K. Pulawa, J.G. McGuire, R. Pita, R.H. Eckel y R.V. Farese Jr (2002a) Increased insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(8):1049-1055.
- Chen, H.C., S.S. Stone, P. Zhou, K.K. Buhman y R.V. Farese Jr (2002b) Dissociation of Obesity and Impaired Glucose Disposal in Mice Overexpressing Acyl Coenzyme A:Diacylglycerol Acyltransferase 1 in White Adipose Tissue. *Diabetes*, 51:3189-3195.
- Chen, H.C. y R.V. Farese Jr (2005) Inhibition of triglyceride synthesis as a treatment strategy for obesity: lessons from DGAT1-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 25(3):482-486.
- Cheng, D., R.L. Meegalla, B. He, D.A. Cromley, J.T. Billheimer y P.R. Young (2001) Human acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase is a tetrameric protein. *The Biochemical journal*, 359:707-714.
- Cho, Y.Y., M.J. Kang, H. Sone, T. Suzuki, M. Abe, M. Igarashi, T. Tokunaga, S. Ogawa, Y.A. Takei, T. Miyazawa, H. Sasano, T. Fujino y T.T. Yamamoto (2001) Abnormal uterus with polycysts, accumulation of uterine prostaglandins, and reduced fertility in mice heterozygous for acyl-CoA synthetase deficiency. *Biochemical and biophysical research communications*, 284(4):993-997.
- Ciobanu, D., J. Bastiaansen, M. Malek, J. Helm, J. Woollard, G. Plastow y M.F. Rothschild (2001) Evidence for New Alleles in the Protein Kinase Adenosine Monophosphate-Activated  $\gamma_3$ -Subunit Gene Associated With Low Glycogen Content in Pig Skeletal Muscle and Improved Meat Quality. *Genetics*, 159:1151-1162.
- Clop, A., C. Óviló, A. Coll, C. Barragán y J.M. Folch (1998) Informatividad de marcadores moleculares tipo microsatélite en dos poblaciones de cerdos de raza Ibérica y Landrace. *ITEA 94 A(3):351-354*.
- Clop, A. (2001) Detecció de QTL d'interès econòmic en un encreuament experimental de tipus F<sub>2</sub> entre porc Ibèric i Landrace. Tesis Doctoral.
- Clop, A., A. Cercós, A. Tomàs, M. Pérez-Enciso, L. Varona, J.L. Noguera, A. Sánchez y M. Amills (2002) Assignment of the 2,4-dienoyl-CoA reductase (*DECR*) gene to porcine chromosome 4. *Animal Genetics*, 33:158-167.
- Clop, A., C. Óviló, M. Pérez-Enciso, A. Cercós, A. Tomàs, A. Fernández, A. Coll, J.M. Folch, C. Barragán, I. Díaz, M. Oliver, L. Varona, L. Silió, A. Sánchez y J.L. Noguera (2003) Detection of QTL affecting fatty acid composition in the pig. *Mammalian Genome*, 14:650-656.
- Coe, N.R., M.A. Simpson y D.A. Bernlohr (1999) Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *Journal of Lipid Research*, 40:967-972.
- Combet C., C. Blanchet, C. Geourjon y G. Deleage (2000) NPS@: network protein sequence analysis. *Trends in Biochemistry Science*, 25:147-150.
- Coleman, R.A., T.M. Lewin, C.G. Van Horn y M.R. Gonzalez-Baro (2002) Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *The Journal of nutrition*, 132:2123-2126.

- Coudreau, S.K., P. Tounian, G. Bonhomme, P. Froguel, J.P. Girardet, B. Guy-Grand, A. Basdevant y K. Clement (2003) Role of the DGAT gene C79T single-nucleotide polymorphism in French obese subjects. *Obesity Research*, 11(10):1163-1167.
- Covault, J., H. Pettinati, D. Moak, T. Mueller y H.R. Kranzler (2004) Association of a long-chain fatty acid-CoA ligase 4 gene polymorphism with depression and with enhanced niacin-induced dermal erythema. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics*, 127(1):42-47.
- Cox, L.A, S. Birnbaum y J.L. VanderBerg (2002) Identification of candidate genes regulating HDL cholesterol using a chromosomal region expression array. *Genome Research*, 12(11):1693-1702.
- Darvasi, A. (1998) Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nature Genetics*, 18:19-24.
- De Koning, D.J., L. Janss, A. Rattink, P. van Oers, B. de Vries, M. Groenen, J. van der Poel, P. De Groot, E. Brascamp y J. Van Arendonk (1999) Detection of Quantitative Trait Loci for Backfat Thickness and Intramuscular Fat Content in Pigs (*Sus scrofa*). *Genetics*, 152:1679-1690.
- De Koning, D.J., A. Rattink, B. Harzilius, J. van Arendonk, E. Brascamp y M. Groenen. (2000) Genome-wide scan for body composition in pigs reveals important role of imprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97(14):7947-7950.
- De Koning, D.J., A. Rattink, B. Harzilius, M. Groenen, E. Brascamp y J. van Arendonk. (2001a) Detection and characterization of quantitative trait loci for growth and reproduction traits in pigs. *Livestock Production Science*, 72:185-198.
- De Koning, D.J., B. Harzilius, A. Rattink, M. Groenen, E. Brascamp y J. van Arendonk. (2001b) Detection and characterization of quantitative trait loci for meat quality traits in pigs. *Journal of Animal Science*, 79:2812-2819.
- De Koning, D.J., R. Pong-Wong, L. Varona, G.J. Evans, E. Giuffra, A. Sanchez, G. Plastow, J.L. Noguera, L. Andersson y C.S. Haley (2003) Full pedigree quantitative trait locus analysis in commercial pigs using variance components. *Journal of Animal Science*, 81:2155-2163.
- De Vries, A.G., A. Sosnicki, J.P. Garnier y G.S. Plastow (1998) The role of major genes and DNA technology in selection for meat quality in pigs. *Meat Science*, 49:245-255.
- Estellé, J, A. Mercadé, J.L. Noguera, M. Pérez-Enciso, C. Óvilo, A. Sánchez y J.M. Folch (2005) Effect of the porcine IGF2-intron3-G3072A substitution in an outbred Large White population and in an Iberian x Landrace cross. *Journal of Animal Science*, 83(12):2723-2728.
- Evans, G., E. Giuffra, A. Sánchez, S. Kerje, G. Davalos, O. Vidal, S. Illán, J.L. Noguera, L. Varona, I. Velandar, O.I. Southwood, D.J. de Koning, C.S. Haley, G.S. Plastow y L. Andersson (2003) Identification of quantitative trait loci for production traits in commercial pig populations. *Genetics*, 164:621-627.
- Falconer, D.S y T.F.C. McKay (1996) *Introduction to quantitative genetics*, 4th edition. Ed. Harlow Longman.
- Fahrenkrug, S.C., G.A. Rohrer, B.A. Freking, T.P. Smith, K. Osoegawa, C.L. Shu, J.J. Catanese y P.J. de Jong (2001) A porcine BAC library with tenfold genome coverage: a resource for physical and genetic map integration. *Mammalian Genome*, 12(6):472-474.
- Fernández, X., G. Monin, A. Talmant, J. Mourot y B. Lebret (1999) Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat-1. Composition of the lipid

- fraction and sensory characteristics of *m. longissimus lumborum*. *Meat Science*, 53:59-65.
- Fujii, J., K. Otsu, F. Zorzato, S. De Leon, V.K. Khanna, J.F. Weiler, P.J. O'Brien y D.H. MacLennan (1991) Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253:448-451.
- Fujishima-Kanaya, N., D. Toki, K. Suzuki, T. Sawazaki, H. Hiraiwa, M. Iida, T. Hayashi, H. Uenishi, Y. Wada, Y. Ito y T. Awata (2003) Development of 50 gene-associated microsatellite markers using BAC clones and the construction of a linkage map of swine chromosome 4. *Animal Genetics*, 34:135-141.
- Gaboreanu, A.M., L. Grapes, A.M. Ramos, J.J. Kim y M.F. Rothschild (2004). Characterization of an X-chromosome PCR-RFLP marker associated with fat deposition and growth in the pig. *Animal Genetics*, 35(5):401-403.
- Geldermann, H., E. Mueller, P. Beekmann, C. Knorr y G. YUE *et al.* (1996) Mapping of quantitative-trait loci by means of marker genes in F-2 generations of wild boar, Pietrain and Meishan pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 113:381-387.
- Geldermann, H., E. Müller, G. Moser, G. Reiner, H. Bartenschlager, S. Cepica, A. Stratil, J. Kuryl, C. Moran, R. Davoli y C. Brunsch (2003) Genome-wide linkage and QTL mapping in porcine F2 families generated from Pietrain, Meishan and Wild Boar crosses. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120:363-393.
- Gerbens, F., A. Jansen, A. van Erp, F. Harders, T. Meuwissen, G. Rettenbergern, J. Veerkamp y M. te Pas (1998) The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pig. *Mammalian Genome*, 9(12):1022-1026.
- Gerbens, F., D.J. de Koning, F. Harders, T. Meuwissen, L. Janss, M. Groenen, J. Veerkamp, J. van Arendonk y M. te Pas (2000) The effects of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and back-fat contents in Meishan crossed pigs. *Journal of Animal Science*, 78(3):552-559.
- Gerbens, F., F.J. Verburg, H.T. Van Moerkerk, B. Engel, W. Buist, J.H. Veerkamp y M. te Pas (2001) Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs. *Journal of Animal Science*, 79:347-354.
- Goureau, A., M. Yerle, A. Schnitz, J. Riquet, D. Milan, P. Pinton, G. Frelat y J. Gellin (1996) Human and Porcine Correspondence of Chromosome Segments Using Bidirectional Chromosome Painting. *Genomics*, 36:252-262.
- Green, P., K. Falls y S. Crooks (1990) Documentation for CRI-MAP, version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis, MO.
- Grindflek, E., J. Szyda, Z. Liu y S. Lien (2001) Detection of quantitative trait loci for meat quality in a commercial slaughter pig cross. *Mammalian Genome*, 12:299-304.
- Grisart, B., W. Coppieters, F. Farnir, L. Karim, C. Ford, P. Berzi, N. Cambisano, M. Mni, S. Reid, P. Simon, R. Spelman, M. Georges y R. Snell (2002) Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Research*, 12(2):222-231.
- Grisart, B., F. Farnir, L. Karim, N. Cambisano, J.J. Kim, A. Kvasz, M. Mni, P. Simon, J.M. Frere, W. Coppieters y M. Georges (2004) Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8):2398-2403.

- Haley, C.S., S.A. Knott y J.M. Elsen (1994) Mapping Quantitative Trait Loci in Crosses Between Outbred Lines Using Least Squares. *Genetics*, 136:1195-1207.
- Haley, C. y P. Visscher (1998-1999) DNA markers and genetic testing in farm animal improvement: current applications and future prospects. *Roslin Institute Annual Report*, 28-39.
- Halford, S., K.S. Dulai, S.C. Daw, J. Fitzgibbon y D.M. Hunt (1998) Isolation and Chromosomal Localization of Two human CDP-diacylglycerol Synthase (CDS) Genes. *Genomics*, 54:140-144.
- Halford, S., S. Inglis, R. Gwilliam, P. Spencer, M. Mohamed, N.D. Ebenezer y D.M. Hunt (2002) Genomic organization of human CDS2 and evaluation as a candidate gene for corneal hereditary endothelial dystrophy 2 on chromosome 20p13. *Experimental Eye Research*, 75:619-623.
- Hamasima, N., H. Suzuki, A. Mikawa, T. Morozumi, G. Plastow y T. Mitsuhashi (2003) Construction of a new porcine whole-genome framework map using a radiation hybrid panel. *Animal Genetics*, 34(3):216-220.
- Harlizius, B., A.P. Rattink, D.J. de Koning, M. Faivre, R.G. Joosten, J.A.M. van Arendonk y M.A.M. Groenen (2000) The X chromosome harbors quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs. *Mammalian Genome*, 11:800-802.
- Hatch, G.M. (2004) Cell biology of cardiac mitochondrial phospholipids. *Biochemistry and cell biology*, 82:99-112.
- Hauerland, N.H. y F. Spener (2004) Fatty acid-binding proteins - insights from genetic manipulations. *Progress in lipid research*, 43:328-349.
- Hawken, R.J., J. Murtaugh, G.H. Flickinger, M. Yerle, A. Robic, D. Milan, J. Gelic, C.W. Beattie, L.B. Schook y L.J. Alexander (1999) A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map. *Mammalian Genome*, 10:824-830.
- Heacock, A.M., M.D. Uhler y B.W. Agranoff (1996) Cloning of CDP-diacylglycerol synthase from a Human Neuronal Cell line. *Journal of neurochemistry*, 67:2200-2203.
- Heacock, A.M. y B.W. Agranoff (1997) CDP-diacylglycerol synthase from mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1348:166-172.
- Hertzel, A.V. y D.A. Bernlohr (2000) The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends in endocrinology and metabolism*, 11(5):175-180.
- Hesketh, J. (2004) 3'-Untranslated regions are important in mRNA localization and translation: lessons from selenium and metallothionein. *Biochemical Society Transactions*, 32:990-993.
- Hotamisligil, G.K., R.J. Distel, R.S. Johnson, R. Ellis y B.M. Spiegelman (1995) Mice deficient for aP2 (adipocyte fatty-acid-binding protein) are protected from diet-induced insulin-resistance. *Diabetes*, 44:A41.
- Hotamisligil, G.K., R.S. Johnson, R.J. Distel, R. Ellis, V.E. Papaioannou y B.M. Spiegelman (1996) Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*, 274:1377-1379.
- Inglis-Broadgate, S.L., L. Ocaka, R. Banerjee, M. Gaasenbeek, J.P. Chapple, M.E. Cheetham, B.J. Clark, D.M. Hunt DM y S. Halford (2005) Isolation and characterization of murine Cds (CDP-diacylglycerol synthase) 1 and 2. *Gene*, 356:19-31.
- Jeon, J.T., Ö. Carlborg, A. Törnsten, E. Giuffra, V. Amargerr, P. Chardon, L. Andersson-Eklund, K. Andersson, I. Hansson, L. Lundström y L. Andersson

- (1999) A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus. *Nature Genetics*, 21(2):157-158.
- Jerez-Timaure, N.C., E.J. Eisen y D. Pomp (2005) Fine mapping of a QTL region with large effects on growth and fatness on mouse chromosome 2. *Physiological Genomics*, 21(3):411-422.
- Kang, M.J., T. Fujino, H. Sasano, H. Minekura, N. Yabuki, H. Nagura, H. Iijima y T.T. Yamamoto (1997) A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:2880-2884.
- Kee, H.J., J.T. Koh, S.Y. Yang, Z.H. Lee, Y.H. Baik y K.K. Kim (2003) A novel murine long-chain acyl-CoA synthetase expressed in brain participates in neuronal cell proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 13:925-933.
- Kent, C. (1995) Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annual review of biochemistry*, 64:315-343.
- Kim, C., G. Mues, Y. Liao, T. Hyatt, N. Patil, J.C. Cohen y H.H. Hobbs (2001) Sequence Diversity in Genes of Lipid Metabolism. *Genome Research*, 11:1043-1052.
- Kim, K.S., H. Thomsen, J. Bastiaansen, N.T. Nguyen, J.C. Dekkers, G.S. Plastow y M.F. Rothschild (2004) Investigation of obesity candidate genes on porcine fat deposition quantitative trait loci regions. *Obesity Research*, 12(12):1981-1994.
- Kim, J.J., M.F. Rothschild, J. Beever, S. Rodriguez-Zas y J.C. Dekkers (2005) Joint analysis of two breed cross populations in pigs to improve detection and characterization of quantitative trait loci. *Journal of Animal Science*, 83(6):1229-1240.
- Knott, S., L. Marklund, C. Haley, K. Andersson, W. Davies, H. Ellegren, M. Fredholm, I. Hansson, B. Hoyheim, K. Lundström, M. Moller y L. Andersson (1998) Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and Large White pigs. *Genetics*, 149:1069-1080.
- Knott, S., P.E. Nyström, L. Andersson-Eklund, S. Estern, L. Marklund, L. Andersson y C. Haley (2002) Approches to interval mapping of QTL in a multigeneration pedigree: the example of porcine Chromosome 4. *Animal Genetics*, 33:26-32.
- Kuhn, C., G. Thaller, A. Winter, O.R. Bininda-Emonds, B. Kaupe, G. Erhardt, J. Bennewitz, M. Schwerin y R. Fries (2004) Evidence for multiple alleles at the DGAT1 locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. *Genetics*, 167(4):1873-1881.
- Lahbib-Mansais, Y., G. Dalias, D. Milan, M. Yerle, A. Robic, G. Gyapay y J. Gellin (1999) A successful strategy for comparative mapping with human ESTs: 65 new regional assignments in the pig. *Mammalian Genome*, 10(2):145-153.
- Lahbib-Mansais, Y., G. Tosser-Klopp, S. Leroux, C. Cabau, E. Karsenty, D. Milan, E. Barillot, M. Yerle, F. Hatey y J. Gellin (2003) Contribution to high-resolution mapping in pigs with 101 type I markers and progress in comparative map between humans and pigs. *Mammalian Genome*, 14(4):275-288.
- Lahbib-Mansais, Y., P. Karlskov-Mortensen, F. Mompert, D. Milan, C.B. Jorgensen, S. Cirera, J. Gorodkin, T. Faraut, M. Yerle y M. Fredholm (2005) A high-resolution comparative map between pig chromosome 17 and human chromosomes 4, 8, and 20: identification of synteny breakpoints. *Genomics*, 86(4):405-413.

- Lander, E.S. y D. Botstein (1989) Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits Using RFLP Linkage Maps. *Genetics*, 121:185-199.
- Lander, E.S., L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860-921.
- Lardizabal, K.D., J.T. Mai, N.W. Wagner, A. Wyrick, T. Voelker y D.J. Hawkins (2001) DGAT2 Is a New Diacylglycerol Acyltransferase Gene Family. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(42):38862-38869.
- Lee, S.S., Y. Chen, C. Moran, S. Cepica, G. Reiner, H. Bartenschlager, G. Moser y H. Geldermann (2003a) Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 2. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(1):11-19.
- Lee, C., Y. Chung y J.H. Kim (2003b) Quantitative trait loci mapping for fatty acid contents in the backfat on porcine chromosomes 1, 13, and 18. *Molecules and Cells*, 15(1):62-67.
- Lee, S.S., Y. Chen, C. Moran, A. Stratil, G. Reinder, H. Bartenschlager, G. Moser y H. Geldermann (2003c) Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 5. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(1):38-44.
- Lehner, R. y A. Kuksis (1996) Biosynthesis of triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*, 35(2):169-201.
- Lewin T.M., C.G. Van Horn, S.K. Krisans y R.A. Coleman (2002) Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 404:263-270.
- Lindahl, G., A.C. Enfält, G. von Seth, Å. Josell, I. Hedebro-Velander, H.J. Andersen, M. Braunschweig, L. Andersson y K. Lundström (2003) A second mutant allele (V199I) at the PRKAG3 (RN) locus— I. Effect on technological meat quality of pork loin. *Meat Science*, 66:609-619.
- Ludwig, E.H., R.W. Mahley, E. Palaoglu, S. Özbayrakçi, M.E. Balestra, I.B. Borecki, T.L. Innerarity y RV Farese Jr (2002) DGAT1 promoter polymorphism associated with alterations in body mass index, high density lipoprotein levels and blood pressure in Turkish women. *Clinical Genetics*, 62:68-73.
- Lykidis, A., P.D. Jackson, C.O. Rock y S. Jackowski (1997) The Role of CDP-Diacylglycerol synthetase and Phosphatidylinositol synthase Activity Levels in the Regulation of Cellular Phosphatidylinositol Content. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(52):33402-33409.
- Makowski, L., J.B. Boord, K. Maeda, V.R. Babaev, K.T. Uysal, M.A. Morgan, R.A. Parker, J. Suttles, S. Fazio, G.S. Hotamisligil y M.F. Linton (2001) Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nature Medicine*, 7(6):699-705.
- Malek, M., J.C. Dekkers, H.K. Lee, T.J. Baas y M.F. Rothschild (2001a) A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. I. Growth and body composition. *Mammalian Genome*, 12(8):630-636.
- Malek, M., J.C. Dekkers, H.K. Lee, T.J. Baas, K. Prusa, E. Huff-Loergan y M.F. Rothschild (2001b) A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. *Mammalian Genome*, 12(8):637-645.
- Marklund, L., M. Johansson Moller, B. Hoyheim, W. Davies, M. Fredholm, R.K. Juneja, P. Mariani, W. Coppieters, H. Ellegren y L. Andersson (1996) A

- comprehensive linkage map of the pig based on a wild pig-Large White intercross. *Animal Genetics*, 27:255-269.
- Marklund, L., P. Nyström, S. Stern, L. Andersson-Eklund y L. Andersson (1999) Confirmed quantitative trait loci for fatness and growth on pig chromosome 4. *Heredity*, 82:134-141.
- Mashek, D.G., Bornfeldt K.E., Coleman R.A., Berger J., Bernlohr D.A., Black P., DiRusso C.C., Farber S.A., Guo W., Hashimoto N., *et al.* (2004) Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family. *Journal of Lipid Research*, 45:1958-1961.
- McCoard, S.A., S.C. Fahrenkrug, L. Alexander, B.A. Freking, G.A. Rohrer, T.H. Wise y J.J. Ford (2002) An integrated comparative map of the porcine X chromosome. *Animal Genetics*, 33:178-185.
- Meegalla, R.L., J.T. Billheimer y D. Cheng (2002) Concerted elevation of acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 298:317-323.
- Meloni I., Muscettola M., Raynaud M., Longo I., Bruttini M., Moizard M.P., Gomot M., Chelly J., des Portes., Fryns J.P., Ropers H.H., Magi B., *et al.* (2002) FAACL4, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation. *Nature Genetics*, 30:436-440.
- Mercadé, A., J. Estellé, J.L. Noguera, J.M. Folch, L. Varona, L. Silió, A. Sánchez y M. Pérez-Enciso (2005a) On growth, fatness and form: A further look at porcine's chromosome 4 in an Iberian x Landrace cross. *Mammalian Genome*, 16:374-382.
- Mercadé, A., A. Sánchez y J.M. Folch (2005b) Exclusion of the *acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1* gene (*DGAT1*) as a candidate for a fatty acid composition QTL on porcine chromosome 4. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 122:161-164.
- Mercadé, A., A. Sánchez y J.M. Folch (2005c) Assignment of the *acyl-CoA synthetase long-chain family member 4* (*ACSL4*) gene to porcine chromosome X. *Animal Genetics*, 36:76.
- Mercadé, A., J. Estellé, M. Pérez-Enciso, L. Varona, L. Silió, J.L. Noguera, A. Sánchez y J.M. Folch (2006a) Characterization of the porcine *acyl-CoA synthetase long-chain 4* (*ACSL4*) gene and its association with growth and meat quality traits. Aceptado en *Animal Genetics*.
- Mercadé, A., M. Pérez-Enciso, L. Varona, E. Alves, J.L. Noguera, A. Sánchez y J.M. Folch (2006b) Fatty acid binding protein 4 is closely associated to the porcine *FAT1* locus on chromosome 4. Enviado a *Journal of Animal Science*.
- Mercadé, A., A. Sánchez y J.M. Folch (2006c) Characterization and physical mapping of the porcine *CDS1* and *CDS2* genes. Aceptado en *Animal Biotechnology*.
- Meuwissen, T.H.E. y M.E. Goddard (1996) The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. *Genetic Selection Evolution*, 28:161-176.
- Meyers, S.N., M.B. Rogatcheva, D.M. Larkin, M. Yerle, D. Milan, R.J. Hawken, L.B. Schook, J.E. Beever (2005) Piggy-BACing the human genome II. A high-resolution, physically anchored, comparative map of the porcine autosomes. *Genomics*, 86(6):739-752.
- Mikawa, A., H. Suzuki, K. Suzuki, D. Toki, H. Uenishi, T. Awata y N. Hamasima (2004) Characterization of 298 ESTs from porcine back fat tissue and their

- assignment to the SSRH radiation hybrid map. *Mammalian Genome*, 15(4):315-322
- Milan, D., J.T. Jeon, C. Looft, V. Amarger, A. Robic, M. Thelander, C. Rogel-Gaillard, S. Paul, N. Iannuccelli, L. Rask, H. Ronne, K. Lundström, *et al.* (2000) A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*, 288:1248-1251.
- Milan, D., J.P. Bidanel, N. Iannuccelli, J. Riquet, Y. Amigues, J. Gruand, P.L. Roy, C. Renard y C. Chevalet (2002) Detection of quantitative trait loci for carcass composition traits in pigs. *Genetic Selection Evolution*, 34(6):705-728.
- Minekura, H., M.J. Kang, Y. Inagaki, Y.Y. Cho, H. Suzuki, T. Fujino y T.T. Yamamoto (2001) Exon/intron organization and transcription units of the human acyl-CoA synthetase 4 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286:80-86.
- Moller, M., F. Berg, J. Riquet, D. Pomp, A. Archibald, S. Anderson, K. Feve, Y. Zhang, M.F. Rothschild, D. Milan, L. Andersson y C.K. Tuggle (2004) High-resolution comparative mapping of pig Chromosome 4, emphasizing the FAT1 region. *Mammalian Genome*, 15:717-731.
- Morley, M., C.M. Molony, T.M. Weber, J.L. Devlin, K.G. Ewens, R.S. Spielman y V.G. Cheung (2004) Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. *Nature*, 430(7001):743-747.
- Nagamine, Y., C.S. Haley, A. Sewalen y P.M. Vissler (2003) Quantitative trait loci variation for growth and obesity between and within lines of Pigs (*Sus scrofa*). *Genetics*, 64:629-635.
- Nechtelberger, D., V. Pires, J. Sölkner, I. Stur, G. Brem, M. Mueller y S. Mueller (2001) Intramuscular fat content and genetic variants at fatty acid-binding protein loci in Austrian pigs. *Journal of Animal Science*, 79:2798-2804.
- Nezer, B., L. Moreau, B. Brouwers, W. Coppitiers, J. Dettelleux, R. Hanset, L. Karim, A. Kvasz, P. Leroy y M. Georges. (1999) An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. *Nature Genetics*, 21:155-156.
- Nonneman, D. y G.A. Rohrer (2002) Linkage mapping of porcine DGAT1 to a region of chromosome 4 that contains QTL for growth and fatness. *Animal Genetics*, 33:468-485.
- Oelkers, P., A. Behar, D. Cromley, J.T. Billheimer y S.L. Sturley (1998) Characterization of Two Human Genes Encoding Acyl coenzyme A:cholesterol Acyltransferase-related Enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(41):26765-26771.
- Óvilo, C., M. Pérez-Enciso, C. Barragán, A. Clop, C. Rodríguez, M. Oliver, M. Toro y J.L. Noguera (2000) A QTL for for intramuscular fat and backfat thickness is located on porcine chromosome 6. *Mammalian Genome*, 11:344-346.
- Óvilo, C., A. Clop, J.L. Noguera, M.A. Oliver, C. Barragán, C. Rodríguez, L. Silió, M.A. Toro, A. Coll, J.M. Folch, A. Sánchez, D. Babot, L. Varona y M. Pérez-Enciso (2002a) Quantitative trait locus mapping for meat quality traits in an Iberian X Landrace F<sub>2</sub> pig population. *Journal of Animal Science*, 80:2801-2808.
- Óvilo, C., M.A. Oliver, J.L. Noguera, A. Clop, C. Barragán, L. Varona, C. Rodríguez, M.A. Toro, A. Sánchez, M. Pérez-Enciso y L. Silió (2002b). Test for positional candidate genes for body composition on pig chromosome 6. *Genetic Selection Evolution*, 34:465-479.
- Óvilo, C., A. Fernández, J.L. Noguera, C. Barragán, R. Leton, C. Rodríguez, A. Mercadé, E. Alves, J.M. Folch, L. Varona y M.A. Toro (2005) Fine mapping of



- porcine chromosome 6 QTL and LEPR effects on body composition in multiple generations of an Iberian by Landrace intercross. *Genetical Research*, 85(1):57-67.
- Pareek, C.S., U. Czarnik, T. Zabolewicz, R.S. Pareek y K. Walawski (2005) DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide polymorphism in Polish Black-and-White cattle. *Journal of Applied Genetics*, 46(1):85-87.
- Paszek, A., P. Wilkie, G. Flickenger, G. Rohrer, L. Alexander, C. Beattie y L. Schook. (1999) Interval mapping of growth in divergent swine cross. *Mammalian Genome*, 10:117-122.
- Paszek, A., P. Wilkie, G. Flickenger, L.M. Miller, C.F. Louis, G. Rohrer, L. Alexander, C. Beattie y L. Schook. (2001) Interval mapping of carcass and meat quality traits in a divergent swine cross. *Animal Biotechnology*, 12(2):155-165.
- Pérez-Enciso, M., A. Clop, J.L. Noguera, C. Óvilo, A. Coll, J.M. Folch, D. Babot, J. Estany, M.A. Oliver, I. Díaz y A. Sánchez (2000) A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: Evidence from an Iberian by Landrace intercross. *Journal of Animal Science*, 78:2525-2531.
- Pérez-Enciso, M., A. Clop, J.M. Folch, A. Sánchez, M.A. Oliver, C. Óvilo, C. Barragán, L. Varona y J.L. Noguera (2002) Exploring alternative models for sex-linked quantitative trait loci in outbred populations: application to an Iberian x Landrace intercross. *Genetics*, 161:1625-1632.
- Pérez-Enciso, M. y I. Misztal (2004) Qxpak: a versatile mixed model application for genetical genomics and QTL analyses. *Bioinformatics*, 20:2792-2798.
- Pérez-Enciso, M., A. Mercade, J.P. Bidanel, H. Geldermann, S. Cepica, H. Bartenschlager, L. Varona, D. Milan y J.M. Folch (2005) Large-scale, multibreed, multitrait analyses of quantitative trait loci experiments: the case of porcine X chromosome. *Journal of Animal Science*, 83(10):2289-2296.
- Piccini, M., F. Vitelli, M. Bruttini, B.R. Pober, J.J. Jonsson, M. Villanova, M. Zollo, G. Borsani, A. Ballabio y A. Renieri (1998) *FACL4*, a new gene encoding long-chain acyl-CoA synthetase 4, is deleted in a family with Alport syndrome, elliptocytosis, and mental retardation. *Genomics*, 47:350-358.
- Pinton, P., L. Schibler, E. Cribiu, J. Gellin y M. Yerle (2000) Localization of 113 anchor loci in pigs: improvement of the comparative map for humans, pigs and goats. *Mammalian Genome*, 11:306-315.
- Ponsuksili, S., E. Murani, K. Schellander, M. Schwerin y K. Wimmers (2005) Identification of functional candidate genes for body composition by expression analyses and evidencing impact by association analysis and mapping. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1730(1):31-40.
- Quintanilla, R., D. Milan y J.P. Bidanel (2002) A further look at quantitative trait loci affecting growth and fatness in a cross between Meishan and Large White pig population. *Genetics Selection Evolution*, 34(2):193-210.
- Quintanilla, R., O. Demeure, J.P. Bidanel, D. Milan, N. Ianuccelli, Y. Amigues., J. Gruand, C. Renard, C. Chevalet y M. Bonneau (2003) Detection of quantitative trait loci for fat androstenone levels in pigs. *Journal of Animal Science*, 81(2):385-394.
- Rattink, A.P., D.J. De Koning, M. Faivre, B. Harlizius, J.A. van Arendonk y M.A. Groenen (2000) Fine mapping and imprinting analysis for fatness trait QTLs in pigs. *Mammalian Genome*, 11(8):656-661.
- Robic, A., T. Faraut, N. Iannuccelli, Y. Lahbib-Mansais, V. Cantegrel, L. Alexander y D. Milan (2003) A new contribution to the integration of human and porcine

- genome maps: 623 new points of homology. *Cytogenetics and Genome Research*, 102(1-4):100-108.
- Rogel-Gaillard, C., N. Bourgeaux, A. Billault, M. Vaiman y P. Chardon (1999) Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 85(3-4):205-211.
- Rohrer, G.A., L.J. Alexander, J.W. Keeler, T.P. Smith y C.W. Beattie (1994) A microsatellite Linkage Map of the Porcine Genome. *Genetics*, 136:231-245.
- Rohrer, G.A., L.J. Alexander, Z. Hu, T.P. L. Smith, J.W. Keele y C. W. Beattie (1996) A Comprehensive Map of the Porcine Genome. *Genome Research*, 6:371-391.
- Rohrer, G.A. y J. Keele (1998a) Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: I. Fat deposition traits. *Journal of Animal Science*, 76:2247-2254.
- Rohrer, G.A. y J. Keele (1998b) Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: II. Muscling and wholesale product yield traits. *Journal of Animal Science*, 76:2255-2262.
- Rohrer, G.A. (2000) Identification of quantitative trait loci affecting birth characters and accumulation of backfat and weight in a Meishan-White Composite population. *Journal of Animal Science*, 78:2547-2553.
- Rohrer, G., J.E. Beever, M.F. Rothschild, L. Schook, R. Gibbs y G. Weinstock (2003) Porcine Genomic Sequencing Initiative. (<http://www.animalgenome.org/community/PigWhitePaper/PigWhitePaper.html>)
- Ron, M., H. Lewin, Y. Da, M. Band, A. Yanai, Y. Blank, E. Feldmesser y J.I. Weller (1995) Prediction of informativeness for microsatellite markers among progeny of sires used for detection of economic trait loci in dairy cattle. *Animal Genetics*, 26:439-441.
- Ronaghi, M., M. Uhlen y P. Nyren (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, 281(5375):363-365.
- Roorda, B.D., M.K. Hesselink, G. Schaart, E. Moonen-Kornips, P. Martinez-Martinez, M. Losen, M.H. De Baets, R.P. Mensink y P. Schrauwen (2005) DGAT1 overexpression in muscle by in vivo DNA electroporation increases intramyocellular lipid content. *Journal of Lipid Research*, 46(2):230-236.
- Rothschild, M.F. y G.S. Plastow (1999) Advances in pig genomics and industry applications. *AgBiotechNet*, 1:1-7.
- Rothschild, M.F. (2003) Advances in pig genomics and functional gene discovery. *Comparative and Functional Genomics*, 4:266-280.
- Rothschild, M.F. (2004) Porcine genomics delivers new tools and results: this little piggy did more than just go to market. *Genetical Research*, 83(1):1-6.
- Sachidanandam, R., D. Weissman, S.C. Schmidt, J.M. Kakol, L.D. Stein, G. Marth, S. Sherry, J.C. Mullikin, B.J. Mortimore, D.L. Willey, S.E. Hunt *et al.* (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409(6822):928-933.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich y N. Arnheim (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350-1354.
- Saito, S., K. Goto, A. Tonosaki y H. Kondo (1997) Gene Cloning and Characterization of CDP-diacylglycerol Synthase from Rat Brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(14):9503-9509.

- Sato, S., Y. Oyamada, K. Atsuji, T. Nade, S. Sato, E. Kobayashi, T. Mitsuhashi, K. Nirasawa, A. Komatsuda, Y. Saito, S. Terai, T. Hayashi y Y. Sugimoto (2003) Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a Meishan x Duroc F2 resource population. *Journal of Animal Science*, 81(12):2938-2949.
- Serra, X., F. Gil, M. Pérez-Enciso, M. Oliver, J. Vázquez, M. Gispert, I. Díaz, F. Moreno, R. Latorre y J.L. Noguerra (1998) A comparison of carcass, meat quality and histochemical characteristics of Iberian (Guadyerbas line) and Landrace pigs. *Livestock Production Science*, 56:215-223.
- Schook, L.B., J.E. Beever, J. Rogers, S. Humphray, A. Archibald, P. Chardon, D. Milan, G. Rohrer y K. Eversole (2005) Swine Genome Sequencing Consortium (SGSC): a strategic roadmap for sequencing the pig genome. *Comparative and Functional Genomics*, 6:251-255.
- Shen, H., P.N. Heacock, C.J. Clancey y W. Dowhan (1996) The CDS1 Gene Encoding CDP-diacylglucol Synthase In *Saccharomyces cerevisiae* Is Essential for Cell Growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(2):789-795.
- Silió, L. y C. Rodríguez-Valdovinos (2002) Calidad de carne y grasa y selección de cerdos ibéricos. *Albéitar*, 51:6.
- Smith, S.J., S. Cases, D.R. Jensen, H.C. Chen, E. Sande, B. Tow, D.A. Sanan, J. Raber, R.H. Eckel y R.V. Farese Jr (2000) Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nature genetics*, 25:87-90.
- Spelman, R.J., C.A. Ford, P. McElhinney, G.C. Gregory y R.G. Snell (2002) Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. *Journal of Dairy Science*, 85(12):3514-3517.
- Stearns, T.M., J.E. Beever, B.R. Southey, M. Ellis, F.K. McKeith y S.L. Rodríguez-Zas (2005) Evaluation of approaches to detect quantitative trait loci for growth, carcass, and meat quality on swine chromosomes 2, 6, 13, and 18. II. Multivariate and principal component analyses. *Journal of Animal Science*, 83(11):2471-2481.
- Stumpf, M.P. (2002) Haplotype diversity and the block structure of linkage disequilibrium. *Trends in Genetics*, 18(5):226-228.
- Su, Y., Y. Xiong, S. Jiang, Q. Zhang, M. Lei, R. Zheng y C. Deng (2004) Mapping quantitative trait loci for meat quality traits in a Large White x Meishan cross. *Acta Genetica Sinica*, 31(2):132-136.
- Sun, H.S., C.K. Tuggle, A. Goureau, C.J. Fitzsimmons, P. Pinton, P. Chardon y M. Yerle (2002) Precise mapping of breakpoints in conserved synteny between human chromosome 1 and pig chromosomes 4, 6 i 9. *Animal Genetics*, 33:91-96.
- Suzuki, H., Y. Kawarabayasi, J. Kondo, T. Abe, K. Nishikawa, S. Kimura, T. Hashimoto y T. Yamamoto (1990) Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, 265:8681-8685.
- Suzuki, H., M. Watanabe, T. Fujino y T. Yamamoto (1995) Multiple promoters in rat acyl-CoA synthetase gene mediate differential expression of multiple transcripts with 5'-end heterogeneity. *The Journal of Biological Chemistry*, 270:9676-9682.
- Szyda, J., E. Grindflek, Z. Liu y S. Lien (2003) Multivariate mixed inheritance models for QTL detection on porcine chromosome 6. *Genetical Research*, 81(1):65-73.
- Thaller, G., C. Kuhn, A. Winter, G. Ewald, O. Bellmann, J. Wegner, H. Zuhlke H y R. Fries (2003) DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics*, 34(5):354-357.
- Thomsen, H., H.K. Lee, M.F. Rothschild, M. Malek, J.C. y M. Dekkers (2004) Characterization of quantitative trait loci for growth and meat quality in a cross

- between commercial breeds of swine. *Journal of Animal Science*, 82:2213–2228.
- Tibau, J. (1992) Mejora genética de los caracteres productivos en el ganado porcino. *Torcí*, 7:11-21.
- Vance, JE y D.E. Vance (2004) Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochemistry and Cell Biology*, 82:113-128.
- Van Horn, C.G., J.M. Caviglia, L.O. Li, S. Wang, D.A. Granger y R.A. Coleman R.A. (2005) Characterization of recombinant long-chain rat acyl-CoA synthetase isoforms 3 and 6: identification of a novel variant of isoform 6. *Biochemistry*, 8:1635-1642.
- Van Laack, R.L.J.M., S.G. Stevensi y K.J. Stalder (2001) The influence of ultimate pH and intramuscular fat content on pork tenderness and tenderization. *Journal of Animal Science*, 79:392-397.
- Van Laere, A.S., M. Nguyen, M. Braunschweig, C. Nezer, C. Collette, L. Moreau, A.L. Archibald, C.S. Haley, N. Buys, M. Tally, G. Andersson, M. Georges, L. Andersson (2003) A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*, 425:832-836.
- Van Poucke, M., M. Yerle, P. Chardon, K. Jacobs, C. Genet, M. Mattheeuws, A. Van Zeveren, L.J. Peelman (2003) A refined comparative map between porcine chromosome 13 and human chromosome 3. *Cytogenetics and Genome Research*, 102(1-4):133-138.
- Varona, L., C. Óvilo, A. Clop, J.L. Noguera, M. Pérez-Enciso, A. Coll, J.M. Folch, C. Barragán, M.A. Toro, D. Babot y A. Sánchez (2002) QTL mapping for growth and carcass traits in an Iberian by Landrace pig intercross: additive, dominant and epistatic effects. *Genetical Research*, 80:145-154.
- Varona, L., L. Gomez-Raya, W.M. Rauw, J.L. Noguera JL (2005) A simulation study on the detection of causal mutations from F2 experiments. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 122(1):30-6.
- Veerkamp, J.H. y R.G. Maatman (1995) Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. *Progress in Lipid Research*, 34(1):17-52.
- Vidal, O., J.L. Noguera, M. Amills, L. Varona, M. Gil, N. Jiménez, G. Dávalos, J.M. Folch y A. Sánchez (2005) Identification of carcass and meat quality quantitative trait loci in a Landrace pig population selected for growth and leanness. *Journal of Animal Science*, 83:293–300.
- Vitelli, F., I. Meloni, S. Fineschi, F. Favara, C. Tiziana Storlazzi, M. Rocchi y A. Renieri (2000) Identification and characterization of mouse orthologs of the AMMECR1 and FAFL4 genes deleted in AMME syndrome: orthology of Xq22.3 and MmuXF1-F3. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 88:259-263.
- Volta, M., A. Bulfone, C. Gattuso, E. Rossi, M. Mariani, G.G. Consalez, O. Zuffardi, A. Ballabio, S. Banfi y B. Franco (1999) Identification and Characterization of CDS2, a Mammalian Homolog of the *Drosophila* CDP- diacylglycerol Synthase Gene. *Genomics*, 55:68-77.
- Wada, Y., T. Akita, T. Awada, T. Furukawa, N. Sugai, Y. Inage, K. Ishii, Y. Ito, E. Kobayashi, H. Kusumoto, T. Matsumoto, S. Mikawa, M. Miyake, *et al.* (2000) Quantitative trait loci analysis in a Meishan x Göttingen cross population. *Animal Genetics*, 31:376-384.
- Walling, G., A. Archibald, J. Cattermole, A. Downing, H. Finlayson, D. Nicholson, P. Visscher, C. Walker y C. Haley (1998) Mapping of quantitative trait loci on porcine chromosome 4. *Animal Genetics*, 29:415-424.

- Walling, G., P. Visscher, L. Andersson, M. Rothschild, L. Wang, G. Moser, M. Groenen, J. Bidanel, S. Cepica, A. Archibald, H. Geldermann, D.J. de Koning, D. Milan y C. Haley (2000) Combined analyses of data from quantitative trait loci mapping studies. Chromosome 4 effects on porcine growth and fatness. *Genetics*, 155:1369-1378.
- Wang, L., T.P. Yu, H.W. Chung, C.K. Tuggle y M. F. Rothschild (1998) A directed search for quantitative trait loci on chromosome 4 and 7 in the pig. *Journal of Animal Science*, 76:2560-2567.
- Wang, Q., H. Li, N. Li, Z. Gu y Y. Wang (2004) Cloning and characterization of chicken adipocyte fatty acid binding protein gene. *Animal Biotechnology*, 15(2):121-132.
- Wayne, M.L. y L.M. McIntyre (2002) Combining mapping and arraying: An approach to candidate gene identification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23):14903-14906.
- Webb, A.J. (1998) Objectives and Strategies in Pig Improvement: An Applied Perspective. *Journal of Dairy Science*, 81(2):36-46.
- Weeks, R, W. Dowhan, H. Shen, N. Balantac, B. Meengs, E. Nudelman y D.W. Leung (1997) Isolation and expression of an isoform of human CDP-diacylglycerol synthase cDNA. *DNA and Cell Biology*, 16:281-289.
- Weimar, J.D., C.C. DiRusso, R. Delio y P.N. Black (2002) Functional role of fatty acyl-coenzyme A synthetase in the transmembrane movement and activation of exogenous long-chain fatty acids. Amino acid residues within the ATP/AMP signature motif of *Escherichia coli* FadD are required for enzyme activity and fatty acid transport. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:29369-29376.
- Weller, J.I., M. Golik, E. Seroussi, E. Ezra y M. Ron (2003) Population-wide analysis of a QTL affecting milk-fat production in the Israeli Holstein population. *Journal of Dairy Science*, 86(6):2219-2227.
- Wernersson, R., M.H. Schierup, F.G. Jorgensen, J. Gorodkin, F. Panitz, H.H. Staerfeldt, O.F. Christensen, T. Mailund, H. Hornshoj, A. Klein, J. Wang, B. Liu, S. Hu, W. Dong, W. Li, G.K. Wong, J. Yu, et al. (2005) Pigs in sequence space: a 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing. *BMC Genomics*, 6(1):70.
- Wimmers, K., E. Murani, S. Ponsuksili, M. Yerle y K. Schellander (2002) Detection of quantitative trait loci for carcass traits in the pig by using AFLP. *Mammalian Genome*, 13:206-210.
- Winter, A, W. Kramer, F.A. Werner, S. Kollers, S. Kata, G. Durstewitz, J. Buitkamp, J.E. Womack, G. Thaller y R. Fries (2002) Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14):9300-9305.
- Wu, L., B. Niemeyer, N. Colley, M. Socolich y C.S. Zuker (1995) Regulation of PLC-mediated signalling in vivo by CDP-diacylglycerol synthase. *Nature*, 373:216-222.
- Yerle, M., P. Pinton, A. Robic, A. Alfonso, Y. Palvadeau, C. Delcros, R. Hawken, L. Alexander, C. Beattie, L. Schook, D. Milan y J. Gellin (1998) Construction of a

- whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 82(3-4):182-188.
- Yerle, M., P. Pinton, C. Delcros, N. Arnal, D. Milan y A. Robic (2002) Generation and characterization of a 12,000-rad radiation hybrid pannel for fine mapping in pigs. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 97(3-4):219-228.
- Yu, T., L. Wang, C. Tuggle, C. Schmitz y M.F. Rothschild. (1995) Association of PIT1 Polymorphism with Growth and carcass traits in Pigs. *Journal of Animal Science*, 73:1282-1288.
- Yue, G., A. Stratil, M. Kopecny, D. Schröffelova, J. Schröffel Jr., J. Hojny, S Cepica, R. Davoli, P. Zambonelli y C. Brunsch (2003a) Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 6. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(1):45-55.
- Yue, G., V. Russo, R. Davoli, I. Sternstein, C. Brunsch, D. Schroffelova, A. Stratil, G. Moser, H. Bartenschlager y G. Reiner (2003b) Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 13. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(1):103-110.
- Yue, G., A. Stratil, S. Cepica, J. Schröffel Jr., D. Schröffelova, L. Fontanesi, M. Cagnazzo, G. Moser, H. Bartenschlager y G. Rei (2003c) Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 7. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(1):56-65.
- Zhao, H., M.F. Rothschild, R.L. Fernando y J.C. Dekkers (2003) Tests of candidate genes in breed cross populations for QTL mapping in livestock. *Mammalian Genome*, 14(7):472-482.
- Zimmerman, A.W. y J.H. Veerkamp (2002) New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59:1096-1116.

# **ANEXO 1**

### Marcadores excluidos del análisis de QTL por su baja informatividad o dificultad de amplificación

| Cr.   | Marcador | Cr. | Marcador |
|-------|----------|-----|----------|
|       | S0307    |     | DG33     |
|       | SW1883   |     | SW763    |
| 2     | SW2167   | 8   | SW1085   |
|       | SW2134   |     | SW1337   |
|       | SW2442   |     | SW1679   |
|       | S0023    |     | SW2160   |
| 4     | SW2435   |     | SW864    |
|       | SW252    | 13  | SW1378   |
| SW352 | SW1691   |     |          |
| 7     | SW472    |     | S0218    |
|       | SW859    |     | SW1426   |
|       | SW1409   | X   | SW1903   |
|       | SW1856   |     | SW2588   |
|       | SW2428   |     | SWr1861  |
|       |          |     |          |

Cr.: cromosoma

### Marcadores genotipados en la F<sub>3</sub> y RC

| Cr. | Marcador      | Secuencia de los cebadores 5' →<br>3'              | I <sub>e</sub> | Tamaño alelos<br>(pb) | Núm.<br>alelos |
|-----|---------------|--|----------------|-----------------------|----------------|
| 4   | <i>α-FABP</i> | GGTACTTTCTGATCTAATGGTG<br>GGGAACCTTGAAGTCTTTCTC    | 0,77           | 249-252               | 9              |
|     | <i>S0001</i>  | TGGATGGGTCTCATTCTCAG<br>TGATTCCTAGCCTGAGAAGC       | 0,90           | 182-196               | 5              |
|     | <i>S0073</i>  | ACTGAAACAGGAATTCAGATCC<br>TGAAGTATTATGGCATCATGGA   | 0,87           | 102-111               | 7              |
|     | <i>S0097</i>  | GACCTATCTAATGTCATTATAGT<br>TTCCTCCTAGAGTTGACAAACTT | 0,85           | 204-242               | 11             |
|     | <i>S0214</i>  | CCCTGCAAGCGTTCATCTCA<br>GGCTGTGCCAAGTCCATTAG       | 0,98           | 123-134               | 5              |
|     | <i>S0301</i>  | CCGTCTTACTTAGGATGTTT<br>TGATGTGTTTATGTGTTTGA       | 0,83           | 250-263               | 8              |
|     | <i>SW2404</i> | TGACAGCCTCCTGGTTCC<br>AGCTGTCGTTGTTTTCTCTCC        | 0,71           | 127-175               | 5              |
|     | <i>SW317</i>  | GGGATGCTAAAGTTGGAGGG<br>TTAGTGTCTGGCAAGGAG         | 0,60           | 154-166               | 5              |
|     | <i>SW35</i>   | TCAAGTTGGAGAGTCTGAGGC<br>AAGACTGCCCAACCAATGAG      | 1,00           | 136-142               | 5              |



|   |                |   |      |         |    |
|---|----------------|---|------|---------|----|
|   | <i>SW445</i>   | CCTCCCTGGCACTCATTG<br>CACACACACAAGCAGGTGC                               | 1,00 | 183-206 | 6  |
|   | <i>SW524</i>   | ACCAGGTTGAGTCACATCTGC<br>AGGTCTGGTACCCGTCCTG                            | 0,80 | 147-213 | 4  |
|   | <i>SW58</i>    | TCCTACCAGAAATCCTACCACA<br>ATGGGAAGAGAATCTGACAAGG                        | 0,87 | 205-219 | 6  |
|   | <i>SW839</i>   | GGAAACCAGGATAACAGGAGG<br>TAACCCACTGTACCACCAAGG                          | 1,00 | 143-171 | 4  |
| 8 | <i>S0017</i>   | CTAGGAGAAAATCTGAGGTT<br>GTTTGAATGGAGGTGCTGTA                            | 0,98 | 161-174 | 5  |
|   | <i>S0069</i>   | TGCAAAACTAATGTTTGTGTTGCC<br>CATATGCCACAGGTGTGACCTAAA                    | 0,53 | 160-175 | 7  |
|   | <i>S0144</i>   | ATTAGAGCCACCTGAAGGCT<br>CGTTGGTCGGCAGCTATAGC                            | 0,83 | 209-216 | 6  |
|   | <i>S0225</i>   | GCTAATGCCAGAGAAATGCAGA<br>CAGGTGGAAAGAATGGAATGAA                        | 0,81 | 168-185 | 4  |
|   | <i>SW2410</i>  | ATTTGCCCCCAAGGTATTTT<br>CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG                            | 1,00 | 105-120 | 5  |
|   | <i>SW61</i>    | GAGAGGGATGAGCACTCTGG<br>AGAGCATTCCAGGCTTCTCA                            | 1,00 | 237-265 | 10 |
|   | <i>SW905</i>   | ATCCCAACCTTCTTTCAAAGG<br>TCCAGTGGCAGAACAACATG                           | 0,63 | 130-146 | 5  |
|   | <i>SWr1101</i> | AACTTCCATATGCCACAGGTG<br>GGTCCTCCTCAGAAAGTCCC<br>TGGAACATGATGGAGGATAATG | 1,00 | 118-170 | 9  |
| X | <i>SW1608</i>  | CTAATGTTGACTTGATTAATGGGC<br>TGAAGCTTCTACTTAAGGAAGAATC                   | 0,90 | 122-136 | 6  |
|   | <i>SW1943</i>  | ATCCCCTTGACACATTAATGG<br>TATGGCTGAGTAGTATTCCATTTTG                      | 0,77 | 98-104  | 5  |
|   | <i>SW2059</i>  | GCTGTCTGGCTTTGGACAG<br>ACTAAGTTCAGGCACTCAGAC                            | 1,00 | 172-186 | 6  |
|   | <i>SW2126</i>  | CCTAAATGTCCATCTATAAATGAATGAC<br>CATTATTTTGTCTTTTTAATAGCTGAG             | 0,65 | 134-152 | 7  |
|   | <i>SW2456</i>  | GAGCAACCTTGAGCTGGAAC<br>AATGTGATTGATGCTGTGAAGC                          | 0,95 | 186-208 | 6  |
|   | <i>SW2470</i>  | TAGTACCTAGGCTTCCCCAGG<br>CTTTGTCTCTCCCTCTCCATAC                         | 0,73 | 162-170 | 6  |
|   | <i>SW2476</i>  | GAGAGGGACAGAGCTGAGAGC<br>CTTGAGGTTTGATGGCACG                            | 0,85 | 91-101  | 5  |
|   | <i>SW949</i>   | TGAGCAATGAGTTCAATGCC<br>TCGTTGGTGAAGGCATCC                              | 1,00 | 181-206 | 6  |

Cr.: cromosoma; Ie: informatividad; Núm alelos: número de alelos del marcador

## **ANEXO 2**

***Effect of the porcine IGF2-intron3-G3072A substitution in an outbred Large White population and in an Iberian by Landrace***

J. Estellé, A. Mercadé, J. L. Noguera, M. Pérez-Enciso, C. Óvilo, A. Sánchez, J. M. Folch

*Journal of Animal Science* (2005) 83(12):2723-2728

## **ANEXO 3**

**Alineamiento de la región homóloga de 374 aa de los genes *CDS1* y *CDS2* de diferentes especies mediante el programa *Clustal X***



