

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
Facultat de Veterinària

**DETECCIÓ DE QTLs D'INTERÈS  
ECONÒMIC EN UN ENCREUAMENT  
EXPERIMENTAL DE TIPUS F<sub>2</sub> ENTRE  
PORC IBÈRIC I LANDRACE**



Porc de Bronze 'La Tene'

**TESI DOCTORAL**

**ALEX CLOP I PONTE**

Bellaterra (Barcelona), octubre 2001

*Aquesta Tesi ha estat fruit de la col.laboració de moltes persones. Sense l'aportació d'alguna d'elles no haguera estat possible, o si més no fora set difícil que en algun moment es podessin llegir aquestes línies.*

*En primer lloc, al Dr. Armand Sànchez i Bonastre i a la Dra. Agustina Coll i Cerdà, per la seva tenacitat i el seu suport científic en la direcció de la Tesi i de la meva formació científica.*

*Al Marcel, en Josep Maria i l'Olga, pel seu consell científic i en la redacció dels diversos manuscrits realitzats arran d'aquest projecte.*

*A la Laura, la Natàlia, la dolça Neus i la Romi, amb qui vaig compartir els primers anys de Tesi i d'espai al departament i a qui guardo especial record.*

*A l'Anna, l'Albert, l'Elisenda i per haver col.laborat directament en part del treball experimental presentat en la Tesi.*

*A l'Alhelí, en Habib, la Maria, l'Oriol, l'Oscar i en Guillermo amb qui he compartit els últims però especialment intensos mesos de la Tesi.*

*A la Betlem i la Maria del Mar per haver-me ajudat inestimablement en el manteniment i subministrament del material de laboratori.*

*A la resta de membres que han format part del meu àmbit quotidià durant els darrers cinc anys: Jesús, Jordi, Atilio, Elisabeth i Naema.*

*A membres d'altres departaments que m'han ajudat en la comprensió i l'evolució científica en àrees paral·leles a la meua, Luís Varona, Miguel Pérez-Enciso, José Luís Noguera, Luís Silió, Miguel Angel Toro, Cristina Ovilo i la M<sup>o</sup> Carmen Rodríguez,*

*A la resta de persones que si bé no formeu part dels anomenats, esteu dins de la universitat, i heu estat una part important de la meua vida durant aquest període. Els implicats ja sabreu que hem refereixo a vosaltres.*

*Als meus pares, com no, per TOT.*

*Als meus germans i a tota la meua família en general perquè us ha tocat de prop.*

*Al Dr. Leif Andersson (Department of Animal Science and Genetics, de la Universitat d'Uppsala) per haver-me acollit en dues ocasions al seu laboratori.*

*Aquesta Tesi ha estat possible gràcies a una beca de formació d'investigadors de la UAB. El treball ha estat finançat per la CICYT (AGF96-2510).*

# INDEX

1. INTRODUCCIO	
1.1 LA MILLORA GENETICA EN PORCI	1
1.2 CARACTERS DE QUALITAT DE CARN I DE CANAL EN PORCI	3
1.2.1 <u>Definició i caràcters relacionats</u>	3
1.2.2 <u>Heretabilitat</u>	4
1.2.3 <u>Correlacions genètiques</u>	5
1.2.4 <u>Consanguinitat</u>	6
1.2.5 <u>Gens majors i qualitat de la carn en porcí</u>	6
1.2.5.1 GEN RYRI	7
1.2.5.2 GEN RN	7
1.2.6 <u>Influència de la raça porc Ibèric versus Landrace) sobre la qualitat de la canal i de la carn</u>	8
1.3 CONSTRUCCIO DE MAPES FISICS I GENETICS EN PORCI	9
1.3.1 <u>Mapes Físics</u>	10
1.3.2 <u>Mapes Genètics o de lLigament</u>	12
1.3.2.1 <i>Marcadors Genètics</i>	13
1.3.2.1.1 Polimorfismes bioquímics	14
1.3.2.1.2 RFLP ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )	14
1.3.2.1.3 RAPD ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> )	15
1.3.2.1.4 AFLP ( <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> )	15
1.3.2.1.5 RDA ( <i>Representational Difference Analysis</i> )	15
1.3.2.1.6 VNTR ( <i>Variable Number Tandem Repeat</i> )	16
1.3.2.1.7 SSCP ( <i>Single Strand Conformational Polymorphism</i> )	17
1.3.2.1.8 DGGE ( <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> )	17
1.3.2.1.9 SNP ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )	17
1.3.2.2 <i>Pedigrees familiars</i>	19
1.3.2.3 <i>El mapa genètic porcí</i>	19
1.3.2.3.1 PiGMaP	20
1.3.2.3.2 NORDIC	20
1.3.2.3.3 USDA-MARC	21
1.4 DETECCIO I LOCALITZACIO DE QTLs	22
1.4.1 <u>Disenys experimentals</u>	23
1.4.2 <u>Mètodes estadístics per al mapeig de QTLs</u>	24

1.4.2.1 <i>Aproximació amb un sol marcador</i>	24
1.4.2.2 <i>Interval Mapping</i>	24
1.4.2.3 <i>Regressió amb múltiples marcadors-Mínims quadrats</i>	24
1.4.3 <b><u>QTLs detectats en porcí</u></b>	25
1.4.3.1 <i>Caràcters de qualitat de la canal</i>	25
1.4.3.2 <i>Caràcters de qualitat de la carn</i>	27
1.4.4 <b><u>Identificació de gens associats als QTLs</u></b>	28
1.4.4.1 <i>Aproximacions per a la identificació de gens</i>	29
1.4.4.1.1 <b>Positional Cloning</b>	29
1.4.4.1.2 <b>Gens candidats</b>	29
1.4.4.1.3 <b>Gens candidats per posició</b>	29
1.4.4.2 <i>Gens candidats detectats en porcí</i>	30
1.5 DNA MITOCONDRIAL	32
<b>2. OBJECTIUS</b>	
<b>3. MATERIAL I METODES</b>	
3.1 MATERIAL ANIMAL	36
3.2 CARACTERS FENOTÍPICS	40
3.2.1 <b><u>Caràcters enregistrats</u></b>	40
3.2.1.1 <i>Mesures de qualitat de la canal</i>	40
3.2.1.2 <i>Mesures de qualitat de la carn</i>	40
3.2.1.3 <i>Mesures de qualitat del greix (mesurada per cromatografia de gasos)</i>	41
3.2.2 <b><u>Registres fenotípics obtinguts</u></b>	41
3.3 ANALISI DELS MICROSATEL·LITS	42
3.3.1 <b><u>Extracció de DNA</u></b>	42
3.3.2 <b><u>Microsatèl·lits</u></b>	44
3.3.3 <b><u>Reaccions d'amplificació</u></b>	48
3.3.4 <b><u>Anàlisi dels productes de PCR</u></b>	51
3.3.5 <b><u>Informativitat i variabilitat dels marcadors</u></b>	53
3.4 REALITZACIO DELS MAPES DE L·LIGAMENT	53
3.5 RECERCA DE QTLs	54
3.5.1 <b><u>Anàlisi de regressió</u></b>	54
3.5.1.1 <i>Regressió lineal directament sobre el QTL</i>	55
3.5.1.2 <i>Regressió lineal amb un sol marcador</i>	55

3.5.1.3 <i>Regressió lineal amb marcadors flanquejants</i>	56
3.5.2 <i><u>Llindars de significació cromosòmic i genòmic</u></i>	57
3.5.3 <i><u>Intervals de confiança</u></i>	57
3.6 GENS CANDIDATS: ANALISI DE POLIMORFISMES I LOCALITZACIO CROMOSOMICA DEL GEN DE LA 2,4-DIENOIL COENZIM A REDUCTASA ( <i>DECR</i> )	57
3.6.1 <i><u>Diseny de primers per a la detecció de polimorfismes</u></i>	58
3.6.2 <i><u>Detecció de polimorfismes</u></i>	58
3.6.3 <i><u>Genotipat del gen <i>DECR</i></u></i>	58
3.6.4 <i><u>Localització cromosòmica</u></i>	60
3.7 ESTUDI DE L'HAPLOTIP DE DNA MITOCONDRIAL EN UNA REGIO DEL CITOCROM B ( <i>CytB</i> ) PORCI	60
<b>4. RESULTATS</b>	
4.1 INFORMATIVITAT DELS MARCADORS MOLECULARS	64
4.1.1 <i><u>Index de Ron</u></i>	64
4.1.2 <i><u>Contingut informatiu a la <math>F_2</math> (IC)</u></i>	64
4.1.3 <i><u>Heterozigositat en la <math>F_1</math></u></i>	65
4.1.4 <i><u>Nombre d'al·lels</u></i>	66
4.2 MAPES DE LLIGAMENT	69
4.3 DETECCIO DE QTLs	70
4.3.1 <i><u>Cromosoma 1</u></i>	70
4.3.2 <i><u>Cromosoma 2</u></i>	71
4.3.3 <i><u>Cromosoma 3</u></i>	72
4.3.4 <i><u>Cromosoma 4</u></i>	72
4.3.5 <i><u>Cromosoma 7</u></i>	74
4.3.6 <i><u>Cromosoma 8</u></i>	76
4.3.7 <i><u>Cromosoma 9</u></i>	77
4.3.8 <i><u>Cromosoma 13</u></i>	77
4.3.9 <i><u>Cromosoma 16</u></i>	77
4.3.10 <i><u>Cromosoma 17</u></i>	77
4.4 POLIMORFISME PCR-RFLP DEL GEN <i>DECR</i>	78
4.5 HAPLOTIP AL CITOCROM B MITOCONDRIAL PORCI	79
<b>5. DISCUSSIO</b>	

5.1 MATERIAL ANIMAL	81
5.2 MARCADORS MOLECULARS	82
5.3 MAPA DE LLIGAMENT	83
5.4 DETECCIO DE QTLs	85
5.4.1 <i><u>QTLs detectats al cromosoma 1</u></i>	85
5.4.2 <i><u>QTLs detectats al cromosoma 2</u></i>	86
5.4.3 <i><u>QTLs detectats al cromosoma 3</u></i>	88
5.4.4 <i><u>QTLs detectats al cromosoma 4</u></i>	89
5.4.5 <i><u>QTLs detectats al cromosoma 7</u></i>	98
5.4.6 <i><u>QTLs detectats al cromosoma 8</u></i>	102
5.4.7 <i><u>QTLs detectats al cromosoma 13</u></i>	104
5.5 ANALISI DEL POLIMORFISME EN UN HAPLOTIP MITOCONDRIAL	105
5.6 GENS CANDIDATS	106
5.6.1 <i><u>Gens mapejats en porcí</u></i>	107
5.6.1.1 <i>Cromosoma 2</i>	107
5.6.1.2 <i>Cromosoma 4</i>	108
5.6.1.3 <i>Cromosoma 7</i>	109
5.6.1.4 <i>Cromosoma 8</i>	110
5.6.2 <i><u>Mapeig comparatiu</u></i>	110
6. CONCLUSIONS	115
7. RESUM	118
8. SUMMARY	122
9. REFERENCIES BIBLIOGRAFiques	126
10. ANNEXES	
10.1 ANNEX 1	146
10.2 ANNEX 2	156
10.3 ANNEX 3	189
10.4 ANNEX 4	202
10.5 ANNEX 5	209
10.6 ANNEX 6	215



# **INDEX DE TAULES I FIGURES**

**TAULES**

1.1 Projectes de detecció de QTLs en porcí amb articles publicats.	28
3.1 Mitja de la raça en els caràcters amb diferències significatives (Serra <i>et al.</i> , 1998).	38
3.2 Registres fenotípics dels caràcters que posseeixen algun QTL descrit a la present tesi.	42
3.3 Microsatèl·lits seleccionats per a realitzar el mapa de lligament.	46
3.4 Estructura dels 10 sets de microsatèl·lits.	50
3.5 Genotip esperat del QTL segons el genotip del marcador i el valor fenotípic del genotip del marcador.	56
4.1 Resultats de la informativitat i del polimorfisme dels marcadors analitzats en aquesta tesi.	67
4.2 Característiques del mapa genètic IBMAP especificades per cromosomes.	69
4.3. Valors de significació de F per cromosomes.	70
4.4 QTLs detectats al cromosoma 1.	71
4.5 QTLs detectats al cromosoma 2.	72
4.6 QTLs detectats al cromosoma 4, exceptuant els relatius a àcids grassos.	72
4.7 QTLs detectats al cromosoma 7.	76
4.8 QTLs detectats al cromosoma 8, exceptuant els relatius a àcids grassos.	77
4.9 Freqüències al·leliques en les tres generacions analitzades per a la realització del mapa de lligament.	79
4.10 Nombre d'animals per haplotip del <i>Cyt B</i> distribuït per races.	80
5.1 Correlació entre les quatre mesures d'informativitat dels marcadors analitzats.	82
5.2 Publicacions que descriuen QTLs de caràcters productius en el cromosoma 2 porcí.	88
5.3 Publicacions que descriuen QTLs productius al cromosoma 4 porcí.	98
5.4 Publicacions que descriuen QTLs productius al cromosoma 7 porcí.	101

**FIGURES**

3.1 Porc Ibèric de l'estirp Guadyerbas.	36
3.2 Truja Landrace.	37
3.3 Electroferograma obtingut amb el <i>GeneScan Analysis Software</i> corresponent al set I de microsatèl·lits.	52
3.4 Electroferograma obtingut en el <i>GeneScan Analysis Software</i> mitjançant el mètode <i>Primer Extension Analysis</i> de <i>Applied Biosystems</i> .	60
3.5 Descripció del procés de piroseqüenciació pel qual es produeix bioluminiscència.	62
3.6 Gràfic de piroseqüenciació.	62
3.7 Producte obtingut amb la piroseqüenciació.	63
3.8 Haplotips possibles en la combinació dels 4 SNPs de la seqüència obtinguda per piroseqüenciació.	63
4.1 Histograma dels valors de $Ie_{15}$ i $Ie_{29}$ en els 60 microsatèl·lits de l'estudi.	64
4.2 Histograma dels valors de IC en els 60 microsatèl·lits de l'estudi.	65
4.3 Histograma dels valors de H en els 60 microsatèl·lits de l'estudi.	65
4.4 Histograma dels valors del nombre d'al·lels en els 60 microsatèl·lits de l'estudi.	66
4.5 QTLs amb F significativa detectats en el cromosoma 2.	71
4.6 QTLs per a caràcters de deposició de greix detectats al cromosoma 4.	73
4.7 QTLs de longitud de la canal, color i pigmentació de la carn detectats al cromosoma 4.	73
4.8 QTL de concentració d'hematina en el múscul <i>Longissimus</i> detectat al cromosoma 7.	75
5.1 Interval de confiança dels QTLs detectats al cromosoma 4.	94
5.2 Mapes comparatius humà-porc dels cromosomes porcins 2, 4, 7 i 8.	111

# **INTRODUCCIO**

## 1.1 LA MILLORA GENETICA EN PORCI

El procés de domesticació del porc es va iniciar a partir del porc senglar, fa uns 9.000 anys al Pròxim Orient. Des d'ençà, i durant segles, es van fer encreuaments entre els animals més productius o de millor conformació i fàcil maneig. Així, de forma inconscient, començà el procés de selecció i millora genètica. Cap al segle XVIII comença a aparèixer el concepte de raça, tal com el definim actualment, en els animals domèstics de la societat industrial del Regne Unit. A partir d'aquest moment, i gràcies a la creació de societats de criadors en el segle XIX, es pot parlar del concepte de millora genètica a l'espècie porcina. Actualment, l'estructura bàsica de la millora genètica està basada en una organització piramidal composta per tres estrats. El primer d'ells és l'anomenat "nucli", on es produeix la selecció genètica obtenint-se els animals milloradors. En el segon estrat, al que s'anomena "multiplicador", es realitzen encreuaments entre diferents línies seleccionades que es complementen per a augmentar la qualitat dels animals resultants. L'últim estrat, anomenat "productor", que correspon la base de la piràmide, està constituït pels individus procedents dels dos estrats anteriors i que són destinats al sacrifici. És important destacar que els programes de millora genètica han accelerat molt el progrés genètic anual en l'última dècada, gràcies a la generalització de l'ús de la inseminació artificial. Els objectius d'un programa de selecció són de tipus productiu i econòmic, i és necessari seleccionar-los a la vegada, ponderant la importància econòmica dels caràcters productius, per així evitar la pèrdua de valor genètic degut a l'existència de correlacions negatives entre diferents objectius. Així, la millora genètica és, en realitat, la millora d'una selecció de caràcters. Segons Ollivier *et al.* (1990), els objectius productius de major interès l'any 1980 eren millorar l'índex de conversió dels aliments i el contingut magre així com la velocitat de creixement. No obstant, l'any 1990, prengueren més importància els caràcters de qualitat de la carn, en detriment dels caràcters de conformació de la canal. Avui en dia, els objectius de selecció es proposen millorar la qualitat de la carn i del greix de la canal.

Durant les darreres dècades, el mètode més aplicat en millora genètica animal és un model que utilitza la metodologia probabilística BLUP (*Best Linear Unbiased Prediction*) per realitzar l'avaluació del valor genètic dels animals. Aquest rep el nom de model animal. El mètode BLUP es basa en l'aplicació del model lineal mixt, que considera tant efectes fixes com efectes aleatoris. El model animal permet combinar diferents tipus d'informació, com la

d'un propi individu, la dels animals emparentats i fins i tot, la combinació de varis paràmetres productius per establir el seu valor millorant. Però, a finals dels anys 80 millora la construcció dels mapes genètics i la densitat de marcadors moleculars augmenta notablement. Això permet avançar en el posicionament de gens i de marcadors estretament lligats a ells, de manera que es poden utilitzar pels programes de millora genètica seleccionant els animals que presentin els al·lels d'interès i eliminant els d'al·lels desfavorables en la població (Visscher i Haley, 1995). Aquesta tècnica de selecció mitjançant l'ús de marcadors moleculars és el que es coneix com selecció assistida per marcadors (M.A.S.) (Lande i Thompson, 1990). Per exemple, per diagnosticar la presència de l'al·lel *Hal'* en el gen de l'halotà es van utilitzar, a la dècada dels vuitanta, els marcadors bioquímics Phi, Pgd i Po2 (Gahne *et al.*, 1985). M.A.S. és especialment atractiva per a caràcters amb heretabilitat baixa o que només es poden mesurar en alguns animals de la població, ja que el genotipat del marcador molecular es pot aplicar en tots els animals i sense la necessitat d'adoptar mesures fenotípiques. Exemples d'aquests caràcters serien la prolificitat, només quantificable en un sexe, o caràcters reproductius, que només són mesurables en edats avançades. Aplicant M.A.S. s'augmenta per tant la intensitat de selecció, a la vegada que es redueix l'interval generacional al no haver d'esperar a poder recollir els registres fenotípics i es redueixen els costos del programa de millora. La selecció assistida per marcadors, no obstant, té com a desavantatge la disminució en l'efectivitat de la selecció en el temps, degut a la pèrdua natural del desequilibri de lligament entre el marcador i el propi gen estructural amb el pas de les generacions. Per solucionar aquest problema s'ha proposat la selecció de marcadors lligats alternatius que encara no hagin estat fixats. La genètica molecular pot ser de gran utilitat per a programes de introgressió genètica (M.A.I.), en els que s'introdueix un al·lel beneficiós en una població que està mancada d'ell. Al introduir aquest al·lel mitjançant un encreuament amb animals d'una altra població, s'introdueixen a la vegada al·lels d'altres loci que poden ser negatius pels objectius de millora. Per solucionar aquest problema es poden genotipar els animals per a marcadors distribuïts en tot el genoma. Així, es podrien dirigir millor els encreuaments, escalonats en varis retrocreuaments, de manera que es guanyés el màxim progrés genètic possible. Aquesta mateixa aproximació pot ser aplicada a programes de conservació de races en perill d'extinció o fins i tot ja extingides si es disposa d'un banc de gamets.

El futur de la millora genètica passarà, probablement, pel desenvolupament de models mixtes que integrin el mètode BLUP i la selecció assistida per marcadors moleculars. És

necessari també avançar en el coneixement de la fisiologia i de les interaccions entre els gens i amb l'ambient.

## 1.2 CARACTERS DE QUALITAT DE CARN I DE CANAL EN PORCI

### 1.2.1 Definició i caràcters relacionats

La qualitat de la canal es considera com un conjunt de caràcters de conformació corporal i de composició de la canal. Així, són importants el rendiment de la canal (la relació entre el pes viu i el pes de la canal), el pes i la longitud de la canal, el percentatge de teixit magre, l'estat d'engreixament (generalment mesurat en l'animal viu amb aparells d'ultrasons) i algunes mesures musculars (l'àrea del llom, el pes del pernil, etc...). La qualitat de la carn en canvi, és un terme de difícil definició. Aquest concepte engloba l'aptitud organolèptica o sensorial de la carn així com la seva aptitud tecnològica. L'aptitud organolèptica de la carn depèn de la seva aparença visual (color, aspecte marmorat, etc...), la tendresa i "sucositat" del seu greix intramuscular així com el *flavour* (mescla de sabor i d'olor) de la carn. L'aptitud tecnològica de la carn està relacionada amb la seva capacitat de retenció d'aigua, la seva intensitat i homogeneïtat de color i la seva fermesa, entre d'altres paràmetres. La majoria d'aquests caràcters estan altament correlacionats amb el pH post-mortem. El  $pH_1$ , que és el pH adquirit als 45-60 minuts del sacrifici, i el  $pH_u$ , que és l'adquirit a les 24 hores de la mort. Així, per exemple, la carn PSE, amb poca capacitat de retenció d'aigua, tova, poc ferma i d'un color molt pàl·lid, es caracteritza i es pot reconèixer per un  $pH_1$  inferior a 5,9-6,1. La carn DFD, que es reconeix per la seva obscuritat, rigidesa i sequedat, té un  $pH_u$  per sobre de 6,0-6,2. Finalment, la "carn àcida", que té un aspecte pàl·lid, poca capacitat de retenció d'aigua, i poca aptitud tecnològica, té un  $pH_u$  inferior a 5,4-5,5. Tant la carn PSE com la carn àcida són característiques amb una forta base genètica, mentre que la carn DFD apareix únicament en determinades condicions ambientals.

Actualment està guanyant molta importància la qualitat del greix i de les fibres musculars. La qualitat del greix es centra en la consistència del teixit adipós, i aquesta depèn de la composició en àcids grassos. Com més insaturats siguin els àcids grassos, més tou serà el greix que els conté, tenint més risc de patir oxidació. Així, dins d'uns límits, la qualitat del teixit adipós serà més alta quan major sigui la seva fermesa, o el que és el mateix, el seu percentatge en àcids grassos saturats.

La qualitat histològica de la carn es centra en la relació percentual entre fibres oxidatives i glicolítiques i el diàmetre de cadascun dels tipus, estimant-se el nivell glicolític del múscul. És sabut que les races amb major velocitat de creixement i percentatge de magre tenen un múscul més glicolític que els animals de poblacions rústiques. Es defineixen quatre tipus de fibres musculars: les de tipus I, de metabolisme oxidatiu, i les de tipus IIA de metabolisme mixt oxidatiu-glicolític, i IIB, de metabolisme glicolític i creixement més ràpid. Per últim, existeix un tipus de fibra muscular coneguda com IIBoxi de característiques histològiques similars a las fibres IIB, amb un metabolisme oxidatiu més similar a les fibres IIA (Gil *et al.*, 2001).

### 1.2.2 Heretabilitat

Es defineix com la proporció de la variació fenotípica d'un caràcter que pot atribuir-se a la variació genètica additiva. L'heretabilitat ( $h^2$ ) d'un caràcter és la mesura que indica el grau de semblança fenotípica entre dos generacions diferents d'una mateixa població. Es una mesura important, degut a que indica el grau de millora o progrés genètic que es pot aconseguir per aquell caràcter i en aquesta població i sense conèixer cap dels gens implicats. En general, l'heretabilitat d'un caràcter és diferent en cada població i en cada ambient, i per tant no se la pot extrapolar a d'altres estudis.

No obstant i establint uns valors mitjos, els caràcters de qualitat de canal tenen una  $h^2$ , generalment, entre moderada i alta. Així, el rendiment de la canal té una heretabilitat propera a 0,35, la longitud de la canal s'aproxima a una heretabilitat de 0,6 i la profunditat del greix dorsal i el percentatge de magre disposen de  $h^2$  al voltant de 0,5. Els caràcters relacionats amb qualitat de carn tenen heretabilitats entre moderades i baixes (entre 0,1 i 0,3). La tendresa de la carn està al voltant de 0,3 unitats d'heretabilitat i la "sucositat" i el *flavour* disminueixen fins el 0,1. El color de la carn té una heretabilitat del 0,3. Una excepció afecta al percentatge de greix intramuscular, amb una  $h^2$  propera a 0,5. La fermesa del greix subcutani té una heretabilitat considerada entre moderada i alta i que es troba entre 0,35-0,65 (Rothschild i Ruvinsky, 1998).



### 1.2.3 Correlacions genètiques

Es defineix com a coeficient de correlació ( $r_{xy}$ ) a la mesura estadística del grau d'associació (positiva o negativa) entre dos caràcters (x i y). Es a dir, que és la repercussió de la variació en el valor d'un caràcter sobre el valor que adquireix un altre caràcter. Cal tenir en compte que  $r_{xy}$  pot variar entre poblacions i estudis.

La correlació genètica és un concepte important en millora genètica ja que indica quins caràcters fenotípics són els més indicats per estimar els valors d'altres caràcters i a més permet valorar els efectes produïts sobre d'altres caràcters quan es selecciona i es millora per a un efecte concret.

La correlació entre l'espessor del greix dorsal mesurada en l'animal viu amb ultrasons i el percentatge de magre s'acosta a -0,8. A la vegada es correlaciona positivament el percentatge de magre amb la longitud de la canal. Així, és possible estimar el tant per cent de magre en un animal viu.

Com es mencionava anteriorment, el  $pH_u$  té un correlació molt elevada amb els caràcters de qualitat de carn i també de greix. Es correlaciona amb el potencial glicolític de la carn, que és el responsable de les anomenades carns àcides, amb elevada incidència en la raça Hampshire i molt relacionada amb el rendiment tecnològic Napole, indicant la pèrdua de pes del pernil en ser cuit. L'oreig de la canal té una alta correlació amb  $pH_u$  i  $pH_1$  (De Vries, 1994), a més de correlacionar-se amb el diàmetre de las fibres musculars (Dietl, 1993). L'acceptabilitat sensorial en panells de consumidors es veu altament correlacionada també amb el  $pH_u$ . Per últim, la tendresa també es veu afectada pel  $pH_u$  així com pel percentatge de greix intramuscular. El múscul esquelètic que posseeix un metabolisme majoritàriament oxidatiu (major proporció i calibre de les fibres oxidatives) tendeix a mostrar un major contingut de greix intramuscular i una menor humitat que el múscul amb major presència de fibres glicolítiques (Cameron, 1993). Tanmateix, els animals de creixement ràpid i canals més magres posseeixen un major percentatge de fibres IIB, de metabolisme glicolític i creixement ràpid.

Com ja s'ha esmentat anteriorment, la fermesa del greix subcutani, així com la seva tendència a l'oxidació estan altament correlacionades amb la composició en àcids grassos (Cameron *et al.*, 1990). Quan major sigui el grau d'insaturació d'un àcid gras, més tou serà el teixit adipós en el que s'emmagatzema i major risc d'oxidació presentarà. Així doncs, resulta important tenir un greix subcutani amb un alt contingut en àcids grassos saturats i monoinsaturats.

Les canals d'alt espessor de greix subcutani s'associen a un contingut relativament baix d'àcids grassos essencials (Sellier i Monin, 1994), és a dir, d'àcid linoleic (C18:2) i linolènic (C18:3). Això és degut a que provenen d'animals amb molta capacitat per sintetitzar àcids grassos, de manera que la proporció dels essencials es dilueix. Com l'àcid linoleic és poliinsaturat, es correlaciona negativament amb la fermesa del greix i per tant, una canal de baix espessor de llom dorsal, que conté generalment un elevat percentatge d'àcid linoleic presentarà un greix subcutani de pitjor qualitat.

Normalment existeix antagonisme entre qualitat de canal i qualitat de carn. El percentatge de magre està negativament correlacionat amb la qualitat de la carn que, a la vegada presenta una correlació positiva amb l'espessor de greix dorsal.

#### 1.2.4 Consanguinitat

S'han realitzat molt pocs estudis per estimar l'efecte del grau de consanguinitat sobre els caràcters de qualitat de la canal i de la carn. Cap d'ells ha mostrat una influència significativa de la consanguinitat sobre aquests caràcters (Johnson, 1989).

#### 1.2.5 *Gens majors i qualitat de la carn en porcí*

Existeixen alguns gens en els que llur efecte suficientment elevat ha permès l'associació de la segregació dels seus al·lels amb caràcters productius, ja siguin quantitius o qualitius. Així, en l'actualitat s'han identificat dos gens, el gen *RYRI* (*skeletal muscle Ryanodine Receptor*) i el gen RN (Rendiment "Napole"), que afecten molt marcadament a la qualitat de la carn.

#### 1.2.5.1 GEN *RYRI*

El gen del Receptor de la Rianodina 1 (*RYRI*), també és conegut vulgarment com el gen de l'halotà (Davies *et al.*, 1988). Algunes races de porcs, en particular Pietrain i Landrace belga, caracteritzades per canals molt magres i d'excel·lent conformació, presenten una alta incidència de carn PSE (carns pàl·lides, toves i exudatives). Si bé aquest gen s'associa a canals d'elevat contingut magre, la carn PSE és de baixa qualitat, i es caracteritza per una caiguda molt ràpida del pH post-mortem, encara que al final s'estabilitza i es manté en els nivells habituals. Igualment, aquesta carn presenta un color pàl·lid, poca rigidesa, i escassa capacitat de retenció d'aigua. Els animals que presenten aquesta anomalia tenen a la vegada una baixa tolerància a l'estrès, de manera que sota condicions d'estrès, com pot ser el transport a l'escorxador, poden arribar a presentar un quadre de taquipnea, febre, taques i fins i tot la mort, conegut com a Síndrome de l'Estrès Porcí (PSS). Eikelenboom i Minkema (1974) demostraren que els animals que presentaven aquesta peculiaritat podien ser detectats gràcies a la Síndrome de la hipertèrmia maligna que desenvolupaven en resposta a l'exposició al gas halotà. Aquesta anomalia hereditària de comportament autosòmic i recessiu (Christian, 1972) és deguda a una mutació en el gen *RYRI*, localitzat en el cromosoma 6 porcí (Harbitz *et al.*, 1990). Com ja s'ha descrit anteriorment, la detecció dels animals portadors de la mutació es realitzava inicialment, mitjançant els marcadors bioquímics Phi, Pgd i Po2 (Gahne *et al.*, 1985). Però al 1991, Fujii *et al.* van desenvolupar un marcador genètic (RFLP) per detectar la mutació causal. Així, es poden distingir tres classes de genotips: nn, Nn i NN, essent l'al·lel recessiu el que augmenta el contingut muscular i la longitud de la canal. La discussió actual es centra en desvetllar si la qualitat de carn dels heterozigots té unes característiques més o menys intermitges entre els dos homozigots o si s'assembla més als no portadors de la mutació. Els primers resultats apunten que els animals Nn tenen major contingut magre, menor dipòsit greixós, major pes de les peces nobles però amb més tendència a presentar carns PSE (Estany *et al.*, en premsa).

#### 1.2.5.2 GEN *RN*

És un gen autosòmic localitzat en el cromosoma 15 porcí (Milan *et al.*, 1995; Mariani *et al.*, 1996a; Reinsch *et al.*, 1997; Looft *et al.*, 2000). Presenta un al·lel dominant, només descrit a la raça Hampshire, que augmenta la producció total de carn dels animals que el presenten, però disminueix el rendiment tecnològic "Napole". La carn d'aquests animals conté en les fibres musculars blanques (IIB) un nivell molt elevat de glicògen acumulat, fet que

comporta un pH post-mortem sensiblement inferior a l'habitual i un menor contingut proteic contrarestat per una major quantitat d'aigua en la carn (Le Roy *et al.*, 2000). De Vries (1997) desenvolupà un diagnòstic genètic basat en el genotipat de marcadors moleculars altament lligats al gen RN. Milan *et al.* (2000) han descrit recentment una mutació en el gen de la *Protein Kinase, AMP-Activated, Noncatalytic, Gamma-3 (PRKAG3)*, a la que es responsabilitza d'aquest efecte al provocar un defecte en el metabolisme del glicògen.

Existeixen altres gens de menor repercussió fins al moment, que també estan essent utilitzats actualment en la indústria porcina mitjançant tests diagnòstics. Aquests són els gens *Adipocyte Fatty Acid Binding Protein (a-FABP)* i *Heart Fatty Acid Binding Protein (h-FABP)*, que tenen un efecte sobre el percentatge de greix intramuscular; el gen *Insuline Growth Factor-2 (IGF2)*, que influeix sobre la proporció de magre i l'espessor de greix dorsal de la canal (Nezer *et al.*, 1999) i el gen *Melanocortin 4 Receptor (MC4R)*, que afecta al creixement i a la deposició de greixos (Kim *et al.*, 2000a). També s'estan realitzant diagnòstics genètics en caràcters reproductius i del color de la capa dels animals. Existeix un altre grup de gens que encara estan sota estudi i encara no poden ser utilitzats en la indústria porcina, com per exemple el gen de la Leptina (*Lep*), el Receptor de la Leptina (*LEPR*), el *Pou Domain Class I, Transcription Factor (PIT1)*, la Calpastatina (*CAST*), Mioigenina, etc...

#### **1.2.6. Influència de la raça (porc Ibèric versus Landrace) sobre la qualitat de la canal i de la carn**

La majoria de les races comercials actuals provenen de l'antic tronc celta, que es caracteritzava per ser de capa blanca o groguenca, posseir canals de grans dimensions i estar dotada d'un ràpid creixement i baixa precocitat. Les races comercials actuals posseeixen canals molt magres i tenen un gran desenvolupament de les peces nobles. Són canals ben constituït des, amb baix pes gras i de despulles, característiques que han sigut seleccionades en producció porcina durant dècades degut al seu interès econòmic. La raça Landrace és una raça comercial d'importància vital en la indústria porcina. Originària de Dinamarca i amb aportació genètica de diferents races europees com la Large White, està sotmesa a programes de selecció des de 1896 i actualment està distribuït da per tota Europa occidental. Actualment existeixen altres varietats de Landrace, la més important de las quals és la Landrace Belga, anomenat també Blanc Belga. Aquesta raça es caracteritza per la seva elevada conformació de

canal, la seva baixa precocitat i l'alta fecunditat de les seves reproductores. La incidència de la Síndrome de l'Estrès Porcí és molt elevada a la raça Landrace (només superada per Pietrain) fet que redueix la qualitat de la carn dels animals afectats.

El porc Ibèric és la raça rústica de tipus mediterrani més important que existeix degut a la grandària poblacional i als ingressos econòmics que produeix. Originària del sud-oest de la Península Ibèrica, està adaptada a medis hostils de manera que presenta una elevada rusticitat. Són animals de capa fosca o rogenca, que posseeixen una canal curta i petita, amb una conformació inferior a la de les races comercials. A més, és un animal precoç i amb gran capacitat per a dipositar teixits grassos, característiques que no coincideixen amb els interessos productius de la indústria porcina. Tot i això, la seva carn i el seu teixit adipós són d'una qualitat inexistente a la majoria de races comercials. El múscul del porc Ibèric té un elevat índex d'infiltració de greix així com una proporció molt més elevada de fibres musculars de tipus oxidatiu. Els dipòsits grassos estan compostos per un major percentatge d'àcid oleic i menor proporció d'àcids grassos poliinsaturats, fet que li confereix millor qualitat organolèptica i tecnològica, i la converteix en més saludable (Serra *et al.*, 1998).

### 1.3 CONSTRUCCIÓ DE MAPES FÍSICS I GENÈTICS EN PORCI

La mida total del genoma dels mamífers és bastant uniforme, situant-se al voltant de tres mil milions de nucleòtids, uns 2500 centiMorgans. Entre el 40% i el 60% del material hereditari està repetit en regions no funcionals. S'estima que un 10% del genoma mamífer és funcional, essent codificant (exons) només entre el 2% i el 3%. Les regions més riques en guanina (G) i en citosina (C) estan situades majoritàriament a les regions codificants (Rothschild i Ruwinsky, 1998).

En el porc domèstic (*Sus scrofa*), el nombre haploid de cromosomes és de 18 autosomes més un cromosoma sexual (*Committee for the Standardized Karyotype of the domestic pig, 1988*). El seu antecessor salvatge, el porc senglar, està format per poblacions amb el mateix cariotip i per poblacions de 17 autosomes i un cromosoma sexual, degut a la fusió del cromosoma 15 o 16 amb el 17. El cariotip típic es realitza tenyint pel mètode Giemsa els cromosomes en metafase. Les regions menys tenyides, anomenades R són les riques en G i C, i que contenen per tant la majoria dels gens estructurals. Segons Bird (1995) el nombre estimat de gens que conté el genoma porcí és d'uns 50.000. No obstant, existeix

una certa controvèrsia en l'estimació dels gens funcionals existents en humà. Mentre que el *International Human Genome Sequencing Consortium* (2001) considera que el nombre de gens humans manifestats per la seqüenciació completa del seu genoma no supera els 40.000, Wright *et al.* (2001) estimen el seu contingut entre 65.000 i 75.000. El cariotip porcí és el més estudiat d'entre tots els animals de producció, degut a la seva reduïda quantitat de cromosomes i al fàcil reconeixement d'ells per la seva mida, forma, i el patró de bandes.

La genòmica és la ciència que estudia els genomes en la seva totalitat, ja sigui des del punt de vista estructural o funcional. Els mapes genòmics són els qui posicionen els gens en el genoma, dividint-se en dos tipus, els mapes físics i els mapes genètics.

### 1.3.1 Mapes Físics

Els primers mapes físics obtinguts es van realitzar mitjançant tècniques d'hibridació *in situ*, on es realitza una extensió i fixació prèvia dels cromosomes en metafase. Posteriorment s'hibrida una sonda de DNA als cromosomes metafàsics. Aquesta hibridació pot ser detectada a través d'un marcatge del DNA prova amb mètodes radioactius, o més recentment per fluorescència (FISH) (Chowdhary *et al.*, 1995). El marcatge fluorescent és molt més apropiat al reduir el temps necessari per realitzar l'anàlisi i per obtenir posicionaments molt més fins i precisos. El primer treball de mapeig físic mitjançant hibridació *in situ* en porcí fou publicat per Ellegren *et al.* el 1994a.

A principis dels anys vuitanta comencen a desenvolupar-se els mapes físics mitjançant la tècnica d'hibridació somàtica en pannels de cèl·lules somàtiques híbrides (SCH) de porc i cèl·lules transformades de hámster o ratolí (Yerle *et al.*, 1996). Cada clon del pannel prové d'una cèl·lula híbrida que pot contenir un o varis cromosomes, o regions cromosòmiques d'origen porcí, més tot el genoma del hámster. Mitjançant la reacció en cadena de la Polimerasa (PCR) amb *primers* coneguts, poden detectar-se els clons en els que apareix amplificació i per tant contenen la regió d'interès i així, coneixent els cromosomes o les regions cromosòmiques que emmagatzema cada clon, es pot localitzar físicament el fragment amplificat. Una altre metodologia usada per a la realització de posicionament físic és la que utilitza els pannels de cèl·lules irradiades per raigs X (*X-Ray Híbrids*). Es fragmenta, mitjançant dosis de raigs X, el DNA de les cèl·lules de l'espècie d'interès i posteriorment es

fusionen els dos tipus de cèl·lules, com s'ha descrit per a SCH. Els fragments s'introdueixen en cèl·lules receptores, normalment de hàmmster o ratolí (Yerle *et al.*, 1998). A major distància entre dos loci, major serà la probabilitat i la freqüència de fraccionament entre ells i podem per tant, estimar estadísticament la seva distància en unitats anomenades centiRays (cR). La resolució d'aquests pannels cel·lulars és significativament major a l'obtinguda en els pannels de cèl·lules somàtiques híbrides i amb la seva ajuda s'obtenen mapes d'alta resolució ([www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/RH/Menuchr.htm](http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/RH/Menuchr.htm)).

Els mapes de solapament o *contig maps* consisteixen en alinear els clons que contenen fragments de restricció del genoma. Prèviament, es construeix una genoteca de clons, bacterials o de llevat, que continguin cromosomes artificials. Per a això, es realitza la digestió parcial del genoma amb un enzim de restricció i els fragments de restricció obtinguts s'introdueixen en vectors bacterians, virals o de llevat, obtenint-se els cromosomes artificials BAC, PAC o YAC, respectivament. Els clons s'ordenen mitjançant la detecció de marcadors compartits, per mapes de restricció o per hibridació *in situ*.

Altres tècniques usades per al mapeig físic són:

- DISC-PCR (Troyer *et al.*, 1995): Consisteix en realitzar una PCR sobre la preparació de cromosomes en metafase i és utilitzada per detectar regions cromosòmiques com, per exemple, els microsatèl·lits.
- Electroforesi en gel de camp polsant (PFGE): Permet separar grans fragments de DNA (fins 10 Mb). Es digereix el genoma amb enzims que reconeixin dianes de restricció poc freqüents, per poder obtenir fragments de restricció de mida gran que, posteriorment són hibridats en sondes de DNA.
- Microdissecció dels cromosomes per micromanipulació i posterior amplificació de la regió disseccionada.
- Citometria de flux, que consisteix en marcar cromosomes metafàsics amb un colorant fluorescent de manera que es crea un patró de bandes específic per a cada cromosoma. Un làser reconeix aquest patró i separa els cromosomes d'interès.
- *Chromosome Painting*, que es basa en la hibridació *in situ* de sondes cromosòmiques sobre preparacions cromosòmiques en interfase o en metafase.

Aquesta tècnica ha estat àmpliament aplicada per estudiar homologies entre genomes de diferents espècies (Goureau *et al.*, 1996).

L'objectiu final del mapeig físic és l'obtenció de la seqüència completa de tot el genoma. Aquest objectiu s'ha assolit recentment amb un primer esborrany de la seqüència de l'espècie humana en dos projectes paral·lels (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2001; Craig Venter *et al.*, 2001). Es de suposar que aquest fet produirà un avenç exponencial en el coneixement estructural i funcional dels gens humans que afavorirà a la genòmica d'espècies domèstiques.

Els mapes físics són de gran importància per poder entendre els grups de sintènia entre diferents espècies i, en definitiva, per poder realitzar estudis de genòmica comparativa, així com, amb l'ajuda dels mapes de lligament, per estimar la longitud real dels cromosomes.

### 1.3.2 Mapes Genètics o de Lligament

Segons la segona llei de Mendel o llei de la transmissió independent, els gens que determinen diferents caràcters es transmeten a les següents generacions de forma independent, sense veure's influïts els uns pels altres. En realitat, s'observen moltes distorsions d'aquesta llei, al detectar-se grups de gens anomenats grups de lligament que s'hereten conjuntament. Aquest fenomen rep el nom de desequilibri de lligament ja que es distorsionen les freqüències relatives de les classes gamètiques que s'esperarien suposant transmissió independent. El lligament entre dos loci en un cromosoma depèn de la distància física entre ells, i està relacionat amb l'aparició d'entrecreuaments durant la meiosi entre el parell de cromosomes homòlegs, que produeix gamets recombinants. Aquests gamets tenen cromosomes que contenen part de la informació genètica d'un progenitor i part de l'altre. Observant la proporció de gamets recombinants es pot estimar la freqüència de recombinació (FR), que és proporcional al percentatge d'entrecreuaments, i per tant, a la distància entre dos loci. Quan la proporció de recombinants és igual a la de no recombinants, és a dir, igual a 0,5, es diu que no hi ha lligament genètic entre 2 loci.

La unitat de distància genètica adoptada és el centimorgan (cM), que correspon a un 1% de gamets recombinants, i es pot estimar a partir de la funció de mapa d'Haldane (1919).



$$cM = \left[ -\ln(1-2FR) \right] 50 \quad \text{i després,} \quad FR = \left[ 1 - e^{-cM/50} \right] / 2$$

De totes maneres, la distància obtinguda mitjançant l'aplicació d'aquesta fórmula és només un valor orientatiu, degut a l'existència de nombrosos factors que alteren la freqüència de recombinació. Aquest és el cas dels gamets dobles recombinants, que apareixen com no recombinants, i per tant contribueixen a subestimar les distàncies. És també un fenomen àmpliament conegut, que el sexe homogamètic (en mamífers, les femelles) presenta una taxa de recombinació bastant més elevada que el sexe heterogamètic. També depèn de la regió cromosòmica ja que, es sap que, generalment el centròmer presenta un menor percentatge de recombinació que els telòmers. També es postula amb la possibilitat d'interferència entre entrecreuaments, de manera que l'aparició d'un entrecreuament faria disminuir la probabilitat de que aparegués un altre en una posició propera. No obstant, generalitzant i a nivell orientatiu, s'estima que un cM equival a un milió de nucleòtids o parells de bases.

Per a la realització de mapes genètics és necessària l'existència de pedigrees familiars coneguts i l'obtenció de marcadors genètics polimòrfics, abundants i distribuïts per tot el genoma. Així, basant-nos en la taxa de recombinació observada entre els marcadors podem construir mapes genètics o de lligament expressats en cM, que indiquen la posició relativa dels marcadors entre ells.

### 1.3.2.1 *Marcadors genètics*

Són regions del DNA que presenten variabilitat i que es troben àmpliament distribuïdes pel genoma. Aquestes mesures permeten seguir l'herència i transmissió dels al·lels d'una generació a una altra i realitzar per tant estimacions de distàncies genètiques entre ells. És important que els marcadors genètics presentin un elevat polimorfisme ja que a major variabilitat dels marcadors, major probabilitat de detectar fenòmens de recombinació. Les mesures de variabilitat d'un marcador molecular es divideixen en dos grups, les que tenen en compte les freqüències al·lèliques i les que no. També es poden classificar en les que mesuren els polimorfismes observats i les que els estimen. En el primer grup s'hi troba l'heterozigositat (H), que mesura el percentatge d'heterozigots, normalment en la població parental. En el segon grup hi ha el contingut informatiu d'un marcador (PIC) descrit per Botstein (1980), que

mesura la freqüència en que l'origen parental dels al·lels pot ésser traçat en la descendència. Aquestes dues mesures reflecteixen el grau de polimorfisme observat en la població. Existeixen d'altres mesures que estimen el grau de polimorfisme d'un marcador genètic, com l'índex d'informativitat (Ie) establert per Ron *et al.* (1995) per a ser aplicat en bestiar boví de llet i que permet estimar la informativitat del marcador en la descendència a partir de la comparació de las freqüències al·leliques en les dues poblacions parentals.

Els marcadors moleculars es classifiquen en marcadors de tipus I i tipus II (O'Brien, 1991). Els primers es refereixen a gens estructurals, generalment dial·lèlics i posicionats en el genoma i presenten baix polimorfisme i escassa abundància. Els marcadors moleculars tipus II són seqüències no codificants del DNA que presenten un major polimorfisme i que estan distribuïts en tots els cromosomes. Ellegren *et al.* (1994a) descriuen els marcadors de tipus III, que serien aquells que han estat mapejats tant física com genèticament.

Existeixen diversos tipus de marcadors genètics segons el mètode de detecció del polimorfisme que presenten:

#### 1.3.2.1.1 Polimorfismes bioquímics

Són polimorfismes proteics que es detecten bé per electroforesi, per reaccions immunoquímiques o pel seu nivell d'activitat funcional. El seu nivell de polimorfisme és moderat i són poc abundants al genoma ja que tan sols detectem una part de la variabilitat i està limitada a una fracció dels gens estructurals. Requereixen l'extracció de gran quantitat d'una mostra concreta, que a més pot ser molt làbil i de poca duració.

#### 1.3.2.1.2 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Mitjançant l'acció d'endonucleases de restricció es digereixen fragments específics del DNA. Aquest polimorfisme implica l'aparició o desaparició d'una diana de restricció i es detecta a través de l'anàlisi del nombre i grandària dels fragments de restricció en electroforesi o per *Southern Blot*. Són marcadors dial·lèlics i codominants ja que s'evidencia la presència dels 3 genotips possibles. Els marcadors tipus I es detecten en la seva majoria mitjançant RFLP. Gràcies a l'amplificació prèvia per PCR del fragment d'interès (PCR-RFLP) es millora en l'especificitat i sensibilitat de la tècnica.

#### 1.3.2.1.3 RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Amplificació per PCR de seqüències anònimes de DNA amb només un *primer* de seqüència curta i aleatòria, i per tant no específic. El patró de bandes observat (de 5 a 10) depèn del nombre de seqüències homòlogues al *primer* i de la longitud dels productes de la PCR (Williams *et al.*, 1990). És un marcador genètic de tipus dominant, ja que no permet discriminar l'existència d'heterozigots i per tant no detecta un percentatge del polimorfisme existent. És una tècnica interessant pel seu baix cost econòmic i pel fet de que no és necessari conèixer cap seqüència concreta. És un mètode que presenta poca repetibilitat, encara que els marcadors RAPDs poden transformar-se en SCARS (*Sequence Characterized Amplified Regions*) i analitzar-se per PCR convencional.

#### 1.3.2.1.4 AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Després de digerir el DNA amb dos enzims de restricció, s'uneixen uns adaptadors de seqüència coneguda als extrems cohesius dels fragments digerits. Aquests fragments són amplificats per PCR mitjançant *primers* que presenten seqüències aleatòries al seu extrem 3'. El resultat és un patró de bandes de productes de PCR de tipus "fingerprinting" que revela una alta variabilitat en el nombre i grandària de les bandes obtingudes. Com succeeix en els RAPDs, no és necessari tenir cap coneixement, *a priori*, sobre la seqüència del DNA. Aquesta tècnica presenta una repetibilitat més elevada que la tècnica anteriorment anomenada ja que es pot realitzar amb *primers* de major longitud i en conseqüència, emprar temperatures d'hibridació superiors durant la PCR. És també de naturalesa dominant, de manera que es perd informativitat i és de difícil interpretació per l'elevat nombre de bandes anònimes que apareixen (Vos *et al.*, 1995). No obstant, aquesta tècnica pot resultar una eina important en genòmica estructural per l'elevat nombre de marcadors que genera.

#### 1.3.2.1.5 RDA (*Representational Difference Analysis*)

Aquesta tècnica es basa en la diferent afinitat d'hibridació dels fragments de DNA en funció de la seva homologia i s'aplica per comparar dos DNAs, i identificar polimorfismes entre elles. El DNA prova, anomenat *DNA Tester* es desnatura en presència d'un excés de DNA conegut (*DNA driver*), prèvia digestió amb un enzim de restricció conegut i unió d'adaptadors concrets pel *tester* a cada extrem del fragment digerit. Quan es torna a renaturalitzar, hibridaran *driver* amb *driver*, *tester* amb *driver*, i una petita proporció en funció de l'homologia del *tester* amb el *tester*. Posteriorment es realitza una PCR de *primers*

específics dels adaptadors del *tester*. L'amplificació correspondrà a regions diferents entre els dos DNAs (Lisitsyn *et al.*, 1993). Posteriorment aquests fragments poden ser clonats i analitzats.

#### 1.3.2.1.6 VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*)

Són seqüències de DNA que es repeteixen en *tàndem* un nombre variable de vegades. El polimorfisme d'aquests marcadors de naturalesa codominant radica en el nombre de repeticions d'aquestes seqüències, que es pot valorar mitjançant gels d'electroforesi. Aquest tipus de marcadors genètics està format bàsicament per dos tipus de seqüències: els minisatèl·lits i els microsatèl·lits.

Els Minisatèl·lits (Jeffreys *et al.*, 1985) són repeticions en *tàndem* de fragments de més de 10 nucleòtids, arribant a formar regions de fins a 30 Kb. El seu grau de polimorfisme és elevat, però presenten dos inconvenients bàsics. Encara que estan distribuïts per tot el genoma són més abundants en les regions centromèriques dels cromosomes i d'altre banda, degut a la seva grandària presenten dificultats tècniques per ser amplificats per PCR.

Els Microsatèl·lits són repeticions en *tàndem* de 2 a 8 bp segons els diferents autors (Chambers i MacAvoy, 1999) d'una grandària generalment inferior a 300 parells de bases, fet que els fa fàcilment amplificables per PCR. Els *primers* d'amplificació han de ser específics i hibriden en seqüències a ambdós costats del microsatèl·lit, la qual cosa permet l'amplificació específica del marcador. Són molt més polimòrfics, freqüents i omnipresents que els minisatèl·lits. Per aquestes raons, així com per la seva naturalesa multial·lèlica i codominant, són els marcadors moleculars més utilitzats en la construcció de mapes genètics. El tipus més abundant en el genoma dels mamífers és el constituït per repeticions (CA)<sub>n</sub>. Els microsatèl·lits s'han descrit en tots els organismes que fins ara s'han estudiat. Hamada *et al.* (1982) descriuen per primer cop l'existència de microsatèl·lits en eucariotes, concretament llevats i vertebrats. Al 1989 apareixen tres treballs paral·lels on es descriu la variabilitat genètica dels microsatèl·lits detectada mitjançant PCR (Litt i Luty, 1989; Weber i May, 1989; Taylor *et al.*, 1989). Els microsatèl·lits s'han utilitzat per a l'anàlisi de parentesc i proves forenses, estudis paleogenètics, treballs de biodiversitat i filogenètica, i per a la construcció de mapes genètics i posterior detecció de QTLs o gens majors (Brufford i Wayne, 1993; Goldstein i Pollock, 1997). Els primers de la PCR es poden marcar fluorescentment mitjançant l'ús de diferents

fluorocroms, que en ser excitats per un raig làser produeixen una fluorescència amb una longitud d'ona característica de cadascun d'ells. Així, coneixent el rang de mides de cada microsatèl·lit i la fluorescència amb la que els primers estan marcats es poden analitzar varis marcadors de cop en un mateix carril d'electroforesi, en aparells d'electroforesi de detecció fluorescent. Això permet accelerar i automatitzar l'anàlisi dels marcadors moleculars. Al estar connectats a sistemes informàtics, els electroferogrames resultants, equivalents al perfil de bandes del carril en gels d'electroforesi convencionals, poden ser analitzats automàticament i emmagatzemar la informació creada en bases de dades i programes d'anàlisi (Ziegle *et al*, 1992).

#### 1.3.2.1.7 SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*)

Aquesta tècnica va ser descrita per Orita *et al.* el 1989 i es basa en els canvis conformacionals de les molècules desnaturalitzades de DNA amplificat per PCR en funció de la seqüència de nucleòtids que les componen. Aquestes modificacions poden ser detectades pels canvis de mobilitat electroforètica en gels de poliacrilamida no desnaturalitzant.

#### 1.3.2.1.8 DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

Aquesta tècnica és similar al SSCP i es basa en detectar la diferent mobilitat de fragments de DNA prèviament desnaturalitzats mitjançant electroforesi en gradient d'agents desnaturalitzants com la temperatura. Els fragments de DNA posseeixen diferents cinètiques de desnaturalització en funció de la seqüència de nucleòtids que posseeixen, ja que aquesta influeix en la temperatura necessària per a desnaturalitzar-los (Fischer i Lerman, 1983).

#### 1.3.2.1.9 SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)

Són mutacions puntuals, és a dir d'un sol nucleòtid, en la seqüència del DNA. Són marcadors genètics, generalment dial·lèlics, extremadament abundants i omnipresents. L'existència de noves tecnologies i nous sistemes de detecció de polimorfismes faciliten un ritme d'anàlisi molt ràpid i eficient, podent-se analitzar milers de mutacions en un sol dia. Bona part de les tècniques descrites anteriorment tenen la capacitat de detectar SNPs, però les metodologies i les tecnologies implicades no permeten el processament de moltes mostres. Sistemes com el de piroseqüenciació desenvolupat per *Pyrosequencing* ([www.pyrosequencing.com](http://www.pyrosequencing.com)) permeten l'anàlisi d'un volum elevat de mostres en un curt espai de temps. La tècnica es basa en l'emissió de la llum que es produeix quan la luciferina es

transforma en oxiluciferina per acció de la luciferasa en col·laboració amb l'ATP, el qual es produeix quan un nucleòtid concret s'uneix a la cadena en extensió en una reacció de seqüenciació en temps real (Ronagui *et al.*, 1998). Altres tècniques de detecció de SNPs es basen en l'aplicació de la PCR en temps real aprofitant l'activitat exonucleasa de la DNA polimerasa sobre sondes marcades amb dos fluorocroms (*TaqMan assay*). Altres tècniques es basen en la cromatografia (*Denaturing high-performance liquid chromatography* o *DHPLC*) o en la seqüenciació amb l'ús de dideoxinucleòtids marcats fluorescentment (*Primer Extension Analysis*). Recentment s'han desenvolupat metodologies d'anàlisi del DNA basades en les tècniques d'espectrometria de masses, com el MALDI-TOF o el ESI. El MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*) mesura el pes molecular de les molècules directament, combinant la separació, detecció i caracterització d'aquestes en un sol pas. Per això, és necessari transformar a estat gasós les biomolècules. En la tècnica s'irradia una matriu absorbent de llum, que conté els fragments a analitzar, amb llum ultraviolada, ionitzant alguns dels àcids nucleics, i permetent per tant, que posteriorment aquests s'accelerïn en un camp elèctric. Les partícules xoquen contra un "mirall" iònic i en invertir la direcció del seu moviment són detectats per un sensor. Analitzant el temps transcorregut després del xoc i fins a la detecció de la partícula, es pot estimar el seu pes molecular (Andersen i Mann, 2000; Meldrun, 2000). La tècnica ESI (*Electrospray Ionization*) segueix la mateixa filosofia però amb una tècnica de volatilització de les mostres modificada (Andersen i Mann., 2000; Meldrun, 2000). Aquestes noves tecnologies poden aplicar-se a diferents tipus de molècules, com àcids nucleics i aminoàcids, de manera que permetran, en un futur proper, un avanç accelerat en el camp de la proteòmica i de la genòmica funcional.

Aprofitant els avenços en enginyeria de materials semiconductors, s'ha desenvolupat una metodologia d'anàlisi automatitzada en suports miniatura *In Silico*, coneguts com *Microxips de DNA* o *Microarrays*. Són suports sòlids als que s'han transferit, o en els que s'han sintetitzat, centenars de milers d'oligonucleòtids o fragments de DNA de seqüència coneguda permetent així analitzar fragments de DNA o RNA per hibridació. La detecció d'hibridació es realitza normalment per fluorescència i requereix el suport de potents programes informàtics d'anàlisi. Es poden aplicar a mètodes diagnòstics o a mètodes genòmics (mapeig genètic, seqüenciació, detecció de mutacions, monitorització de l'expressió, etc.). La nova tecnologia de microxips està revolucionant el camp de la genètica,

degut a les seves nombroses aplicacions i a l'enorme quantitat de dades que es poden obtenir en poc temps (Nature Genetics Editorial, 1996; Hoheisel, 1997).

### 1.3.2.2 Pedigrees familiars

Una població amb un pedigree conegut de dues o tres generacions permet realitzar un seguiment de la transmissió dels al·lels a la descendència, i per tant, permet detectar fenòmens de recombinació. Per a crear artificialment desequilibri de lligament i perquè el nivell de variabilitat genètica en la població sigui el més elevat possible podem, en vegetals o en animals de laboratori, realitzar encreuaments de poblacions consanguínies i de fons genètic diferent. Posteriorment es poden creuar els animals de la  $F_1$ , que són hipotèticament heterozigots en la majoria dels seus loci, amb una de les poblacions parentals (retrocreuament o *backcross*) o entre ells (entrecreuament o *intercross*). En un entrecreuament s'obté una  $F_2$  en la que segregaran tots els loci. En els animals domèstics no es disposa d'aquests línies consanguínies, de manera que es creuen animals de poblacions no consanguínies però divergents, amb notòries diferències entre elles (Beckmann *et al.*, 1988). El disseny més estès en espècies domèstiques és el encreuament dels animals de la  $F_1$  ja que presenta un major poder estadístic que el retrocreuament.

### 1.3.2.3 El mapa genètic porcí

La construcció de mapes genètics requereix un suport informàtic per la complexitat i el volum dels càlculs a realitzar. Existeixen diferents programes que permeten el processament d'aquestes dades. Un dels més utilitzats és el software LINKAGE (Lathrop i Lalouel, 1988), que utilitza la informació dels marcadors individualment i pot realitzar estudis d'associació amb caràcters fenotípics. MAPMAKER/EXP (Lander i Green, 1987) és un altre programa que permet l'obtenció de mapes de lligament mitjançant marcadors moleculars en poblacions experimentals, encara que no ha estat aplicat en porcí. No obstant, el programa de construcció de mapes de lligament més utilitzat en genòmica porcina és l'anomenat CRI-MAP (Green *et al.*, 1990). Permet la construcció de mapes genètics mitjançant l'ús de la informació de dos marcadors simultàniament (*Two-point analysis*) o el processament de les dades de tots els marcadors de cop (*Multi-point analysis*), així com l'anàlisi de la fiabilitat dels ordres atorgats als marcadors, proporcionant taules de *LOD scores* (mesures de màxima versemblança

transformades mitjançant  $\log_{10}$  per a valorar la fiabilitat dels resultats). Aquest programa també permet la detecció d'errors en el genotipat mitjançant l'existència d'excessius dobles recombinants entre dos marcadors veïns. Té en compte l'existència de dobles recombinants i d'interferència entre els entrecreuaments. A més, permet la deducció de genotips puntuals, en cas que aquests faltin a partir de la informació dels seus progenitors. A l'ordre dels marcadors dels mapes genètics construïts se li atorga una versemblança, que contrastant-la amb altres mapes, pot ajudar a l'elecció de l'ordenació més fiable i consistent.

Els primers mapes genètics descrits en porcí estaven formats per 7 grups de lligament, constituïts per grups sanguinis i polimorfismes bioquímics (Echard *et al.*, 1990). Posteriorment, es va produir un avenç espectacular en la construcció dels mapes genètics porcins, protagonitzat bàsicament per tres projectes diferents però interrelacionats.

#### 1.3.2.3.1 PiGMap Consortium

Aquest projecte (*Pig Gene Mapping Project*) ([www.ri.bbsrc.ac.uk/pigmap](http://www.ri.bbsrc.ac.uk/pigmap)) es va elaborar mitjançant la col·laboració de 18 grups europeus i 7 laboratoris dels USA, Japó i Austràlia. El material animal estava format per cinc pedigrees  $F_2$  de referència provinents de encreuaments divergents. Tres d'ells (Roslin, INRA i Wageningen) varen creuar Meishan amb Large White. El grup suec va creuar porcs senglars mascles amb femelles Large White i el grup de Hohemheim va crear els  $F_2$  a partir del porc senglar X Pietrain. S'analitzaren 239 marcadors moleculars per a aquests animals i els genotips obtinguts s'emmagatzemaren en una base de dades (ResPig) gestionada pel grup de Roslin. D'aquests marcadors, se'n posicionaren 81 de classe I i 152 de tipus II. Seixanta-nou d'ells estaven posicionats també en mapes físics, essent de gran ajuda per l'estimació real de la longitud del genoma porcí. Sis dels marcadors genètics no van poder ser assignats a cap grup de lligament concret. La longitud mitja del mapa era aproximadament de 1.800 cM, essent menor el mapa dels mascles que el de les femelles (Archibald *et al.*, 1995). El mapa genètic del PiGMap està format en aquests moments per 700 marcadors moleculars, 300 dels quals són gens estructurals (Rothschild, 2000).

#### 1.3.2.3.2 NORDIC

Aquest mapa fou realitzat per científics escandinaus i es va basar en el genotipat de 105 marcadors moleculars en un encreuament de dos porcs senglars mascles amb vuit



femelles Large White, i amb el que es va obtenir una F<sub>2</sub> formada per 200 porcs. El mapa genètic es va construir amb el programa informàtic LINKAGE i mesurava, com a mitjana de mascles i femelles, 1.800 cM (Ellegren *et al.*, 1994b). Posteriorment el mapa fou actualitzat per Marklund *et al.* (1996a), contenint 236 marcadors, dels quals 89 eren de tipus I, a més, 72 marcadors estaven també mapejats físicament. El mapa fou construït amb el *software* CRI-MAP i té una grandària mitjana de 2.300 cM, i el de las femelles és, de mitjana, 1,4 vegades major que el dels mascles (degut a la major freqüència de recombinació que posseeixen les femelles). Aquest mapa fou utilitzat per a la posterior detecció de QTLs amb efecte sobre caràcters de qualitat de la canal i de la carn.

#### 1.3.2.3.3 USDA-MARC

Presenta diferències amb els mapes europeus en estar constituït gairebé únicament per microsatèl·lits i per basar-se en un pedigree animal de dues generacions, obtingut a partir d'un tipus de retrocreuament en el que estan involucrats animals Duroc, híbrids comercials i tres races xineses (entre elles la Meishan). El 1994, Rohrer *et al.* publiquen un mapa format per 366 marcadors tipus II, la majoria microsatèl·lits i 15 marcadors tipus I. El 1996, Rohrer *et al.* publicaren un mapa d'alta densitat, ja que estava format per 1.042 loci agrupats en els 19 grups de lligament, dels quals 124 estaven mapejats físicament. La mida mitjana d'aquest mapa s'acostava als 2.300 cM. ([www.genome.iastate.edu/maps/marcmap/html](http://www.genome.iastate.edu/maps/marcmap/html)).

L'actual mapa de lligament porcí està compost per prop de 1.900 loci (<http://www.ri.bbsrc.ac.uk/>), (dels quals uns 530 són gens estructurals) amb una distància mitja entre marcadors de 3 a 5 cM. No obstant, encara resten amples regions sense marcadors posicionats, especialment al cromosoma X. Aquesta situació millorarà substancialment amb la imminent inserció de 2.000 marcadors de tipus AFLP (Plastow, comunicació personal). Paral·lelament, prop de 600 loci estan posicionats físicament, i vora de 1.000 estan en panells de cèl·lules somàtiques híbrides. El panorama futur és esperançador, ja que és de suposar que el mapa genètic porcí surti directament beneficiat del ràpid avenç en la localització de gens estructurals en els mapes humà i del ratolí gràcies al mapeig comparatiu (Rothschild, 2000).

#### 1.4 DETECCIO I LOCALITZACIO DE QTLs

Els mapes genètics, constituïts per marcadors polimòrfics i codominants, tenen una elevada importància per la seva contribució a la detecció de regions genòmiques amb efecte sobre caràcters quantitius. La majoria dels caràcters productius presenten variació contínua, i segons el model infinitesimal proposat per Yule *et al.* (1906) estan controlats per multitud de gens amb un efecte molt petit però acumulatiu sobre el caràcter. Si bé aquest model s'ha utilitzat amb un èxit raonable durant dècades, en els últims anys s'ha verificat que per a molts caràcters existeixen uns pocs gens que expliquen un elevat percentatge de la variació fenotípica, mentre que la resta de la variabilitat en el caràcter es deu a nombrosos gens d'efecte petit (Lande, 1981). Un QTL (*Quantitative Trait Loci*) és una regió genòmica més o menys acotada, en la que hi trobem un o varis gens d'efecte significatiu sobre un caràcter quantitatiu. Per a detectar aquestes regions, és necessari un disseny experimental amb un pedigree conegut, en el que s'han mesurat els valors fenotípics pels caràcters d'interès i en el que s'han determinat els genotips corresponents a varis marcadors polimòrfics. L'objectiu és construir un mapa genètic amb una densitat de marcadors suficientment elevada per poder detectar l'existència de desequilibri de lligament entre algun marcador i el QTL putatiu. Estudiant, per tant, la segregació dels marcadors genètics en les diverses generacions d'aquests pedigrees familiars es pot identificar l'existència d'associacions entre determinats loci i el caràcter d'interès.

El primer treball d'associació d'un marcador amb un caràcter quantitatiu fou descrit per Sax (1923) quan va detectar que el color de la llavor del pèsol (*Phaseolus vulgaris*) es podia usar com a marcador del pes d'aquesta. Adonem-nos que el primer dels caràcters té una distribució discreta i el segon és quantitatiu. Als anys cinquanta i seixanta sorgeix un creixent interès per la detecció de gens amb efectes quantitius en animals domèstics (Neimann-Sorensen i Robertson, 1961). Per detectar aquests gens s'utilitzaven polimorfismes bioquímics (enzims, proteïnes i grups sanguinis), però no donaven resultats molt esperançadors degut al baix nombre de marcadors disponibles i a l'elecció aleatòria dels individus de l'experiment. Els estudis de detecció de QTLs mitjançant l'ús de marcadors genètics s'han optimitzat sensiblement en els últims anys gràcies a l'aparició de nous marcadors polimòrfics distribuïts per tot el genoma i al desenvolupament d'anàlisis estadístiques i dissenys experimentals més eficaços.

### 1.4.1 *Dissenys experimentals*

Els dissenys experimentals per a la detecció de QTLs a través de l'ús de marcadors genètics en encreuaments  $F_2$  es basen generalment, en les següents suposicions:

1. El caràcter quantitatiu es distribueix normalment.
2. Existeix lligament genètic entre els loci.
3. Els loci segreguen mendelianament.
4. Existeixen dos al·lels en el QTL, cadascun d'ells fixats en les poblacions parentals.
5. Els individus de la generació  $F_1$  són heterozigots pels marcadors i els QTLs.
6. No hi ha hagut selecció pels marcadors (per evitar fixació dels al·lels).
7. Els marcadors no tenen efecte pleiotròpic sobre els caràcters estudiats.
8. No existeixen fenòmens d'epistàsia per cap dels caràcters.

L'efecte d'un QTL es detecta comparant les mitges fenotípiques de les diferents classes genètiques d'aquest QTL, estimades a partir dels genotips dels marcadors genètics associats. Així, per a un QTL dial·lèlic, existeixen tres classes genotípiques anomenades,  $Q_1Q_1$ ,  $Q_1Q_2$ ,  $Q_2Q_2$ , amb valors genotípics **a**, **d** i **-a**, respectivament.

Com s'ha mencionat en el capítol anterior, cal disposar d'una població de referència formada per dos o tres generacions, en la que es puguin realitzar els estudis de lligament i de cosegregació. En plantes o en animals de laboratori es poden creuar dues línies consanguínies, amb al·lels fixats en tots els loci, de manera que la heterozigositat en la  $F_1$  tindrà el valor de la unitat en la majoria dels marcadors i en els QTLs. Així es crea desequilibri de lligament i augmenta la variabilitat fenotípica dels caràcters. En animals domèstics no obstant, no es disposa de línies consanguínies, així que s'apliquen altres tipus de encreuaments. Existeixen diferents dissenys experimentals en funció de l'espècie implicada, el sistema productiu, els caràcters que s'estan estudiant i els recursos econòmics dels que es disposa. En boví de llet per exemple, es realitzen anàlisis intra-família en famílies de mitges germanes, en el que coneixem com a un disseny de filles o de netes. D'altra banda, en porcí i en aus de producció no es disposa de registres familiars i fenotípics suficientment grans, de manera que es fa necessària la realització de encreuaments experimentals entre línies divergents que difereixin significativament en els fenotips dels caràcters d'interès (Beckmann i Soller, 1988).

### 1.4.2 Mètodes estadístics per al mapeig de QTLs

#### 1.4.2.1 Aproximació amb un sol marcador

Aquest mètode detecta l'existència de desequilibri de lligament del QTL respecte a un sol marcador dial·lèlic comparant les mitges fenotípiques del caràcter per a cada una de les classes genotípiques del marcador. La diferència entre les mitges permet estudiar l'efecte fenotípic dels dos al·lels. Per provar si aquest efecte és significativament diferent de zero s'aplica una anàlisi de la variància (Soller i Brody, 1976). Aquest mètode presenta nombrosos inconvenients degut a l'elevat nombre d'animals que requereixen ser analitzats i que, en analitzar-se els marcadors individualment, no es defineix la posició relativa del QTL respecte al marcador, de manera que l'estimació de l'efecte QTL queda esbiaixada (infravalorant-la quant menys lligats estiguin ambdós loci).

#### 1.4.2.2 Interval Mapping

El mapeig d'interval, proposat per Lander i Botstein, (1989) analitza l'existència d'un QTL putatiu flanquejat per dos marcadors. La presència o absència del QTL es detecta a partir de la diferència fenotípica entre les classes genètiques del QTL estimades a partir dels genotips dels dos marcadors. Mitjançant el mètode de Màxima Versemblança (ML) es compara la probabilitat que, observant cosegregació, hi hagi lligament dels marcadors amb un QTL (hipòtesi alternativa,  $H_1$ ) amb la probabilitat que aquesta cosegregació no estigui associada a cap QTL lligat als marcadors (hipòtesi nul·la,  $H_0$ ). Per comprovar la força del resultat es calcula el *Lod Score* d'aquest càlcul de ML. Amb aquest mètode s'aconsegueix informació sobre la posició del QTL i s'incrementa l'exactitud de l'estima del seu efecte. No obstant, requereix pedigrees derivats del encreuament de línies consanguínies, i teòricament homozigotes per a tots els loci, de forma que tots els marcadors siguin totalment informatius en la generació segregant.

#### 1.4.2.3 Regressió amb múltiples marcadors-Mínims quadrats

Haley *et al.* (1994) desenvoluparen aquesta metodologia de detecció de QTLs, que aplica el mètode dels Mínims Quadrats (LS), i demostraren que les estimacions i estadístiques que resultaven eren molt semblants a les de ML. L'avantatge respecte a ML radica en que LS no requereix càlculs tant complexos ni sistemes computacionals tant potents i, per tant permet complicar el model estadístic afegint-li efectes fixes, interaccions entre QTLs, etcètera, de

manera que es redueix el biaix i augmenta la potència en la detecció de QTLs (Haley i Knott, 1992). Es també un mètode de mapeig per intervals, però amb la regressió de Haley s'utilitza la informació de tots els marcadors de manera que es pot aplicar en animals domèstics, pels qui no es disposa de línies consanguínies però sí de poblacions genèticament molt divergents que també poden ser creuades. El model suposa que les línies del encreuament posseeixen al·lels segregant en els marcadors, però que per als QTLs existeixen al·lels alternatius i fixats en cada una de les poblacions originals. El genotip del QTL es calcula en cada cM condicionada al genotip dels dos marcadors informatius que flanquegen el QTL putatiu. El model suposant un QTL es contrasta amb el model que no inclou el QTL en cada cM, mitjançant un test F clàssic.

#### 1.4.3 QTLs detectats en porcí

La majoria dels projectes de detecció de QTLs s'han basat en una anàlisi total del genoma a partir de marcadors posicionats en el mapa de lligament cada 20 cM aproximadament, per així tenir una potència estadística suficientment alta per a detectar el desequilibri de lligament de qualsevol QTL d'efecte elevat amb algun dels marcadors. Normalment es prenen dades de nombrosos caràcters fenotípics, com poden ser els caràcters de qualitat de la canal, de qualitat de la carn, caràcters reproductius o amb efecte sobre malalties o respostes immunes. El mètode estadístic més utilitzat per estimar la posició i l'efecte dels caràcters quantitativs és el desenvolupat per Haley *et al.* (1994) descrit anteriorment. Per augmentar el desequilibri de lligament entre els loci i la variació fenotípica dels caràcters es realitzen encreuaments de races divergents per aquests caràcters. A més, en la majoria de casos, i degut a que s'assumeix que els QTLs tenen un efecte bàsicament additiu, les poblacions experimentals són en la seva majoria, del tipus F<sub>2</sub>. A la taula 1.1 es detallen els treballs més rellevants en els que s'ha publicat la detecció d'algun QTL amb efectes sobre caràcters productius en porcí

##### 1.4.3.1 *Caràcters de qualitat de la canal*

Andersson *et al.* van descriure el 1994 el primer treball de detecció de QTLs en porcí utilitzant un encreuament F<sub>2</sub> de porc senglar i Large White. En concret, detectaren una regió bastant àmplia a nivell proximal del cromosoma 4 que explicava aproximadament el 18% de

la variància additiva, en la  $F_2$ , de l'espessor de greix dorsal i el percentatge de greix abdominal, així com el 12% del creixement des del naixement fins als 70 kg i el 11% de la longitud de l'intestí prim. Els al·lels del porc senglar s'associaren a una major deposició de greix i a un menor creixement i longitud de l'intestí prim. Degut a la poca precisió de l'estima de la posició del QTL va quedar el dubte de si es tractava d'un QTL amb efectes pleiotròpics sobre aquests caràcters o si, ans al contrari, hi havia dos QTLs segregant en aquella regió. Així mateix, varen detectar en el cromosoma 13 un locus cosegregant amb la velocitat de creixement des del naixement fins als 30 kg. El QTL del cromosoma 4 ha estat confirmat posteriorment, tant pel mateix grup (Marklund *et al.*, 1996b; Knott *et al.*, 1998), assignant-li fins i tot més efectes sobre d'altres caràcters (Andersson-Eklund *et al.*, 1996), com per altres treballs utilitzant diferents encreuaments experimentals (Wang *et al.*, 1998; Walling *et al.*, 1998; Bidanel *et al.*, 1998; Bidanel *et al.*, 2001). Donada la consistència dels resultats obtinguts, Marklund *et al.* (1999) van decidir denominar-lo FAT1. Més recentment, Walling *et al.* (2000) han confirmat la presència del QTL del cromosoma 4 en una anàlisi conjunt de diverses poblacions de referència en les que individualment s'havia detectat el QTL, per augmentar la potència estadística dels resultats. Tot i això, encara no sabem exactament si es tracta d'un o varis QTLs segregant en la mateixa regió, encara que tot apunta a un sol QTL d'efectes pleiotròpics. També altres grups han detectat un QTL a la mateixa regió del cromosoma 13 amb efectes sobre el creixement abans del deslletament i l'espessor del greix dorsal (Yu *et al.*, 1999; Malek *et al.*, 2000; Bidanel *et al.*, 2001).

A la regió del Complex Major d'Histocompatibilitat (MHC), al cromosoma 7, un QTL d'efectes sobre creixement i greix dorsal fou detectat per Rothschild *et al.* (1995) i confirmat posteriorment per Bidanel *et al.* (1996; 2001), Rohrer i Keele (1998a) Rohrer (2000) i Wang *et al.* (1998).

Altres regions cromosòmiques han presentat evidències estadístiques de contenir QTLs amb efecte sobre la conformació de canal, com els descrits per Rohrer i Keele (1998b) en el cromosoma 1 i X, amb efecte sobre l'àrea del llom i el pes d'altres peces de l'especejament i en el cromosoma 7 relacionat amb la longitud de la canal o el QTL descrit per Casas-Carrillo *et al.* (1997b) en el cromosoma 3 sobre la velocitat de creixement. Rohrer (2000) va detectar efectes sobre el pes i l'estat d'engreixament a diferents edats, en els cromosomes 1, 2, 7, 8, 9, 12 i X. Bidanel *et al.* (2001) han publicat recentment la detecció de

QTLs per a greix i creixement en els cromosomes 1, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 18 i X. Geldermann *et al.* (1996) varen trobar un QTL en la regió del *RYRI* (cromosoma 6) que afectava a diferents caràcters de conformació de la canal, qualitat de la carn i engreixament entre d'altres, i van proposar el propi gen *RYRI* com a gen candidat. D'altres moltes regions han estat relacionades amb caràcters de qualitat de canal, però els QTLs descrits anteriorment són els més estudiats o els més rellevants.

#### 1.4.3.2 Caràcters de qualitat de la carn

Molt pocs QTLs de qualitat de carn s'han detectat fins al moment. Rothschild *et al.* (1995) van detectar dos QTLs, un al cromosoma 4 i l'altre al 7, ambdós amb efecte sobre la fermesa i el color de la carn. En treballs posteriors es va confirmar el QTL del cromosoma 7, associant-lo fins i tot, amb altres factors de qualitat de la carn (Wang *et al.*, 1998; Moser *et al.*, 1998). Andersson-Eklund *et al.* (1996), van trobar dos QTLs en els cromosomes 2 i 12 amb efecte sobre el pH, la capacitat de retenció d'aigua i la pigmentació del múscul. En un encreuament de Meishan es va trobar una regió relacionada amb el nombre de fibres musculars en el cromosoma 3 (Bidanel *et al.*, 1998), així com una altre en el cromosoma 7 amb efecte sobre els nivells d'androstenona, els efectes del qual incideixen en el color de la carn (Bidanel *et al.*, 1996). Pel percentatge de greix intramuscular, De Koning *et al.* (1999) van detectar tres QTLs de significació suggestiva en els cromosomes 2, 4 i 6, i van especular sobre l'existència d'*imprinting* en el cromosoma 6 (De Koning *et al.*, 2000). Ovilo *et al.* (2000) van detectar en el mateix material animal en el que es basa la present tesi, un efecte molt més elevat que el descrit anteriorment sobre el greix intramuscular en el cromosoma 6, tractant-se possiblement del mateix QTL trobat per de Koning.

Per als caràcters que influeixen en la qualitat del greix, fins molt recentment no s'havia descrit cap QTL, degut a que no s'havien enregistrat les mesures fenotípiques pertinents en la majoria de projectes. Grindflek *et al.* (2001) han publicat un treball en el que descriuen un efecte de significació dubtosa sobre el percentatge d'àcid margàric (C17:0) en el cromosoma 4, en un encreuament de línies comercials noruegues.

**Taula 1.1** Projectes de detecció de QTLs en porcí amb articles publicats.

<i>PAIS</i>	<i>DISSENY</i>	<i>RACES</i>	<i>CROMOSOMA</i>	<i>CARÀCTER</i>
Suècia	F <sub>2</sub>	WB, LW	2,4,8,10,13	G, C, CA
Escòcia	F <sub>2</sub>	MS, LW	4, 7, 14	G, C, L
França	F <sub>2</sub>	MS, LW	1, 4, 5, 7, 14, X	G, P
ISU (USA)	F <sub>2</sub>	MS,MZ,D,LD,HS	4,7,13	G, P, C
Minn. (USA)	F <sub>2</sub>	MS, YS	1,2,4,8,13	C
Wisc (USA)	HS	Co	3	C
USDA-MARC (USA)	F <sub>2</sub>	MS, Co	1, 2, 6, 7, 12, X	G, P, CC
Holanda	F <sub>2</sub>	MS, LW, LD	2, 6, 7	G, GRIN, M
Alemanya	F <sub>1</sub>	WB, PT, MS	6	G, CA
Espanya	F <sub>2</sub>	IB, LD	*	*

**Abreujaments:** ISU, Iowa State University; Minn., University of Minnesota; Wisc., University of Wisconsin-Madison; HS, mitjos germans; WB, porc senglar; LW, Large White; MS, Meishan; MZ, Minzhu; D, Duroc; LD, Landrace; HS, Hampshire; YS, Yorkshire; Co, línies comercials; PT, Pietrain; IB, porc Ibèric; G, Greix; C, Creixement; CA, Qualitat de la Carn; L, Àrea del llom; P, Pes, CC, Conformació de la Canal; GRIN, Greix Intramuscular; M, profunditat del múscul. \* no s'indiquen els resultats per formar part d'aquesta tesi.

No obstant, la detecció de QTLs en encreuaments experimentals en els que existeix una gran variabilitat genètica, no és suficient per a que la indústria ramadera pugui treure profit d'aquesta tecnologia. És possible que el QTL detectat en encreuaments experimentals no segregi en poblacions comercials, degut a que en aquestes la variabilitat genètica es veu dràsticament reduïda. Per demostrar que la tecnologia del mapeig de QTLs pot ésser aplicada en línies comercials per al seu posterior ús en M.A.S., s'està portant a terme un projecte finançat pel Programa de Biotecnologia de la Unió Europea. Aquest projecte és una col·laboració entre científics suecs, escocesos, anglesos i espanyols entre els que s'hi troba la Unitat de Genètica i Millora Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona (*PigQTech Consortium*).

#### 1.4.4 Identificació dels gens associats als QTLs

Degut a la baixa precisió en la localització de QTLs dels mètodes actuals, aquestes anàlisis no són més que la fase inicial d'un procés més llarg encaminat a la detecció i caracterització completa dels gens que constitueixen el QTL. En els projectes d'anàlisi complet del genoma per localitzar QTLs, (en els que la distància entre els marcadors és d'uns 20 cM i els individus segregants uns pocs centenars) l'interval de confiança de la posició



cromosòmica pot estendre's a varies desenes de cM. El següent pas és reduir aquest interval tant vast mitjançant el genotipat de nous marcadors i/o la producció a partir de la subpoblació segregant, de nous individus recombinants en la regió del QTL. Una vegada s'ha posicionat un QTL amb la màxima precisió possible, s'ha de trobar el gen causal.

#### *1.4.4.1 Aproximacions per a la identificació de gens*

##### **1.4.4.1.1 Positional Cloning**

Aquest mètode es basa exclusivament en el coneixement de la regió on es localitza el gen i requereix l'ús de llibreries de DNA del genoma que s'està estudiant. Un vegada es disposa d'un marcador suficientment pròxim al gen putatiu, (Collins, 1992), es detecta un conjunt de clons que contenen el marcador i les regions genòmiques adjacents. Diferents tècniques moleculars permeten la identificació de gens en els clons de DNA genòmic que han de ser seqüenciats i analitzats per trobar el gen responsable de la variació observada en el caràcter i la mutació causal. Aquesta metodologia permet la detecció dels gens implicats sense tenir cap coneixement previ de l'estructura genètica de la regió ni de la fisiologia subjacent al caràcter afectat. S'ha utilitzat principalment per a la detecció de gens responsables de malalties humanes.

##### **1.4.4.1.2 Gens candidats**

Aquesta metodologia es basa en un coneixement detallat de la fisiologia del caràcter estudiat i la selecció de gens que, d'acord amb aquest coneixement, puguin afectar a l'expressió d'aquest caràcter. Aquells gens que per raons fisiològiques poguessin estar hipotèticament afectant als fenotips d'interès i que es trobin en varies espècies, es prenen com a possibles candidats. Una vegada seleccionats s'ha de buscar la mutació que causa el polimorfisme proteic i produeix la variació fenotípica.

##### **1.4.4.1.3 Gens candidats per posició**

L'aproximació de gens candidats per posició és un híbrid entre el mètode del gen candidat i la clonació posicional, i és de fet l'aproximació més usual en espècies domèstiques. La investigació es centra directament en uns gens concrets, basant-se en la fisiologia del caràcter i en el mapeig comparatiu amb espècies el mapa genètic dels quals posseeix un elevat grau de resolució. Encara que resulta necessari tenir coneixements bàsics de fisiologia i

genòmica comparativa, aquesta aproximació permet buscar gens candidats fins i tot quan l'interval de confiança del QTL no ha estat refinadament delimitat. Les dues metodologies es complementen sinèrgicament, augmentant substancialment la probabilitat de trobar gens majors associats al QTL.

#### 1.4.4.2 Gens candidats detectats en porcí

En el mapeig comparatiu per a la detecció de gens candidats per posició (*positional candidate gene*) es compara la regió que conté el QTL amb el grup sintènic equivalent d'espècies amb un mapa genètic més desenvolupat, en concret el d'humà i el de ratolí. En aquestes dues espècies a més, s'està avançant de forma accelerada en la detecció i posicionament de gens majors de manera que és de suposar que, per mapeig comparatiu, passi el mateix en les espècies d'animals domèstics. La majoria dels nombrosos estudis de gens majors sobre caràcters productius en porcí es relacionen amb creixement i deposició de greix.

Molts dels gens candidats d'un QTL poden ser al final, el propi gen causal o simplement un bon marcador genètic per detectar la mutació responsable suficientment lligat per a ser utilitzat en programes de M.A.S.

Un dels gens majors més utilitzats en programes de selecció (*Gene Assisted Selection* o G.A.S.) és el gen de l'halotà (Fujii *et al.*, 1991), posicionat en el cromosoma 6 i associat a la variabilitat en el creixement dels animals i la qualitat de la carn (Geldermann *et al.*, 1996). Per aquest gen es comercialitza un test-diagnòstic (HAL-1843<sup>TM</sup>) aplicat directament a la mutació causal de la Síndrome de la Hipertèrmia Maligna, que consisteix en una substitució nucleotídica (C es substitueix per T) en la posició 1843 del cDNA, que pot ser detectada per PCR-RFLP i comprovació en gels d'agarosa (Sánchez-Bonastre *et al.*, 1993).

El gen RN<sup>+</sup> (Milan *et al.*, 1996; Mariani *et al.*, 1996a; Reinsch *et al.*, 1997), localitzat en el cromosoma 15 porcí, que s'associa a una disminució del pH i de la qualitat del pernil cuit a la raça Hampshire, ha estat recentment relacionat amb una mutació en el gen *PRKAG3* de la família de les proteinquinases activades per AMP, i està presumiblement implicat amb algunes formes de diabetis en humans (Milan *et al.*, 2000). Per aquest gen també existeix un test comercial per a la detecció de les seves variants al·lèliques (De Vries *et al.*, 1997).

El gen *PIT1* (Yu *et al.*, 1995; 1999) es localitza a la mateixa regió del cromosoma 13 en la que Andersson *et al.* (1994) detectaren un QTL per creixement en porcs lactants. A més, Yu *et al.* (1999) han detectat a la mateixa regió, un QTL pel pes al naixement i, a 20 cM de aquest, un altre QTL amb efecte sobre l'espessor de greix dorsal. Per estudis de segregació s'ha associat el gen *PIT1* a aquests dos caràcters. No obstant, encara no s'ha pogut determinar si es tracta del propi gen causal o si, ans al contrari, el responsable és algun gen altament lligat, de manera que el gen *PIT1* seria un bon marcador. En un cas similar es troba el gen *AMPEPN*, que està localitzat a la regió del MHC en el cromosoma 7. En un estudi de segregació s'ha demostrat la seva associació amb caràcters de creixement i de greix dorsal (Nielsen *et al.*, 1996). També el gen *IGF-1*, en el cromosoma 5, s'associa a creixement i a deposició de greix subcutani (Casas-Carrillo *et al.*, 1997a). De la mateixa família és el gen *IGF-2*, localitzat a l'extrem distal del cromosoma 2 i associat amb el desenvolupament muscular i del que es disposa d'un diagnòstic comercial. D'aquest gen només s'expressa la còpia paterna degut a l'efecte que es coneix com *imprinting* (Jeon *et al.*, 1999; Nezer *et al.*, 1999). Altres gens candidats associats amb creixement i deposició de greix, degut al seu efecte sobre la gana, són el gen de la colecistoquinina (*CCK*), el *CCKAR* o gen del receptor A de la colecistoquinina (Clutter *et al.*, 1997), el gen *Obese* que codifica per a la leptina (Neuenschwander *et al.*, 1996), el gen del receptor de la leptina (*LEPR*) (Vincent *et al.*, 1997) i el gen del receptor de melanocortina 4 (*MC4R*) descrit molt recentment (Kim *et al.*, 2000a), per el que s'està comercialitzant un test diagnòstic utilitzat per millorar la gana dels animals.

El gen de l'hormona del creixement o *GH* (Nielsen *et al.*, 1995; Casas-Carrillo *et al.*, 1997a), està mapejat en el cromosoma 12 i s'associa a la conformació de la canal i a l'estat de engreixament. Aquest gen està regulat, entre altres, pel *PIT1*, del qual hem parlat anteriorment.

També s'han descrit alguns gens per caràcters de qualitat de la carn, entre els quals s'hi troba el *a-FABP* i el *h-FABP* pel seu efecte sobre el percentatge de greix intramuscular (IMF). El *a-FABP* (Gerbens *et al.*, 1998) està posicionat en el cromosoma 4, molt proper al QTL descrit per Andersson *et al.* (1994) i conté un microsatèl·lit intrònic amb un polimorfisme associat a greix intramuscular i creixement a la raça Duroc. Aquest microsatèl·lit s'ha estudiat posteriorment en un encreuament de línies europees amb Meishan, sense haver-se trobat cap associació amb aquests caràcters (Gerbens *et al.*, 2000). D'altra banda, és un gen candidat

interessant per aquells QTLs detectats en aquesta regió del cromosoma 4 i que tinguin efecte sobre el greix i el creixement. El *h-FABP* és un gen localitzat en el cromosoma 6, pròxim a un QTL per al gruix del greix dorsal i IMF, en el què es va trobar associació amb IMF en una anàlisi de segregació en Duroc i en Meishan, (Gerbens *et al.*, 2000) i és per tant, un bon gen candidat per aquest caràcter. Curiosament no s'ha detectat cap associació d'aquest gen amb la deposició de greix dorsal, de manera que cal suposar que es podrien realitzar programes de selecció per M.A.S. per augmentar IMF sense augmentar la deposició de greix subcutani. No obstant, en l'estudi realitzat per Ovilo *et al.* (2000) no s'ha detectat cap associació amb aquests caràcters. Actualment, ambdós gens s'estan utilitzant a la indústria porcina mitjançant diagnòstics moleculars.

Alguns gens s'associen al metabolisme proteic, com el gen de la calpaina (*SKMC*) i el de la calpastatina (*CAST*), posicionats en els cromosomes 1 i 2, respectivament (Ernst *et al.*, 1998). Altres gens es relacionen amb el desenvolupament muscular i el tipus fibril·lar en etapes embrionàries, com els gens de la família *MyoD* (miogenina, *MyoD1*, *Myf5* i *Myf6*) (te Pas *et al.*, 1996).

També s'ha avançat en la detecció de gens associats a caràcters reproductius i factors de resistència a malalties i resposta immune, i fins i tot s'han descrit gens associats a trets no directament relacionats amb caràcters de qualitat productiva però sí més apreciats a la indústria porcina. El gen *ESR* o gen del receptor de l'estrogen (Rothschild *et al.*, 1996) i el gen del receptor de la prolactina (*PRLR*) (Vincent *et al.*, 1998), estan ambdós clarament associats amb el nombre de garrins per part i es disposa d'un test genètic desenvolupat i utilitzat actualment a la indústria porcina. Per últim, es disposa de tests diagnòstics per detectar els polimorfismes del gen associat amb el color blanc de la capa dels porcs del tronc celta, el *KIT* descrit per Johansson-Moller *et al.* (1996). En una situació similar es troba el gen *MC1R* (Mariani *et al.*, 1996b), responsable del color rogenc de la capa en porcí.

## 1.5 DNA MITOCONDRIAL

La mitocòndria és una organel·la intracel·lular present a les cèl·lules eucariotes que conté un únic cromosoma circular. El DNA mitocondrial dels mamífers conté aproximadament 16 kb, no conté regions intergèniques ni introns, i fins i tot alguns dels seus

gens estan solapats. Aquests gens intervenen en funcions respiratòries (obtenció d'energia), de replicació i de traducció del DNA mitocondrial (Lewin, 2000). Degut al procés de gametogènesi, l'herència mitocondrial és tan sols d'origen matern, de manera que tots els animals descendents d'una mateixa femella ancestral presentaran un DNA mitocondrial idèntic per descendència. Això permet analitzar l'origen de la línia materna dels animals, i permet l'establiment de relacions filogenètiques entre diferents poblacions. Així, per exemple, Troy *et al.* (2001) han pogut confirmar l'origen de les races bovines europees actuals, establint-lo a l'orient pròxim. De la mateixa manera, Giuffra *et al.* (2000) van establir l'origen filogenètic europeu o asiàtic de diferents races porcines comercials i van concloure que les races porcines europees van divergir d'un avantpassat salvatge diferent del que va originar les races asiàtiques.

# **MATERIAL I METODEDES**

### 3.1 MATERIAL ANIMAL

El material animal d'aquest projecte està format per un encreuament  $F_2$  entre mascles Ibèrics de l'estirp Guadyervas i una línia de truges Landrace que es va obtenir a les granges de Nova genètica S.A., a Solsona.

La raça del porc Ibèric comprèn varietats rogenques i negres que es subdivideixen en entrepelades i glabres. La línia Guadyervas (Figura 3.1) és una estirp experimental tancada formada per un nombre reduït d'animals i que es troba al "Dehesón del Encinar" (Oropesa, Toledo). Es va formar al 1945 a partir de 5 mascles i 27 femelles de porc Ibèric de l'estirp *negro lampiño* de la Vega del Guadiana i per tant, posseeix una capa fosca i desprovista de pèl. La seva canal es caracteritza per ésser extremadament grassa i de mida reduïda. Són animals de baixa prolificitat i creixement molt lent, i encara que els encreuaments són dirigits per tal de controlar la consanguinitat i el parentesc, aquestes dues mesures han assolit valors de 0,360 i 0,401, respectivament (Toro *et al.*, 1999).

**Figura 3.1** Porc Ibèric de l'estirp Guadyervas.



Les femelles Landrace que es van utilitzar per l'encreuament, provenien d'una línia de Nova Genètica seleccionada per a un índex que combina el nombre de garrins obtinguts per part, el creixement i el greix dorsal, essent animals amb una bona conformació de la canal, baix engreixament i una prolificitat relativament alta (Figura 3.2). Encara que la freqüència de

PSS és relativament alta en Landrace, es van escollir femelles que no presentessin l'al·lel recessiu (Hal<sup>h</sup>) En els animals Ibèrics no fou necessari realitzar el test ja que aquesta raça està lliure de l'anomalia.

Figura 3.2 Truja Landrace.



Les característiques de conformació i de qualitat de la carn d'aquestes dues poblacions van ser comparades en un estudi realitzat per Serra *et al.* (1998). En aquest estudi s'analitzaren 7 femelles i 5 mascles Ibèrics de la línia Guadyerbàs i 20 porcs Landrace, en la que els dos sexes estaven representats en parts iguals. Tots els animals de l'estudi estaven lliures de la mutació recessiva del gen de l'halotà. Les condicions de maneig foren intensives, a la mateixa granja i amb alimentació *ad libitum* per a ambdues. Els porcs Landrace es van sacrificar als  $105 \pm 10$  kg mentre que els de la població Ibèrica es van portar a l'escorxador amb  $118 \pm 11$  kg degut a un creixement superior a l'esperat. Es varen prendre mesures per a caràcters de creixement, conformació de la canal, greix dorsal i per a caràcters que representessin la qualitat de la carn en mostres de *Longissimus lumborum* i semimembranós (pH, conductivitat elèctrica, color i pigments, així com dades de greix intramuscular i humitat). També es mesurà la composició histoquímica del múscul i la composició en àcids greixosos del greix dorsal.



Els resultats obtinguts mostraven diferències entre ambdues races clarament significatives per a un elevat nombre de caràcters, tot i el baix nombre d'animals analitzats (Taula 3.1).

**Taula 3.1** Mitja de la raça en els caràcters amb diferències significatives (Serra *et al.*, 1998).

<b>Caràcter</b>	<b>Mitja Ibèric</b>	<b>d.t.</b>	<b>Mitja Landrace</b>	<b>d.t.</b>	<b>significació</b>
<b>GMD</b>	0.45	0.01	0.64	0.01	P<0.001
<b>PC</b>	93.10	1.90	76.20	1.50	P<0.001
<b>KOP</b>	78.60	0.70	72.40	0.50	P<0.001
<b>GD</b>	48.10	1.40	20.70	1.00	P<0.001
<b>pH<sub>24</sub></b>	5.75	0.02	5.59	0.02	P<0.001
<b>color</b>	33.80	1.40	38.70	1.10	P<0.01
<b>%GRIN</b>	3.91	0.20	0.66	0.15	P<0.001
<b>%Humitat</b>	72.80	0.20	75.00	0.10	P<0.001
<b>Hematina</b>	47.92	2.51	39.52	1.94	P<0.01
<b>%Palmític</b>	22.98	0.23	20.60	0.18	P<0.001
<b>%Oleic</b>	48.98	0.43	46.50	0.34	P<0.001
<b>%Linoleic</b>	12.11	0.40	16.15	0.32	P<0.001
<b>%Linolènic</b>	1.39	0.11	2.06	0.01	P<0.001
<b>%Saturats</b>	34.79	0.42	32.16	0.33	P<0.001
<b>%Monoinsat</b>	51.67	0.51	49.50	0.40	P<0.01
<b>%Poliinsat</b>	13.50	0.48	18.21	0.38	P<0.001
<b>%Fibres I</b>	12.09	0.66	9.09	0.51	P<0.001
<b>dFibres IIB</b>	48.01	1.35	56.31	1.06	P<0.001

**Abreujaments:** GMD, guany mig diari (kg); PC, pes de canal (kg); KOP, rendiment de la canal (%); GD, espessor del greix dorsal (mm); pH<sub>24</sub>, pH 24 post-mortem; %GRIN, percentatge de greix intramuscular en el *L. Lumborum* (Ll); %Humitat en Ll; Hematina, ìg d' àcid hematínic/g de múscul *Longissimus*.

Com s'observa a la taula 3.1, el rendiment de la canal fou més elevat a Ibèric, encara que aquest efecte sigui probablement degut a una edat i un pes al sacrifici major a Guadyerbas que a Landrace. També es va observar un espessor del greix dorsal molt més desenvolupat en Ibèric que en Landrace. Aquest caràcter, alhora, s'associava a la composició en àcids grassos del teixit adipós, essent molt més abundants a Guadyerbas els àcids greixosos saturats (palmític o C16:0) i monoinsaturats (oleic o C18:1) que els poliinsaturats (linoleic o C18:2 i linolènic o C18:3). Es sap que el grau d'insaturació dels àcids grassos està positivament correlacionat amb la seva susceptibilitat a l'enranciment oxidatiu i sembla ser que el

mecanisme pel que s'inverteixen les proporcions en la composició del greix a Landrace és per la seva baixa capacitat de síntesi d'àcids greixosos, de manera que els que són essencials, com el linoleic (C18:2) augmenten la seva abundància relativa al teixit adipós. També es va observar un percentatge de greix intramuscular superior en les mostres d'Ibèric que en les de Landrace, fins i tot major que a Duroc i Meishan, i pel mateix efecte, el percentatge d'humitat muscular era significativament més elevat a Landrace. Està descrit que el percentatge de greix intramuscular està correlacionat amb el potencial oxidatiu del múscul esquelètic, i per tant, com era d'esperar, hi havia una major proporció de fibres musculars de tipus I (oxidatives) en Ibèric, i que a més eren de major diàmetre que en Landrace. D'altra banda, aquesta última raça presentava un major nombre de fibres del tipus IIB, que a més, eren de major calibre. Un creixement ràpid i magre es correlaciona amb un metabolisme muscular més glicolític i per tant és lògic que a Ibèric el metabolisme sigui més oxidatiu, que alhora s'associa a una major concentració de pigments i a una coloració més fosca.

En definitiva, totes les dades foren similars a les descrites i esperades. Tot i que el nombre d'animals analitzats fou petit, es varen mostrar diferències clarament significatives entre les dues races Ibèric i Landrace. Aquest treball va servir per a demostrar que el porc Ibèric i especialment l'estirp Guadyerbas és clarament interessant com a model per a estudis genètics.

L'obtenció dels animals  $F_2$  es va iniciar amb la inseminació de 31 femelles Landrace amb semen de 3 mascles Guadyerbas. Posteriorment, evitant els encreuaments consanguinis, es van creuar 6 mascles amb 73 femelles  $F_1$ . Els registres fenotípics es van prendre sobre 577 animals de la  $F_2$ , dels quals 295 eren mascles i 282 femelles. El maneig dels animals es va fer en condicions intensives i amb alimentació *ad libitum* a la granja de Nova Genètica. Aquest encreuament experimental i el projecte de detecció de QTLs per al que va ser creat, es batejaren amb el nom d'encreuament i projecte IBMAP (*IBMAP Consortium*, 1998) i amb aquest nom ens hi referirem.

A la present Tesi es descriuen i s'analitzen els resultats corresponents a 321  $F_2$  agrupats en 58 famílies en las que hi estan involucrats els tres mascles Ibèrics i 29 femelles Landrace.

## 3.2 CARACTERS FENOTÍPICS

El sacrifici dels animals de la F<sub>2</sub> es va realitzar a una edat mitjana de  $175 \pm 0,3$  dies amb un pes de la canal de  $74 \pm 0,6$  kg, en nou lots diferents. L'especejament dels animals fou dut a terme de la mateixa manera que en les condicions comercials. Els caràcters analitzats s'assemblen als descrits per Serra *et al.* (1998) i els més destacats són els següents:

### 3.2.1 Caràcters enregistrats

#### 3.2.1.1 *Mesures de qualitat de la canal*

- 1.- Pes viu entre 1 i 3 dies abans del sacrifici (kg).
- 2.- Pes de la canal passats 30 minuts del sacrifici (kg).
- 3.- Pes del greix subcutani dorsal (kg) i de l'espessor del greix dorsal (mm) entre la tercera i la quarta costella i a sis cm. de la línia mitja, mesurat amb la sonda òptica *Fat-O-meter P2*, i mesurat amb regleta 24 hores post-mortem **PRG34**.
- 4.- Area del llom (cm<sup>2</sup>).
- 5.- Profunditat del llom (mm) mesurat amb regleta entre la tercera i quarta costella i a sis cm de línia mitja 24 hores post-mortem **PRL34**.
- 6.- Pes del pernil (kg).
- 7.- Longitud de la canal (cm).

#### 3.2.1.2 *Mesures de qualitat de la carn*

- 1.- pH<sub>u</sub> al múscul *Longissimus dorsi* i semimembranós.
- 2.- Color de la carn en el *longissimus* 24 hores post-mortem mitjançant l'espectrofotòmetre i el colorímetre Minolta CR-200, en el que L\* indica la pal·lidesa o claredat del color, a\* recull l'escala de colors del verd al vermell i els colors extrems que indica b\* són el groc i el blau.
- 3.- Contingut en pigments, mesurat com a percentatge d'hematina a la carn mitjançant el mètode descrit per Hornsey *et al.* (1956).

4.- Percentatge de greix intramuscular al múscul *L. lumborum* mesurat mitjançant la tècnica NIT (*Near Infrared Transmittance*).

5.- Histoquímica muscular al *L. lumborum* i al múscul Vast, per a mesurar el diàmetre i el percentatge de fibres musculars del tipus I, IIA, IIB i IIBoxi. Per a l'anàlisi es van utilitzar les tècniques de tinció mATPasa i NADH-TR per a discriminar el metabolisme de les fibres musculars.

### 3.2.1.3 *Mesures de qualitat del greix (mesurades per cromatografia de gasos)*

1.- Percentatge d'àcid mirístic (C14:0).

2.- Percentatge d'àcid palmític (C16:0) i palmitoleic (C16:1).

3.- Percentatge d'àcid esteàric (C18:0), oleic (C18:1 n9) i vaccènic (C18:1 n-7).

4.- Percentatge d'àcid linoleic (C18:2) i linolènic (C18:3).

5.- Percentatge d'àcid gadoleic (C20:1) i eicosadienoic (C20:2).

6.- Índex metabòlics dels àcids grassos (longitud mitja de la cadena de carbonis o ACL, índex de dobles enllaços o DBI, índex d'insaturació o UI i índex de peroxidabilitat o PI.

### 3.2.2 **Registres fenotípics obtinguts**

Els resultats fenotípics per a aquells caràcters analitzats en els que s'han obtingut evidències d'algun QTL per als cromosomes analitzats en aquesta tesi, es descriuen a la taula 3.2. El nombre d'animals analitzats per a la majoria dels caràcters supera els 300 i per tant, es pot considerar que la mida de la mostra d'animals analitzats es prou elevat per a obtenir resultats fenotípics fiables.

**Taula 3.2** Registres fenotípics en la F<sub>2</sub>, dels caràcters que posseeixen algun QTL descrit a la present tesi.

<i>caràcter</i>	<i>N</i>	<i>mitja</i>	<i>d.t.</i>	<i>màxim</i>	<i>mínim</i>
% IIA	159	9.20	3.41	18.42	2.66
% IIB	159	6.78	4.32	20.79	0.01
Longitud canal	321	79.26	3.96	90.00	65.00
Pes canal	321	74.90	9.82	107.14	44.35
Pes pernil	321	10.89	1.37	15.12	6.25
Area llom	305	34.66	5.03	51.41	20.40
PRL34	317	47.48	6.37	68.00	29.00
PRG34	317	28.31	7.90	53.00	10.00
P2	318	25.75	5.85	44.00	12.00
Pes greix	317	2.51	0.76	5.44	1.02
a*	319	6.53	1.23	14.37	0.61
L*	319	48.86	3.95	59.23	37.16
Hematina	318	29.49	6.63	47.89	12.11
pH <sub>i</sub>	321	5.91	0.30	7.75	5.37
Ac. mirístic	321	1.50	0.17	2.12	0.83
Ac. palmític	321	21.80	1.46	25.22	16.61
Ac. palmitoleic	321	2.47	0.37	4.07	1.54
Ac. esteàric	321	10.88	0.91	25.41	7.85
Ac. vaccènic	321	2.94	0.28	5.84	0.40
Ac. oleic	321	44.12	1.67	49.60	7.79
Ac. linoleic	321	14.43	1.45	18.79	0.37
Ac. linolènic	321	1.08	0.18	0.23	0.53
Ac. gadoleic	321	0.86	0.21	2.29	0.22
Ac. eicosadienoic <sup>a</sup>	321	0.63	0.17	1.85	0.13
ACL	321	17.50	0.04	17.69	17.40
DBI	321	0.84	0.03	0.93	0.68
UI	321	2.52	0.23	3.25	1.50
PI	321	18.49	1.60	23.60	12.75

<sup>a</sup> en nomenclatura IUPAC.

### 3.3 ANALISI DELS MICROSATEL·LITS

#### 3.3.1 Extracció de DNA

Es van provar varis protocols d'extracció de DNA a partir de sang fresca no heparinitzada. Aquests protocols es basen en l'ús de tampons de digestió amb detergent i

proteïnasa K per a lissar les membranes plasmàtica i nuclear dels leucòcits i posterior desproteïnitació del DNA mitjançant precipitació salina o extracció amb solvents orgànics (fenol: cloroform: alcohol isoamílic en la proporció 25:24:1). Es va escollir un mètode de precipitació de les proteïnes mitjançant la addició de NaCl saturat (Miller *et al.*, 1988), que tot i que proporciona un DNA de qualitat inferior a la obtinguda en la desproteïnitació amb solvents orgànics, la puresa i qualitat del DNA és prou bona. A més, la simplicitat, la rapidesa i la quantitat de DNA genòmic que s'obté supera a la proveïda pels solvents orgànics. Aquest protocol va ésser aplicat als individus que pertanyen a la  $F_0$ , a partir de 400  $\mu$ L de sang fresca. En els casos en que no fou possible obtenir DNA de sang, el DNA es va extreure de 30 mg de teixit esplènic o muscular, amb un mètode que, mitjançant l'ús d'una major proporció de detergent i proteïnasa K, permet digerir els teixits i en el que s'usa fenol per a desproteïnitze el DNA. Donat el gran volum de mostres, el DNA de la  $F_1$  y la  $F_2$  es va obtenir a partir de 3,75 mL de sang mitjançant un protocol comercial basat també en una precipitació salina (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, cat. N° 1 667 327, *Boehringer Mannheim*). El DNA es va resuspendre en TE (TRIS-HCl pH 8 10 mM; EDTA 1mM pH 8) i l'emmagatzemament es feia a  $-20$  °C per poder disposar d'un DNA genòmic de bona qualitat i el menys perible possible.

La comprovació quantitativa i qualitativa del DNA es va fer a partir d'un  $\mu$ L de DNA genòmic de les extraccions, mitjançant electroforesi en gels d'agarosa amb les següents característiques:

- Agarosa al 0,8 % en tampó TAE (0,04 M Tris-acetat, 0,001 M EDTA).
- Voltatge de 50 V.
- 35 minuts.
- Com a marcador de quantitat es va utilitzar una escala amb tres concentracions diferents de bacteriòfag  $\lambda$ .

Un cop realitzada l'electroforesi, els gels s'exposaven a llum UV per a poder observar les bandes del DNA-EtBr i es fotografiaven amb un sistema CCD i les imatges eren digitalitzades mitjançant un *software* informàtic de captació d'imatges (BIOCAPT V.97 software). Les imatges s'analitzaven posteriorment mitjançant el *software* BIO-ID Version 97

que permet realitzar, entre d'altres funcions, la quantificació del DNA per densitometria basada en la intensitat dels *pixels* de la imatge digitalitzada.

En alguns casos, per corroborar la quantificació i estimar la puresa de l'extracció del DNA genòmic es va fer un estudi espectrofotomètric del DNA a 260 nm de longitud d'ona, i es va comparar la relació d'absorbància a 260nm/280 nm.

### 3.3.2 Microsatèl· lits

Un del objectius del treball descrit en aquesta Tesi era el desenvolupament d'un mapa de lligament per als cromosomes 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 13, 16, 17 i X, assignats al nostre laboratori en el projecte ILMAP. La resta de cromosomes fou analitzada al laboratori de l'Àrea de Genètica Animal del INIA. Per a l'obtenció dels mapes de lligament, indispensables per a la detecció de QTLs, disposàvem de *primers* marcats fluorescentment i que amplifiquen regions que engloben microsatèl· lits, distribuïts pel coordinador del *U.S. Pig Genome Program*, Max F. Rothschild. L'elecció dels microsatèl· lits es va realitzar en funció de tres criteris:

- la posició en el genoma, que requeria marcadors espaiats cada 20 cM. Per fer-ho ens vàrem basar en els mapes de lligament del USDA-MARC (<http://www.genome.iastate.edu/maps/marcmap/html>).
- La facilitat d'amplificació dels marcadors així com la facilitat d'interpretació dels productes amplificats.
- La informativitat dels marcadors, que s'incrementa quan hi ha al·lels alternatius fixats a cada població parental o quan el nombre d'al·lels és molt elevat. Aquest paràmetre fou valorat en tres mascles Ibèrics i quinze femelles Landrace mitjançant l'índex d'informativitat descrit per Ron *et al.* (1995).

L'índex de Ron ( $I_e$ ) analitza la informativitat dels microsatèl·lits en les poblacions parentals, de forma que no cal genotipar les generacions següents per obtenir aquesta dada. Aquest càlcul ha estat adaptat al nostre disseny experimental per poder-lo aplicar (Clop *et al.*, 1998). Així, si  $A_i$ ,  $A_j$  és el genotip de cada mascle Ibèric, calculem:

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

On:  $P_i$  = Freqüència de l'al·lel  $A_i$  a la mostra de femelles Landrace.

$P_j$  = Freqüència de l'al·lel  $A_j$  a la mostra de femelles Landrace.

Un cop calculat el  $I_e$  per a cadascun dels tres mascles, es calcula la mitja dels resultats. Així, com menor sigui la freqüència dels al·lels Ibèrics a Landrace, més gran serà el valor  $I_e$  per aquell microsatèl·lit.

Així, el  $I_e$  és màxim quan els al·lels presents a Ibèric no es troben a la població Landrace analitzada i, per contra,  $I_e$  és 0 quan les dues poblacions analitzades tenen fixat el mateix al·lel.

Al no disposar de la informació genealògica en el moment en que s'estava realitzant aquesta part del projecte, calculàrem el  $I_e$  de cada marcador en un grup de 15 femelles que foren comparades amb els tres mascles indistintament, és a dir, sense tenir en compte la informació d'encreuaments ( $I_{e15}$ ).

Després de provar un total de 89 marcadors repartits en els onze cromosomes assignats a la UAB, se'n van descartar 29. Aquests marcadors van ser eliminats bé per estar en posicions cromosòmiques properes a marcadors més informatius, per ser de difícil amplificació o interpretació, o bé per tenir un  $I_{e15}$  inferior a 0,5. Així doncs, finalment es van seleccionar 60 marcadors amb un  $I_{e15}$  prou elevat (Taula 3.3), espaiats en segments d'aproximadament 20 cM i de fàcil amplificació i interpretació. Un cop seleccionats els marcadors mitjançant el  $I_e$  dels tres mascles i quinze femelles, es va recalculer aquest índex amb les dades de totes les femelles Landrace i, basant-se en la informació dels encreuaments realitzats, comparant les femelles només amb els mascles amb els que s'havien creuat ( $I_{e29}$ ).



Així, posteriorment es va comparar aquest resultat amb l'obtingut inicialment. A l'annex 4 es presenta la localització genètica dels microsatèl·lits seleccionats, en el mapa de lligament accessible a l'adreça web <http://www.genome.iastate.edu/maps/marcmmap/html>.

**Taula 3.3.** Microsatèl·lits seleccionats per a realitzar el mapa de lligament.

Cr.	Microsat.	Seqüència dels primers	Fluor.	I <sub>e</sub> <sub>15</sub>	Referència
1	CGA	GTCACAGTGGATGGCATTG	Hex	1.00	Ellegren <i>et al.</i> , 1994c
1	CGA	ACATCCCTAAGGTCGTGGC			
1	S0113	AGCCTCCGTGTAATATAATCCTTG	Tet	0.90	Ruyter <i>et al.</i> , 1994c
1	S0113	AGGACATCTCTCATTCTCTGGCAG			
1	S0155	TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTTG	Fam	0.74	Ellegren <i>et al.</i> , 1994c
1	S0155	AAAGTGGAAAGAGTCAATGGCTAT			
1	SW1515	CTCCGGTTTCCATTTGTGG	Hex	0.79	Alexander <i>et al.</i> , 1996a
1	SW1515	GATCCCTGCCCAACAC			
1	SW1828	AATGCATTGTCTTCATTCAACC	Fam	0.84	Alexander <i>et al.</i> , 1996a
1	SW1828	TTAACCGGGGCACTTGTG			
2	IGF2 <sub>ms</sub>	GTTTCTCCTGTACCCACACGCATC	Fam	0.92	NO PUBLICAT
2	IGF2 <sub>ms</sub>	CTACATAGCTGGGCTCAGGG			
2	S0141	GATCTGGTCTGTCTTGTGTCTT	Hex	0.96	Jung <i>et al.</i> , 1994
2	S0141	AGACCCCAACTCTTGGTCTCAT			
2	S0226	GGTTAAACTTTTNCCTCAATACA	Fam	1.00	Robic <i>et al.</i> , 1994
2	S0226	GCACTTTTAACTTTCATGATGCTCC			
2	S0378	TGGGACCTAATTGTTGAGACAG	Hex	0.90	Robic <i>et al.</i> , 1997
2	S0378	ACTGAGCCACAATGAAGAGAAC			
2	SW240	AGAAATTAGTGCTCAAATTGG	Tet	0.90	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
2	SW240	AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA			
2	SW395	TTCCAAGGTATGGAGATATCC	Fam	0.92	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
2	SW395	GATCCCTACCTCACACCACA			
2	SWr308	TCCAGTCCCTTGGTCTCTTG	Tet	1.00	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
2	SWr308	TTAGCCTGGGAACCTCCATG			
3	S0002	GAAGCCAAAGAGACAACTGC	Hex	0.83	Fredholm <i>et al.</i> , 1993
3	S0002	GTTCTTTACCCACTGAGCCA			
3	S0206	TGGGTGTGGTCAACAACCAA	Fam	0.67	Robic <i>et al.</i> , 1995
3	S0206	ACGTGCCTGCCTCTACCATC			
3	S0216	TCCACCACTGCCAGTCACTT	Tet	1.00	Robic <i>et al.</i> , 1995
3	S0216	CTGGGCTTTGAACCCACA			
3	SW349	CCTGTTGTAGGCTCCATGAGC	Hex	1.00	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
3	SW349	CTAGGAGTCGGCCCTGAAC			
3	SW72	ATCAGAACAGTGCGCCGT	Fam	1.00	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
3	SW72	TTTGAAAATGGGGTGTTC			
4	S0001	TGGATGGGTCTCATTCTCAG	Fam	0.90	Fredholm <i>et al.</i> , 1993
4	S0001	TGATTCTAGCCTGAGAAGC			
4	S0097	GACCTATCTAATGTCAATTATAGT	Tet	0.85	Ellegren <i>et al.</i> , 1993
4	S0097	TTCTCCTAGAGTTGACAAACTT			
4	S0214	CCCTGCAAGCGTTTCATCTCA	Tet	0.98	Robic <i>et al.</i> , 1995
4	S0214	GGCTGTGCCAAGTCCATTAG			
4	S0301	CCGTCTTACTTAGGATGTTT	Fam	0.83	Hoyheim <i>et al.</i> , 1994
4	S0301	TGATGTGTTTATGTGTTTGA			
4	SW2404	TGACAGCCTCCTGGTTCC	Hex	0.71	Alexander <i>et al.</i> , 1996b

Cr.	Microsat.	Seqüència dels primers	Fluor.	Ie <sub>15</sub>	Referència
4	SW2404	AGCTGTCGTTGTTTTCTCTCC			
4	SW445	CCTCCCTGGCACTCATTG	Tet	1.00	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
4	SW445	CACACACACAAGCAGGTGC			
4	SW839	GGAAACCAGGATAACAGGAGG	Fam	1.00	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
4	SW839	TAACCCACTGTACCACCAAGG			
7	S0025	TCTCCCTTCCCTCCATCTCT	Fam	0.67	Coppieters <i>et al.</i> , 1993
7	S0025	CTCCATCAGCCAAAAACATT			
7	S0064	TGAGCTGGAGGTTAGCTACC	Fam	0.70	Fredholm <i>et al.</i> , 1993
7	S0064	TGTCAGAAAGACTGCTTGCG			
7	S0066	ACATTTAAGGTGAAGCAGCAAGTG	Tet	1.00	Fredholm <i>et al.</i> , 1993
7	S0066	TGTCATCAACATTGAGAATTGGTG			
7	S0101	GAATGCAAAAGAGTTCAGTGTAGG	Hex	0.76	Ellegren <i>et al.</i> , 1994b
7	S0101	GTCTCCCTCACACTTACCGCAG			
7	SW632	TGGGTTGAAAAGATTTCCCAA	Tet	0.93	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
7	SW632	GGAGTCAGTACTTTGGCTTGA			
7	SW764	TAGCAGATTGTTTAGCCTCTGTG	Tet	0.98	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
7	SW764	AAGCATCTTTTCTAAGCACAACA			
7	TNF-b	CTGGTCAGCCACCAAGATTT	Hex	0.85	Robic <i>et al.</i> , 1996
7	TNF-b	GGAAATGAGAAGTGTGGAGACC			
8	S0017	CTAGGAGAAAATCTGAGGTT	Hex	0.98	Coppieters <i>et al.</i> , 1993
8	S0017	GTTTGAATGGAGGTGCTGTA			
8	S0225	GCTAATGCCAGAGAAATGCAGA	Hex	0.81	Robic <i>et al.</i> , 1994
8	S0225	CAGGTGGAAAGAATGGAATGAA			
8	SW2410	ATTTGCCCCCAAGGTATTTT	Hex	1.00	Alexander <i>et al.</i> , 1996b
8	SW2410	CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG			
8	SW61	GAGAGGGATGAGCACTCTGG	Hex	1.00	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
8	SW61	AGAGCATTCAGGCTTCTCA			
8	SW905	ATCCCAACCTTCTTTCAAAGG	Fam	0.63	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
8	SW905	TCCAGTGGCAGAACAACATG			
8	SWr1001	AACTTCCATATGCCACAGGTG	Fam	1.00	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
8	SWr1001	GGTCTCTCAGAAAAGTCCC			
9	SW1349	ATTTAATGTTTTTCATTGTGCCG	Fam	0.43	Alexander <i>et al.</i> , 1996a
9	SW1349	CTTACATGATGCCAAACTGG			
9	SW2093	ATGCACCTGCTCAGAGGC	Tet	0.97	Alexander <i>et al.</i> , 1996a
9	SW2093	GTCTGTTGAGGCCATGGG			
9	SW2571	AAGGGCATACAAAGTGCAGG	Fam	0.88	Alexander <i>et al.</i> , 1996b
9	SW2571	TCCATGTGCACACACTCATG			
9	SW911	CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC	Fam	0.63	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
9	SW911	CATCTGTGGAAAAAAAAGCC			
9	SW983	GCAGTCCCCTCTTAGGTATATATCC	Hex	0.94	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
9	SW983	ATAATGCTGCTATGAACACTGTAGTG			
13	SW1056	GGTGGTTGGTTCTCAAAAACA	Tet	0.47	Alexander <i>et al.</i> , 1996a
13	SW1056	TTTCTGGTGTACAGCAAAGTGA			
13	SW219	CCGCCAATGCCATTCCAA	Hex	0.43	Robic <i>et al.</i> , 1994
13	SW219	CACATCGGTAGTGTTTTACATTGAT			
13	SW398	AAGTGCCAATGCTTTGTTC	Hex	0.76	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
13	SW398	CGGAGGAGAAATAAGGGTAGC			
13	SW769	GGTATGACCAAAGTCTGGG	Fam	0.61	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
13	SW769	TCTGCTATGTGGGAAGAATGC			
13	SW935	GTGGTGGTTGCTCTTATAGC	Tet	0.90	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
13	SW935	ATATAAGGGAAAATAATCTGAAAGAGTATG			

Cr.	Microsat.	Seqüència dels primers	Fluor.	Ie <sub>15</sub>	Referència
13	SWr1008	ACAGCCACCAACAGTGTITG	Hex	0.97	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
13	SWr1008	GAACCTCCATATGCTGCAAGTG			
16	S0061	AAGCAGAAGGGATCTCTCTA	Hex	0.55	Fredholm <i>et al.</i> , 1993
16	S0061	GCTGTTTCTGGGTTCTCTTA			
16	S0298	ACATAACATCGTAAATCAGC	Tet	0.71	Hoyheim <i>et al.</i> , 1995
16	S0298	CTCCATCACAGGTCTCACA			
16	SW2517	ATACTATGTGCTTGCCTGCG	Fam	1.00	Alexander <i>et al.</i> , 1996b
16	SW2517	AAGGAACCCATGAGAGTACTGG			
16	SW742	AATTCTACTTCTGGGGAGAGGG	Hex	0.99	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
16	SW742	CTTTTGGGAACATTTCTGCC			
17	SW1920	GATCCGTATCTATAGCCACCTG	Tet	0.94	Alexander <i>et al.</i> , 1996a
17	SW1920	ATGAAAGCTACCAACCCTTCC			
17	SW24	CITGGGTGGAGTGTGTGC	Tet	1.00	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
17	SW24	ATCCAAATGCTGCAAGCG			
17	SW2431	CTTCCCAGGATGTTGTCTAAAC	Fam	0.57	Alexander <i>et al.</i> , 1996b
17	SW2431	CATGGTGCACACTTAGTGGG			
X	SW1608	CTAATGTTGACTTGATTAATGGGC	Fam	0.90	Alexander <i>et al.</i> , 1996a
X	SW1608	TGAAGCTTCTACTTAAGGAAGAATC			
X	SW2126	CCTAAATGTCCATCTATAAATGAATGAC	Tet	0.65	Alexander <i>et al.</i> , 1996a
X	SW2126	CATTATTTTGTCTTTTAAATAGCTGAG			
X	SW2456	GAGCAACCTGAGCTGGAAC	Hex	0.95	Alexander <i>et al.</i> , 1996b
X	SW2456	AATGTGATTGATGCTGTGAAGC			
X	SW2476	GAGAGGGACAGAGCTGAGAGC	Hex	0.85	Alexander <i>et al.</i> , 1996a
X	SW2476	CTTGAGGTTTGTGGCAGC			
X	SW949	TGAGCAATGAGTTCAATGCC	Tet	1.00	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
X	SW949	TCGTTGGTGAAGGCATCC			

**Abreujaments.** Cr., cromosoma; microsat., microsatèl· lit.; Fluor., fluorescència.

### 3.3.3 Reaccions d'amplificació

Les reaccions d'amplificació o PCRs realitzades per seleccionar els microsatèl· lits més adequats es van realitzar seguint les condicions recomanades a la base de dades accessible via web <http://www.genome.iastate.edu/maps/marcmmap/html> en un termociclador PTC-100 de MJ Research. Les PCRs de genotipat dels individus del pedigree per als microsatèl· lits seleccionats per a la construcció del mapa de lligament es van realitzar en un termociclador automatitzat ABI PRISM 877 *Integrated Thermal Cycler*. Aquest equip consisteix en un termociclador associat a un braç mecànic que duu incorporats una agulla i un sistema de xeringues que permet la distribució de volums petits i exactes de diferents solucions i reactius. Així, es poden introduir els tubs amb les diferents solucions de la PCR per una banda i els DNAs genòmics per l'altra, indicant a l'ordinador associat al sistema que els barregi en les proporcions desitjades, i realitzant posteriorment l'amplificació. Totes les PCRs dels

microsatèl·lits seleccionats es realitzaren en un volum de cinc microlitres i en les mateixes condicions, amb algunes excepcions (Taula 3.4).

### Concentracions en la PCR

- 50 mM KCl, 15 mM Tris-HCl a pH 8
- MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM
- dNTPs 0,2 mM
- *Primers* 1 pmol de cadascun
- DNApol 0,25 Unitats AmpliTaq Gold™
- DNAgenòmic 30 ng

### Perfil tèrmic

- *Hot Start* a 94 °C / 10 minuts
- *Touchdown* (10 cicles)
  - 94 °C / 15 seg
  - (62 °C → 52 °C) / 30 seg
  - 72 °C / 1 minut
- 25 cicles
  - 94 °C / 15 seg
  - 52 °C / 30 seg
  - 72 °C / 1 minut
- Extensió final a 72 °C / 60 minuts

El protocol de PCR *Touchdown* consisteix en realitzar una sèrie de cicles la temperatura d'*annealing* dels quals va disminuint gradualment en cada cicle (en el nostre cas la reducció era d'un grau per cicle). Així s'obté una reacció més universal, permetent l'amplificació de la major part dels fragments en les mateixes condicions.

A la taula 3.4 es detalla com, amb la intenció de millorar l'amplificació d'alguns microsatèl·lits, es va doblar la concentració dels *primers* S0395, S0226, S0113 i S0378 i es va reduir la de MgCl<sub>2</sub> per al microsatèl·lit IGF2<sub>ms</sub>.

**Tabla 3.4.** Estructura dels 10 sets de microsatèl·lits.

SET	FLUOR.	VOLUM	MICROSAT.			
I	F	1	SW839*	S0226*		
I	T	1	SW240*	S0214*	S0097	
I	H	2	SW2410*	S0101*	S2404	
II	F	1	S0155*	S0301*	S0001	
II	T	1	SW445*	SW632*		
II	H	1	S0225*	SWr1008*		
III	F	2.5	2pmol SW395*	2pmol S0226*	SW72*	
III	T	2	2pmol S0113*	S0298*	S0206*	
III	H	2.5	S0017*	SW2456*		
IV	F	3	S0025*	S0064*	SW905*	
IV	T	2	SW764*	S0066*		
IV	H	3	S0141*	CGA*	2pmol S0378	
V	F	5	IGF2 <sub>ms</sub> 1.5 mM Mg <sup>++</sup>	SW769		
V	T	2	SW949*	SW2456*		
V	H	5	S0002*	S0219*	SW2456	
VI	F	4	SW911			
VI	H	3	SW983	SW742	SW398	S0061
VII	F	5	SW1828	SWr1101		
VII	T	2	SW2093			
VII	H	3	SW349			
VIII	F	5	SW2517	SW1608		
VIII	T	3	SWr308	SW935		
VIII	H	5	SW61			
IX	F	1	SW2571	SW2431		
IX	T	1	SW2126			
IX	H	1	SW1515			
X	F	1	SW1349			
X	T	1	SW1920	SW1056		
X	H	1	TNFb			

**Abreujaments:** *SET* conjunt de microsatèl·lits analitzats en una mateixa electroforesi. **F** fam, **T** tet, **H** hex. *MICROSAT.* Microsatèl·lit. A la columna *VOLUM* es detalla el volum en ul de cada producte de PCR en el total de la barreja del set. En els microsatèl·lits que fou necessària una concentració de *primer* o de MgCl<sub>2</sub> diferent a l'habitual, aquesta concentració es detalla a la columna *MICROSAT.*. Els microsatèl·lits que es troben a la mateixa fila foren amplificats conjuntament (*multiplex*). Per a l'anàlisi dels microsatèl·lits es barrejava 1 uL de cada set en 11.5 uL de formamida + GS Standard. \* microsatèl·lits amplificats en una mateixa reacció (*multiplex*).

Per als marcadors que havien estat seleccionats, es va aplicar un sistema que dificulta l'acumulació d'errors per mala interpretació dels genotips. Aquest sistema consisteix en amplificar i analitzar les famílies d'animals conjuntament en dos grups. Primer es realitza l'amplificació dels animals de la generació fundadora amb els descendents directes de la  $F_1$  en una placa organitzada per famílies en un ordre encapçalat pels progenitors i seguit dels seus fills. Posteriorment es repeteix el mateix disseny, però aquest cop es col·loquen en primer terme els  $F_1$  seguits dels seus descendents directes de la  $F_2$ .

Per optimitzar les reaccions d'amplificació i per reduir el temps emprat i les despeses de genotipat, es poden amplificar varis marcadors simultàniament. Aquesta tècnica, que es coneix com a *multiplex*, requereix una optimització prèvia, que pot resultar llarga i poc exitosa degut a la dificultat i poca repetibilitat que presenta. Per a realitzar l'anàlisi complet de tots els cromosomes que ens havien estat assignats, era necessari realitzar el genotipat de nombrosos microsatèl·lits, per la qual cosa l'optimització de les *multiplex* per a tots resultava una tasca força arduosa. Donat que en el termociclador automatitzat el treball manual queda sensiblement reduït i el temps no resulta un factor limitant, es va decidir no dedicar gaires esforços en l'optimització de les *multiplex*, i tan sols es varen dur a terme aquelles en les que s'aconseguí una optimització raonable en les primeres proves.

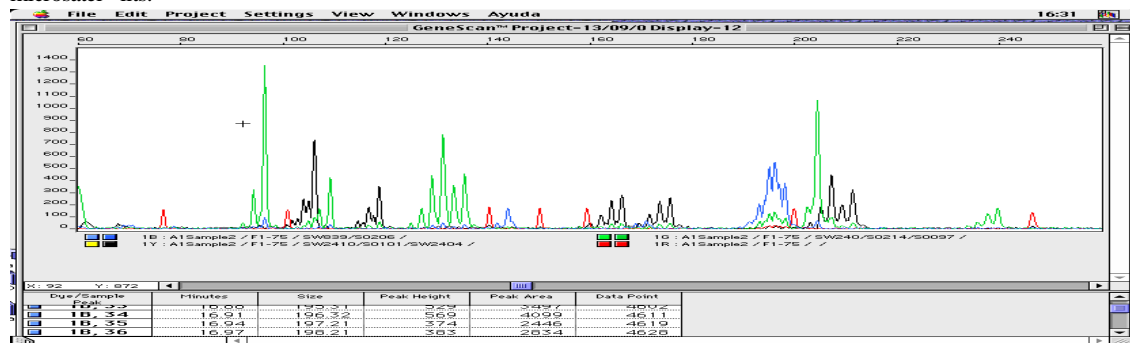
### 3.3.4 Anàlisi dels productes de PCR

Un cop realitzades les PCRs, aquestes eren sotmeses a electroforesi en un equip automatitzat d'electroforesi capil·lar i detecció fluorescent (ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* de *Applied Biosystems*), conjuntament amb un marcador intern de pesos moleculars (GS350, *Applied Biosystems*) marcat amb el fluorocrom Tetrametilrodamina, conegut com a Tamra. Aquest equip automatitzat du integrats un capil·lar que està ple d'un polímer hidrofílic (POP-4) compostat per una solució d'acrilamida al 3% i urea. Als extrems del capil·lar hi ha incorporats uns elèctrodes que permeten l'aplicació d'un camp elèctric en el capil·lar, de forma semblant a les electroforesis en gels. Els fragments de DNA migren en funció de la seva longitud i al passar per una finestra que hi ha en el capil·lar, un làser excita els fluorocroms associats als fragments amplificats. Els fluorocroms units als *primers* desprenen una fluorescència al ésser excitats i en funció del màxim de longitud d'ona que desprenen

poden ésser distingits. Per al marcatge dels microsatèl·lits es van utilitzar el fluorocroms Fam (Carboxifluoresceïna), Tet (Tetraclorofluoresceïna), i Hex (Hexaclorofluoresceïna) (Taula 3.4). Per a poder aconseguir una major optimització de les electroforesis es barrejaven els productes de diferents reaccions de la manera que es detalla a la taula 3.4. Les electroforesis es van realitzar a 15 kV i 60 °C durant 22 minuts.

L'equip du incorporat un ordinador que mitjançant un *software* d'anàlisi (*GeneScan Analysis Software* d'*Applied Biosystems*), converteix el senyal fluorescent en un electroferograma, (Figura 3.3) en el qual els pics equivalen a les bandes dels gels electroforètics. A l'electroferograma, els pics de color blau corresponen als fragments marcats amb Fam, els verds amb Tet i els grocs amb Hex. El *software* és capaç d'assignar a cada pic una intensitat i una grandària mesurada en parells de bases. Degut al marcatge fluorescent dels primers, varis productes amplificats poder analitzar-se en una mateixa electroforesi, fins i tot quan són de mides similars. Així, per a optimitzar les electroforesis es barrejaven les reaccions de PCR, en funció del fluorocrom dels primers i de les mides dels fragments amplificats, en les degudes proporcions (Taula 3.4). Posteriorment es desnaturalitzava 1 µL de la mescla amb 11 µL de formamida+GS-350 TAMRA a 95 graus centígrads, durant 3-5 minuts.

**Figura 3.3** Electroferograma obtingut amb el *GeneScan Analysis Software* corresponent al set I de microsatèl·lits.



S'hi observen pics d'amplificació per a 8 microsatèl·lits, 2 marcats amb fluorescència Fam, tres amb fluorocrom Tet y 3 més amb l'Hex.

Els electroferogrames eren transferits a la base de dades i analitzats mitjançant el *software* GEMMA (Iannucelli *et al.*, 1996). Aquest programa és capaç de realitzar una interpretació automàtica dels genotips a partir dels gràfics creats per GeneScan i pot realitzar verificacions de l'herència mendeliana dels diferents al·lels de cada marcador amb les dades

genealògiques. A més, el *software* permet l'emmagatzemament i el maneig de la informació de la genealogia, animals, DNAs, marcadors, protocols de PCR, disseny de les plaques de PCR, electroforesis, etcètera, així com la realització de diferents càlculs de distàncies genètiques, freqüències al·lèliques, informativitats i variabilitat dels marcadors.

### 3.3.5 Informativitat i Variabilitat dels marcadors

Com ja s'ha descrit prèviament, el primer càlcul d'informativitat dels microsatèl·lits es va realitzar a la  $F_0$  mitjançant l'índex de Ron ( $I_e$ ) per tal de poder seleccionar els marcadors més informatius en el nostre encreuament.

Un cop obtinguts els genotips dels microsatèl·lits seleccionats, en totes les generacions, es va realitzar el càlcul del contingut informatiu (C.I.) mesurat a la  $F_2$  amb el programa CRI-MAP *version 2.4*. Aquesta mesura indica la possibilitat de deducció de l'origen dels al·lels d'un marcador en un individu o la mitja en el total de la  $F_2$ . Hi ha quatre combinacions possibles en l'origen dels al·lels, cadascuna corresponent a un dels quatre progenitors de la  $F_0$  d'un individu. La probabilitat de cadascuna de les combinacions oscil·la entre 0 i 1, essent el cas òptim aquell en el que una sola combinació o ruta possible i essent el pitjor cas aquell en el que cadascuna de les rutes tingui la mateixa probabilitat.

## 3.4 REALITZACIO DELS MAPES DE L·LIGAMENT

La construcció dels mapes genètics, realitzada pel grup de l'Àrea de Producció Animal del UdL-IRTA de Lleida, es va obtenir mitjançant l'aplicació de la opció *build* del programa CRI-MAP *version 2.4*, que utilitza la funció de mapa de Kosambi (1944) per a determinar l'ordre i la distància relativa dels marcadors, tenint en compte l'existència d'interferència entre els entrecreuaments propers:

$$d = \frac{1}{2} \ln \left[ \frac{(1 + 2r)}{(1 - 2r)} \right]$$

Aquest programa utilitza un mètode de versemblança simplificat per a determinar la construcció més exacta d'entre totes les possibles. Es un dels programes de mapeig més



emprats donada la seva simplicitat i la velocitat de maneig en comparació amb altres programes.

### 3.5 RECERCA DE QTLs

Per a la detecció de QTLs, realitzada pel grup de l'Àrea de Producció Animal del UdL-IRTA de Lleida, es va aplicar el mètode descrit per Haley *et al.* (1994) de mapeig per intervals mitjançant regressió múltiple i mínims quadrats a partir dels mapes genètics obtinguts en el projecte. Com ja s'ha indicat a la introducció, Lander i Botstein van dissenyar al 1989 un eficaç mètode de detecció de QTLs de mapeig per intervals basat en l'anàlisi de les dades per màxima versemblança utilitzant la informació de dos marcadors flanquejant al QTL putatiu. Aquest mètode és útil per a l'estudi de poblacions consanguínies i per tant no requereix l'estudi de més marcadors que els dos flanquejants al QTLs, la informativitat dels quals es suposa que és màxima. Haley i Knott (1992) van demostrar que l'aplicació dels mínims quadrats, més senzilla, ràpida i amb menys complexitat computacional, aporta uns resultats al mapeig d'intervals igualment sensibles que els mètodes de màxima versemblança. La menor complexitat dels mínims quadrats permet complicar el model estadístic, incloent efectes fixes, covariables, o fins i tot interaccions entre dos o més QTLs, de manera que el resultat final presenta major sensibilitat i potència que els mètodes de màxima versemblança. El mètode de regressió lineal múltiple mitjançant mínims quadrats descrit per Haley i coautors al 1994 fou dissenyat per a poder ser aplicat a les poblacions originades a partir de l'encreuament de línies segregants i suposa per tant, que els marcadors presenten al·lels segregant en les poblacions parentals de manera que la informativitat d'aquests a la  $F_2$  pot ser clarament inferior a 1. Així, s'utilitza la informació de tots els marcadors disponibles en un grup de lligament i s'escullen els dos marcadors flanquejants més propers que siguin informatius en cada individu.

#### 3.5.1 Anàlisi de regressió

Per estimar l'efecte d'un QTL putatiu sobre un caràcter fenotípic es realitza una regressió múltiple comparant com a variables aleatòries els genotips dels animals amb el valor fenotípic com a variable dependent. Es contempen tres opcions:

### 3.5.1.1 Regressió linial directament sobre el QTL

En l'estudi de l'efecte del propi QTL o gen dial·lèlic sobre un caràcter, es coneix directament el genotip dels animals per aquell QTL, de manera que el valor additiu **a** i el dominant **d** es poden definir segons Falconer i Mackay (1996) com:

$$\mathbf{a} = (\overline{QQ} - \overline{qq}) / 2 \quad \mathbf{d} = \overline{Qq} - (\overline{QQ} + \overline{qq}) / 2$$

On  $\overline{QQ}$ ,  $\overline{Qq}$  i  $\overline{qq}$  són els valors fenotípics mitjos per al caràcter, en cadascuna de les tres classes genotípiques. S'aplica el següent model de regressió:  $Y = \mu + a \cdot c_a + d \cdot c_d$

On **a** i **d** són els coeficients de regressió additiu i dominant, respectivament;  $c_a$  és la variable del coeficient additiu que equival al genotip i adquireix el valor 1, 0 i -1 per als genotips QQ, Qq i qq, respectivament i  $c_d$  és la variable del coeficient dominant que equival al genotip i adquireix el valor 0, 1 i 0 per a QQ, Qq i qq, respectivament.

### 3.5.1.2 Regressió linial amb un sol marcador

En el cas en que no es conegui el QTL o el gen, els genotips d'aquest tan sols poden ser deduïts a partir dels genotips del o dels marcadors que hi estiguin lligats. Es a dir, en el cas en que existís un sol marcador ( $M_i$ ) lligat al QTL putatiu, el model lineal és equivalent a l'anterior, però el genotip del QTL està condicionat al genotip del marcador i a la freqüència de recombinació entre els dos loci. Es a dir:

$$c_{ai} = P(QQ/M_iM_i) - P(qq/M_iM_i) / 2$$

$$c_{di} = P(Qq/M_iM_i) - (P(QQ/M_iM_i) + P(qq/M_iM_i)) / 2$$

En aquest cas i en un encreuament  $F_2$ , el genotip esperat del QTL donat un genotip concret dels marcadors, queda representat a la taula 3.5.

**Taula 3.5** Genotip esperat del QTL segons el genotip del marcador i valor fenotípic del genotip del marcador.

Genotip $M_i$	Genotip QTL	Probabilitat	Valor Genètic	Valor de $M_i$
MM	QQ	$(1-r)^2$	a	$a(1-2r)+2dr(1-r)$
	Qq	$2 \cdot r \cdot (1-r)$	d	
	qq	$r^2$	-a	
Mm	QQ	$(1-r) \cdot r$	a	$d(1-2r+2r^2)$
	Qq	$1-2r+2r^2$	d	
	qq	$r \cdot (1-r)$	-a	
mm	QQ	$r^2$	a	$-a(1-2r)+2dr(1-r)$
	Qq	$2 \cdot r \cdot (1-r)$	d	
	qq	$(1-r)^2$	-a	
<b>MM-mm</b>				$2a(1-2r)$
<b>Mm-(MM+mm)/2</b>				$d(1-2r+2r^2)-a(1-2r)$

### 3.5.1.3 Regressió lineal amb marcadors flanquejants

Aquest és el model en el que es basen en Haley i col·laboradors (1994), que contempla dos marcadors informatius ( $M_1$  i  $M_2$ ) lligats i flanquejant la posició del QTL putatiu. En aquest cas el genotip del QTL està condicionat al genotip dels dos marcadors i a la recombinació existent en els dos intervals, per la qual cosa l'exactitud en l'estima del genotip es veu incrementada respecte a l'ús d'un sol marcador. A més, es pot estimar amb certa exactitud la posició del QTL. Així,

$$C_{ai} = P(QQ/M_1M_1M_2M_2) - P(qq/M_1M_1M_2M_2) / 2$$

$$C_{di} = P(Qq/M_1M_1M_2M_2) + (P(QQ/M_1M_1M_2M_2) - P(qq/M_1M_1M_2M_2)) / 2$$

Per a l'anàlisi dels caràcters analitzats en aquesta Tesi es va utilitzar la següent fórmula de regressió lineal múltiple:

$$Y = \text{sexe} + \text{família} + \text{covariable} + a \cdot c_a + d \cdot c_d + e$$

essent el sexe i la família, els efectes fixes, e els residus del model i la covariable, diferent en funció del caràcter que s'estudiï.

La covariable utilitzada per al pes viu i el pes de la canal fou l'edat al sacrifici. Per a la resta de variables descrites en aquesta Tesi es va prendre el pes de la canal com a covariable.

Per als caràcters relacionats amb els àcids grassos també es valorà el gruix del greix dorsal com a covariable.

### 3.5.2 Llindars de significació cromosòmic i genòmic

Els nivells de significació tant a nivell genòmic com a nivell individual per a cadascun dels cromosomes es van calcular tal i com descriuen Churchill i Doerge (1994), permutant 20.000 vegades els genotips dels marcadors i relacionant-los amb els fenotips enregistrats, mitjançant el mètode de regressió descrit per Haley *et al.* (1994).

### 3.5.3 Intervals de confiança

Els intervals de confiança del 95% per la posició dels QTLs es va obtenir mitjançant l'aproximació del *Chi-square drop*. Consisteix en disminuir en una unitat el LOD SCORE en cada direcció. El valor del llindar de significació de F equival a  $\chi^2_{p/p}$ , aproximadament, on  $p$  és el nombre de paràmetres estimats, **a** el nostre cas dos (el valor additiu, **a** i el dominant, **d**). Així, per a un nivell de significació del 95%,  $\chi^2_{2/95} = 3,85$ . Si disminuïm el valor de F  $3,85/2 = 1,92$  unitats, obtenim un interval de confiança en les posicions en les que el valor de F decreix 1,92 unitats respecte del màxim (Mangin *et al.*, 1994).

## 3.6 GENS CANDIDATS: ANALISI DE POLIMORFISMES I LOCALITZACIO CROMOSOMICA DEL GEN DE LA 2,4-DIENOIL COENZIM A REDUCTASA (*DECR*)

A partir dels resultats obtinguts en la detecció de QTLs, es va plantejar la recerca de gens candidats per als caràcters de composició d'àcids grassos en el greix dorsal.

El gen de la 2,4-Dienoil Coenzim A Reductasa intervé a la beta-oxidació dels àcids grassos i la seva localització cromosòmica en humà correspon a la regió Hsa p 8q21.3 (Helander *et al.*, 1997). No es disposava d'informació molecular sobre aquest gen a l'espècie porcina a l'inici d'aquesta tesi.

El primer objectiu d'aquest treball consistia en la caracterització de polimorfismes del gen *DECR* que segreguessin a la nostra població per així poder realitzar posteriorment, el mapeig de lligament i la recerca d'associacions amb caràcters productius. La metodologia experimental es detalla a l'article que s'adjunta a la present Tesi (annex 3).

### 3.6.1 Disseny de primers per a la detecció de polimorfismes

Degut al fet que el gen *DECR* no ha estat encara seqüenciat en porc, fou necessari dissenyar els primers mitjançant l'alineament de les seqüències de rata (número d'accés *Genbank*: D00569) i humana (número d'accés *Genbank*: U94981). Per l'alineament, s'emprà el programa de comparació de seqüències, MULTALIN ([www.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl](http://www.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl)).

Per poder realitzar l'amplificació del gen *DECR* porcí en un pannel de cèl·lules irradiades híbrides de hámster-porc (Yerle *et al.*, 1998), fou necessari el disseny de nous primers específics de porc. Aquests primers es varen dissenyar a partir de la seqüència obtinguda de l'exò 2 del gen *DECR* porcí. Aquesta seqüència fou alineada amb les de rata i ratolí per evitar amplificació creuada.

### 3.6.2 Detecció de polimorfismes

Per detectar la presència de polimorfisme es varen realitzar les reaccions d'amplificació en quatre mascles Ibèrics i tres femelles Landrace. Els fragments amplificats es varen clonar en un plàsmid pCR21-TOPO (Invitrogen). Posteriorment, es van seqüenciar els diferents clons mitjançant l'*ABI PRISM Cycle Sequencing kit* (*Applied Biosystems*) en un equip d'electroforesis capil·lar *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) i es va realitzar l'alineament múltiple de les seqüències obtingudes.

### 3.6.3 Genotipat del gen *DECR*

Per al genotipat de la mutació detectada es va utilitzar un protocol de PCR-RFLP. La digestió del producte amplificat es va realitzar mitjançant l'enzim *MaeI* o el seu

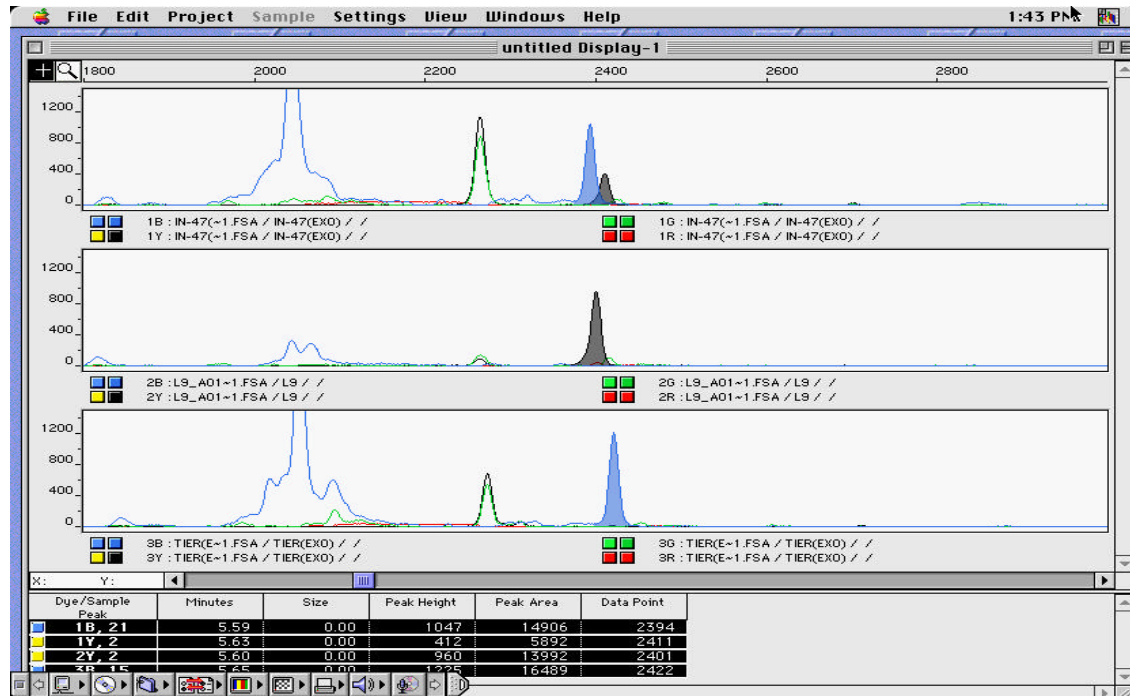
isoesquizòmer *BfaI*. Per a la digestió amb *MaeI* s'utilitzaven 11 µL de producte amplificat i 10 U de l'enzim i s'incubava a 45 °C-12 hores. Per l'enzim *BfaI*, la digestió es realitzava en el mateix volum de producte amplificat i 22,5 U de l'enzim, a 37 °C-12 hores. Aplicant aquestes condicions es va realitzar l'amplificació i la digestió en tots els animals del pedigree.

El genotipat de part de la F<sub>2</sub> es va realitzar mitjançant, el kit de detecció de SNPs d'*Applied Biosystems ABI PRISM SNaPshot ddNTP Primer Extension Kit*. Per a la realització del protocol es van seguir les següents fases (Figura 3.5):

1. PCR sobre DNA genòmic amb els primers descrits a l'annex 3.
2. Purificació del producte de PCR mitjançant exonucleasa i fosfatasa alcalina amb el *EXOSAP-IT PCR CLEAN-UP* (Usb).
3. Reacció d'extensió sobre el producte amplificat amb un primer que hibrida a la posició nucleotídica anterior al SNP (5'-CCA CCA AAT ACT TTT CAA GGA AAA-3'). En la reacció s'incorporen nucleòtids terminadors marcats amb diferents fluorocroms, de manera que el producte amplificat està marcat amb la fluorescència corresponent al ddNTP incorporat i consisteix en la seqüència del primer més el nucleòtid polimòrfic.
4. Electroforesi a l'ABI PRISM 310 Genetic Analyzer i anàlisi amb el GeneScan software.

A l'electroferograma s'observa un pic d una mida N+1, essent N la grandària en pb del primer intern i de la fluorescència pròpia al ddNTP incorporat, la qual cosa permet inferir el genotip de la mostra analitzada (Figura 3.4).

**Figura 3.4** Electroferograma obtingut en el *GeneScan Analysis Software* mitjançant el mètode *Primer Extension Analysis* de *Applied Biosystems*.



En el primer electroferograma s'observa un individu heterozigot, en el segon, l'homozigot per a Citosina i en l'últim, l'homozigot per a Guanina. La resta de pics són *primers* i nucleòtids que no han intervingut en l'extensió

### 3.6.4 Localització cromosòmica

Un cop obtinguts els genotips es va reconstruir el mapa de lligament amb tots els microsatèl·lits i el gen en el mapa de lligament mitjançant l'opció *build* del programa *CRI-MAP version 2.4*. Per tal de tenir un posicionament més acurat i que pogués ajudar a confirmar la localització del gen, es mapejà també en un pannel de cèl·lules híbrides irradiades de hàmfster-porc (Yerle *et al.*, 1998) mitjançant l'ús de *primers* específics de porc.

## 3.7 ESTUDI DE L'HAPLOTIP DE DNA MITOCONDRIAL EN UNA REGIO DEL CITOCROM B (*CytB*) PORCI

El citocrom B porcí és una regió del DNA mitocondrial que codifica per a una cromoproteïna que intervé en la cadena respiratòria. El DNA mitocondrial, circular i haploide, té una grandària de 16 Kb i manca de regions no codificants (a excepció de la regió del *D-loop*) arribant fins i tot a existir solapament entre alguns gens.

Giuffra *et al.* (2000) descriuen varis polimorfismes mitocondrials i nuclears incloent-hi el citocrom B (*CytB*), que mitjançant anàlisi filogenètic evidencien la domesticació independent entre els porcs occidentals i els asiàtics 9.000 anys enrera. S'estima que els antecessors d'ambdós grups van divergir fa aproximadament, 500.000 anys. Amb els estudis presentats en aquest treball es reflexa a nivell molecular, degut a la introgressió de porcs asiàtics en les races europees cap als segles XVIII i XIX, l'origen híbrid de la major part de les races comercials europees actuals. Aquest article va propiciar un treball (Clop *et al.*, 2000) en col·laboració amb el grup del Dr. Leif Anderson del *Department of Animal Breeding and Genetics* de la *Swedish University of Agricultural Sciences*. L'objectiu d'aquest estudi era la caracterització d'una petita regió del *CytB* en una mostra d'animals de l'estirp Guayerbas del porc Ibèric i una mostra d'animals de la línia Landrace creada a Nova Genètica i que incloïa tots els animals fundadors utilitzats en aquesta tesi. Inicialment es va realitzar una estada al laboratori del Dr. Andersson per analitzar mitjançant la tècnica de la piroseqüenciació un nombre variable d'animals de cinc races diferents. Entre aquestes races figuraven les anteriorment nomenades més una mostra d'animals d'una població Large White i una de Pietrain creades a una empresa privada i una petita mostra de porcs de la raça illenca Porc Negre de Mallorca.

La piroseqüenciació és una tècnica d'anàlisi del DNA basada en la seqüenciació en temps real, de petits fragments interns de producte amplificat. L'estratègia emprada consisteix en la detecció de la reacció lluminosa produïda per l'acció de la Luciferasa al incorporar -se els deoxinucleòtids trifosfat (dNTPs) a la cadena en extensió. La incorporació d'un dNTP allibera un grup pirofosfat (PPi). L'ATP sulfurilasa transforma, en presència d'ADP, el PPi en ATP i aquest, conjuntament amb la luciferasa, catalitza la conversió de luciferina a oxiluciferina, produint l'emissió de llum (Figura 3.5). La detecció de la llum emesa permet establir el nombre i ordre dels nucleòtids incorporats a la reacció de seqüenciació. Els nucleòtids es dispensen per separat i en l'ordre desitjat, sabent-se en tot moment quin s'incorpora en cada moment i possibilitant l'establiment de correlacions entre el pic de llum amb el nucleòtid que s'afegeix en cada moment (Figura 3.6). L'instrument de seqüenciació usa tecnologia INK-JET per a proporcionar amb exactitud els volums requerits dels diferents reactius i a més disposa d'una càmera CCD per a poder detectar la luminiscència.



Figura 3.5 Descripció del procés de piroseqüenciació pel qual es produeix bioluminiscència.

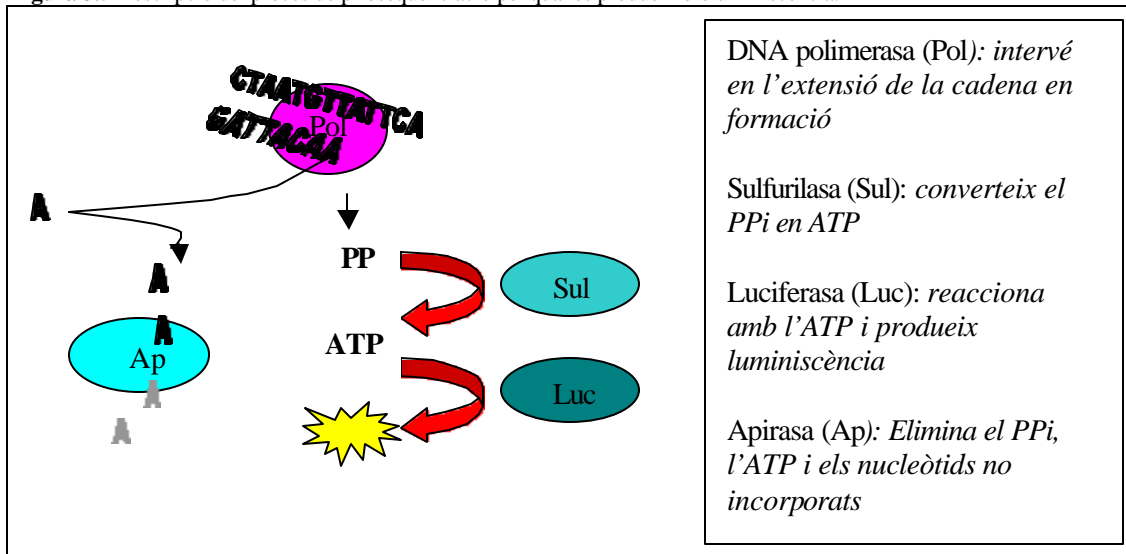
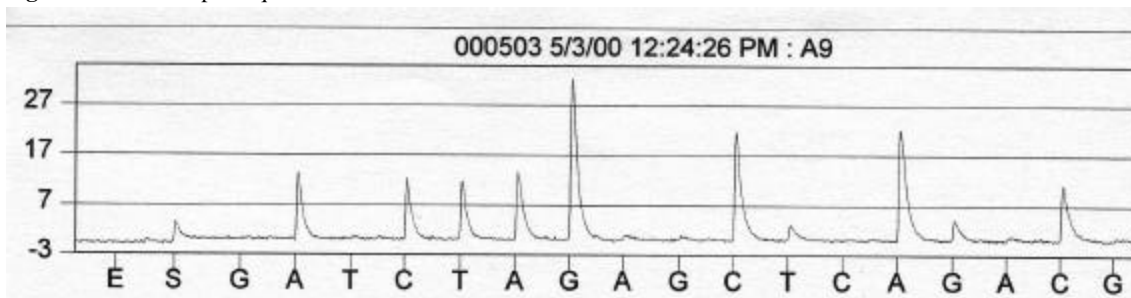


Figura 3.6 Gràfic de piroseqüenciació.

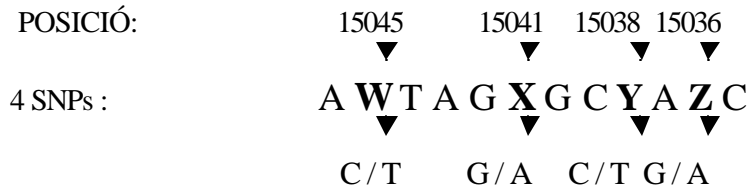


A l'eix d'abscisses es detalla el subministrament dels diferents reactius. E (conjunt d'enzims que intervenen a la reacció), S (substrat amb els dos reactius necessaris per al procés), G (Guanina), A (Adenina), T (Tiamina) i C (Citosina). Al gràfic s'observa un minúscul pic de llum quan el substrat és subministrat, indicant la degradació de l'ATP lliure que al interaccionar amb el conjunt d'enzims produeix una reacció lumínica. Pel patró de pics que segueix, es desxifra la següent seqüència: ACTAGGCCAAC.

Mitjançant la reacció de PCR es va amplificar una regió de 131 parells de bases del citocrom B del DNA mitocondrial. La reacció de piroseqüenciació es va realitzar sobre una regió de 12 parells de bases del producte amplificat que presentava 4 SNPs. Les reaccions d'amplificació es van realitzar en un volum final de 20 µL que contenien 2 ng de DNA genòmic, 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 15 mM Tris-HCl a pH 8, 200 µM dNTPs, 0,5 unitats d'AmpliTaQ Gold (Perkin Elmer), 10 pmol del primer forward (5'-GCCTACGCTATTCTACGTTCA-3') i 10 pmol del primer reverse (5'-GTGGTCGAAATATTATGC-3'). Per a activar l'AmpliTaQ Gold es va realitzar una etapa inicial a 95 °C durant 9 minuts, seguit de 45 cicles amb un perfil tèrmic de a 94 °C-45'', 50 °C-45'' i 72 °C-

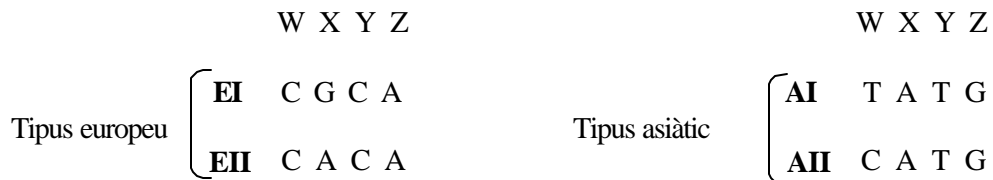
45". Posteriorment es van realitzar les reaccions de piroseqüenciació en un volum final de 40 µL que contenia 20 mM Tris-Acetat, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 15 pmol del primer de piroseqüenciació (5'-ATTAGGATGGAGGCT-3') i producte amplificat purificat mitjançant *Dynabeads*. El producte resultat de la seqüenciació era el descrit a la figura 3.7.

**Figura 3.7** Producte obtingut amb la piroseqüenciació.



Segons Andersson (comunicació personal), la combinació d'aquests 4 SNPs permet caracteritzar 4 haplotips que poden ser utilitzats com a marcadors filogenètics de l'origen de la línia materna dels animals analitzats (Figura 3.8).

**Figura 3.8** Haplotips possibles en la combinació dels 4 SNPs de la seqüència obtinguda per piroseqüenciació.



Posteriorment es van realitzar, ja al laboratori de la UAB, l'anàlisi de més animals de diferents estirps de porc Ibèric per seqüenciació amb nucleòtids terminadors fluorescents i electroforesi capil·lar a l'ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Les condicions d'amplificació es van modificar lleugerament per adequar-les als nostres equips d'anàlisi. Així, es va reduir la concentració de MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM i la temperatura d'hibridació es va augmentar fins als 54 °C, i el nombre de cicles es va reduir a 30. Els productes de PCR es purificaven amb el *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN). Posteriorment es realitzava la reacció de seqüenciació amb l'ABI PRISM BigDye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, version 2.0. d'Applied Biosystems. El perfil tèrmic de la reacció consistia en 94°C-3 minuts, seguit de 25 cicles de 96 °C-10 segons, 50 °C-5 segons i 60 °C-4 minuts.