



**Anàlisi de *quantitative trait loci* i de gens
candidats relacionats amb la qualitat de la carn i
de la canal en una població Landrace**

Oriol Vidal i Fàbrega

El Dr. **Armand Sànchez i Bonastre**, catedràtic del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

i

el Dr. **Marcel Amills i Eras**, professor del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que l'**Oriol Vidal i Fàbrega** ha realitzat sota la seva direcció el treball de recerca "Anàlisi de *quantitative trait loci* i de gens candidats relacionats amb la qualitat de la carn i de la canal en una població Landrace"

Aquest treball s'ha dut a terme al Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 26 de Juliol de 2004

Dr. Armand Sànchez i Bonastre

Dr. Marcel Amills i Eras

Escriure els agraïments no és senzill, i, com gairebé tothom he esperat fins als pitjors moments (i ho puc confirmar, perquè he fet una de les coses que he après amb aquesta tesi: una recerca bibliogràfica!). Com que sense el consell d'en Marcel no sabia quin dels dos formats d'agraïments més habituals escollir (el "malalt de nit" o el "que faig tard"), els he fets servir tots dos: vaig començar fa tres dies, que tenia unes dècimes de febre, i els acabo ara, que m'estan esperant a copisteria per començar l'enquadernació. Ah! Penseu que aquesta serà l'única part que en Marcel no m'haurà corregit, o sigui que si hi ha errors, ja ho sabeu: he estat jo, però ho reconec...

Aquesta tesi no hauria estat possible sense l'ajut dels meus directors, el doctor Armand Sánchez i el doctor Marcel Amills, que m'han donat l'oportunitat d'estudiar i/o treballar (què és una tesi?) al Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona. Especialment li haig d'agrair a en Marcel, per tot el que ha patit amb aquesta tesi. Sense ell segur que no l'hauria acabada.

També haig d'agrair al doctor Josep Maria Folch la seva ajuda als meus inicis al laboratori. També el doctor Luís Varona i al doctor José Luis Noguera de l'IRTA de Lleida, que han participat activament en els projectes que han permès la realització d'aquesta tesi. També al doctor Miguel Pérez-Enciso per algunes correccions i comentaris valuosos, i finalment a la doctora Elisabetta Giuffra per haver-me acollit al seu laboratori de Milà.

I ara sí, que ja comença la llista!

A la Neus (aquest cop sí!), per presentar-me els micros, el Gemma i el robot, i sobretot per ensenyar-nos cada dia les noves tendències del pentinat *no-brush*.

A l'Óscar, per introduir-nos al món del rol. Ja saps que jo estic amb tu: al *Senyor dels Anells* no li falta de res!

A l'Anna (la Tomàs), reina absoluta de l'RNA. Sempre serà, el hòbbit més valent de la història!

A l'Alhelí, per les xerrades, les opinions i la companyia. Ah! I jo crec que en Sauron era una dona... com podria ser tan dolent, sinó?

A les nenes JM: la Maria, l'Anna (la Mercadé) i la Maribel. Per cert, una pregunta: els conills no tenen pas β lactoglobulina?

A la Mifune, en Samot, l'Elbereth, l'Anskar (en pau descansi) i el que va venir després, la Zenit, en Rael (també descansa en pau, no?) i en Mafkess, que no va dubtar a llençar el seu escut de bronze a un nan que s'ofegava. Ei, de salvavides, eh?

A totes les dones de serveis, per tots els consells i les xerrades al laboratori: la Betlem (mai més deixaré l'antosta, prestatge o taula de laboratori –i no *pojata*– desordenada), la Laura, l'Elisenda (del conservatori a la pipeta... això sembla ben bé el títol d'un serial, eh?), l'Anna (la Castelló) i l'Olga.

Als companys que hi eren al principi, però que ara ja són fora: la Romi, en Guillermo, en Raül, l'Àlex i l'Albert.

També a les noves incorporacions: David, Jordi i Iolanda; a la Maria del Mar, a les farmacèutiques, la Fina i l'Anna (l'Ojeda... i aquesta era l'última!) i a tota la resta del Departament.

A Gloria y Ana, las madrileñas que vinieron para unas semanas y no han dejado de volver. ¡Siempre recordaré una gran interpretación de Fama!

A l'Ignasi, per les històries compartides... una gran pèrdua pels genètics!

A en Quim, pels viatges i les "notícies".

A tota la gent de Girona. A la Maria Borrell (aviat ja no ens quedaran pelis estranyes per anar a veure!), a l'Ivet, a la Maria Rubio i en Sergi, a l'Imma, a la Marta i en Narcís, a la Maria Pifarré (sort que ja has tornat, Pifa!), a la Laia i l'Albert, a la Laia i en Miki, a la Rosor i en David i a la Meritxell i en Jordi (i la Rut, esclar!).

A en Xavi, que tot i que des de fa uns mesos sempre li dic que no puc quedar encara em truca.

A la Maria Carme. Vam començar junts a l'escola i no hem parat fins ara! Et trobaré a faltar, sort que quatre carrers costen poc de travessar...

A la Montse. Gràcies a tu ara em coneixen a Bioquímica (records a les Bassoles!), els genètics es riuen de mi quan vaig a dinar amb ells i he saltat a Patum! Encara que fa uns quants anys jo no volia donar el meu telèfon a ningú, he canviat: ara aconseguixo dir sense quequejar les tres primeres xifres. Ehem. La brometa és dolenta, però només volia posar una cosa que ara no fa gràcia però que feia molt de riure quan va passar...

A la Mar. Aquí i a les festes (cada cop més escasses i menys nombroses) et trobem a faltar. La Tisó va venir poc, però va deixar marca. I si no, pregunta-ho als genètics!

A la Clara, que m'ha fet aprendre que no només hi ha catalans de la ceba a Girona! Et mereixies ser de la nostra classe, i no de l'altra!!

A la Gemma, en Nando i la Georgina. Som l'última resistència de la promoció, eh?

Als bioquímics del Quiz (Àlex, Xavi, Virgínia...). Tornarem a lluitar, tornarem a vèncer!

A en Joel (el bioquímic dissident) i a la Núria, que m'han ensenyat una altra manera de veure (i viure!) les coses.

A en Josep, per totes les bones (i les males) estones.

A en Josep i a la Judith, per haver-me ajudat en tot sempre que m'ha fet falta. També a la Tuies, evidentment, per tot el que farà algun dia! Ah, i esclar, a en Grau, en Guim o els (i les) que hagin de venir!

A la Laia, que encara em deixa fer de germà gran.

Aquesta tesi està dedicada als meus pares en Ramon i l'Aurora, que sempre m'han ajudat. Per tot, gràcies.

Resum

Els treballs que inclou aquest compendi s'han desenvolupat dins del projecte FEDER 2FD97-0916-C02-02, que té com a objectiu principal confirmar l'existència, en una població comercial Landrace altament seleccionada, de *quantitative trait loci* (QTL) prèviament descrits en encreuaments de races divergents. Els caràcters analitzats en aquest projecte inclouen tant mesures de la qualitat de la carn com de conformació i de qualitat de la canal.

Mitjançant la segregació de marcadors moleculars tipus microsatèl·lits en un pedigrí de dues generacions d'una població Landrace es van analitzar 10 regions dels cromosomes 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 i 13. Els resultats demostren l'existència d'efectes als cromosomes 2, 6, 7, 8, 9 i 10, tot indicant que QTL descrits prèviament en encreuaments de races divergents són encara presents en les poblacions comercials.

A més a més s'han caracteritzat quatre gens candidats (*MDH1*, *ME1*, *DECR* i *ACLS1*) relacionats amb el metabolisme lipídic. Encara que en tots quatre s'han pogut identificar polimorfismes, només en el cas del *DECR* les dues transversions detectades provoquen canvis aminoacídics. Els polimorfismes identificats en l'*ME1* i el *DECR* s'han fet servir de marcadors en dos estudis d'associació.

En el cas del gen *MDH1* hem pogut observar l'existència a l'intró 6 d'una inserció del tipus L1Ss que genera un polimorfisme. A més a més, hem identificat una seqüència, anomenada *MDH1Ψ*, que podria correspondre a un pseudogen no processat del gen *MDH1*.

El gen *ACLS1* s'ha seqüenciat per primer cop en porcí i mitjançant el panell de cèl·lules somàtiques irradiades ImpRH s'ha pogut dur a terme el mapeig d'aquest gen al cromosoma 15, lligat al microsatèl·lit SW1989.

1.- Introducció	15
1.1.- La millora genètica del porcí	17
1.1.1.- Importància econòmica del sector porcí	17
1.1.2.- Objectius i criteris de selecció	19
1.1.3.- Avaluació dels reproductors en els nuclis selectes	22
1.1.4.- Factors que incideixen en la millora del porcí	23
1.1.4.1.- Mida del nucli de selecció	23
1.1.4.2.- Components genètics dels caràcters a millorar	23
1.2.- Marcadors moleculars	25
1.2.1.- Tipus de marcadors moleculars	25
1.2.1.1.- RFLP	25
1.2.1.2.- Microsatèl·lits	26
1.2.1.3.- SNP	28
1.2.1.4.- RAPD	29
1.2.1.5.- AFLP	29
1.2.2.- Mesura del polimorfisme d'un marcador	30
1.3.- Cartografia del genoma porcí	30
1.3.1.- Mapes físics: <i>radiation hybrid map</i>	31
1.3.2.- Mapes de lligament	33
1.3.3.- Projectes de seqüenciació del genoma porcí	36
1.4.- Identificació de QTL	37
1.4.1.- Disseny experimental	37
1.4.2.- Mesures fenotípiques	39
1.4.3.- Genotipatge del pedigrí	40
1.4.4.- Metodologia estadística	43

1.4.4.1.- <i>Interval mapping</i>	43
1.4.4.2.- Models bayesians	45
1.4.5.- Detecció de QTL	46
1.4.5.1.- Cromosoma 1	49
1.4.5.2.- Cromosoma 2	49
1.4.5.3.- Cromosoma 3	50
1.4.5.4.- Cromosoma 4	50
1.4.5.5.- Cromosoma 5	51
1.4.5.6.- Cromosoma 6	51
1.4.5.7.- Cromosoma 7	52
1.4.5.8.- Cromosoma 8	52
1.4.5.9.- Cromosoma 10	53
1.4.5.10.- Cromosoma 13	53
1.4.5.11.- Cromosoma X	53
1.5.- Identificació de les mutacions causals dels QTL	54
1.5.1.- Clonació posicional	54
1.5.2.- Gens candidats	55
1.5.2.1.- Estratègies	55
1.5.2.2.- El metabolisme dels àcids grassos	56
2.- Objectius	59
3.- Articles i treballs	63
3.1.- Identification of carcass and meat quality QTL in a Landrace pig population selected for growth and leanness	65
3.2.- Polimorfismo del gen de la malato deshidrogenasa (<i>MDH1</i>) porcino	95

3.3.- Pig <i>malic enzyme 1 (ME1)</i> genotype is associated with backfat thickness and meat quality traits	115
3.4.- Polymorphism of the pig <i>2,4-dienoyl-CoA reductase gene (DECR)</i> and its association with carcass and meat quality traits	145
3.5.- Assignment of the <i>fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2 (FACL2)</i> gene to the porcino chromosome 15	167
3.6.- Nucleotide sequence, polymorphism and mRNA expression of the <i>pig acyl coenzyme A synthetase long-chain 1 (ACLS1)</i> gene	173
4.- Discussió	193
4.1.- Variabilitat genètica en una població comercial Landrace	195
4.2.- Existència de <i>quantitative trait loci</i> relacionats amb caràcters productius en una població comercial Landrace altament seleccionada	200
4.3.- Comparació de l'abundància i de les HPD dels QTL relacionats amb caràcters de creixement, engreixament i qualitat de la carn	204
4.4.- Els gens candidats	206
4.4.1.- L'elecció dels gens candidats	208
4.4.2. La malat deshidrogenasa 1	209
4.4.3.- L'enzim màlic citosòlic	212
4.4.4.- La 2,4-dienoil-CoA-reductasa	217
4.4.5.- La sintasa d'acil-coenzim A de cadena llarga 1	219
4.4.6.- Polimorfisme dels gens del metabolisme lipídic	222
4.5.- Perspectives de futur i selecció assistida per marcadors	224
5.- Conclusions	225
6.- Bibliografia	

1.1.- La millora genètica del porcí

1.1.1.- Importància econòmica del sector porcí

El sector porcí té molta rellevància dins del context de la producció ramadera de la Unió Europea (UE). Un 50% de la carn consumida a la UE és de porcí (Aumaitre 2001), fet que mostra la importància d'aquest sector, que va produir 202,5 milions d'animals el 2003 (Harley 2004). A Espanya i a Catalunya el sector porcí també és determinant en la ramaderia, i el 1999 tenien, respectivament, el 18% i el 5,1% del cens de porcs de la UE (DARP 2000). A Europa, Espanya és un dels cinc principals productors de carn de porc i té una producció en creixement (Weiler i Poschacher 2003).

Des de l'any 1986 (any d'entrada a la Comunitat Europea), l'activitat del sector porcí espanyol i català ha mostrat una clara tendència expansiva i ha patit un canvi estructural important. El cens de bestiar porcí va incrementar-se un 16% del 1986 al 1994 (Figura 1.1). Durant aquest període les granges de reproductores de més de 100 animals es van incrementar en un 28%, mentre que les de menys de 50 van disminuir. Pel que fa a les explotacions d'engreix, les explotacions més grans (de més de 1000 animals) van experimentar un augment, mentre que la resta van disminuir (Escribano 1995).

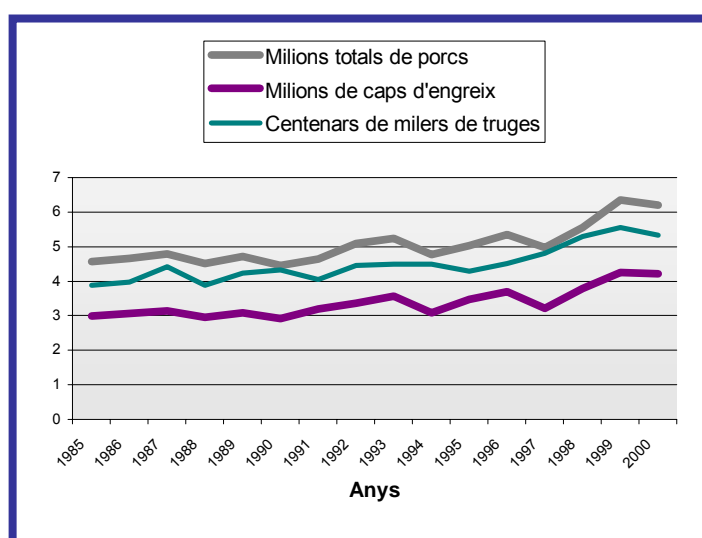


Figura 1.1. Evolució del cens de porcs a Catalunya de l'any 1985 a l'any 2000.

El desembre del 2000 Catalunya tenia, segons el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca (DARP), el 29% del cens de porcs d'Espanya. Això la situa entre les sis primeres regions europees en la producció de carn de porc i fa del porcí el principal subsector agrari català. Tot i això, l'activitat productiva ha patit un sèrie de crisis conjunturals que s'expliquen per les fortes oscil·lacions de preus, la competència creixent amb altres regions d'Espanya, l'estancament de la demanda interna i les fluctuacions en els preus dels pinsos industrials (DARP 2000). A més a més, el sector ha sofert també l'efecte dels brots de pesta porcina clàssica (el 1997 i el 2001-2002). Durant l'últim brot, que va afectar sobretot el Segrià i Osona, es van haver de sacrificar, segons el DARP, un total de 291.058 animals.

Segons les últimes dades detallades sobre l'estructura productiva del sector, del desembre del 1999, a Catalunya hi havia unes 11.900 explotacions de bestiar porcí. D'aquestes explotacions, 6.600 estaven especialitzades en la producció de garrins (incloent-hi les de cicle tancat) i unes 5.300 es dedicaven gairebé exclusivament a l'engreix. El grau de diferenciació funcional en aquest sector era ja molt elevat, i de les 582.300 places de truges comptabilitzades, el 99% es localitzava a les explotacions de producció i/o cicle tancat, mentre que només un 1% corresponia a les granges d'engreix. Així mateix, de les 5.112.700 places d'engreix disponibles, el 73% s'ubicaven a instal·lacions exclusives d'engreix i un 27% a les granges de producció i/o cicle tancat. A més, la dimensió mitjana de les explotacions catalanes havia arribat als 534 caps de bestiar, comparable a les mitjanes de grans països productors com Holanda i Gran Bretanya (DARP 2000).

A Catalunya, doncs, el sector porcí és un sector molt tecnificat que es caracteritza per (1) un nivell productiu molt elevat, (2) una clara separació funcional entre explotacions, (3) l'alimentació del bestiar basada exclusivament en pinsos industrials i (4) el predomini dels contractes d'integració, sobretot en l'engreix (DARP 2000). En una producció tan industrialitzada, tots els marges de benefici són molt estrets i cal tenir molt controlats tots els factors que incideixen en la productivitat. És en aquest sentit que els programes de millora genètica són indispensables, perquè contribueixen en la producció d'un

material animal altament seleccionat i competitiu en els mercats nacionals i internacionals.

1.1.2.- Objectius i criteris de selecció

L'objectiu bàsic dels programes de millora consisteix a aconseguir, en una població determinada, un canvi genètic que sigui favorable des d'una perspectiva econòmica i productiva. En la producció porcina es fan servir dues estratègies de millora genètica: la selecció i els encreuaments industrials de línies (pures o híbrides) (Falconer i MacKay 1996). Els encreuaments industrials optimitzen l'obtenció d'un producte final d'escorxador, mentre que la selecció consisteix a escollir com a reproductors aquells individus que presenten una superioritat fenotípica per un o més caràcters d'interès econòmic. La genètica molecular troba la seva aplicació principal en els programes de selecció.

En el disseny d'un programa de selecció cal establir uns **objectius de selecció**, que són els caràcters fenotípics en els quals esperem aconseguir els canvis genètics desitjats. Els objectius de selecció no sempre són fàcilment mesurables o objectivables, i és per això que a l'hora de fer la selecció es fan servir els **criteris de selecció**, fàcils de mesurar i ben correlacionats amb els objectius de selecció (Tibau 1992).

L'elecció dels objectius de selecció es realitza en funció del pes econòmic i de l'heretabilitat del caràcter. L'heretabilitat és la proporció de la variància fenotípica d'un caràcter que pot atribuir-se a la variància genètica additiva (Falconer i MacKay 1996), i és un paràmetre molt important en els programes de selecció. Els caràcters amb heretabilitats més altes seran els més fàcilment millorables i és per això que caràcters com l'índex de conversió, el percentatge de magre de la canal o el gruix del greix dorsal han estat durant molt anys els objectius principals de la selecció.

No obstant això, a conseqüència de la intensa pressió selectiva, han aparegut problemes que afecten directament la producció porcina: gana, prolificitat o qualitat de la carn han disminuït ostensiblement (Toro i Silió 1992). La problemàtica de la reducció de la gana en els porcs de producció es va

començar a discutir a principis dels 80, però és encara ara un fenomen poc estudiat i sense explicacions clares. Per exemple, segons la revisió de Knap (2002), als porcs d'engreix aquesta reducció de la ingesta no està tan relacionada amb la capacitat d'ingestió mateix sinó amb una reducció dels requeriments de manteniment de l'animal, i no afectaria el creixement. En canvi, la reproducció es podria veure més afectada perquè la condició corporal de les truges en lactació costa de mantenir i la fertilitat se'n pot ressentir.

El cas de la prolificitat tampoc és gaire clar. La conclusió a la qual arriben Clutter i Brascamp (1998) és que la correlació entre caràcters reproductius i productius podria no ser lineal, i que les relacions antagòniques podrien presentar-se a partir d'un cert llindar de la selecció. Així, per exemple, la pressió en contra del dipòsit de greix podria arribar a provocar caigudes importants en la capacitat reproductiva de les truges.

Pel que fa a la qualitat de la carn, els efectes són força més clars, perquè hi ha correlacions negatives amb els caràcters de producció. A la Taula 1.1 podem observar que la selecció a favor del magre de la canal i en contra del dipòsit de greix pot afectar la major part de caràcters que determinen la qualitat de la carn. Per exemple la selecció en contra del dipòsit de greix (que afecta tant el greix dorsal com el greix intramuscular) ha provocat una disminució en la qualitat del producte càrnic, per tal com el contingut en greix intramuscular és en bona part responsable del gust i la textura de la carn.

Taula 1.1. Correlacions genètiques entre caràcters de qualitat de la carn i percentatge de múscul i de greix de la canal.

Caràcter	Múscul de la canal	Greix de la canal
pH	-0,13	0,15
Reflectància	0,16	-0,21
Capacitat de retenció d'aigua	-0,19	0,02
Pèrdues per degoteig	0,05	-0,10
Pèrdues a la cocció	-0,07	0,12
Contingut de greix intramuscular	-0,34	0,30
Tendresa	-0,20	0,24
Sucositat	-0,18	0,29
<i>Flavour</i>	-0,27	0,35
Acceptabilitat	-0,48	0,34

Adaptada de Sellier (1998)

Com veiem, caràcters que no havien estat objectius prioritaris en els programes de selecció (i de retruc, tampoc en els estudis de genètica molecular) van prenent cada cop més importància. És per això que cada cop hi ha més treballs publicats sobre aquests caràcters, tant pels reproductius (King *et al.* 2003, Rathje *et al.* 1997, Rohrer *et al.* 1999) com pels de qualitat de la carn (Clop *et al.* 2003, Grindflek *et al.* 2001, Knott *et al.* 1998).

Entre els objectius de selecció que s'utilitzen actualment podem distingir entre els que afecten a:

- Explotacions de cria: prolificitat i ritme reproductiu.
- Fase d'engreix: creixement i índex de conversió.
- Comercialització de la canal: qualitat de la carn i de la canal.

Si bé aquests objectius poden millorar-se individualment de manera eficaç, la selecció conjunta de tots en una sola línia és pràcticament impossible. Tal com ja hem vist, per una banda no tots els nivells de la cadena de producció estan interessats en els mateixos caràcters i per l'altra sovint hi ha correlacions desfavorables entre els diferents caràcters seleccionats. Per tot això, l'estratègia més adient en producció porcina és establir simultàniament la selecció de diferents línies pures i dissenyar un programa d'encreuaments que optimitzin l'obtenció final d'un producte destinat a escorxador (Figura 1.2).



Figura 1.2. En la producció de porcs s'utilitzen línies de bona aptitud maternal (sovint amb sang Landrace o Large White) que es cobreixen amb mascles finalitzadors de races ben conformades com la Piétrain. A la fotografia, animals de la generació de sacrifici d'un encreuament industrial.

1.1.3.- Avaluació dels reproductors en els nuclis selectes

Un cop definits uns objectius de selecció i uns criteris de selecció, cal planificar un mètode de selecció dels millors animals. Tradicionalment s'ha fet servir l'índex de selecció, que és la millor predicció lineal del valor millorant d'un individu i que pren la forma d'una regressió múltiple del valor millorant sobre totes les fonts d'informació (Falconer i MacKay 1996). L'establiment d'un índex multicaràcter requereix la definició d'un valor millorant agregat que dependrà dels valors millorants i de la importància econòmica dels caràcters considerats.

L'ús d'aquests índexs multicaràcter és més efectiu que els esquemes de selecció seqüencial, que fixen uns registres mínims per a cada caràcter i són, de fet, un esquema de selecció a nivells independents (Hazel *et al.* 1994).

Els mètodes de selecció més utilitzats actualment és, de totes maneres, la millor predicció lineal no esbiaixada del mèrit genètic (BLUP). Les tècniques de màxima versemblança restringida són, en canvi, emprades per a l'estimació de paràmetres (REML). Com a avantatges d'aquests mètodes respecte dels índexs de selecció tradicionals cal destacar (Toro i Silió 1992):

- Permeten realitzar estimacions de l'heretabilitat, de l'heterosi, de les correlacions i dels efectes ambientals, així com les prediccions de mèrit genètic, de més precisió, fins i tot a partir de dades desequilibrades (amb informació familiar desigual) registrades en les poblacions sotmeses a selecció.
- Els predictors BLUP del mèrit genètic possibiliten un diferencial de selecció més elevat ja que permeten la comparació d'animals nascuts en granges diferents però connectades, així com la comparació d'individus amb un nombre diferent de registres en caràcters amb mesures repetides (com per exemple, la mida de la garrinada).
- Aquests mètodes permeten estimar (cas que es donin certes condicions) les taxes de progrés genètic obtingudes en les poblacions seleccionades i comparar el nivell genètic de diferents granges o nuclis de selecció.

L'atractiu d'aquests mètodes radica en la capacitat d'estimació simultània d'efectes genètics i no genètics a partir de dades productives, tot

tenint en compte el conjunt de les relacions de parentiu conegudes. Les estimes que s'obtenen amb aquests mètodes són invariants respecte dels efectes fixes (sexe, granja, ramat, any...) i tenen un error més petit perquè s'utilitza tota la informació registrada, de cada animal i de tots els seus parents (Toro i Silió 1992). El control de produccions i de la genealogia són imprescindibles.

1.1.4.- Factors que incideixen en la millora del porcí

Els ràpids avenços genètics en alguns caràcters productius del porcí han estat possibles gràcies a les característiques de l'espècie porcina (multípara i amb un interval generacional curt), als sistemes d'avaluació que permeten fer mesures directes en els futurs reproductors i a les heretabilitats i correlacions favorables dels caràcters. Tot i això, hi ha limitacions derivades de la disponibilitat inicial d'animals, de les variacions en les heretabilitats dels caràcters i d'altres factors que condicionen els nivells de progrés genètic, com ara la vida productiva dels reproductors.

1.1.4.1.- *Mida del nucli de selecció*

El número d'animals que s'utilitzen en un programa de selecció és restringit, i això provoca un increment inevitable de la consanguinitat, que serà més important com més reduït sigui el nucli (Falconer i MacKay 1996). Aquest augment de la consanguinitat s'ha de controlar perquè té dos efectes indesitjables: hi ha una reducció de l'aptitud dels individus de la població (per exemple, disminueix l'eficiència reproductiva de les mares i la viabilitat dels garrins) i es redueix la variabilitat genètica de la població, aspecte que incideix negativament en la resposta a la selecció (Whittemore 1993)

1.1.4.2.- *Components genètics dels caràcters a millorar*

El progrés genètic en un caràcter o conjunt de caràcters depèn dels paràmetres genètics dels caràcters que es mesuren (criteris de selecció), dels objectius que es pretén millorar genèticament i de les relacions entre tots dos.

Així doncs, les heretabilitats i les correlacions genètiques dels caràcters són fonamentals per avaluar l'eficiència de la selecció en una població concreta.

A la Taula 1.2 es poden observar les heretabilitats de diferents caràcters i les seves correlacions genètiques. Serà important seleccionar caràcters que tinguin correlacions favorables, és a dir, que la selecció conjunta no sigui incompatible.

Taula 1.2. Correlacions i heretabilitats (h^2) de diferents caràcters productius. A la diagonal hi ha indicades les heretabilitats. Les correlacions no mesurades s'indiquen amb un asterisc.

Correlacions i h^2	GMD	GD	IDG	IC	CTM	ICM
Guany mig diari	0,31	0,12	0,65	-0,53	-0,09	0,02
Greix dorsal		0,49	0,37	0,3	0,02	0,52
Ingestia diària de menjar			0,29	*	0,27	-0,41
Índex de conversió				0,3	*	*
Creixement del teixit magre					0,34	0,82
Índex de conversió del teixit magre						0,31

Adaptada de Clutter i Brascamp (1998)

Tant els caràcters de producció com els caràcters de qualitat de la carn tenen heretabilitats entre moderades i altes, cosa que com ja hem vist, incrementa la resposta a la selecció.

Els progressos en genètica molecular poden millorar l'eficiència dels programes de selecció. La millora genètica porcina tradicional, basada en l'estimació del valor millorant d'un individu mitjançant diverses aproximacions estadístiques, ha incorporat en els darrers anys informació generada a partir de tècniques de tipus molecular, basades en la reacció en cadena de la polimerasa o PCR (Saiki *et al.* 1985).

Les principals contribucions de la genètica molecular a la producció animal són, de moment, la construcció de mapes genètics, l'establiment de protocols ràpids de genotipatge i la generació de milers de marcadors moleculars. En un futur proper, la selecció assistida per marcadors (que ja s'ha fet servir en alguns casos concrets, com veurem) pot ser una eina fonamental per maximitzar el progrés genètic obtingut en els programes de millora.

1.2.- Marcadors moleculars

Un marcador molecular es pot definir com una regió del genoma, generalment de posició coneguda, que presenta polimorfisme (Kinghorn i van der Werf 2000). Com comentarem més endavant, els marcadors moleculars són l'eina bàsica per a la construcció de mapes genètics, indispensables en els estudis de genòmica i de cerca de *quantitative trait loci* o QTL.

Al llarg d'aquests últims anys s'han anat descrivint noves classes de marcadors, en especial marcadors que permeten fer genotipatges senzills, fiables i barats.

1.2.1.- Tipus de marcadors moleculars

1.2.1.1.- *Polimorfisme en la longitud dels fragments de restricció o RFLP*

Els enzims de restricció tallen el DNA per punts específics, anomenats dianes de restricció. Aquestes dianes de restricció són seqüències de pocs parells de bases (generalment de 4 a 8 pb), habitualment palindròmiques i que els enzims reconeixen específicament, tot tallant en una posició concreta. La presència o absència de la diana de restricció es tradueix en diferents patrons de restricció, que es consideren al·lels diferents. Així, la presència de la diana en alguns individus d'una població i l'absència en d'altres genera un polimorfisme en els patrons de restricció, i, per tant, en la mida dels fragments de restricció generats (Paterson *et al.* 1988).

En un primer moment, per genotipar els RFLP es feien digestions de DNA genòmic que s'analitzaven amb la tècnica de transferència *Southern* (Southern 1975). Amb l'aparició de la PCR es va dissenyar la tècnica de PCR-RFLP. En aquest cas la digestió enzimàtica és posterior a una PCR que ha amplificat la zona que conté la diana de restricció. Així, el patró de bandes es redueix només a les que resulten de la digestió del fragment amplificat i és fàcilment visualitzable en un gel d'agarosa. Aquesta aproximació s'utilitza per genotipar el gen del receptor de la rianodina (*Ryr1*) o gen de l'halotà (Figura 1.3), responsable de la síndrome de l'estrès porcí (Fujii *et al.* 1991).

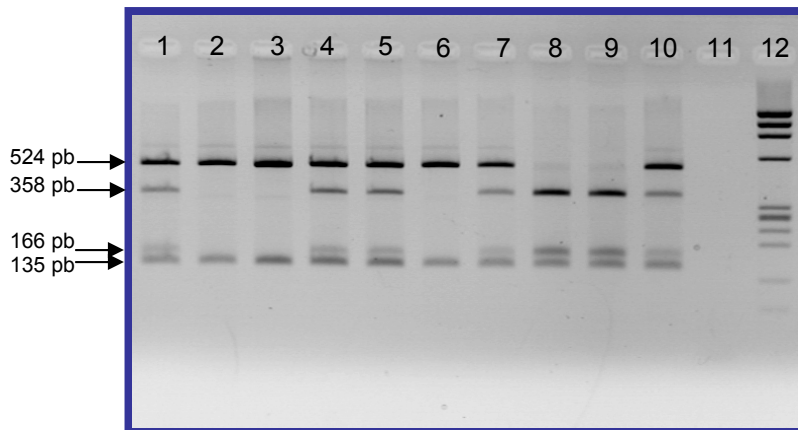


Figura 1.3. Gel de genotipatge de la mutació del gen *Ryr1* responsable de la síndrome de l'estrès porcí. El patró de bandes de 135 pb i 524 pb correspon a l'homozigot NN (pous 2, 3 i 6) i el patró de 358 pb, 166 pb i 135 pb a l'homozigot nn (pous 1, 4, 5, 7 i 10). L'heterozigot té un patró de digestió amb totes quatre bandes (pous 8 i 9). Al pou 11 hi ha el control negatiu de la PCR i al pou 12 el marcador de mides.

1.2.1.2.- Microsatèl·lits

Els microsatèl·lits són seqüències de DNA de 2 a 5 parells de bases repetides en tàndem, d'una longitud total de normalment menys de 300 parells de bases i que es troben als genomes de tots els organismes (Chambers i MacAvoy 2000).

La dinàmica de formació dels microsatèl·lits és complexa i poc coneguda. En principi, els microsatèl·lits sorgeixen en regions del genoma on ja hi ha petites seqüències simples repetides. A partir d'aquí, el principal mecanisme de mutació és l'anomenat *slipped-strand mispairing*, que consisteix en un desacoblament entre les dues cadenes de DNA durant la replicació. Accidentalment, una cadena queda desplaçada respecte de l'altra i es forma un llaç (Figura 1.4). El resultat final és la pèrdua o el guany d'una unitat de repetició segons si la cadena que s'ha desplaçat és la motlle (A) o la de nova síntesi (B) respectivament.

També s'ha proposat com a força conductora de l'evolució dels microsatèl·lits la inestabilitat de l'acoblament de les dues cadenes de DNA en els individus heterozigots. Les mutacions serien més freqüents quan les diferències de mida entre els dos al·lels fossin més grans, i aleshores el ritme

evolutiu seria dependent de la mida de la població i de l'interval generacional (Chambers i MacAvoy 2000).

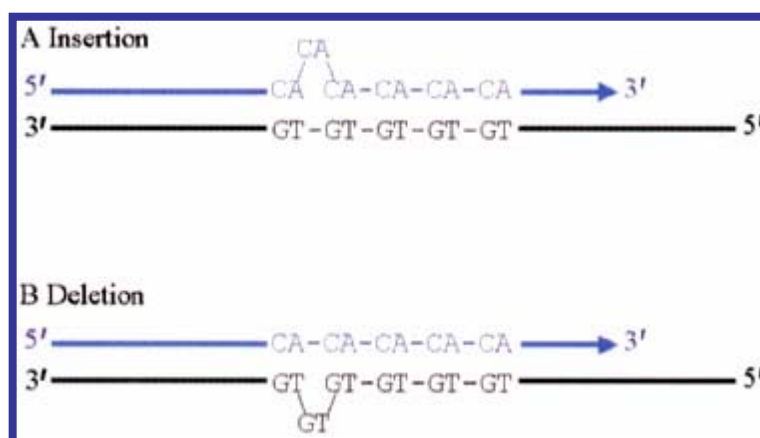


Figura 1.4. Expansió (A) i contracció (B) d'un microsatèl·lit mitjançant el mecanisme d'*slipped strand mispairing* (Bennet 2000).

Els microsatèl·lits són una eina molecular extremadament versàtil, i s'han utilitzat en anàlisis de parentiu i proves forenses, estudis paleogenètics, treballs de biodiversitat i filogènia i per a la construcció de mapes genètics i posterior detecció de QTLs o gens majors. Aquest ampli ventall d'aplicacions és possible gràcies a una sèrie de característiques que els fan molt interessants. En primer lloc tenen un grau molt alt de polimorfisme i són marcadors codominants, és a dir, que podem identificar els dos al·lels d'un individu. En segon lloc, són seqüències molt abundants. Un 3 % del genoma humà el conformen les *simple sequence repeats*, SSRs (repeticions d'una 1 a 13 parells de bases), que podem trobar, de mitjana, cada dues kilobases. Les repeticions de pocs parells de bases són les més abundants, i, per exemple, les de dinucleòtids són un 0,5 % del total del genoma (Lander *et al.* 2001). Per últim, un altre gran avantatge dels microsatèl·lits és la facilitat d'anàlisi. Com que el polimorfisme que els caracteritza resideix en el número de repeticions del motiu nucleotídic, en una PCR es generen productes amplificats de mides diferents (cadascun corresponent a un únic al·lel) distingibles mitjançant electroforesi d'alta resolució. Aquest procés de genotipatge és fàcilment automatitzable amb els sistemes fluorescents d'electroforesi capil·lar (Figura 1.5).

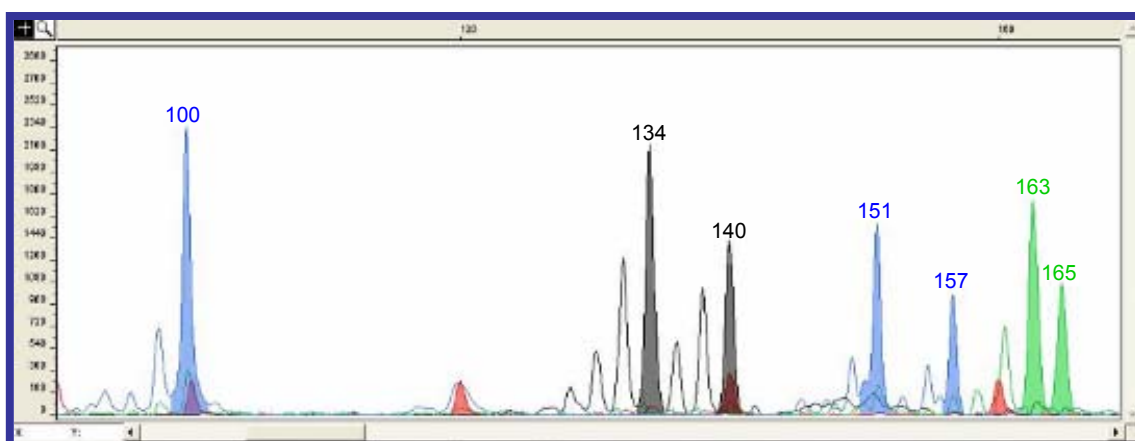


Figura 1.5. La lectura del genotipatge d'un joc de microsatèl·lits es pot fer amb un aparell fluorescent d'electroforesi capil·lar, que registra tant les mides com les longituds d'ona del fluoròfor de cada fragment amplificat. En vermell hi ha els pics de marcador, la resta de pics marcats són els al·lels de quatre microsatèl·lits diferents. Els genotipatges dels quatre microsatèl·lits són homozigot 100, heterozigot 134-140, heterozigot 151-157 i heterozigot 163-165, respectivament. Les mides dels al·lels s'indiquen a sobre de cada pic.

1.2.1.3.- Polimorfismes nucleotídics o SNP

Els SNP són posicions nucleotídiques en les quals la substitució d'una base per una altra genera un polimorfisme. Com a màxim, doncs, podran ser tetraal·lèlics encara que generalment siguin dial·lèlics. Al genoma humà la freqüència d'SNP és aproximadament de l'ordre d'1 SNP/100-300 pb, i són per tant els marcadors més abundants del genoma. A més ja hi ha uns quants sistemes de detecció ràpids i efectius (Taula 1.3), que permeten l'anàlisi d'un volum elevat de mostres en molt poc temps. Els xips de DNA i l'espectrofotometria de masses són les últimes tècniques desenvolupades en aquest camp.

Taula 1.3. Mètodes de genotipatge d'SNPs a gran escala basats en l'ús de sondes o molècules fluorescents.

Oligonucleotide ligation assay	Delahunty <i>et al.</i> 1996
Single-base extension with fluorescence detection	Pastinen <i>et al.</i> 2000
Homogeneous solution hybridization (Taqman)	Livak 1999
Molecular beacon genotyping	Tan <i>et al.</i> 2000
Rolling circle amplification	Lizardi <i>et al.</i> 1998
Invader assays	Hsu <i>et al.</i> 2001

Adaptada de Shi (2001).

Cal esmentar la *SNP Database*, del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>) que actualitza la informació d'aquests polimorfismes en 25 espècies diferents. Segons l'últim resum, del juny del 2004, en porc s'han descrit més de 5.000 SNP. A l'espècie humana el nombre d'SNP supera els 19 milions.

Altres tipus de marcadors menys importants són:

1.2.1.4.- *Random amplified polymorphic DNAs o RAPD*

Són polimorfismes que es detecten mitjançant l'amplificació aleatòria de determinades regions del DNA motlle, amb uns oligonucleòtids de seqüència arbitrària. Els RAPD presenten una herència mendeliana dominant i es poden utilitzar per construir mapes genètics (Williams *et al.* 1990). Es fan servir sobretot en espècies on hi ha posicionats molt pocs marcadors. En porc s'han fet servir, per exemple, per a la identificació de marcadors al cromosoma Y (Castellanos *et al.* 1996).

1.2.1.5.- *Amplified fragment length polymorphisms o AFLP*

La tècnica de detecció d'AFLP es basa en l'amplificació selectiva de fragments de restricció generats mitjançant la digestió de DNA genòmic. El procés inclou tres passos: digestió del DNA i lligació d'adaptadors, amplificació selectiva dels fragments de restricció i anàlisi en gel dels fragments amplificats. L'amplificació selectiva s'aconsegueix mitjançant l'ús d'uns oligonucleòtids complementaris als adaptadors, però que tenen una seqüència curta específica (normalment de 2 parells de bases) a l'extrem 3'. Així doncs, només s'amplifiquen aquells fragments en els quals els extrems 3' dels *primers* són complementaris als nucleòtids que flanquegen les dianes de restricció (Vos *et al.* 1995). Els AFLP en porcí s'han utilitzat per a la detecció de QTLs (Wimmers *et al.* 2002a).

1.2.2.- Mesura del polimorfisme dels marcadors

El grau de polimorfisme d'un marcador és el que en determina la seva utilitat, perquè condiona la informativitat. El polimorfisme dels marcadors varia a cada població, i abans de fer cap anàlisi relacionada que depengui dels marcadors, cal fer una selecció dels marcadors més adequats. Una primera aproximació que es fa servir és l'heterozigositat, que es calcula com el percentatge d'animals heterozigots de la població. L'heterozigositat es calcula per cada marcador.

Hi ha altres índexs que serveixen per avaluar la utilitat d'un marcador en una població segons el seu polimorfisme i la seva distribució al·lèlica. Un dels més utilitzats és l'índex de contingut polimòrfic, PIC (*Polymorphism Information Content*) de Botstein *et al.* (1980)

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

on p_i i p_j són les freqüències al·lèliques del marcador.

Aquest índex va de 0 a 1 i avalua la informativitat d'un marcador en una població segons les freqüències al·lèliques. Es multiplica la probabilitat de cada possible encreuament (calculable a partir de les freqüències al·lèliques) amb la probabilitat que siguin informatius, és a dir, que es pugui identificar de quin progenitor procedeix l'al·lel que estem considerant. Per exemple, en un encreuament del tipus AB x CD, tota la descendència és informativa. En un creuament AB x AB, en canvi, només la meitat de la descendència (AA i BB) serà informativa.

1.3.- Cartografia del genoma porcí

Un dels objectius fonamentals de la genètica molecular aplicada a la millora del porcí consisteix en la construcció de mapes del genoma que ens permetin conèixer la localització cromosòmica d'una sèrie de loci prèviament caracteritzats. Hi ha diversos tipus de mapes, dels quals en destacarem dos:

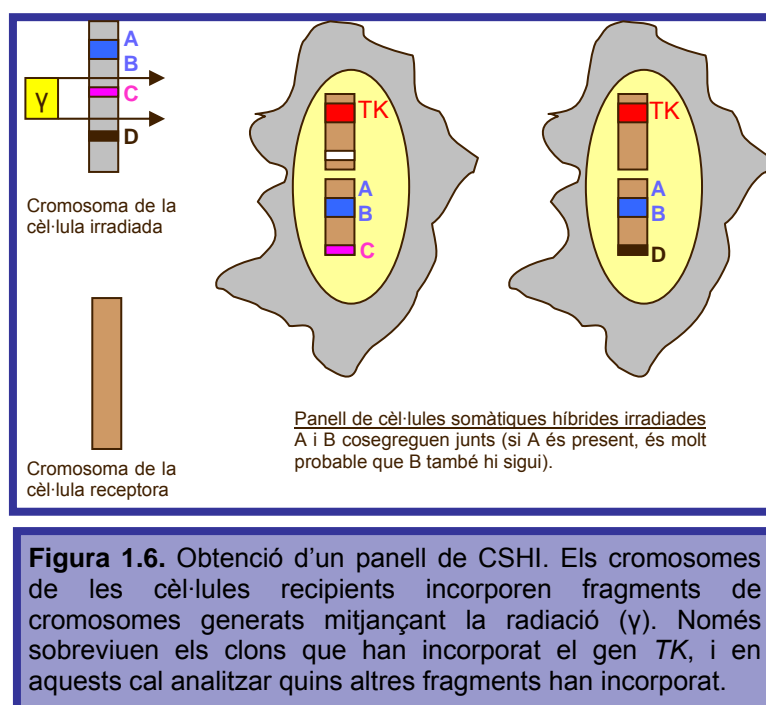
1.3.1.- Mapes físics realitzats a partir de panells de cèl·lules somàtiques híbrides irradiades (*radiation hybrid map*)

La construcció d'aquests mapes es fa mitjançant els panells de cèl·lules somàtiques híbrides irradiades (CSHI), és a dir, d'un joc de línies cel·lulars (generalment de rosegador) que, a més dels cromosomes propis té parts de cromosomes d'una altra espècie (el porc en el nostre cas).

L'obtenció de les CSHI implica l'ús de dues línies cel·lulars (donadora i receptora), de les quals almenys una és tumoral. Les cèl·lules de l'espècie donadora (el porc en el nostre cas) s'irradien, i els cromosomes es fragmenten. Mitjançant diferents tècniques, es provoca una fusió de les línies cel·lulars, el resultat de la qual és un heterocarió binucleat transitori. Per provocar la fusió el mètode més habitual és l'addició de polietilenglicol al medi. La fusió de les cèl·lules implica la fusió de nuclis, i alguns dels fragments cromosòmics de l'espècie donadora s'insereixen de manera estable als cromosomes de l'espècie receptora.

A partir d'aquí cal implementar una mètode de selecció que afavoreixi la supervivència dels clons híbrids. Una possibilitat és fer servir com a línia receptora una línia cel·lular amb algun dèficit enzimàtic que li impedeixi la proliferació en alguns medis concrets. Per exemple, la línia de cèl·lules de hámster CHO no té timidinquinasa (TK), que és indispensable per la síntesi del DNA quan el medi té aminopterina. En un medi amb aquest compost, doncs, només sobreviuran els clons que hagin incorporat algun fragment cromosòmic amb el gen *TK* (Figura 1.6).

Llavors es fa la caracterització dels diferents clons de CSHI mitjançant FISH, estudis citogenètics de bandes i anàlisi per PCR d'un joc de marcadors representatiu del genoma de l'espècie. Amb aquestes estratègies es pot identificar els fragments cromosòmics de l'espècie donadora que s'han integrat d'una manera estable al genoma de l'espècie receptora. El panell es construeix amb 90 clons amb una elevada capacitat de retenció, que en conjunt contindran el genoma de l'espècie donadora.



Per poder cartografiar un marcador cal identificar els clons portadors del panell de CSHI. Això s'aconsegueix mitjançant l'amplificació d'un fragment de la seqüència del marcador amb *primers* espècie-específics a cadascun dels clons (Figura 1.7). La informació dels 90 clons s'analitza conjuntament amb un programari específic i permet determinar una localització cromosòmica i la distància amb altres marcadors.

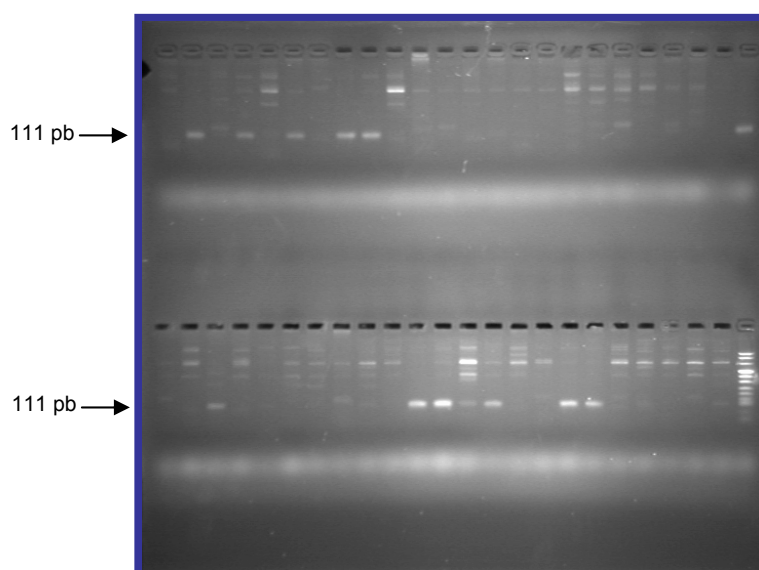


Figura 1.7. Gel d'electroforesi corresponent a 48 de les PCRs del panell IMpRH per localitzar el gen de l'acetil coenzim A sintetasa de cadena llarga 1 (*ACLS1*). Als clons portadors del gen *ACLS1* s'observa una banda de 111 pb.

La unitat de distància que es fa servir en aquest tipus de mapes és el centiRay. Aquesta mesura s'obté a partir de la probabilitat que dos marcadors estiguin separats per un o més trencaments cromosòmics (denotada θ), que es calcula a partir de les dades experimentals d'amplificació de cada gen o marcador que vulguem posicionar. La distància de mapa es mesura llavors amb una funció,

$$D = -\ln(1 - \theta)$$

la unitat de la qual és el Ray. Habitualment es transforma en centiRays que s'adequa més a l'ordre dels valors que s'obtenen.

Per calcular la fiabilitat d'aquesta distància calculem un LOD score (*likelihood odds ratio*), comparant la probabilitat que les dades es generin perquè els marcadors estan lligats (o sigui la θ estimada) amb la probabilitat que les dades s'hagin generat a l'atzar ($\theta = 1$). El LOD és una mesura en escala logarítmica de quantes vegades és més probable un cas que l'altre.

Com que θ depèn de la dosi de radiació que hem fet servir per irradiar les cèl·lules somàtiques híbrides, l'equivalència amb altres distàncies (per exemple, amb les distàncies dels mapes de lligament que comentarem més endavant) serà diferent a cada mapa que construïm.

Actualment a l'espècie porcina hi ha tres panells de CSHI: l'IMpRH (Yerle *et al.* 1998), l'IMNpRH2 (Yerle *et al.* 2002) i l'SSRH (Hamashima *et al.* 2003), amb unes dosis d'irradiació de 7.000-rad, 12.000-rad i 5.000-rad respectivament. Aquestes diferències de dosi repercuteixen en la resolució, que es correspon, en cada cas, a 35-37 kb/cR_{7.000}, 12-14 kb/cR_{12.000} i 0,49 Mb/cR_{5.000}. A més a més, un panell de 3000-rad s'ha fet servir per construir un mapa del cromosoma 2 (Rattink *et al.* 2001).

1.3.2.- Mapes de lligament

L'estudi de la segregació de marcadors genètics polimòrfics en encreuaments dirigits ha permès la construcció de mapes de lligament en moltes espècies domèstiques. Aquests mapes utilitzen el fet que la freqüència de recombinació entre dos punts d'un mateix cromosoma és directament

proporcional a la distància que els separa. Així, la freqüència de recombinació pot fer-se servir per mesurar distàncies entre marcadors genètics. Quan dos marcadors segreguen independentment, la freqüència de recombinació és de 0,5 i s'assumeix que o estan a una distància molt gran (a més de 50 cM) o en cromosomes diferents.

Per construir un mapa de lligament cal disposar d'una genealogia amb relacions de parentiu conegudes i de marcadors moleculars fàcilment analitzables que siguin polimòrfics en el pedigrí utilitzat. Així, analitzant la segregació dels marcadors podem estimar les freqüències de recombinació entre diferents loci i inferir les distàncies corresponents. En els mapes de lligament la unitat de distància adoptada és el centiMorgan (cM), que equival a una freqüència de recombinació de l'1%. D'una manera molt aproximada es correspon a una distància física d'1 Mb.

De la mateixa manera que en els mapes RH, la distància de mapa es mesura amb una funció, en aquest cas amb una funció de la freqüència de recombinació. Hi ha diferents funcions de mapa, que varien bàsicament en la interferència que s'assumeix. La interferència és l'efecte pel qual la formació d'un quiasma en una determinada regió redueix la probabilitat que es produeixi un altre quiasma en una regió adjacent, reduint, per tant, la freqüència de dobles recombinants observats. Una bona funció de mapa cal que tingui les propietats següents (Kinghorn i van der Werf 2000):

- 1) Les distàncies entre loci han de ser additives, o sigui, la distància AC ha de ser igual a AB+BC si l'ordre és A-B-C.
- 2) Una distància de més de 50 cM s'ha de traduir en una freqüència de recombinació del 50% (o sigui, segregació independent).

Hi ha diferents funcions de mapa. Si r és la freqüència de recombinació i d la distància entre dos loci, tenim:

1.- Amb interferència completa i en distàncies petites, la funció és la més senzilla:

$$d = r$$

2.- Funció de mapa de Haldane (1919), apropiada quan no hi ha interferència:

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

3.- Funció de mapa de Kosambi (1944), que permet un cert grau d'interferència:

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

En distàncies inferiors a 15 cM hi ha poques diferències entre les 3 funcions de mapa i podem assumir que $d = r$ (Kinghorn i van der Werf 2000).

Hi ha molts factors que poden alterar la freqüència de recombinació i, per tant, la correspondència entre aquest valor i la distància física real serà només orientativa. Els dobles recombinants, per exemple, apareixen com a no recombinants en els mapes de dos punts i contribueixen a subestimar les distàncies. Un altre fenomen prou ben conegut és que el sexe homogamètic presenta una taxa de recombinació més elevada que el sexe heterogamètic, per la qual cosa les distàncies inferides són més grans (Ellegren *et al.* 1994).

El suport informàtic que més s'utilitza per a la construcció de mapes de lligament en genòmica porcina és el CRI-MAP (Green *et al.* 1990), i els marcadors més utilitzats en els mapes de lligament han estat els microsatèl·lits. Segons Bennett (2000), se'ls considera els marcadors ideals gràcies a l'abundància, la codominància, l'alt grau de polimorfisme i la bona distribució al llarg de tota la part eucromàtica del genoma.

En porcí hi ha disponibles uns quants mapes de lligament construïts a partir d'encreuaments diferents. D'entre les entitats científiques internacionals dedicades a la construcció de mapes de lligament cal destacar el PigMap linkage consortium (Archibald *et al.* 1995), la Nordic Pig Gene Mapping Collaboration (Marklund *et al.* 1996) i l'USDA Meat Animal Research Center (USDA-MARC) (Rohrer *et al.* 1994, Rohrer *et al.* 1996). A la Figura 1.8 podem observar alguns dels marcadors que s'han posicionat al cromosoma 2 porcí, del mapa de lligament USDA-MARC_v2.

Segons el PigMap Annual Update del 2003, hi ha un total de 1.381 gens (1562 segons ArkDB) gens i 2.262 marcadors (2444 segons ArkDB)

posicionats en com a mínim algun dels mapes. A la base de dades del panell ImpRH hi ha com a mínim 4.000 marcadors posicionats (Yerle *et al.* 2002).

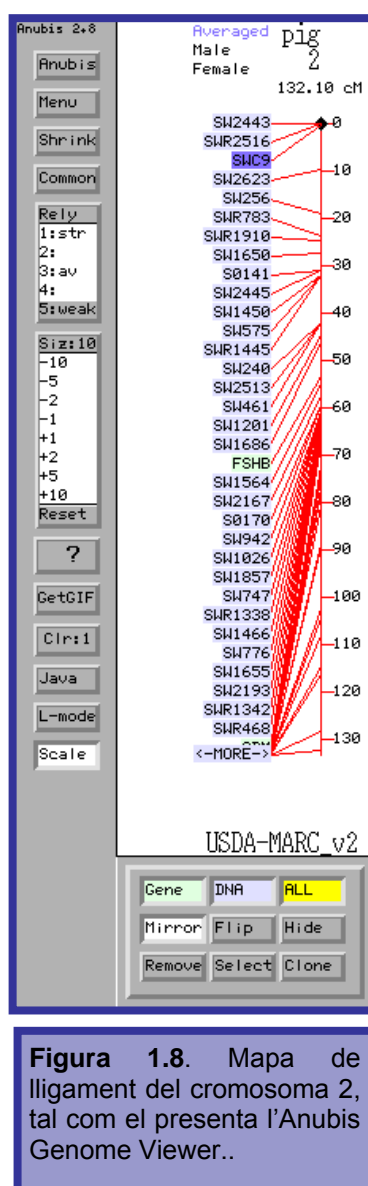


Figura 1.8. Mapa de lligament del cromosoma 2, tal com el presenta l'Anubis Genome Viewer..

1.3.3.- Projectes de seqüenciació del genoma porcí

A gairebé totes les espècies domèstiques i de laboratori en les quals encara no s'ha seqüenciat el genoma hi ha projectes de seqüenciació en diferents fases de desenvolupament, detallats breument al web de l'*International Sequence Consortium* (<http://www.intlgenome.org>).

En el cas del porc, hi ha dos projectes de seqüenciació, un projecte conjunt de la Xina i de Dinamarca iniciat a l'abril del 2001 i que ja ha caracteritzat la seqüència de 700.000 EST (Rothschild 2003). A més a més

també hi ha l'*International Swine Genome Sequencing Consortium*, entitat creada al setembre del 2003 i que agrupa institucions de diferents països. Aquest consorci té l'objectiu d'obtenir la seqüència completa 6x del genoma porcí, tal com es detalla al *Porcine Sequencing White Paper* (Rohrer *et al.* 2003). La seqüenciació del genoma porcí ha estat qualificada de prioritat moderada pel National Human Genome Research Institute.

1.4.- Identificació de *quantitative trait loci*

El nom de *quantitative trait loci* (QTL) es fa servir per designar *loci* que són responsables d'una part de la variació fenotípica observada en un caràcter mètric i en una població determinada. Els caràcters mètrics quantitius o poligènics són caràcters en l'herència dels quals hi participa teòricament un gran nombre de gens, però només amb uns quants que tinguin efectes importants. Els QTL són, de fet, regions del genoma que contenen algun o alguns d'aquests gens d'efecte major.

Els estudis de detecció de QTL es basen a determinar si hi ha cosegregació entre els fenotipus observats per cadascun dels caràcters estudiats (o sigui, la variació fenotípica) i la variació genètica, que visualitzem gràcies al genotipatge d'un joc de marcadors moleculars. En el cas que hi hagi cosegregació, cal inferir que en una zona del genoma més o menys pròxima al marcador molecular hi ha un gen (o potser un grup de gens) d'efecte major sobre el caràcter estudiat.

1.4.1.- Disseny experimental

Habitualment, els estudis de QTL es duen a terme amb encreuaments experimentals de tres generacions entre dues línies consanguínies diferents, des que Paterson *et al.* (1988) van fer un encreuament d'aquest tipus entre dues línies de tomata.

Una línia consanguínia només es pot aconseguir en plantes i en animals de laboratori, perquè s'obté a partir d'encreuaments entre individus molt emparentats (o, si es pot, d'un individu amb ell mateix), i així es pot considerar

que tots els integrants de la línia són homozigots pels mateixos al·lells. Utilitzant dues línies consanguínies prou diferents fenotípicament pels caràcters que volem estudiar s'incrementa la possibilitat de detectar la segregació de QTL amb efectes importants, al mateix temps que s'aconsegueixen uns marcadors amb una bona heterozigositat i amb un origen (dins de l'encreuament) fàcilment traçable.

No obstant això, aquests procediments no són possibles en el cas de les espècies domèstiques. En poblacions d'animals de producció, per tal de facilitar la detecció dels QTL es fan altres dissenys experimentals:

- Esquemes F_2 (Figura 1.9) amb poblacions no consanguínies. En aquest tipus de dissenys s'escull una F_0 de dues races diferents, se n'obté una F_1 , que s'encreua per obtenir una F_2 . Idealment, les races F_0 han de presentar fenotipus clarament diferents pels caràcters estudiats, ja que això maximitza la possibilitat de trobar al·lells del QTL amb efectes fenotípics extrems. S'assumeix que el QTL té dos al·lells Q i q , essent una de les races homozigota QQ i l'altra homozigota qq . És el tipus de disseny més utilitzat en porcí.

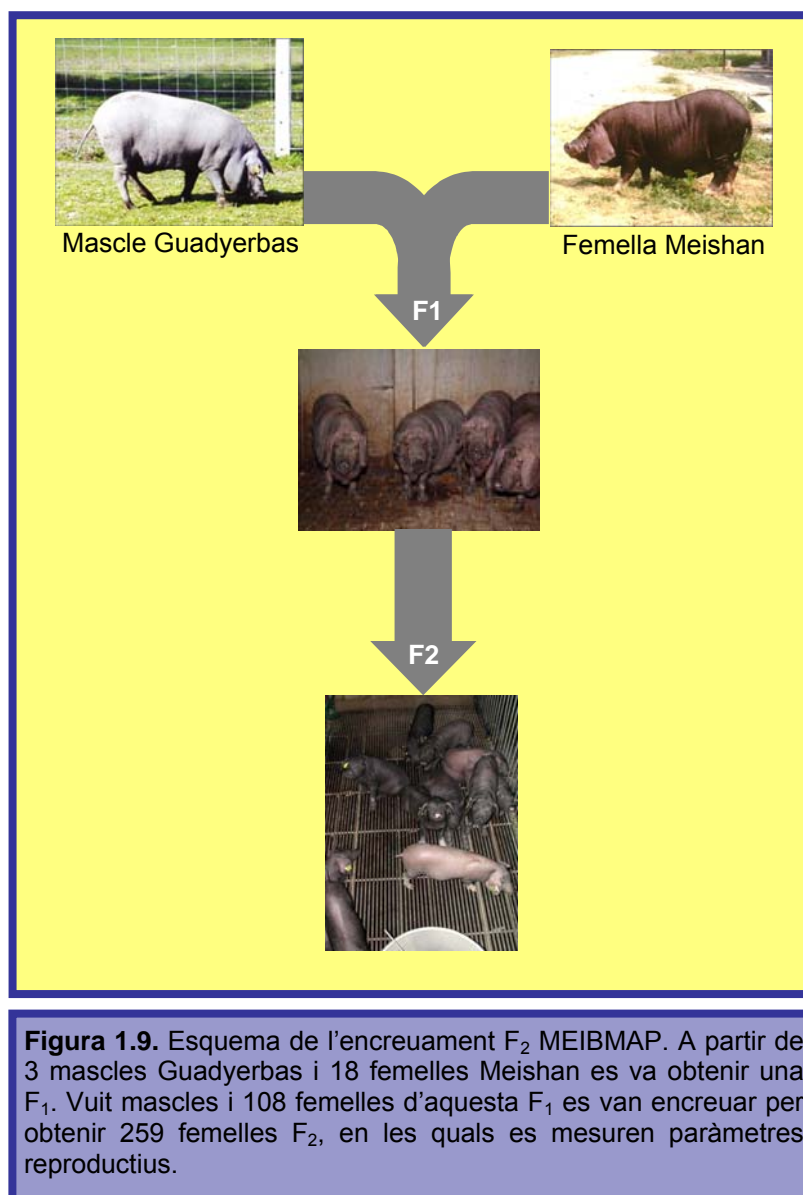
- Retroencreuament o *backcross*. Es diferencia del disseny anterior perquè l' F_2 s'obté d'encreuar animals de l' F_1 amb animals d'una de les races de l' F_0 .

En tots dos casos s'optimitza la capacitat de detecció de QTL, perquè s'incrementen tant les possibilitats que els QTL estiguin segregant com que els marcadors siguin fàcilment traçables.

- Esquemes en poblacions obertes. En aquest cas, s'escullen animals d'una població com a pares i se n'obté una descendència. L'interès és demostrar que els resultats obtinguts en encreuaments de tres generacions (que des d'un punta de vista productiu són artificials perquè sovint involucren races no comercials) són extrapolables a poblacions productives.

Aquest disseny, tot i l'aplicabilitat que té, presenta complicacions a l'hora de mesurar els resultats perquè la major part de tests estadístics s'han

desenvolupat a partir de supòsits que només són certs en els encreuaments experimentals d' F_2 o de retroencreuament.



1.4.2.- Mesures fenotípiques

Les mesures fenotípiques són un aspecte fonamental en els estudis de QTL. El canvi en els criteris del mercat, que prioritzen la qualitat, ha determinat un canvi en els objectius de selecció dels programes de millora, i la qualitat de la carn i de la canal han passat a ser fonamentals.

La qualitat de la canal es defineix com un conjunt de caràcters de conformació corporal i de composició, entre els quals destaquen el percentatge de magre de la canal, el pes, el gruix del greix dorsal i la conformació (Diestre i

Gispert 1993). La qualitat de la carn, en canvi, és un terme amb una definició més complicada, perquè engloba tant l'aptitud organolèptica com l'aptitud tecnològica de la carn. L'aptitud organolèptica depèn de l'aparença visual i sobretot de la tendresa i del *flavour*, que és una mescla de gust i olor. L'aptitud tecnològica, en canvi, està relacionada amb la capacitat de retenció d'aigua, el percentatge de proteïna (i les seves propietats funcionals), el percentatge i la composició del greix, la quantitat de col·lagen, el pH, el color i la consistència (Arnau *et al.* 1993).

Totes aquestes característiques determinen la qualitat final, i, per tant, el preu de la carn i de la canal. És per això que s'utilitzen en els programes de selecció i que s'inclouen en els estudis de QTL.

En els dissenys experimentals que hem comentat suara, totes aquestes mesures fenotípiques es prenen només en els individus de l'última generació de l'encreuament, perquè és a partir de la variabilitat fenotípica d'aquests individus que fem l'anàlisi estadística.

1.4.3.- Genotipatge del pedigrí

Sigui quin sigui el tipus de marcador escollit en un estudi de QTL, totes les generacions han de ser genotipades per tal de determinar l'origen (patern o matern) dels al·lels. Així, el volum de mostres per processar sovint és molt elevat. Afortunadament s'han desenvolupat mètodes d'anàlisi que permeten processar un gran nombre de mostres en poc temps: són els anomenats mètodes de genotipatge a gran escala o *high-throughput genotyping methods*.

El punt inicial de tots aquests processos és una PCR que permet amplificar el marcador que volem analitzar, seguida d'algun sistema de visualització del resultat. Per exemple, el genotipatge tradicional de microsatèl·lits (que ha estat el marcador més utilitzat en genòmica porcina) implicava la resolució dels diferents al·lels existents en gels de poliacrilamida i la visualització del resultat mitjançant autoradiografia o tinció amb plata.

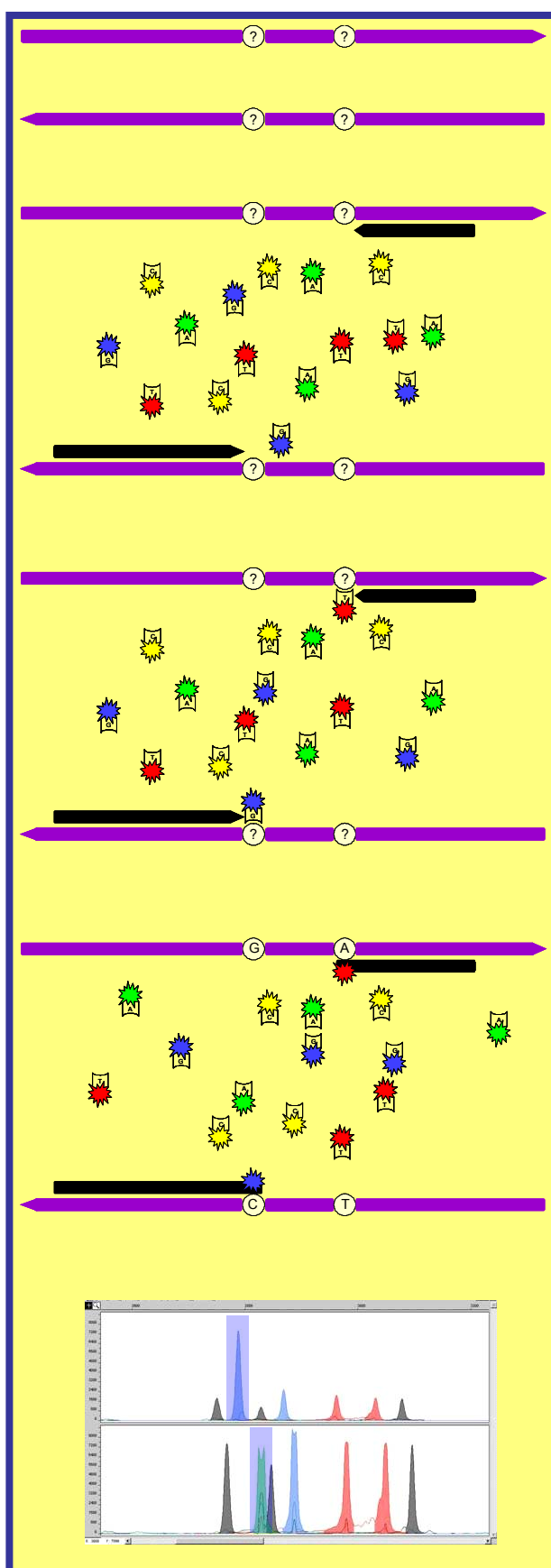
L'aparició de seqüenciadors automàtics i de tècniques basades en el marcatge fluorescent han suposat un canvi qualitatiu molt important en els mètodes de genotipatge. Amb els marcadors fluorescents la visualització és

molt més senzilla perquè els fluoròfors al ser estimulats amb llum làser emeten llum amb una longitud d'ona coneguda i que pot ser detectada per un sensor. D'aquesta manera, es pot automatitzar la lectura. Actualment ja es fan servir fins a cinc fluoròfors simultàniament amb emissions de longituds d'ona diferents i no solapades (Pet: vermell, Ned: groc, Fam: blau, Vic: verd i Liz: carbassa i reservat pel marcador).

Així, pel genotipatge de microsatèl·lits i pel d'SNP és habitual fer servir aquest mètode. En el cas dels microsatèl·lits, es marca amb un fluoròfor un dels oligonucleòtids de la PCR inicial, mentre que pels SNP, en l'anomenada tècnica de *primer extension analysis*, es fan servir dideoxinucleòtids marcats. En aquest cas, després de la primera PCR, que amplifica la regió que conté el polimorfisme, es duu a terme una segona reacció d'extensió amb els dideoxinucleòtids marcats i amb un sol oligonucleòtid, adjacent a l'SNP (Figura 1.10). Així, com que després de la incorporació d'un dideoxinucleòtid (marcat) no és possible continuar l'extensió, només afegeix una sola base a l'oligonucleòtid.

En tots dos casos, una electroforesi d'alta resolució permet una òptima identificació dels diferents al·lels. Combinant les mides (dels fragments amplificats en el cas dels microsatèl·lits i dels oligonucleòtids de la segona amplificació en el cas dels SNP) i els colors dels fluoròfors és possible fer, simultàniament, l'electroforesi de diferents marcadors. Gràcies al programari d'anàlisi (per exemple, el GeneMapper SoftwareTM, d'Applied Biosystems) es pot assignar a cada pic electroforètic la mida en pb (per comparació amb un marcador de pes molecular) i la longitud d'ona del fluoròfor, que permeten el genotipatge del marcador (Figura 1.10).

Els aparells d'electroforesi que més es fan servir en aquests casos són els seqüenciadors automàtics (per exemple, l'ABI 377 d'Applied Biosystems) o bé els aparells d'electroforesi capil·lar (per exemple, l'ABI Prism 310 o l'ABI Prism 3100, també d'Applied Biosystems).



1.- A la doble cadena de DNA hi tenim dos polimorfismes que volem genotipar. Amb una PCR prèvia cal amplificar un fragment que contingui la regió amb els polimorfismes.

2.- Per a la reacció d'extensió fem servir dideoxinucleòtids que porten un marcatge fluorescent. Els primers, adjacents a les posicions polimòrfiques, s'hibriden amb les cadenes mètles. Com que volem genotipar simultàniament les dues mutacions, cal que els oligonucleòtids siguin de mides diferents.

3.- Els dideoxinucleòtids complementaris als polimorfismes s'incorporen a la cadena del primer i no permeten la incorporació de cap altre dideoxinucleòtid.

4.- Els oligonucleòtids queden marcats amb una fluorescència diferent segons el dideoxinucleòtid que han incorporat. Amb un aparell d'electroforesi capil·lar es pot identificar la fluorescència de cada oligonucleòtid i llegir el genotipus.

5.- Electroferogrames de genotipatge de 6 SNP. Es pot observar que el segon SNP (ressaltat en blau) és GG al primer carril i AA al segon.

Figura 1.10. Genotipatge d'SNP mitjançant el protocol de primer extension analysis.

1.4.4.- Metodologia estadística

L'estima de la posició i magnitud d'un QTL es basa en dos principis essencials: la probabilitat que un individu concret tingui un determinat genotipus pel QTL, tot tenint en compte els marcadors flanquejants, i l'efecte estimat d'aquest genotipus específic sobre el fenotipus de l'individu.

La principal metodologia que es fa servir en la detecció de QTL és l'anomenada *d'interval mapping*, amb dues aproximacions principals: la màxima versemblança i la regressió.

1.4.4.1.- *Interval mapping*.

Aquest mètode, proposat per Lander i Botstein (1989), fa servir un mapa genètic de marcadors tipats i assumeix la presència d'un sol QTL. Totes les posicions del genoma són tractades, una per una, com la localització del QTL putatiu. Amb les dades genotípiques dels marcadors es pot calcular la probabilitat dels genotipus possibles del QTL, que només dependran dels genotipus dels marcadors flanquejants més propers a la posició que estem avaluant. Per exemple, en un encreuament *backcross*, podem calcular la probabilitat que un individu tingui el genotipus AA o AB al QTL putatiu.

A més a més s'assumeix que, donat el genotipus del QTL, el fenotipus segueix una distribució normal, amb mitjana μ_A o μ_B , segons si el genotipus del QTL és (seguint amb l'exemple de *backcross*) AA o AB respectivament i una desviació estàndard comú, σ . Donats els genotipus dels marcadors flanquejants del QTL, la distribució fenotípica condicional és llavors una mixtura de dues distribucions normals (Broman 2001).

Amb totes aquestes dades (la posició d'un QTL putatiu, μ_A , μ_B i σ) podem formular la probabilitat de les dades experimentals condicionades a aquests paràmetres, que permet obtenir els anomenats *maximum likelihood estimates* de cadascún dels tres paràmetres no coneguts (μ_A , μ_B i σ). Amb aquestes estimes podem calcular un LOD score que mesura la probabilitat de

l'existència del QTL, comparant amb la no-segregació del QTL en aquella posició.

Amb aquest sistema s'aconsegueix informació sobre la posició del QTL i sobre l'estima del seu efecte. No obstant això, requereix encreuaments de línies consanguínies (homozigotes a tots els loci), per tal que tots els marcadors siguin informatius en la generació segregant. A més a més és computacionalment intens i requereix un programari especialitzat.

Haley i Knott (1992) van descriure una aproximació més senzilla de calcular i que es pot dur a terme amb el programari estàndard d'estadística. En aquest mètode cal suposar que a l'encreuament experimental hi ha algun QTL segregant, amb al·lels diferents fixats a les línies de la F_0 (Q i q, per exemple). A partir d'aquí es tracta de dissenyar una equació de regressió per predir els fenotipus dels individus en funció de la informació que es poden donar els marcadors, és a dir, l'origen patern o matern i possibles recombinacions del segment que estem mirant.

Els coeficients de regressió que es fan servir són l'efecte additiu i l'efecte de dominància (a i d, respectivament) del possible QTL. Aleshores, el model de regressió seria:

$$y = \mu + a \cdot p(QQ | M) + d \cdot p(Qq | M) - a \cdot p(qq | M) + e$$

on el fenotipus y d'un individu s'explica per la suma de la mitjana de la població $[\mu]$, el producte de la probabilitat que l'individu tingui el genotipus QQ pel QTL condicionada a la informació dels marcadors flanquejants $[p(QQ | M)]$ per l'efecte additiu $[a]$, el producte de la probabilitat que l'individu tingui el genotipus Qq condicionada a la informació dels marcadors $[p(Qq | M)]$ per l'efecte de dominància $[d]$ i, finalment, la probabilitat que l'individu sigui qq condicionada als marcadors $[p(qq | M)]$ per $[-a]$, que n'és l'efecte additiu associat.

Per poder calcular totes aquestes probabilitats de genotipus condicionades als marcadors cal assignar una posició arbitrària al QTL, i així, a partir de la distància del QTL amb els marcadors podem incloure al model les freqüències de recombinació. Mitjançant un test F es compara, per a cada posició, el model amb QTL amb el model sense QTL (en el qual $a = 0$ i $d = 0$). Seran les F més altes les que indicaran l'existència d'un QTL (Figura 1.11).

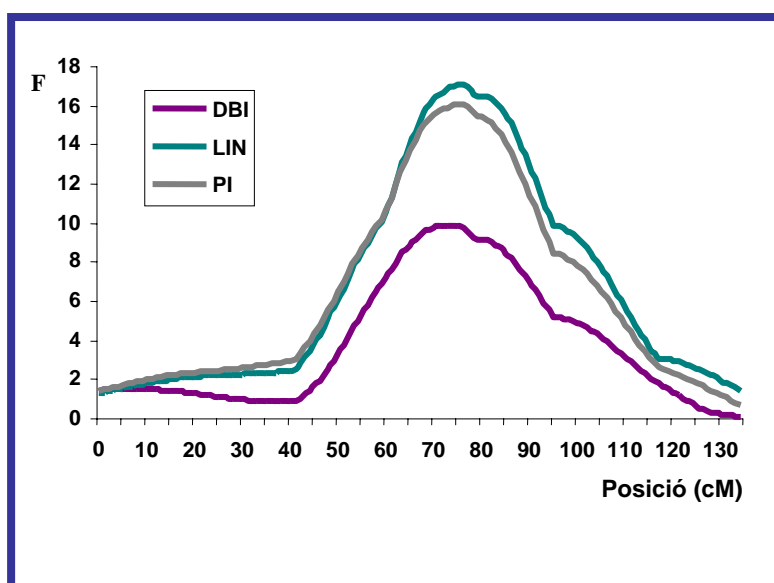


Figura 1.11. Posició dels QTL per contingut en linoleic (LIN), índex de peroxidabilitat (PI) i índex de dobles enllaços (DBI) al cromosoma 4, segons Clop *et al.* (2003). A l'eix de les y s'hi indiquen les F calculades a cada posició. Els màxims indiquen les localitzacions més probables de cada QTL.

1.4.4.2.- Models bayesians

El teorema de Bayes descriu la probabilitat condicionada d'un esdeveniment:

$$p(A|B) = [p(B|A) \cdot p(A)] / p(B)$$

Per poder aplicar a l'anàlisi estadística les bases d'aquest teorema, cal modelitzar les nostres dades experimentals, és a dir, cal fer una distribució de probabilitats (en funció d'un o d'uns paràmetres) que ens descriu les nostres observacions. Així, el que volem obtenir al final és una fórmula general com:

$$p(\theta|y) = [p(y|\theta) \cdot p(\theta)] / p(y)$$

en la qual y representa les dades experimentals i θ els paràmetres. Així doncs, el que volem és estimar la probabilitat $p(\theta|y)$, que és la probabilitat que θ tingui un determinat valor donats uns determinats valors de y . Aquesta probabilitat, anomenada distribució *a posteriori* de θ inclou tota la informació necessària per poder fer inferències sobre θ .

Els altres membres del model defineixen la distribució de probabilitat *a priori* dels paràmetres $[p(\theta)]$ que ens permet d'introduir al model informació

prèvia sobre els paràmetres, i la distribució de probabilitat de les dades assumint una determinada distribució de probabilitats a priori de θ [$p(y | \theta)$]. El producte d'aquestes dues probabilitats és el que ens permet obtenir $p(\theta | y)$.

La probabilitat marginal de les dades [$p(y)$] és una constant, i s'elimina del model per a l'anàlisi. No obstant això, com que indica la probabilitat de les dades sota les assumpcions del model que ha servit per calcular-la, és l'eina que es fa servir per comparar diferents models. Es calcula com:

$$p(y) = \sum p(y | \theta) \cdot p(\theta)$$

o en el cas de variables contínues, com una integral dels mateixos membres.

L'anomenat factor de Bayes (BF) és el quocient de les probabilitats marginals de dos models, i dóna una indicació de quantes vegades és més probable un model que l'altre.

En el cas de la cerca de QTL, s'ha proposat una aproximació en la qual s'inclou un efecte sobre les dades associat a certs segments del genoma, amb una matriu d'incidència (que seria una matriu de parentiu) calculada com la probabilitat que dos individus comparteixin la regió entre marcadors. El principal problema d'aquests mètodes és la dificultat en l'estima de la posició del QTL.

L'estadística bayesiana té cada vegada més aplicacions en el món de la genètica, i ja s'ha aplicat a la genètica de poblacions, en la detecció dels efectes de la selecció, l'anàlisi de seqüències i el descobriment d'SNP entre d'altres (Beaumont i Rannala 2004)

1.4.5.- Detecció de QTL

La detecció de QTL mitjançant estudis de lligament amb marcadors es va fer servir per primer cop el 1923 en l'espècie *Phaseolus vulgaris* i amb la pigmentació com a marcador fenotípic (Sax 1923). No obstant això, no ha estat fins a la dècada dels 90 que el desenvolupament de tècniques moleculars ha permès de descriure una gran quantitat de marcadors genètics, i ha estat des d'aleshores que els estudis de QTL han adquirit una gran importància en el món de la producció animal.

Tot i el volum de feina que implica el disseny experimental, des de principis de la dècada dels 90 s'han publicat més d'una trentena d'estudis que caracteritzen regions cromosòmiques porcines relacionades amb el creixement o el dipòsit de greix, entre d'altres caràcters amb transcendència econòmica. Al mateix temps, i com ja hem comentat, durant aquesta dècada també s'han produït avenços molt significatius tant des del punt de vista d'implementació de tècniques estadístiques com d'optimització de protocols de genotipatge de mostres.

L'estudi d'Andersson *et al.* (1994) és el primer experiment de QTL dut a terme en una població porcina i és un referent inevitable en tots els treballs posteriors. Es tracta d'un encreuament experimental del tipus F_2 entre senglar i Large White, amb un mapa de lligament que cobreix aproximadament el 75% del genoma del porc. Els trets fenotípics mesurats van ser pes al naixement, creixement, dipòsit de greix a l'abdomen, gruix del greix dorsal i llargada de l'intestí prim. Els resultats descriuen un QTL al cromosoma 4 amb grans efectes sobre el creixement, la mida de l'intestí i el dipòsit de greix. Tot i que aquest QTL s'ha confirmat en altres poblacions (en les quals té sobretot un efecte sobre el dipòsit de greix), encara no s'ha pogut identificar el gen o gens responsables.

Després d'aquest estudi se n'han fet molts d'altres, i actualment ja s'han publicat estudis de dinou encreuaments experimentals (Taula 1.4). Els caràcters més estudiats han estat els de creixement, de dipòsit de greix i els de conformació muscular, tot i que els caràcters de qualitat de la carn van prenent cada vegada més importància i s'han anat introduint progressivament a gairebé tots els encreuaments. A més a més, a banda dels caràcters relacionats amb la resposta immunitària que s'han estudiat en alguns casos, els trets reproductius són cada vegada més importants. Actualment, el grup de la UAB en col·laboració amb l'IRTA de Lleida i l'INIA de Madrid ha generat un encreuament F_2 Ibèric x Meishan en el qual s'analitzen exclusivament caràcters reproductius.

El material animal de partida dels encreuaments és molt divers. En general, es prefereixen encreuaments d'una raça comercial (Duroc, Landrace,

Taula 1.4. Encreuaments experimentals que s'han fet a l'espècie porcina.

País	Institució	Població	Caràcters	Referències
Bèlgica	Universitat de Liège	Large White x Piétrain	G, M, C	Nezer <i>et al.</i> 1999, Nezer <i>et al.</i> 2002
França	INRA	Meishan x Large White	G, M, C, A, Re	Bidanel <i>et al.</i> 2001, Desautès <i>et al.</i> 2002, Milan <i>et al.</i> 2002, Quintanilla <i>et al.</i> 2002, Quintanilla <i>et al.</i> 2003
Alemanya	Universitat de Hohenheim	Piétrain x (Meishan o Senglar)	G, M, C, Q, Re	Beeckmann <i>et al.</i> 2003a, Beeckmann <i>et al.</i> 2003b, Beeckmann <i>et al.</i> 2003c, Dragos-Wendrich <i>et al.</i> 2003a, Dragos-Wendrich <i>et al.</i> 2003b, Dragos-Wendrich <i>et al.</i> 2003c, Dragos-Wendrich <i>et al.</i> 2003d, Geldermann <i>et al.</i> 1996, Geldermann <i>et al.</i> 2003, Lee <i>et al.</i> 2003, Yue <i>et al.</i> 2000
Japó	Institut Nacional d'Indústria Animal	Porc miniatura de Gottingen x Meishan	G, M, C, R	Wada <i>et al.</i> 2000, Yasue <i>et al.</i> 1999
Països Baixos	Universitat de Wageningen	Meishan x Large White	G, M, C, Q, R	De Koning <i>et al.</i> 1999, de Koning <i>et al.</i> 2000, de Koning <i>et al.</i> 2001, Harlizius <i>et al.</i> 2000, Hirooka <i>et al.</i> 2001, Rattink <i>et al.</i> 2000
Noruega	Universitat d'Agricultura de Noruega	Duroc x Landrace x Landrace-Yorkshire	G, Q, Qg	Grindflek <i>et al.</i> 2001, Szyda <i>et al.</i> 2003
Escòcia	Insitut Roslin	Meishan x Large White	G, C, R	Walling <i>et al.</i> 2000, Walling <i>et al.</i> 1998
Espanya	IRTA-INIA-UAB	Ibèric x Landrace	G, M, C, Q, Qg	Clop <i>et al.</i> 2003, Óvilo <i>et al.</i> 2000, Óvilo <i>et al.</i> 2002a, Óvilo <i>et al.</i> 2002b, Pérez-Enciso <i>et al.</i> 2000, Varona <i>et al.</i> 2002
Suècia	Universitat d'Uppsala	Senglar x Large White	G, M, C, Q, O, I, Re	Andersson <i>et al.</i> 1994, Andersson-Eklund <i>et al.</i> 1998, Andersson-Eklund <i>et al.</i> 2000, Edfors-Lilja <i>et al.</i> 1998, Knott <i>et al.</i> 1998 Edfors-Lilja <i>et al.</i> 2000, Jeon <i>et al.</i> 1999
EUA	Universitat de l'estat d'Iowa	Races xineses x races americanes	G, M, C, Q	Rothschild <i>et al.</i> 1995, Wang <i>et al.</i> 1998
EUA	Universitat de l'estat d'Iowa	Berkshire x Yorkshire	G, M, C, Q	Malek <i>et al.</i> 2001b, Malek <i>et al.</i> 2001a
EUA	Universitat de Minnesota	Meishan x Yorkshire	G, M, C, Q, R	Paszek <i>et al.</i> 1999, Paszek <i>et al.</i> 2001, Wilkie <i>et al.</i> 1999
EUA	USDA	Meishan x Línia sintètica	G, M, C, R	Campbell <i>et al.</i> 2003, Rohrer 2000, Rohrer i Keele 1998a, Rohrer i Keele 1998b, Rohrer <i>et al.</i> 1999, Rohrer <i>et al.</i> 2001
EUA	Universitat de Nebraska	Línia d'alta ovulació x Línia control	R	Cassady <i>et al.</i> 2001, Rathje <i>et al.</i> 1997
EUA	Universitat de Wisconsin	Creixement ràpid x creixement lent	C	Casas-Carrillo <i>et al.</i> 1997
Corea	Universitat de Hallym	Població de referència	Qg	Lee <i>et al.</i> 2003
França	INRA	Línia europea-xinesa Tiameslan	G, M, Q, R	Sanchez <i>et al.</i> 2003
Japó	Centre Nacional de Crià	Duroc x Meishan	G, M, C, Q, R	Sato <i>et al.</i> 2003
Alemanya	Universitat de Bonn	Porc miniatura de Berlín x Duroc	G, M	Wimmers <i>et al.</i> 2002a

Adaptada i ampliada a partir de Bidanel i Rothschild (2002).

G: greix, M: conformació muscular, C: creixement, Q: qualitat de la carn, Qg: qualitat del greix, R: reproducció, I: resposta immunitària, A: androstenona, Co: comportament, Re: resposta a l'estrès i O: paràmetres d'ossificació.

Large White) amb races o poblacions amb un origen molt distant (Senglar, Ibèric, Meishan o Porcs miniatura). Així, no és d'estranyar que els resultats depenguin molt de cada experiment, perquè estem detectant amb preferència els *loci* que tenen diferents al·lels fixats a les poblacions parentals. El fet que les posicions estimades dels QTL també depenguin de cada experiment dificulta molt la comparació de resultats i en la major part dels casos no es pot assegurar que resultats coincidents signifiquin la segregació dels mateixos QTL. Vegem els resultats més destacats en l'identificació de QTL relacionats amb caràcters productius cromosoma per cromosoma.

1.4.5.1.- Cromosoma 1

Els efectes més importants detectats en el cromosoma 1 estan localitzats a la part distal del braç q. Aquesta regió té efectes sobre creixement, dipòsit de greix i conformació de la canal en com a mínim tres encreuaments diferents (Bidanel *et al.* 2001, Geldermann *et al.* 2003, Milan *et al.* 2002, Rohrer 2000) i efectes sobre algun d'aquests tres grups de caràcters en quatre encreuaments més (De Koning *et al.* 1999, Paszek *et al.* 1999, Sato *et al.* 2003, Wada *et al.* 2000). En aquesta regió, a més, també s'hi ha trobat efectes sobre la composició en àcids grassos del greix (Lee *et al.* 2003) i sobre el nombre de mugrons (Beeckmann *et al.* 2003b). Aquesta gran varietat d'efectes fa pensar en la possibilitat que hi hagi dos (o més) QTL en aquesta regió del cromosoma 1, i per això en alguns casos s'han fet servir models estadístics de dos QTL amb resultats significatius (Quintanilla *et al.* 2002).

A part, s'han descrit efectes més dispersos al llarg de tot el cromosoma, tant per dipòsit de greix (Malek *et al.* 2001a, Nezer *et al.* 1999), qualitat de la carn (Malek *et al.* 2001b), immunitat cel·lular (Edfors-Lilja *et al.* 1998) i nombre de mugrons (Wada *et al.* 2000).

1.4.5.2.- Cromosoma 2

En aquest cromosoma la regió amb més efectes correspon al gen que codifica l'*insulin-like growth factor 2 (IGF2)*, situat a 2p17. En almenys quatre

encreuaments diferents s'han descrit QTLs en aquesta regió que afecten la conformació muscular de la canal (Jeon *et al.* 1999, Lee *et al.* 2003, Milan *et al.* 2002, Nezer *et al.* 1999). Recentment s'ha descrit la mutació responsable d'aquests efectes, a l'intró 3 del gen *IGF2*, que presenta impressió genètica materna, és a dir, que només s'expressa l'al·lel hereditat del pare (van Laere *et al.* 2003).

Tot i que en aquesta mateixa regió s'hi han descrit efectes sobre el greix dorsal en un d'aquests encreuaments (Milan *et al.* 2002) en dos altres casos aquests efectes s'han localitzat en una posició més distal (Geldermann *et al.* 2003, Rattink *et al.* 2000), amb la qual cosa no es pot concloure que el locus responsable d'aquests efectes sigui el gen *IGF2*.

1.4.5.3.- Cromosoma 3

Tot i que en aquest cromosoma s'han descrit efectes per creixement (Casas-Carrillo *et al.* 1997, Quintanilla *et al.* 2002), greix dorsal (Wada *et al.* 2000) i conformació (Andersson-Eklund *et al.* 1998) en posicions diferents, alguns efectes sobre la reproducció es concentren a aproximadament la mateixa regió d'aquest cromosoma (a uns 45 cM) en com a mínim dos encreuaments diferents (Rohrer *et al.* 2001, Sato *et al.* 2003).

1.4.5.4.- Cromosoma 4

Com ja hem comentat, al cromosoma 4 s'hi va descriure per primera vegada un QTL relacionat amb caràcters productius (Andersson *et al.* 1994), que després s'ha confirmat en la major part d'encreuaments posteriors. Aquest QTL té efectes sobre dipòsit de greix i creixement (Bidanel *et al.* 2001, de Koning *et al.* 2001, Geldermann *et al.* 2003, Varona *et al.* 2002, Walling *et al.* 2000, Wimmers *et al.* 2002a). Marklund *et al.* (1999) van reanalitzar els mateixos caràcters que l'estudi original en un retroencreuament de la F₂ amb Large White i Landrace. Els seus resultats suggereixen la presència d'un o més QTL en aquest cromosoma, en una posició d'entre 40 cM a 70 cM, que afecten l'engreixament i el desenvolupament. Confirmen, a més a més, que els descendents que reben el segment cromosòmic del senglar són més grassos,

creixen menys i tenen la canal més curta. Un estudi transversal de set encreuaments diferents ha confirmat aquests resultats sobre els caràcters de dipòsit de greix i ha trobat evidències dels efectes sobre creixement (Walling *et al.* 2000).

En alguns altres encreuaments, els efectes d'aquest QTL es presenten també al contingut de greix intramuscular (Rattink *et al.* 2000) o a la composició en àcids grassos del greix (Clop *et al.* 2003), que hem pogut observar a la Figura 11.

1.4.5.5.- Cromosoma 5

En aquest cromosoma s'han detectat efectes sobre caràcters diversos i en posicions variades, amb la qual cosa no es pot inferir la coincidència de QTL en els diferents encreuaments. Els efectes més importants són sobre greix dorsal i conformació muscular en l'encreuament de l'INRA Meishan x Large White (Bidanel *et al.* 2001, Milan *et al.* 2002) que estan localitzats en posicions diferents. Així mateix, en la població Senglar x Large White descrita per Andersson *et al.* (1994) s'hi han descrit efectes sobre l'osteocondrosi (Andersson-Eklund *et al.* 2000) i sobre la immunitat humoral (Edfors-Lilja *et al.* 1998), en dues posicions properes. Finalment, Cassady *et al.* (2001) descriuen una regió d'aquest cromosoma associada a nombre de nascuts morts en un encreuament d'una línia seleccionada per caràcters reproductius amb una línia control.

1.4.5.6.- Cromosoma 6

En aquest cromosoma es descriuen, en una regió d'uns 60 cM, efectes sobre greix dorsal (Bidanel *et al.* 2001, Geldermann *et al.* 2003) i sobre contingut de greix intramuscular (Grindflek *et al.* 2001, Óvilo *et al.* 2000). En l'encreuament Ibèric x Landrace de l'IRTA-INIA-UAB, també s'hi han detectat efectes sobre la composició en àcids grassos (Clop *et al.* 2003). Aquesta regió, doncs, té un dels QTLs més importants que s'han descrit sobre caràcters de qualitat de la carn. Tot i aquestes coincidències, de Koning *et al.* (2000) troben

efectes en aquest cromosoma sobre el contingut de greix intramuscular, però hi descriuen dos QTL, a 23 cM i a 117cM.

A més a més, al braç q d'aquest cromosoma també hi ha el gen del receptor de la rianodina (*Ryr1*), que té grans efectes sobre la qualitat de la carn i que és responsable de la síndrome de l'estrès porcí.

1.4.5.7.- Cromosoma 7

Al cromosoma 7 hi trobem un dels QTL més importants que s'han descrit fins ara, amb efectes sobre dipòsit de greix, creixement i/o conformació muscular en almenys 9 encreuaments diferents (Bidanel *et al.* 2001, de Koning *et al.* 2001, Geldermann *et al.* 2003, Malek *et al.* 2001a, Nezer *et al.* 2002, Rohrer i Keele 1998a, Rohrer i Keele 1998b, Rothschild *et al.* 1995, Sato *et al.* 2003, Wada *et al.* 2000). Aquest QTL està situat a la regió del gen del complex major d'histocompatibilitat (*MHC*) i del gen del factor de necrosi tumoral α (*TNF α*). Com sempre que una regió està associada a tants efectes, s'han proposat models amb dos QTL (Quintanilla *et al.* 2002) i fins i tot amb diferents tipus d'impressió genètica (de Koning *et al.* 2000, Milan *et al.* 2002).

En aquesta mateixa regió del cromosoma també s'hi han descrit efectes sobre caràcters de qualitat de la carn (Óvilo *et al.* 2002a, Rothschild *et al.* 1995), sobre el nombre de mugrons i edat a la pubertat (Cassady *et al.* 2001) i sobre la immunitat cel·lular (Edfors-Lilja *et al.* 1998). Es tracta, de totes maneres, d'efectes dispersos i amb un nivell de significació més baix.

1.4.5.8.- Cromosoma 8

Almenys en tres encreuaments s'ha detectat un QTL que afecta el creixement o la conformació en aquest cromosoma, en una regió que va de 5 a 29 cM (Andersson-Eklund *et al.* 1998, de Koning *et al.* 2001, Quintanilla *et al.* 2002). És possible que no sigui un QTL d'herència purament mendeliana, ja que a Quintanilla *et al.* (2002) s'arriba al nivell de significació més alt amb un model que inclou la interacció sexe x QTL, i a de Koning *et al.* (2001) l'aconsegueixen detectar amb un model d'impressió genètica materna.

Altres efectes que semblen importants en aquest cromosoma són sobre caràcters de la reproducció. Així, dos encreuaments diferents han descrit QTL a aproximadament 100 cM que afecten la taxa d'ovulació (Rathje *et al.* 1997) i el recompte de cossos lútics (Wilkie *et al.* 1999). Rohrer *et al.* (1999) i Rohrer *et al.* (2001) descriuen un altre QTL per taxa d'ovulació i per la concentració plasmàtica de l'hormona estimulant del folicle (FSH), però en aquest cas a la regió proximal del cromosoma. A més a més, en una posició intermèdia entre els dos QTL sobre taxa d'ovulació hi ha descrits efectes sobre el número de mugrons (Cassady *et al.* 2001, King *et al.* 2003).

També s'han publicat efectes puntuals sobre la composició en àcids grassos del greix (Clop *et al.* 2003) i sobre la resposta a l'estrès (Desautels *et al.* 2002, Edfors-Lilja *et al.* 1998).

1.4.5.9.- Cromosoma 10

No hi ha grans efectes en aquest cromosoma, no obstant això s'han descrit QTL per creixement (Knott *et al.* 1998, Wada *et al.* 2000) en posicions no coincidents. Els resultats més consistents són els que descriuen un QTL amb efecte sobre el número de mugrons en tres encreuaments i localitzat a l'interval d'entre 80 cM i 140 cM (Dragos-Wendrich *et al.* 2003a, Hirooka *et al.* 2001, Rohrer 2000).

1.4.5.10.- Cromosoma 13

Andersson *et al.* (1994) i Bidanel *et al.* (2001) coincideixen a descriure un QTL per creixement en una posició similar d'aquest cromosoma. La resta d'efectes descrits són dispersos i sobre caràcters diferents: greix del gruix dorsal (Nezer *et al.* 1999), color del múscul (de Koning *et al.* 2001), taxa d'ovulació (Rathje *et al.* 1997) i immunitat cel·lular (Edfors-Lilja *et al.* 1998).

1.4.5.11.- Cromosoma X

A cinc encreuaments diferents s'ha detectat un QTL sobre gruix del greix dorsal i/o conformació a l'interval de 60 cM a 80 cM (Geldermann *et al.* 2003,

Harlizius *et al.* 2000, Milan *et al.* 2002, Rohrer i Keele 1998a, Rohrer i Keele 1998b, Sato *et al.* 2003). En aquesta mateixa regió alguns d'aquests treballs hi han trobat altres efectes: sobre la quantitat del greix intramuscular (Harlizius *et al.* 2000), sobre el pes dels testicles (Sato *et al.* 2003) i creixement (Geldermann *et al.* 2003).

A la resta de cromosomes (9, 11, 12, 14, 15, 16, 17 i 18) no s'han descrit QTL en diferents encreuaments. Són efectes dispersos i en la major part dels casos de baixa significació. Per una revisió més exhaustiva de QTL en porcí es pot consultar Bidanel i Rothschild (2002) i Geldermann *et al.* (2003).

1.5.- Identificació de les mutacions causals dels QTL

Tal com hem vist, els estudis de QTL ens informen, de fet, sobre regions del genoma relacionades amb algun caràcter fenotípic: la posició del QTL és només una estima i els intervals de confiança poden ser de desenes de cM.

La inclusió de tota aquesta informació molecular als programes de millora, mitjançant la selecció assistida amb marcadors (MAS) passa per afinar les posicions del QTL (per aconseguir marcadors més propers) i, idealment, trobar el gen i la mutació responsables de la variància observada. Per poder assolir aquests objectius hi ha dues aproximacions possibles:

1.5.1.- Clonació posicional

La clonació posicional consisteix en identificar i seqüenciar una col·lecció de fragments cromosòmics clonats en un vector apropiat (per exemple BAC) i corresponents a la regió que es vol analitzar. Es basa, doncs, en l'anàlisi de llibreries de DNA genòmic, en les quals cal identificar un grup de clons que continguin els marcadors adjacents al QTL. Un cop identificats aquests clons, cal seqüenciar-los per identificar la presència de gens i mutacions que puguin ser els responsables dels efectes del QTL.

1.5.2.- Gens candidats

1.5.2.1.- Estratègies

En aquesta aproximació ens basem en el coneixement previ de la fisiologia del caràcter per seleccionar els gens que puguin afectar-ne l'expressió. En el cas dels QTL, aquesta informació es combina amb la de l'interval de confiança, i se seleccionen els gens seguint tots dos criteris. Un cop hem seleccionat una sèrie de gens candidats per posició, cal seqüenciar-los per detectar diversos polimorfismes existents i identificar la mutació responsable del QTL. Com veurem en algun exemple, aquesta mutació no sempre és a la seqüència codificant.

En el cas del porcí, per poder seleccionar gens candidats per posició cal fer servir els mapes comparatius, per exemple el mapa comparatiu entre l'home i el porc de l'INRA (www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/compare.htm) (Figura 1.12) que ens podrà donar informació sobre gens que encara no s'han descrit a l'espècie porcina.

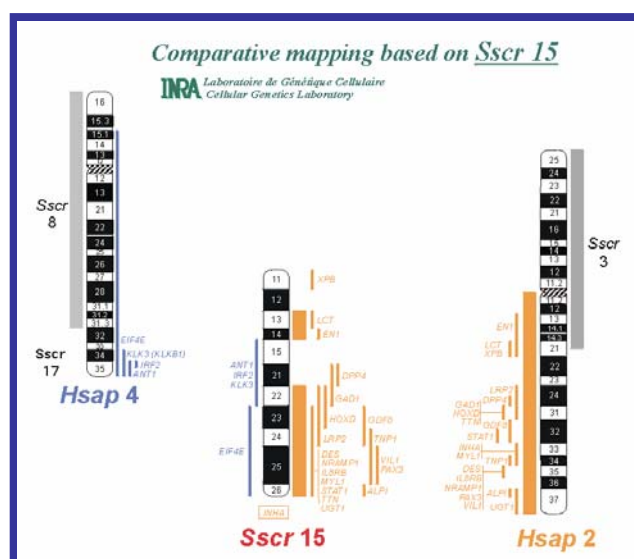


Figura 1.12. Mapa comparatiu porc-home del cromosoma 15 del porc, que conté regions que es corresponen al cromosoma 4 i al cromosoma 2 humans.

Alguns gens de gran importància per a la producció porcina ja s'han identificat i s'han introduït en esquemes de millora. Així per exemple, certes mutacions del gen de *Ryr1* (Fujii *et al.* 1991) o del gen de la proteïna quinasa no catalítica activada per AMP γ -3, *PRKAG3* (Milan *et al.* 2000) es genotipen en les poblacions dels programes de selecció, en el que, estrictament, seria una selecció assistida per gens (GAS).

No obstant això, potser l'exemple més clar de l'aplicació de la tecnologia de QTL en el descobriment de gens importants en la producció porcina és el cas del gen *IGF2*. Tal com ja hem comentat anteriorment, un dels primers QTLs descrits va ser el del cromosoma 2, que afecta la conformació muscular i és d'impressió genètica materna (Jeon *et al.* 1999, Nezer *et al.* 1999). Recentment s'ha aconseguit identificar el polimorfisme responsable, una mutació de l'intró 3 del gen *IGF2* (van Laere *et al.* 2003).

1.5.2.2.- El metabolisme dels àcids grassos

Tant la tendresa de la carn com el *flavour* estan molt influïts per la composició del greix intramuscular (Rosenvold i Anderssen 2003), i és per això que els àcids grassos tenen un paper fonamental en la qualitat de la carn. Clop *et al.* (2003) ja van fer una primera aproximació per detectar regions del genoma porcí amb efectes sobre la composició en àcids grassos del greix, amb resultats força significatius als cromosomes 8 i 12. L'existència d'aquests QTL, amb grans efectes tant sobre composició com dipòsit de greix obre una via d'estudi molt interessant, paral·lela a la dels QTL: la identificació de mutacions relacionades amb el metabolisme dels àcids grassos.

Els gens que codifiquen enzims tant de la síntesi com de la β oxidació dels àcids grassos, així com enzims que participen en vies de transport o de subministrament d'energia o de poder reductor són, doncs, molt bons candidats funcionals per explicar els caràcters relacionats amb l'engreixament. La informació sobre posicions de QTL pot adaptar-se perfectament al disseny per restringir els criteris de selecció dels gens que volem estudiar.

En el nostre cas hem escollit quatre gens d'enzims relacionats amb el metabolisme dels lípids: la malat deshidrogenasa citosòlica (MDH1), l'enzim

màlic citosòlic (ME1), la 2,4-dienoil-CoA-reductasa (DECR) i l'acil-CoA sintetasa de cadena llarga (ACSL1).

L'enzim MDH1 catalitza la reducció de l'oxaloacetat a malat i l'ME1 la descarboxilació oxidativa del malat a piruvat i NADPH. Aquestes dues reaccions estan acoblades, i formen part d'un sistema enzimàtic que permet la transferència d'acetil-coenzim A del mitocondri al citosol, que així es pot utilitzar en la biosíntesi dels àcids grassos. L'enzim ME1, a més a més, subministra part del poder reductor (en forma de NADPH) que es requereix, i s'ha demostrat que pot tenir efectes importants en el dipòsit de greix intramuscular (Mouroi i Kouba 1999).

El gen *MDH1* s'ha localitzat al cromosoma 3 porcí (Wintero *et al.* 1998), mentre que el gen *ME1* és a la regió proximal del cromosoma 1 (Nunes *et al.* 1996), que conté un QTL que afecta el dipòsit de greix (Milan *et al.* 2002, Paszek *et al.* 1999, Rohrer i Keele 1998a).

El gen *DECR* està posicionat al cromosoma 4 (Clop *et al.* 2002), en una posició coincident amb el QTL que afecta el percentatge d'àcid linoleic del greix (Pérez-Enciso *et al.* 2000). A més a més, l'enzim DECR és fonamental per la degradació d'àcids grassos que tinguin dobles enllaços, perquè catalitza la reducció de les cadenes poliinsaturades.

Finalment, el gen *ACSL1* no s'ha seqüenciat ni mapejat a l'espècie porcina. L'enzim participa en l'activació dels àcids grassos de cadena llarga, a través de la incorporació d'un coenzim A. Aquests àcids grassos de cadena llarga activats són substractes en molts processos metabòlics, entre els quals cal destacar la β oxidació i la síntesi de fosfolípids.

Objectiu general

Aquest compendi presenta una sèrie de treballs finançats pel projecte FEDER 2FD97-0916-C02-02. L'objectiu principal d'aquest projecte és confirmar l'existència de QTL prèviament descrits en encreuaments de races divergents en una població comercial Landrace altament seleccionada.

Per investigar la segregació de QTL s'han genotipat 10 regions cromosòmiques amb efectes sobre caràcters de dipòsit de greix i de creixement. A més, a part dels registres fenotípics de creixement i de dipòsit de greix també s'han analitzat caràcters de qualitat de la carn.

Objectius específics

1.- Identificació de QTL relacionats amb el creixement, l'engreixament i la qualitat de la carn en una població comercial altament seleccionada de raça Landrace.

2.- Caracterització estructural dels gens candidats *MDH1*, *ME1*, *DECR* i *ACLS1*, relacionats amb el metabolisme lipídic. Identificació de polimorfismes i realització d'estudis d'associació amb caràcters relacionats amb la qualitat de la canal i de la carn.