

Títol: Assignment of the *fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2 (FACL2)* gene to the porcine chromosome 15.

Autors: Oriol Vidal i Marcel Amills.

.Estatus: Publicat a *Animal Genetics*.

1 **Assignment of the fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2 (FACL2)**
2 **gene to the porcine chromosome 15.**

3

4 O. Vidal and M. Amills

5

6 Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària,

7 Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain.

8

9 *Source/description:*

10 Fatty acyl-CoAs are bioactive fatty acid metabolites which play essential roles in
11 many cellular biochemical processes such as lipid metabolism, enzyme
12 activation and protein transport. Moreover, fatty acyl-CoAs are used as
13 substrates in the fatty acid β -oxidation pathway and in the synthesis of
14 phospholipids¹. Fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2 (FACL2) catalyzes
15 the formation of these fatty acyl-CoAs by a two-step process that starts with the
16 incorporation of an AMP at the carboxyl group of the fatty acid. This AMP is
17 produced by the hydrolysis of an ATP and it is subsequently exchanged by a
18 CoA group¹. In rat, the FACL2 enzyme is mainly expressed in liver, heart and
19 epididymal tissues².

20

21 *Primer sequences:*

22 FACL12: 5'-ATT TTT GGA CAA GCA AAT ACC A-3'

23 FACL13: 5'-CCC TCA GGA AGG TCA GCA C-3'

24 mFACL1: 5'-TGA TTC CTC AAA ATC CC TGC-3'

25 mFACL2: 5'-GGT CCA AGA GGA CAC CTG AC-3'

26

27 *Nucleotide sequence:* Pig genomic DNA was isolated from 0.4 ml blood
28 samples. The samples were centrifuged at 13,000 g and washed with 500 µl TE
29 (Tris-HCl 10 mM pH = 8, EDTA 1 mM). This step was repeated 4 or 5 times until
30 a white cell pellet was obtained. Peripheral blood mononuclear cells were
31 incubated with 40 µg proteinase K and 400 µl buffer K (KCl 50 mM, Tris-HCl 10
32 mM, 0.5% Tween 20) for 5 hours at 56 °C. Genomic DNA was purified by
33 phenol-chlorophorm extraction and ethanol precipitation with 25 µl NaCl 2 M and
34 800 µl ice-cold absolute ethanol. After a 10 min centrifugation step, genomic
35 DNA was washed with ethanol 70% and resuspended in 100 µl TE.

36 One set of primers corresponding to exons 12 (*FACL12*) and 13
37 (*FACL13*) were designed by aligning the nucleotide *FACL2* sequences of
38 mouse (GenBank no. U15977), rat (GenBank no. D90109) and human
39 (GenBank no. NM_001995). Amplification reactions with a final volume of 50 µl
40 were carried out with 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0.2 µM of each primer, 25
41 ng of genomic DNA and 1.25 U Taq DNA polymerase (Ecogen S.R.L,
42 Barcelona 08041, Spain). Thirty-five cycles of 94 °C for 1 min, 61 °C for 1 min
43 and 72 °C for 1 min were performed in order to amplify a fragment of
44 approximately 1.2 kb.

45 The amplified product was sequenced by using the BigDye Terminator
46 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Two
47 sequences including 423 bp of exon 12 and intron 12 (GenBank no. AY507988)
48 and 787 bp of intron 12 and exon 13 (GenBank no. AY489189) were obtained.
49 We were unable to completely sequence the 1.2 kb fragment due to the
50 presence of a run of about 20 dT located at position 310 of intron 12.

51

52 *Radiation hybrid mapping:* Two specific primers (mFACL1 and mFACL2)
53 amplifying 111 bp of intron 12 were designed. Radiation hybrid mapping was
54 performed with the INRA–University of Minnesota porcine radiation hybrid panel
55 (ImpRH)³. Amplification reactions contained 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 0.2
56 μM of each primer (mFACL1 and mFACL2), 6.25 ng of the ImpRH panel DNA,
57 0.5 U Taq DNA polymerase (Ecogen S.R.L, Barcelona 08041, Spain) in a final
58 volume of 20 μl. The thermal profile was 94 °C for 5 min and 35 cycles of 94 °C
59 for 1 min, 62 °C for 2 min and 72 °C for 1 min. Data were analyzed with the
60 ImpRH mapping tool⁴. We found that the pig *FACL2* gene is linked to the
61 *SW1989* microsatellite (45 cR, LOD score: 8.65) on porcine chromosome 15.
62 Comparative mapping between pig and human revealed that this chromosomal
63 assignment is consistent with the position of the *FACL2* gene at human
64 chromosome 4q34-q35⁵.

65

66 *Acknowledgements:* We are grateful to D. Milan for providing the irradiated
67 pig/hamster somatic cell hybrid panel. This project was granted by the Spanish
68 Science and Technology Ministry (AGL2002-04271-C03-03).

69

70 REFERENCES

- 71 1 Weimar J.D. *et al.* (2002) *J Biol Chem* **277**, 29369-76.
72 2 Suzuki H. *et al.* (1990) *J Biol Chem* **265**, 8681-5
73 3 Yerle M. *et al.* (1998) *Cytogenet Cell Genet* **82**, 182-8
74 4 Milan D. *et al.* (2000) *Bioinformatics* **16**, 558-9
75 5 Cantu E.S. *et al.* (1995) *Genomics* **28**, 600-2

Títol: Nucleotide sequence, polymorphism and mRNA expression of the pig acyl coenzyme A synthetase long-chain 1 (*ACLS1*) gene.

Autors: Oriol Vidal, Armand Sànchez, José Luis Noguera, Luis Gómez-Raya i Marcel Amills.

.Estatus: Enviat a *Genetics Selection and Evolution*..

1 Running head: **Characterization of the pig *ACLS1* gene**

2

3 **Nucleotide sequence, polymorphism and mRNA expression of the pig acyl**
4 **coenzyme A synthetase long-chain 1 (*ACLS1*) gene.**

5

6

7 Oriol Vidal*¹, Armand Sánchez¹, José Luis Noguera², Luis Gómez-Raya² and
8 Marcel Amills¹.

9

10 ¹Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de
11 Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

12

13 ² Àrea de Producció Animal, Centre UdL-IRTA, Rovira Roure 177, Lleida
14 25198, Spain.

15

16

17

18

19

20

21

22 Thanks to Nova Genètica for providing the samples and to Meritxell Arqué for
23 her technical assistance. O. Vidal was funded by a fellowship of the Generalitat
24 de Catalunya. This work was funded by the Spanish Ministry of Science and
25 Technology (CICYT AGL2002-04271-C03-03).

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

Abstract

We have sequenced 3,013 bp of the pig acyl coenzyme A long-chain synthetase 1 (*ACLS1*) gene. Sequence analysis allowed to identify three conserved elements in the predicted amino acid sequence, two of them related to the ATP/AMP signature motif and the third involved in enzyme catalysis and fatty acid substrate specificity. The pig acyl coenzyme A synthetase long-chain 1 mRNA was expressed in several pig tissues including spleen, stomach, pancreas, liver, backfat, heart, muscle, testicle, ovaries, uterus, lung and kidney. In addition, we have identified five C→T and one G→A transition polymorphisms located in exon 16 (SNPe16), exon 17 (SNPe17) and the 3' UTR (SNPa to d), which have been genotyped in 143 pigs from the Landrace, Large White, Piétrain, Iberian and Duroc breeds.

51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75

1. - Introduction

Acyl coenzyme A long-chain 1 synthetase (*ACLS1*) is a central enzyme in the intermediary metabolism due to its fundamental role in the activation of long-chain fatty acids through the incorporation of coenzyme a (CoA). These bioactive fatty acid metabolites are involved in many cellular biochemical processes, including protein transport, enzyme activation and transcriptional control [1]. In addition, fatty acyl-CoAs are used as substrates in the fatty acid β -oxidation and the phospholipid biosynthesis pathways.

In rat, the *ACLS1* enzyme is mainly expressed in liver, heart and epididymal adipose tissues [2]. Sequence comparison with other acyl-CoA synthetases and the firefly luciferase has demonstrated that these enzymes share two highly conserved sequence motifs involved in ATP/AMP binding [3]. A third less-conserved motif might be involved in both catalysis and substrate specificity [4]. The complete nucleotide sequences of the human, rat and mouse *ACLS1* genes have been described [5,2,6]. These genes are split in 20 exons and the resulting cDNAs encompass 3.1 kb, of which 2 kb correspond to the coding region. In human, the *ACLS1* gene has been mapped on chromosome 4 q34-q35 [7].

In a previous work, we mapped the pig *ACLS1* gene on chromosome 15, near the SW1989 microsatellite [8]. The main objective of the current study was the characterization of the nucleotide sequence, polymorphism and tissue mRNA expression of the *ACLS1* gene as a first step to investigate its role on lipid metabolism and fatness.

76

2. - Materials and methods

77

78 *2.1. - Sequencing of the pig acyl coenzyme A synthetase 1 (ACLS1)*79 *complementary DNA*

80 Total RNA was isolated from liver samples corresponding to twelve pigs
81 belonging to four different breeds (Landrace, Piétrain, Large White and Iberian)
82 by using the *TRIZOL reagent* (GibcoBRL, Life Technologies S.A, Prat del
83 Llobregat, Spain), as previously described [9]. Complementary DNAs were
84 synthesized with the *Thermoscript RT-PCR System* (Invitrogen, S.A, Prat del
85 Llobregat, Spain).

86 In order to characterize the sequence and the mRNA expression pattern
87 of the pig *ACLS1* gene, five different PCR reactions were optimized. The
88 targeted regions, primer combinations and thermal profiles are shown in Table I.
89 The amplification reactions contained 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0.2 µM of
90 each primer, 1 µl of template DNA (either genomic or cDNA) and 1.25 U Taq
91 DNA polymerase. Hot start and final extension steps were performed at 94°C
92 for 5 min and 72°C for 10 min, respectively. The final PCR volume was 50 µl
93 (PCR1 and2) or 30 µl (PCR3 to 5).

94 With the aim of sequencing the coding region of the pig *ACLS1* gene, we
95 designed a set of consensus primers derived from human (Genbank accession
96 number NM_001995), rat (Genbank accession number D90109) and mouse
97 (Genbank accession number BC056644) *ACLS1* cDNA sequences (Tab. II).
98 These primers allowed the amplification of a region of 2,209 bp encompassing
99 exons 9 and 20. This fragment included 964 bp corresponding to the 3' UTR
100 region (PCR1, Tab. I and Tab. II). Subsequently, we designed a second set of

101 primers (*ACLS3* and *ACLS4*) that amplified 2,052 bp of the coding region (from
102 exon 1 to 20) and 171 bp of the 3' UTR. *ACLS3* was designed by aligning exon
103 1 sequences from human, rat and mouse; whereas *ACLS4* was complementary
104 to the 3' UTR fragment that we had partially sequenced. (PCR2, Tab. I and Tab.
105 II).

106 These two fragments were sequenced forward and reverse with the
107 BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA,
108 USA). Sequencing primers were *ACLS1*, *ACLS2*, *ACLS3*, *ACLS4* and five
109 internal primers named as *ACLSe3F*, *ACLSe12F*, *ACLSe5R*, *ACLSe12R* and
110 *ACLSe13R* (Tab. II). Electrophoresis of the sequencing products was performed
111 in an ABI 3100 Avant device (Applied Biosystems), and the resulting sequences
112 were aligned with the Multalin program [10].

113

114 2.2. - Genotyping of the pig *ACLS1* gene

115 A multiplex primer extension protocol was implemented for typing the
116 polymorphism of the *ACLS1* gene in 143 pigs belonging to five different breeds
117 (Iberian, Large White, Piétrain, Duroc and Landrace). Two different fragments
118 encompassing exons 16 and 17 (PCR4) and 1 kb of the 3'UTR region (PCR5)
119 were amplified with primers *ACLS16eF* and *ACLSe17R*, and *ACLS19eF* and
120 *ACLS2*, respectively (PCR4 and PCR5, Tab. I and II) . Amplified products were
121 purified with the ExoSAP-IT kit (Amersham Biosciences Europe GmbH,
122 Cerdanyola, Spain). The genotyping was performed with the SnaPshot™
123 ddNTP Primer Extension kit (Applied Biosystems). Extension primers were
124 *ACLSsnp16*, *ACLSsnp17*, *ACLSsnpA*, *ACLSsnpB*, *ACLSsnpC* and *ACLSsnpD*

125 (Tab. I). Reaction products were analyzed in an ABI 3100 capillary
126 electrophoresis device (Applied Biosystems).

127

128 *2.3. - Tissue mRNA expression of the pig acyl coenzyme A synthetase 1*
129 *(ACLS1) gene*

130 Total RNA extraction and cDNA synthesis were performed as previously
131 described by using spleen, stomach, pancreas, liver, backfat, heart, muscle,
132 testicle, ovaries, uterus, lung and kidney samples. A 101 bp exon 4 fragment
133 was amplified with primer ACLSe4F and ACLSe4R (PCR 3, Tab. I and Tab. II)
134 and electrophoresed in a 2 % agarose gel stained with ethidium bromide.

135

136 *2.4. - Phylogenetic analysis*

137 A phylogenetic analysis including the five members of the acyl coA
138 synthetase long chain family was performed. The analyzed sequences were pig
139 *ACLS1* (Genbank accession number AY690660), human *ACLS1* (Genbank
140 accession number NM_001995), *ACLS3* (Genbank accession number
141 BC041692), *ACLS4* (Genbank accession number BC034959), *ACLS5*
142 (Genbank accession number BC007985), *ACLS6* (Genbank accession number
143 BC026161); and murine *ACLS1* (Genbank accession number BC056644),
144 *ACLS3* (Genbank accession number BC031529), *ACLS4* (Genbank accession
145 number BC016416), *ACLS5* (Genbank accession number BC031544) and
146 *ACLS6* (Genbank accession number BC022959). A neighbor joining tree was
147 constructed with the MEGA v2.1 program [11] by using the Kimura 2-parameter
148 genetic distance and bootstrap resampling (1,000 replicates).

149

3. - Results and Discussion

150

151 We have characterized the near complete sequence of the *ACLS1* gene
152 in eight individuals from the Iberian, Large White, Piétrain and Landrace breeds
153 (Genbank accession number AY690660). The pig *ACLS1* sequence included
154 2,049 bp of the coding region (from exons 1 to 20) and 964 bp of the 3'UTR.
155 Exon 1 sequence is partial since 45 bp remain to be sequenced. Thus, the pig
156 *ACLS1* cDNA sequence was 3,013 bp and encoded a protein of 683 amino
157 acids. A BlastP search of the Genbank database showed that this sequence
158 had 90%, 83% and 77% amino acid identities with the human, mouse and
159 African frog (*Xenopus laevis*) *ACLS1* orthologous sequences, respectively. The
160 homology between the five members of the *ACLS* family is weak, a feature that
161 makes difficult to obtain a reliable alignment. We limited our phylogenetic analysis
162 to a 435 bp region which is highly conserved in the five *ACLS* paralogs. The pig
163 *ACLS* sequence clustered very consistently (100 bootstrap value) with the
164 human and mouse *ACLS1* sequences, a feature that confirms that the
165 sequence we have obtained belongs to the class 1 family.

166

167 We found two different clades with a 100 bootstrap value in the neighbor
168 joining tree: one including the *ACLS1* sequences and the other one formed by
169 the *ACLS3*, *ACLS4* and *ACLS5* sequences. The *ACLS6* sequences were the
170 most divergent ones and they did not cluster with the other *ACLS* family
171 members. This pattern of clustering is consistent with the notion that these five
172 *ACLS* paralogous sequences diverged well before the radiation of human and
173 mouse, 75 MYR ago. Six and nine *ACLS* isoforms have been identified in yeast
174 [12] and *Arabidopsis thaliana* [13], but their relationships with the mammalian
175 *ACLS* family members remain to be established. In *E.coli* there is a single *ACLS*

175 protein which is functionally related with the vertebrate *ACLS5*, a feature that
176 suggests that *ACLS5* might be the ancestral isoform [14].

177 Two conserved sequence elements (²⁷⁵FTSGTTGNPKGA²⁸⁶ and
178 ⁴⁵⁷GYGQTE⁴⁶²) belonging to the ATP/AMP signature motif, that is commonly
179 found in the adenylate forming enzymes, have been identified in the pig amino
180 acid sequence. A third conserved element
181 (⁵³³DGWLHTGDIGKWLPNGTLKIIDRKK⁵⁵⁷) related with enzyme catalysis and
182 fatty acid substrate specificity was also identified in the pig sequence.

183 In addition, the *ACLS1* mRNA was ubiquitously expressed in the 12
184 analyzed pig tissues, a feature which is consistent with the key metabolic role of
185 its product. Coleman and coworkers have reported that the five *ACLS* isoforms
186 have a differential pattern of tissue expression that might explain the different
187 functions of each isoform [15].

188 The alignment of eight pig *ACLS1* cDNA sequences allowed to identify
189 five C→T and one G→A transition polymorphisms located in exon 16
190 (SNPe16), exon 17 (SNPe17) and the 3' UTR (SNPa to d, Tab. III). We
191 designed a primer extension-based protocol to perform the *ACLS1* genotyping
192 of 143 animals from the Iberian (N = 18), Landrace (N = 25), Piétrain (N = 25),
193 Large White (N = 25) and Duroc (N = 50) breeds. Our analysis showed that the
194 SNPe16, SNPa and SNPc only segregated in the Landrace population,
195 whereas SNPd segregated in both Landrace and Duroc populations. Single
196 nucleotide polymorphism SNPe17 was found in four of the five analyzed
197 breeds, whereas SNPb segregated in the Piétrain, Duroc and Large White
198 populations.

199 The six polymorphisms we have identified are silent, but this feature does
200 not necessarily imply that they do not have any functional consequence.
201 Polymorphisms located in the 3'UTR might affect mRNA stability and/or
202 translatability. as previously reported for the human β globin [16] and the mice
203 tumor necrosis factor α [17] genes. Functional studies and association analysis
204 in reference populations will be needed in order to investigate if the
205 polymorphism of the pig *ACLS1* gene has any influence on phenotypic variation
206 at growth, fatness and meat quality traits.

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224 **References**

225

226 [1] Weimar J.D., DiRusso C.C., Delio R., Black P.N., Functional role of fatty
227 acyl-coenzyme A synthetase in the transmembrane movement and
228 activation of exogenous long-chain fatty acids. Amino acid residues
229 within the ATP/AMP signature motif of Escherichia coli FadD are
230 required for enzyme activity and fatty acid transport, J.Biol.Chem. 277
231 (2002) 29369-29376.

232 [2] Suzuki H., Kawarabayasi Y., Kondo J., Abe T., Nishikawa K., Kimura S.,
233 Hashimoto T., Yamamoto T., Structure and regulation of rat long-chain
234 acyl-CoA synthetase, J.Biol.Chem. 265 (1990) 8681-8685.

235 [3] Black P.N., DiRusso C.C., Metzger A.K., Heimert T.L., Cloning,
236 sequencing, and expression of the fadD gene of Escherichia coli
237 encoding acyl coenzyme A synthetase, J.Biol.Chem. 267 (1992) 25513-
238 25520.

239 [4] Black P.N., Zhang Q., Weimar J.D., DiRusso C.C., Mutational analysis of
240 a fatty acyl-coenzyme A synthetase signature motif identifies seven
241 amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity,
242 J.Biol.Chem. 272 (1997) 4896-4903.

243 [5] Ghosh B., Barbosa E., Singh I., Molecular cloning and sequencing of
244 human palmitoyl-CoA ligase and its tissue specific expression, Mol.Cell
245 Biochem. 151 (1995) 77-81.

- 246 [6] Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H., Derge J.G., Klausner R.D.
247 et al., Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length
248 human and mouse cDNA sequences, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99
249 (2002) 16899-16903.
- 250 [7] Cantu E.S., Sprinkle T.J., Ghosh B., Singh I., The human palmitoyl-CoA
251 ligase (FACL2) gene maps to the chromosome 4q34-q35 region by
252 fluorescence in situ hybridization (FISH) and somatic cell hybrid panels,
253 *Genomics* 28 (1995) 600-602.
- 254 [8] Vidal O., Amills M., Assignment of the fatty acid Coenzyme A ligase, long
255 chain 2 (FACL2) gene to porcine chromosome 15, *Anim.Genet.* 35
256 (2004) 245.
- 257 [9] Amills M., Jiménez N., Villalba D., Tor M., Molina E., Cubiló D., Marcos
258 C., Francesch A., Sánchez A., Estany J., Identification of three single
259 nucleotide polymorphisms in the chicken insulin-like growth factor 1 and
260 2 genes and their associations with growth and feeding traits, *Poult.Sci.*
261 82 (2003) 1485-1493.
- 262 [10] Corpet F., Multiple sequence alignment with hierarchical clustering,
263 *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 10881-10890.
- 264 [11] Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M., MEGA2: molecular
265 evolutionary genetics analysis software, *Bioinformatics* 17 (2001) 1244-
266 1245.

- 267 [12] Johnson D.R., Knoll L.J., Levin D.E., Gordon J.I., Saccharomyces
268 cerevisiae contains four fatty acid activation (FAA) genes: an
269 assessment of their role in regulating protein N-myristoylation and
270 cellular lipid metabolism, J.Cell Biol. 127 (1994) 751-762.
- 271 [13] Shockey J.M., Fulda M.S., Browse J.A., Arabidopsis contains nine long-
272 chain acyl-coenzyme a synthetase genes that participate in fatty acid and
273 glycerolipid metabolism, Plant Physiol 129 (2002) 1710-1722.
- 274 [14] Caviglia J.M., Li L.O., Wang S., DiRusso C.C., Coleman R.A., Lewin
275 T.M., Rat long chain acyl-CoA synthetase 5, but not 1, 2, 3, or 4,
276 complements Escherichia coli fadD, J.Biol.Chem. 279 (2004) 11163-
277 11169.
- 278 [15] Coleman R.A., Lewin T.M., Van Horn C.G., González-Baro M.R., Do
279 long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic
280 versus degradative pathways?, J.Nutr. 132 (2002) 2123-2126.
- 281 [16] Bilenoglu O., Basak A.N., Russell J.E., A 3'UTR mutation affects beta-
282 globin expression without altering the stability of its fully processed
283 mRNA, Br.J.Haematol. 119 (2002) 1106-1114.
- 284 [17] Di Marco S., Hel Z., Lachance C., Furneaux H., Radzioch D.,
285 Polymorphism in the 3'-untranslated region of TNF α mRNA impairs
286 binding of the post-transcriptional regulatory protein HuR to TNF α
287 mRNA, Nucleic Acids Res. 29 (2001) 863-871.

Table I. Polymerase chain reaction conditions for the amplification of several target regions of the *pig acyl coenzyme A synthetase 1 (ACLS1)* gene.

Reaction	Target	Primers	Thermal profile
PCR1	Exon 9 - 3'UTR	ACLS1+ACLS2	94 °C for 1 min, 64 °C for 2 min, 72 °C for 2 min (35 cycles)
PCR2	Exon 1 - 3'UTR	ACLS3+ACLS4	94 °C for 1 min, 62 °C for 1 min, 72 °C for 1 min (35 cycles)
PCR3	Exon 4	ACLSe4F+ACLS4eR	94 °C for 30 s, 60 °C for 45 s, 72 °C for 45 s (30 cycles)
PCR4	Exon 16 - Exon 17	ACLSe16F+ACLSe17R	94 °C for 1 min, 51 °C for 2 min, 72°C for 2 min (35 cycles)
PCR5	Exon 19 - 3' UTR	ACLSe19F+ACLS2	94 °C for 1 min, 51 °C for 2 min, 72°C for 2 min (35 cycles)

Table II. Sequence, orientation and targets of the primers used for sequencing and genotyping the *pig acyl coenzyme A synthetase 1 (ACLS1)* gene.

Primer	Orientation	Target	Sequence
ACLS1	Forward	Exon 9	GTGGAACTACAGGCAACCCC
ACLS2	Reverse	3' UTR	TCCGTTCCATAAGTACCCAAG
ACLS3	Forward	Exon 1	GTATTTTCGAATGCCAGAGCTG
ACLS4	Reverse	3' UTR	GTCTGCGACGTGAGGTGAC
ACLSe4F	Forward	Exon 4	TTGAAGACATGTCGGAGTGTG
ACLSe4R	Reverse	Exon 4	CTCAGGCCTGTTCTGAGCG
ACLSe16F	Forward	Exon 16	GTGTGTGTGAAAGGGCCAAA
ACLSe17R	Reverse	Exon 17	CTCTCCGTGGACAAACACCT
ACLSe19F	Forward	Exon 19	TGAAGACATGCTGAGACTGGG
ACLSe3F	Forward	Exon 3	ATAATGGCCCATGTTTAGGATCTC
ACLSe12F	Forward	Exon 12	ACAGCCTGTGGGATAAACTG
ACLSe5R	Reverse	Exon 5	CTCAGTTCCGAGGGTGTCTG
ACLSe12R	Reverse	Exon 12	TTTGTGGAAGATCAGTTTATCCC
ACLSe13R	Reverse	Exon 13	TCACTTTTCCTCCCAGGCTT
ACLSsnp16	Forward	Exon 16	ATATATATATACGGAAGCTCTGGATAAAGA
ACLSsnp17	Forward	Exon 17	ATATATATATATATGGAAAAAGCACATCTTCAA
ACLSsnpA	Forward	3' UTR	GGGAGAAACCGCCTC
ACLSsnpB	Forward	3' UTR	ATATATATATATATAGTTCACGGTGATACACAATT
ACLSsnpC	Forward	3' UTR	ATATATATATATATATATATGGTTTTTTAACATCCCTGC
ACLSsnpD	Forward	3' UTR	TAACCTTTGCTGAACCGATC

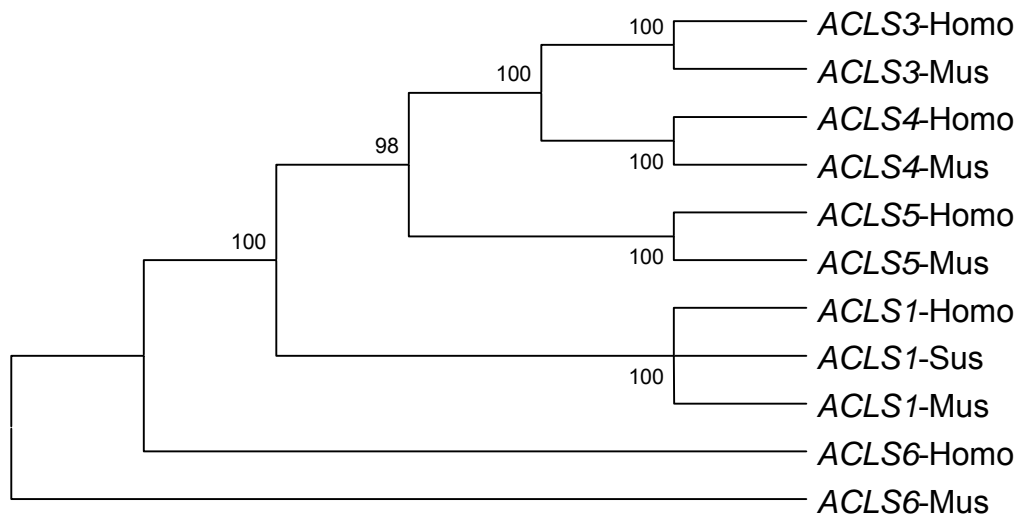
Table III. Allelic frequencies of six polymorphisms located in the coding sequence (SNPe16 and SNPe17) and the 3'UTR region (SNPa to d) of the pig *acyl coenzyme A synthetase 1 (ACLS1)* gene. Allelic frequencies were calculated in 143 pigs corresponding to the Duroc (N = 50), Piétrain (N = 25), Large White (N = 25), Landrace (N = 25) and Iberian (N = 18) breeds.

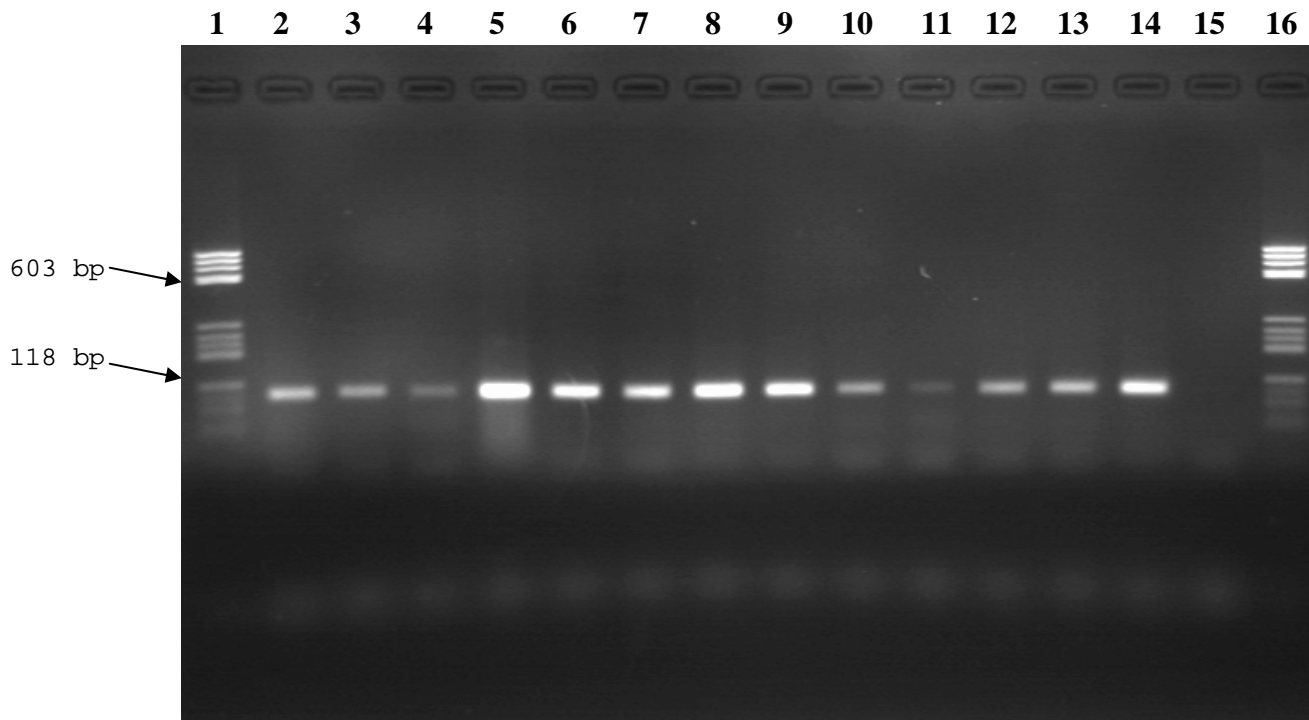
Mutation		SNPe16		SNPe17		SNPa		SNPb		SNPc		SNPd	
Position in AY690660		1,554		1,639		2,084		2,126		2,266		2,597	
Nucleotidic Change		T	C	T	C	C	T	G	A	T	C	T	C
Breed	Piétrain (N=25)	1	0	1	0	1	0	0.5	0.5	1	0	1	0
	Large White (N=25)	1	0	0.9	0.1	1	0	0.7	0.3	1	0	1	0
	Landrace (N=25)	0.9	0.1	0.9	0.1	0.8	0.2	1	0	0.8	0.2	0.8	0.2
	Iberian (N=18)	1	0	0.7	0.3	1	0	1	0	1	0	1	0
	Duroc (N=50)	1	0	0.7	0.3	1	0	0.6	0.4	1	0	0.9	0.1

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Neighbour joining phylogenetic analysis of a highly conserved 436 bp fragment corresponding to the human and murine *ACLS1* and *ACLS3* to *ACLS6* sequences, and the pig *ACLS1* sequence.

Figure 2. Expression of the *acyl coenzyme A synthetase 1 (ACLS1)* mRNA in diverse porcine tissues. Lanes 1 and 16, molecular weight marker IX (Roche Diagnostics S.L., Barcelona, Spain), 1353, 1078, 872, 603, 310, 281/271, 234, 194, 118, 72 bp; lane 2, spleen; lane 3, stomach; lane 4, pancreas; lane 5, liver; lane 6, back fat; lane 7, heart; lane 8, *semimembranosus* muscle; lane 9, *longissimus dorsi* muscle; lane 10, testicle; lane 11, ovary; lane 12, uterus; lane 13, lung; lane 14, kidney; lane 15, blank. The expected size of the amplified product was 101 bp.





4.1.- Variabilitat genètica en una població comercial Landrace

El primer objectiu del treball realitzat ha consistit en mesurar els nivells de variabilitat genètica d'una població comercial Landrace per 42 microsatèl·lits situats en 10 cromosomes. La mesura de la variabilitat és un aspecte crucial, ja que per realitzar estudis d'identificació de QTL cal que en la població hi segreguin les diferents variants dels marcadors genètics analitzats. Quan es realitzen encreuaments divergents, les poblacions emprades acostumen a presentar una gran divergència genètica i per tant habitualment no existeixen problemes de manca d'informativitat dels marcadors. En poblacions comercials altament seleccionades la situació és completament diferent.

Un dels principals requeriments del nostre estudi consistia a seleccionar un joc de microsatèl·lits que permetés rastrejar l'origen (patern) dels al·lels. Per això vam escollir aquells microsatèl·lits pels quals la major part dels cinc mascles (i en principi com a mínim tres) fossin heterozigots, i després de provar-ne 42 de diferents en vam seleccionar un joc de 23. D'aquests 23, només 3 no complien el requisit de presentar un genotipus heterozigot en almenys 3 mascles..

Posteriorment, i ja amb les mares completament genotipades vam calcular les heterozigositats i els índexs PIC (Botstein *et al.* 1980). Amb aquests índexs disposàvem d'una mesura del polimorfisme i podíem assegurar un nivell de variabilitat prou elevat com per poder identificar l'origen dels al·lels en una bona part dels casos. L'índex PIC és de fet una heterozigositat corregida que es fa servir per mesurar la informativitat d'un marcador. L'índex PIC no té en compte els encreuaments no informatius, i és per això que acota millor la mesura del polimorfisme. En general es considera que un PIC superior a 0,5

garanteix un bon grau d'informativitat, i en el nostres cas, la PIC mitjana era de 0.63. A més a més, 19 dels microsatèl·lits presentaven un PIC > 0,5 i els quatre restants no baixaven de 0,4 (veure Taula 4.1).

Taula 4.1. Mesures del polimorfisme dels marcadors que hem fet servir per a l'anàlisi de QTLs de la població Landrace.

Marcador	PIC	Heterozigositat	
		Esperada	Observada
<i>IGF2</i>	0,697	0,724	0,789
<i>S0001</i>	0,455	0,531	0,657
<i>S0059</i>	0,688	0,725	0,750
<i>S0070</i>	0,579	0,633	0,671
<i>S0121</i>	0,702	0,741	0,855
<i>S0206</i>	0,666	0,712	0,763
<i>S0214</i>	0,707	0,748	0,763
<i>S0313</i>	0,635	0,687	0,697
<i>SW1056</i>	0,498	0,541	0,578
<i>SW1369</i>	0,496	0,564	0,657
<i>SW173</i>	0,515	0,571	0,644
<i>SW21</i>	0,527	0,593	0,671
<i>SW2185</i>	0,708	0,742	0,750
<i>SW2443</i>	0,623	0,675	0,710
<i>SW2618</i>	0,809	0,832	0,855
<i>SW35</i>	0,647	0,697	0,750
<i>SW398</i>	0,730	0,767	0,842
<i>SW72</i>	0,627	0,679	0,710
<i>SW905</i>	0,635	0,691	0,657
<i>SWC19</i>	0,359	0,405	0,421
<i>SWR1101</i>	0,810	0,831	0,868
<i>SWR1848</i>	0,713	0,750	0,776
<i>TNFB</i>	0,756	0,787	0,881
Mitjana	0,634	0,679	0,727

Cal remarcar de tota manera, que els resultats obtinguts en la nostra població Landrace sobreestimen el PIC i l'heterozigositat reals de la població, ja que els 23 microsatèl·lits emprats han estat preseleccionats d'acord amb la seva informativitat. També hem observat l'existència d'una notable variació fenotípica pels caràcters considerats, fet que queda reflectit a la Taula 4.2, en

la qual es presenten els coeficients de variació per diferents caràcters analitzats.

Taula 4.2. Mitjana (M), desviació típica (D.T.), coeficient de variació (C.V.) expressat com a percentatge i número d'animals amb els quals s'han calculat les mesures anteriors. Els caràcters fenotípics que es presenten en aquesta taula es van fer servir per a una anàlisi preliminar dels nostres resultats, i no són tots els que al final vam incloure a l'anàlisi definitiva.

CARÀCTER	M	D.T.	C.V.	N
Pes al sacrifici (Kg)	104,55	11,04	10,56	480
Gruix del greix dorsal (mm)	13,28	1,51	11,37	480
Pes de la canal (Kg)	77,75	7,99	10,28	410
Mesura del greix de la canal amb Fat-o-Meter (mm)	16,23	3,00	18,48	404
Mesura del greix de la canal amb Fat-o-Meter en el llom (mm)	54,06	5,92	10,95	404
Gruix del greix mesurat amb regleta al coll (mm)	3,52	0,47	13,35	481
Gruix del greix mesurat amb regleta entre la 3 ^a i la 4 ^{ta} costella (mm)	1,92	0,36	18,75	481
pH als 45' en el múscul <i>Semimembranosus</i>	6,47	0,32	4,95	481
pH als 45' en el múscul <i>Longissimus dorsi</i>	6,28	0,30	4,78	481
Conductivitat elèctrica als 45' en el múscul <i>Semimembranosus</i>	3,59	0,97	27,02	468
Conductivitat elèctrica als 45' en el múscul <i>Longissimus dorsi</i>	2,74	0,49	17,88	468
pH a les 24h. en el múscul <i>Semimembranosus</i>	5,81	0,19	3,27	461
pH a les 24h. en el múscul <i>Longissimus dorsi</i>	5,95	0,22	3,70	481
Conductivitat elèctrica a les 24h. en el múscul <i>Semimembranosus</i>	5,38	2,12	39,41	435
Conductivitat elèctrica a les 24h. en el múscul <i>Longissimus dorsi</i>	2,51	0,89	35,46	436
Longitud de la canal (cm)	89,3	3,28	36,73	476
Pes del pernil esquerre (Kg)	12,10	1,17	9,67	481
Pes de l'espatlla esquerra (Kg)	4,48	0,49	10,94	481
Pes de l'lom esquerre (Kg)	7,39	0,80	10,83	485
Pes del costellam esquerre (Kg)	7,43	1,00	13,46	365
Pes de la panxeta esquerra (Kg)	2,42	0,56	23,14	411
Pes del pernil dret (Kg)	12,14	1,19	9,80	481
Pes de l'espatlla dreta (Kg)	4,48	0,46	10,27	480
Pes del llom dret (Kg)	7,13	0,81	11,36	481
Pes del costellam dret (Kg)	6,63	0,94	14,18	336
Pes de la panxeta dreta (Kg)	2,46	0,55	22,36	382
Activitat enzimàtica lactat deshidrogenasa ($\mu\text{mol NADH min}^{-1}\cdot\text{g muscle}^{-1}$)	3264,2	607,4	18,6	481
Activitat enzimàtica isocitrat deshidrogenasa ($\text{nmol NADPH min}^{-1}\cdot\text{g muscle}^{-1}$)	1,30	0,45	34,62	481
Percentatge de la cadena pesada de la mioglobina	7,99	4,11	51,44	481
Mesura de la pigmentació muscular	34,94	7,02	20,09	481
Extracte eteri (%) a partir de 100g. de múscul	2,12	0,84	39,39	313
Proteïna bruta (%) a partir de 100g. de múscul	23,56	0,65	2,76	313
Materia orgànica (%) a partir de 100g. de múscul	26,07	0,76	2,92	313
Aigua (%) a partir de 100g. de múscul	72,73	0,78	1,07	313

La comparació de les heterozigositats i els índexs PIC obtinguts en altres races de porcs (veure Taula 4.3) ens indiquen el possible biaix que comentàvem suara. Per exemple, Laval *et al.* (2000) estudien la diversitat

genètica d'onze races europees mitjançant el genotipatge de 18 microsatèl·lits. Els valors d'heterozigositat observada (que oscil·len entre 0,4 i 0,6) són, en totes les poblacions, més baixos que el nostres. El mateix passa al Porc Ibèric i a la raça Duroc (Martinez *et al.* 2000) o la raça polonesa Pulawska (Babic *et al.* 2003). En races xineses, en canvi, els valors són significativament més alts (Taula 4.3), tant pel que fa a les heterozigositats com als índexs PIC.

Aquests resultats indiquen que les races comercials europees, tot i haver estat intensament seleccionades, mantenen un grau de polimorfisme genètic relativament elevat. L'existència d'aquesta diversitat genètica en races comercials, tot i la intensa pressió de selecció, podria atribuir-se a les introgressions amb races xineses (molt allunyades genèticament del tronc europeu) que es van fer en aquestes races durant els s. XVIII-XIX. De fet, s'han observat l'existència d'haplotipus asiàtics al citocrom b mitocondrial en la raça Landrace, a freqüències de 0,16 (Clou *et al.* 2004) o de 0,4 (Giuffra *et al.* 2000). Aquests estudis, doncs, confirmen l'origen híbrid del porc Landrace (i d'altres races comercials) així com la persistència de variabilitat genètica corresponent als troncs europeu i asiàtic.

Altres races europees que no tenen aquest doble origen (com el porc Ibèric, la raça Pulawska o el porc Basc) també mantenen un grau de variabilitat genètica prou alt, similar al de les poblacions comercials. Possiblement les intensitats de selecció no són tant elevades en aquestes poblacions (en les quals interessa mantenir la rusticitat) i la variabilitat genètica, tot i no haver-hi episodis d'hibridació, es manté. Aquest fet també es pot observar en algunes races xineses en les quals la diversitat genètica es manté a nivells més alts i la intensitat de selecció és mínima (Li *et al.* 2004).

Taula 4.3. Heterozigositats observades (H) i PICs de 26 poblacions de races diverses. Els índexs no mesurats s'indiquen amb un asterisc.

Estudi	Raça	N marc.	N anim.	PIC	H
Martinez <i>et al.</i> 2000	Poblacions de Porc Ibèric	25	210	*	0,46-0,64
	Duroc	25	20	*	0,6083
Laval <i>et al.</i> 2000	Piértrain	18	50	*	0,6
	Sortbroget	18	59	*	0,53
	Basc	18	47	*	0,35
	Gascó	18	56	*	0,47
	Limousin	18	56	*	0,43
	Normand	18	52	*	0,5
	Landrace alemany	18	50	*	0,54
	Schwäbisch-Hällisches	18	45	*	0,53
	Great Yorkshire	18	32	*	0,51
	Landrace suec	18	24	*	0,57
	Senglar	18	12	*	0,58
Babicz <i>et al.</i> 2003	Pulawska	20	52	0,55	0,61
Zhang <i>et al.</i> 2003	56 races xineses	27	27	0,39 - 0,86	0,44 - 0,87
Li <i>et al.</i> 2004	Dong Shan	20	32	0,6	0,63
	Gan Xi Two-Ends Black	20	34	0,59	0,63
	Jin Hua	20	33	0,53	0,57
	Jian Li	20	29	0,67	0,71
	Ji Xing Black	20	40	0,64	0,67
	Huai Nan Black	20	46	0,62	0,65
	Hai Nan	20	49	0,74	0,77
	Nan Yang Black	20	53	0,72	0,75
	Sheng Xian Spotted	20	30	0,72	0,75
	Shazi Ling	20	33	0,64	0,68
	Duroc	20	24	0,4	0,47

Aquestes mesures de variabilitat genètica són importants a l'hora de determinar la informativitat d'un marcador. El grau de polimorfisme pot variar molt segons el marcador i segons la població, i en els dissenys experimentals en els quals intervé una sola raça trobar microsatèl·lits informatius no és trivial. En el nostre cas hem hagut de relaxar els criteris de selecció de marcadors, rebaixant de 3 a 2 el mínim de mascles heterozigots.

4.2.- Existència de *quantitative trait loci* relacionats amb caràcters productius en una població comercial Landrace altament seleccionada

Una de les conclusions més interessants dels estudis de QTL en porc és que han permès demostrar que els caràcters quantitius no estan governats per l'acció d'un nombre "infinit" de gens cadascun amb un efecte petit i equivalent, sinó que la variació d'aquest tipus de caràcters es pot explicar per la contribució desigual d'un nombre limitat de gens o regions genòmiques. Per exemple un 18% de la variància fenotípica pel contingut de greix abdominal en una F_2 obtinguda a partir d'un encreuament Large White x Senglar s'explica per l'acció d'un QTL localitzat al cromosoma 4 (Andersson *et al.* 1994), quan en general la porció de la variància fenotípica dels caràcters de dipòsit de greix que s'explica genèticament oscil·la d'un 20 % a un 40 %. Sens dubte, aquest coneixement es podria aplicar als esquemes de selecció assistida per marcadors (MAS). En porc, malgrat tot, només s'ha fet servir la selecció assistida per gens (GAS), un cop identificada la mutació o mutacions responsables de l'existència d'aquests QTL i després d'optimitzar sistemes senzills de genotipatge, d'una manera similar a com s'ha fet amb el gen *Ryr1* (Fujii *et al.* 1991).

És per això que la segona qüestió que ens hem volgut plantejar després de confirmar la variabilitat dels marcadors és saber si també existeix variabilitat genètica pels gens i per les regions genòmiques que regulen la variació fenotípica dels diferents caràcters considerats en el nostre experiment. De fet, hi ha la possibilitat que la població Landrace sigui polimòrfica pels microsatèl·lits analitzats (que en si mateixos són neutres des de un punt de vista selectiu) i que en canvi els al·lels del QTLs s'hagin fixat degut a l'efecte de la selecció.

En el fons, i des d'una perspectiva més àmplia, això implica verificar si els resultats que s'han obtingut en encreuaments experimentals de races fenotípicament divergents són extrapolables a poblacions comercials. De fet, és en aquest context que apareixen els primers estudis amb animals de poblacions comercials, per tal de fer un primer pas cap a la transferència de la tecnologia dels QTL a la pràctica de la producció porcina. És el cas del projecte europeu BIO4-CT97-2243, en el qual va participar el nostre grup i que tenia com a objectiu principal detectar QTL per creixement i dipòsit de greix en 11 poblacions comercials de les races Large White, Landrace, Hampshire, Piétrain i Meishan. Amb aquesta finalitat es van estudiar 7 regions cromosòmiques on prèviament s'hi havia descrit algun QTL i 3 regions de control (en les quals en el moment del disseny no se n'hi havia descrit cap). En totes aquestes poblacions es van registrar caràcters de dipòsit de greix i de creixement. La nostra aportació, que és el resultat d'un treball de col·laboració amb l'Àrea de Producció Animal del Centre UdL-IRTA de Lleida i el Centre de Tecnologia de la Carn-IRTA de Monells, va consistir en analitzar tres poblacions comercials de les races Large White, Piétrain i Landrace.

En aquest context, vam decidir ampliar el nostre estudi en la població Landrace a una sèrie de caràcters relacionats amb la qualitat de la carn i no contemplats en el projecte BIO4-CT97-2243, com són el color de la carn, la composició del múscul o la tendresa. Encara que la població Landrace d'origen era la mateixa en els dos projectes, els animals no eren exactament els mateixos. Les regions analitzades, en canvi, serien les mateixes 10 que en el projecte anterior. Malauradament, amb posterioritat a l'inici del projecte es van descriure QTL en les tres regions que havíem definit com a controls. Aquest

projecte es va finançar amb fons del FEDER 2FD97-0916-C02-02. Els resultats del projecte europeu han estat publicats a Evans *et al.* (2003), amb una reanàlisi mitjançant els components de la variància a de Koning *et al.* (2003). Els resultats del projecte FEDER són els que presentem en el primer article d'aquest compendi.

De moment només hi ha hagut un altre estudi d'aquestes característiques, en el qual s'estudiava la segregació dels QTL del cromosoma 4 i del cromosoma 7 en 5 poblacions comercials diferents. Els resultats d'aquest estudi es poden trobar a Nagamine *et al.* (2003) i Nagamine *et al.* (2004).

Els resultats més importants del nostre projecte són al cromosoma 2, en el qual hi ha efectes sobre el pes de les espatlles, el pes de les llonzes i la fermesa de la carn amb una densitat màxima posterior (HPD) superior al 0,99. Altres efectes menys importants en aquest cromosoma els trobem al pes de la canal (HPD = 0,87) i al pes dels pernills (HPD = 0.81). La regió analitzada en aquest cromosoma coincideix amb el QTL de l'*IGF2*, i aquests efectes tant importants en suggereixen la segregació a la nostra població. Recentment, la mutació causal per aquest QTL ha estat descrita a l'intró 3 d'aquest gen (van Laere *et al.* 2003), i actualment estem analitzant la possible segregació d'aquest polimorfisme a la nostra població mitjançant la tècnica de piroseqüenciació (Ronaghi *et al.* 1998).

Altres efectes importants els trobem al cromosoma 7 sobre dipòsit de greix (HPD = 0,84), al cromosoma 8 sobre gruix del greix dorsal (HPD = 0,79) i al cromosoma 10, també pel gruix del greix dorsal (HPD = 0,88).

En conjunt, aquests resultats demostren de forma clara l'existència de diversos QTL segregant en la nostra població comercial. Això vol dir que una proporció important de la variabilitat genètica per caràcters que han estat directa o indirectament seleccionats ha romàs en aquesta població. Els nostres resultats coincideixen plenament amb els d'Evans *et al.* (2003) i Nagamine *et al.* (2003), que també detecten l'existència de QTL segregant en totes les poblacions que han analitzat.

A Evans *et al.* (2003) troben a totes les regions analitzades (que ja hem comentat que són les mateixes que les analitzades en el nostre treball) efectes per almenys una de les poblacions. Són interessants els casos del cromosoma 4 (que té efectes en quatre de les deu poblacions seleccionades) i el del cromosoma 7 (que arriba al nivell de significació més alt de l'estudi, al 99,9 % pel dipòsit de greix en una població Hampshire).

Nagamine *et al.* (2003) van genotipar cinc poblacions comercials de diferents empreses de producció porcina per vuit microsatèl·lits del cromosoma 4 i set microsatèl·lits del cromosoma 7, propers a les regions dels QTL més rellevants d'aquests cromosomes. A totes cinc poblacions van trobar evidències del QTL del cromosoma 7, mentre que el QTL del cromosoma 4 només apareixia en dues. La reanàlisi d'aquests resultats mitjançant components de la variància (Nagamine *et al.* 2004) encara que no coincideix exactament amb els primers resultats, confirma l'existència de QTL segregant en aquestes poblacions comercials.

La principal conseqüència que podem extreure de tots aquests treballs és que la informació de QTL obtinguda en encreuaments divergents és extrapolable, almenys parcialment, a poblacions comercials. Una altra

conseqüència interessant és que l'assumpció que s'acostuma a realitzar en els encreuaments de races divergents que els al·lels alternatius dels QTL estan fixats a cada línia sovint és una simplificació excessiva d'una realitat biològica molt més complexa. Possiblement sigui certa en poblacions molt tancades i consanguínies com per exemple l'estirp Guadyerbas d'Ibèric, però no en altres poblacions més "obertes", amb un major cens efectiu i una menor consanguinitat.

La selecció, per tant, no ha aconseguit fixar els al·lels dels QTL a totes les poblacions en les quals actua. Les raons d'aquesta ineficàcia poden ser diverses. Per una banda, la diferència d'intensitat de selecció entre mascles i femelles (en les quals generalment no pot ser gaire alta) pot retardar el progrés genètic i dificultar la fixació d'al·lels. Per l'altra, trobem els efectes derivats del fet que la selecció és multicaràcter. Així, tant correlacions negatives entre caràcters com efectes pleiotròpics d'alguns loci poden impedir la fixació de segons quins al·lels.

4.3.- Comparació de l'abundància i de les HPD dels QTL relacionats amb caràcters de creixement, engreixament i qualitat de la carn

Un altre resultat interessant és que en general els QTL relacionats amb el creixement i l'engreixament són més abundants i tenen HPD més altes que els relacionats amb la qualitat de la carn. Això és particularment curiós si es valora el fet que la nostra població ha estat seleccionada per creixement i dipòsit de greix. Així, per caràcters de qualitat comptabilitzem 2 efectes amb una HPD més gran de 0,76 (**) i un efecte amb una HPD més gran de 0,99 (****). Per caràcters de creixement i de dipòsit de greix, en canvi, hem trobat 7

efectes d'una HPD més gran de 0,76 (**) i 2 d'HPD més gran de 0,99 (****). Els nostres resultats coincideixen amb les conclusions generals de les publicacions que han estudiat simultàniament caràcters de conformació i caràcters de qualitat (Andersson-Eklund *et al.* 1998, Óvilo *et al.* 2002a, Varona *et al.* 2002), en els quals els QTL per caràcters de qualitat són també menys abundants.

Aquesta observació es pot interpretar de diverses maneres. En primer lloc, el fet que estem analitzant regions on inicialment s'hi havien descrit QTL per creixement i dipòsit de greix fa inevitable pensar en un biaix dels resultats. Així, és possible que, primer, estiguem analitzant zones especialment poc significatives pel que fa a efectes sobre la qualitat de la carn i, segon, que els efectes que detectem siguin efectes pleiotròpics dels mateixos QTL, amb la qual cosa la selecció també els hauria afectat.

La realitat, però, és que al llarg dels anys que ha durat el projecte, s'han anat trobant nous QTL per qualitat de la carn en posicions properes o coincidents amb els QTL per caràcters de conformació (veure Taula 2 de l'anàlisi de QTL, pàg. 93) i l'efecte del biaix inicial no sembla, doncs, tant important.

Aquesta diferència entre els efectes també pot interpretar-se com una conseqüència d'una arquitectura genètica diferent entre els caràcters de conformació i els de qualitat de la carn. Així, podem observar que, tot i la diversitat de caràcters que defineixen la qualitat de la carn, tenen unes heretabilitats més baixes que no pas els caràcters de dipòsit de greix i de creixement (veure Taula 1.1 de la Introducció, pàg. 20). Per exemple, encara que en general els efectes genètics semblen importants per caràcters com el pH o el contingut de greix intramuscular, no ho són tant pel *flavour* (molt influït

pel grau d'oxidació) o per la tendresa (que, a part d'estar relacionada amb el contingut de greix intramuscular, es pot veure molt afectada per les temperatures *post mortem*) (Coma 2001).

Una situació anàloga la trobem en estudis que han analitzat QTL relacionats amb caràcters reproductius. Aquests caràcters tenen heretabilitats baixes i un fort component ambiental, i en els encreuaments experimentals de línies divergents es detecten menys QTL i de significacions més baixes (Cassady *et al.* 2001, Rohrer *et al.* 2001).

4.4.- Els gens candidats

El sistema més adequat per poder identificar la mutació responsable d'un QTL consisteix en seqüenciar el segment genòmic, prèviament clonat en un conjunt de BAC, on està ubicat el QTL. Aquesta metodologia planteja el problema que no existeixen llibreries de BAC per totes les races porcines, i que per tant en la llibreria analitzada poden no existir els polimorfismes responsables del QTL (p.e. en una llibreria preparada a partir de DNA genòmic d'ibèric seria molt difícil, per no dir impossible, trobar la mutació responsable del síndrome d'estrès porquí). En definitiva, aquesta aproximació serà factible quan els mètodes de preparació de llibreries i de seqüenciació hagin evolucionat de manera que es puguin dur a terme de forma molt més ràpida i efectiva. Actualment, preparar una llibreria de BAC a partir del DNA genòmic d'un individu pot involucrar una feina de 3-4 mesos en un laboratori molt especialitzat i en el que totes les tècniques estiguin molt optimitzades (Pieter de Jong, comunicació personal). En altres circumstàncies pot abastar un període

de 2-3 anys. A més a més la identificació dels clons portadors del fragment i la seqüenciació és una feina lenta i, sobretot, molt cara.

Una aproximació molt més directa, i factible en les nostres circumstàncies, consisteix en seqüenciar gens candidats localitzats en les regions genòmiques on hem trobat QTL. Amb aquest mètode s'escull una bateria de gens coneguts, amb una funció relacionada amb el caràcter considerat i amb posicions compatibles amb la del QTL. Per obtenir aquest llistat de gens és habitual fer servir la informació d'espècies com l'humà i el ratolí, en les quals hi ha molts més gens descrits. En aquests casos la informació de la posició dels gens s'ha de valorar mitjançant el mapa comparatiu amb el porcí. Un cop hem seleccionat els gens candidats, cal seqüenciar-los i buscar polimorfismes mitjançant l'alineament de seqüències. Aquest polimorfismes s'han de genotipar en un pedigrí per detectar-ne una possible associació amb els efectes fenotípics del QTL.

Aquest mètode té forces limitacions, perquè cal demostrar una relació biològica entre la mutació i els efectes per poder afirmar que hem trobat la mutació causal del QTL. Si això no és possible, amb els estudis d'associació només demostrem la relació entre els efectes i un polimorfisme que esperem que sigui relativament proper a la mutació causal. Una altra limitació és que el contingut genètic del porcí, de la espècie humana o del ratolí no tenen per què ser idèntics. A més a més, tant en humà com en ratolí hi ha molts gens o seqüències que han estat identificades com a tal mitjançant programes informàtics específics, i dels quals se'n desconeix la funció.

4.4.1.- L'elecció dels gens candidats

Una de les prioritats d'investigació del nostre departament és la genètica dels caràcters relacionats amb el metabolisme lipídic i l'engreixament, perquè són caràcters que tenen una gran influència en la qualitat de la carn. Encara que es tracta d'un caràcter complex i determinat per una gran quantitat de paràmetres (pH, tendresa, color...), la qualitat de la carn està molt influïda tant pel contingut de greix intramuscular com pel contingut d'àcids grassos del greix. Així, el contingut d'àcids grassos pot afectar l'oxidació de la carn, que al seu temps té una gran influència en el *flavour* i el color (Coma 2001). A més a més, la tendresa, la intensitat del gust i la sucositat de la carn tenen correlacions prou elevades (de 0,15 a 0,30) tant amb el greix intramuscular com amb la composició d'àcids grassos (Van Oeckel *et al.* 2000).

A part d'aquesta gran influència en la qualitat de la carn, les heretabilitats tant del contingut del greix intramuscular com de la composició en àcids grassos del teixit adipós són molt elevades, amb valors que van de 0,4 a 0,6 (Sellier 1998). La influència genètica és doncs molt important, i, de fet, estudis de QTL ja han demostrat l'existència de regions amb grans efectes sobre aquests caràcters. Clop *et al.* (2003) van identificar per primer cop QTL relacionats amb la composició en àcids grassos del greix, així com diferents índexs (índexs de dobles enllaços i de peroxidabilitat) vinculats amb la composició en àcids grassos i amb la qualitat del greix. Els resultats d'aquest estudi demostren l'existència de QTL per aquests caràcters als cromosomes 4, 6, 8, 10 i 12. Varona *et al.* (2004) aprofundeixen en l'estudi dels QTL del

cromosoma 6, i conclouen que en aquest cromosoma hi ha 3 QTL pleiotròpics respecte al contingut de diferents àcids grassos en cada cas.

Al nostre departament ja s'han caracteritzat alguns dels gens relacionats amb el metabolisme lipídic en el marc d'altres projectes de recerca, com per exemple el gen de la piruvat carboxilasa (Dávalos *et al.* 2003), el de la glicerol fosfat aciltransferasa (Tomàs *et al.* 2003) i el de la diacilglicerol aciltransferasa (Mercader, comunicació personal). D'altra banda, actualment s'està duent a terme un projecte (LIPGEN, CICYT AGL2002-04271-C03-03) en el qual està prevista la caracterització de 38 gens relacionats amb el metabolisme dels lípids i més específicament del colesterol. Els treballs de la tesi doctoral que a continuació discutirem s'emmarquen dins d'aquesta línia d'investigació, i inclouen la caracterització dels gens de la malat deshidrogenasa citosòlica (*MDH1*), de l'enzim màlic citosòlic (*ME1*), de la 2,4-dienoil-CoA reductasa (*DECR*) i de l'acil CoA sintasa 1 (*ACLS1*).

4.4.2. La malat deshidrogenasa 1

La malat deshidrogenasa citosòlica (*MDH1*) és un enzim que catalitza la reacció de reducció de l'oxaloacetat a malat i participa, juntament amb l'enzim màlic i d'altres enzims en el transport d'acetil coenzim A del mitocondri al citosol de la cèl·lula (Figura 4.1). Aquest acetil coenzim A, a banda de participar en el metabolisme dels glúcids és necessari per a la síntesi de lípids, que es duu a terme al citosol cel·lular.

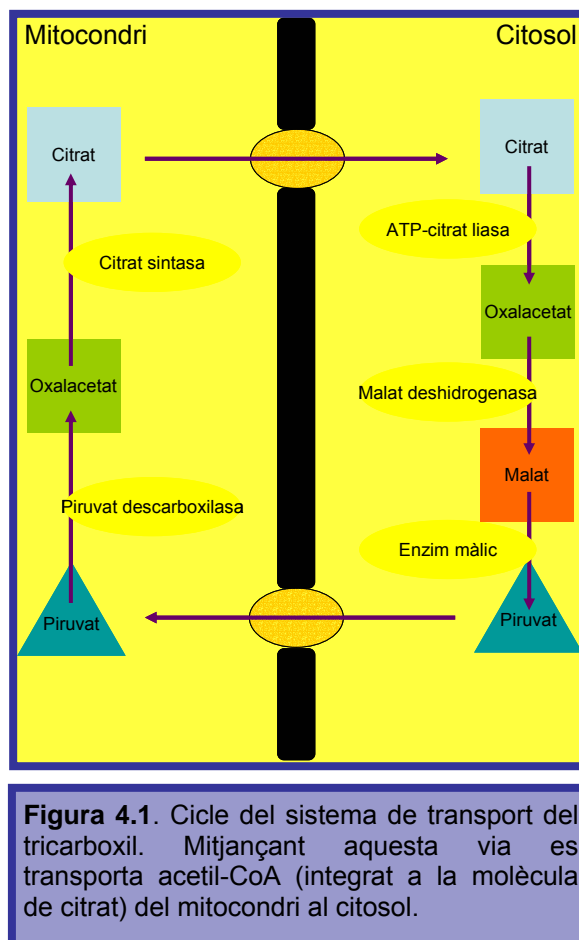


Figura 4.1. Cicle del sistema de transport del tricarboxil. Mitjançant aquesta via es transporta acetil-CoA (integrat a la molècula de citrat) del mitocondri al citosol.

Vam escollir l'*MDH1* com a gen candidat basant-nos, a banda de la funció, en una anàlisi preliminar de l'estudi de microsatèl·lits, en la qual trobàvem efectes significatius al cromosoma 3, que és on es localitza el gen *MDH1* (Wintero *et al.* 1998). A l'anàlisi de microsatèl·lits definitiva aquest QTL preliminar no s'ha confirmat.

En aquest gen hem descrit un polimorfisme silent C→T a l'exó 7. Al tractar-se d'un polimorfisme exònic que no provoca canvis en la seqüència aminoacídica en principi no és previsible que tingui efectes sobre l'expressió o la funció del gen. No obstant això, sí que es pot fer servir de marcador en

estudis d'associació en els quals es vulgui valorar possibles efectes associats a aquesta regió.

Al dissenyar un protocol de *primer extension analysis* per al genotipatge d'aquesta mutació, hem pogut identificar una inserció a l'intró 6 del gen MDH1. Aquest fragment té 722 pb i és a la posició 262 de l'intró, i l'anàlisi de la seqüència amb el programa BLASTN ha permès determinar que correspon a un *long interspersed nucleotide element* (LINE) de tipus 1.

Els elements LINE són retrotransposons de seqüència llarga (de 6 o 7 kb quan són senceres), integrats al genoma i que formen part del DNA altament repetitiu. La majoria dels elements LINE-1 (o L1) estan truncats per la regió 5' i presumiblement no poden provocar noves transposicions. En porc s'ha descrit un grup d'elements L1, que s'ha denominat L1Ss (Miller 1994), dins del qual hem pogut classificar la nostra seqüència.

Aquest insert segrega a les diferents poblacions, cosa que ens fa pensar en un episodi de retrotransposició molt recent. Aquesta segregació permet fer servir de marcador aquest element L1Ss. Cal tenir en compte que aquest tipus de polimorfismes són de gran interès perquè es poden genotipar ràpidament, discriminant els al·lels per la mida. A més a més es pot assegurar la identitat per descendència de les insercions, perquè és extremadament improbable que es produeixin insercions independents en una mateixa posició del genoma.

A banda d'això, també hem amplificat un fragment d'1,7 kb que té similituds amb l'exó 6 i l'exó 7 del gen MDH1, així com amb part de l'intró 6. És possible que es tracti d'un pseudogen no processat, en el qual hem identificat quatre elements que corresponen a *short interspersed nuclear elements* (SINE) de la família de SINE porcíns PRE-1 (Singer *et al.* 1987).

4.4.3.- L'enzim màlic citosòlic

L'enzim màlic citosòlic (ME1), com l'enzim MDH1, participa en el transport d'acetil coenzim A de dins del mitocondri al citosol cel·lular. Com en el cas del gen *MDH1*, en l'anàlisi preliminar vam trobar efectes en el cromosoma 1 del porc, que és on el localitza el gen *ME1* (Nunes *et al.* 1996).

El treball realitzat amb el gen *ME1* ha permès d'identificar 5 polimorfismes de la regió 3' UTR del gen (Taula 1 de Polimorfismes i estudi d'associació del gen *ME1*, pàg. 134), que segreguen a la població comercial Landrace del projecte FEDER. Tot i que a l'anàlisi definitiva de QTL no hem detectat efectes en aquest cromosoma, vam decidir de fer un estudi d'associació amb els caràcters fenotípics que ja s'havien mesurat perquè la posició del *ME1* no coincideix amb l'interval dels dos microsatèl·lits que hem genotipat en aquest cromosoma, l'*SW2185* i l'*S0313* (Figura 4.2). Així, efectes moderats provocats per mutacions en aquest gen (o molt properes) podrien haver passat inadvertits en l'anàlisi de QTL.

Encara que cap de les 5 mutacions descrites al nostre treball és a la seqüència codificant, no és totalment descartable que puguin tenir algun efecte funcional. De fet, la zona 3'UTR té una funció reguladora, i ja s'ha demostrat que pot afectar l'estabilitat de l'RNA missatger (Day i Tuite 1998), i per això no podem descartar totalment una causalitat directa de l'enzim màlic en els efectes detectats.

Els resultats més importants de l'anàlisi d'associació indiquen efectes sobre el gruix del greix dorsal a 156 d i a 171 d que no passen mai d'una HPD

del 95 %, però que són biològicament explicables en un enzim que participa en la síntesi d'àcids grassos. Hem observat també que la magnitud dels efectes depèn de l'edat, i disminueixen a mesura que el porc arriba al pes del sacrifici. Això podria indicar que l'engreixament al final del període de creixement és més dependent de factors ambientals que no pas de genètics, fet que explicaria l'absència d'efectes en altres mesures de dipòsit de greix que es prenen a la canal.

El gen *ME1* no s'ha cartografiat a cap mapa de lligament, i la posició descrita a la bibliografia (citogenètica, a 1p1.2) és molt difícil de relacionar amb les posicions de QTLs descrits prèviament. Per comparació entre marcadors del mapa citogenètic i del mapa de lligament de l'USDA-Marc (<http://www.genome.iastate.edu/maps/marcmmap.html>), podem estimar una posició aproximada de l'*ME1* a uns 60 cM (Figura 5).

Al cromosoma 1 s'hi han descrit QTL pel gruix del greix dorsal a 29 cM (Malek *et al.* 2001a) i a 56 cM (Nezer *et al.* 2002). El polimorfisme del gen *ME1* no s'ha estudiat en cap dels dos encreuaments, i per tant no podem afirmar que hi hagi correspondència entre els efectes observats.

Els efectes de l'enzim màlic sobre el dipòsit de greix en el porc ja s'han descrit en alguns altres experiments. Per exemple, s'ha demostrat que l'activitat de l'enzim màlic té molta influència en el contingut de greix intramuscular (Mourot i Kouba 1999). Morales *et al.* (2002) estudiant l'efecte de dues dietes diferents en porcs Landrace i Ibèrics van trobar diferències importants en l'activitat enzimàtica de l'*ME1*, no atribuïbles a l'alimentació. Cal tenir en compte que la quantitat de greix dipositat en aquestes dues races és molt diferent, cosa que podria estar relacionada amb les activitats de l'*ME1*.

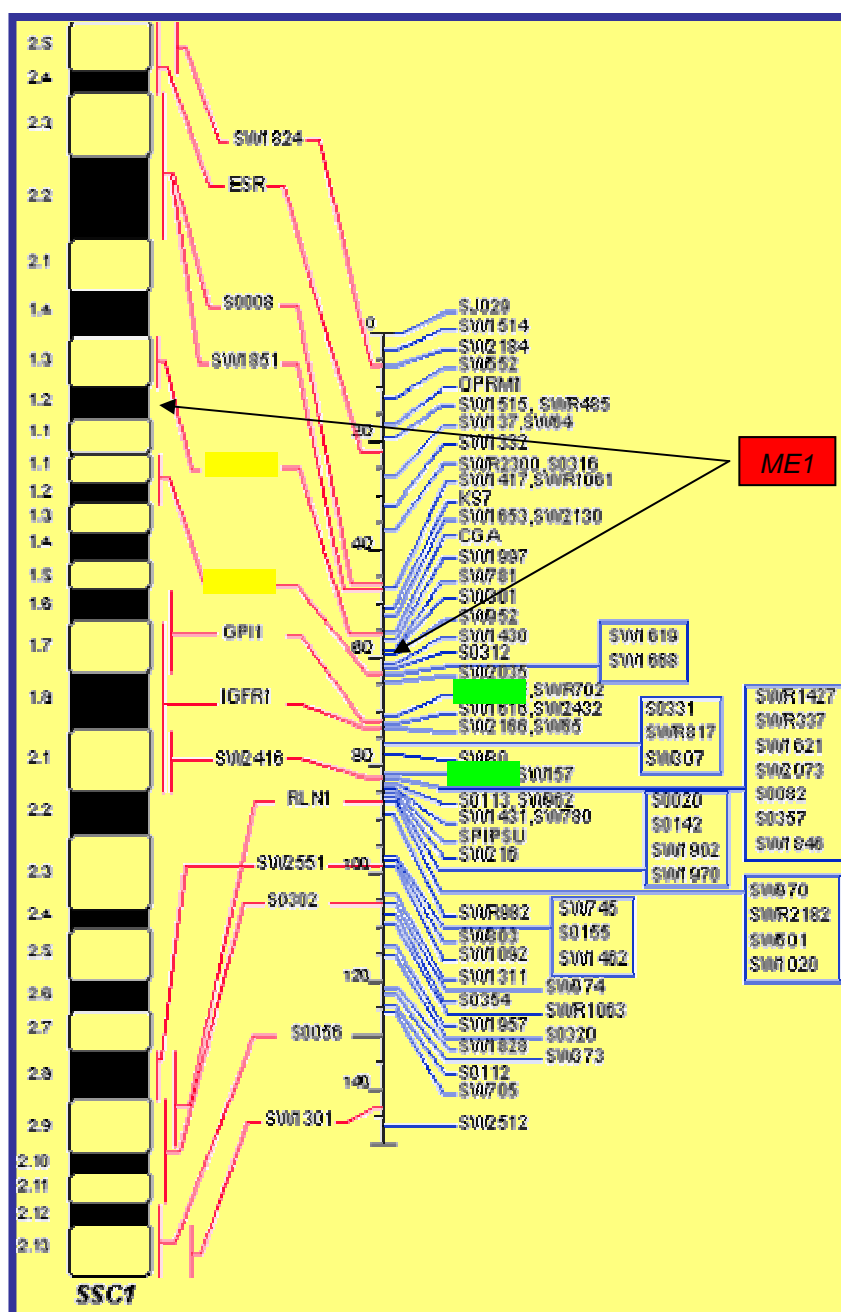


Figura 4.2. La posició del gen de l'enzim màlic és p1.2 al mapa citogenètic. Aquesta localització es correspon, segons la posició dels marcadors flanquejants (SW123 i S0122, en groc) a uns 60 cM. En verd hi ha els dos microsatèl·lits que hem genotipat a la nostra població Landrace, i com es pot comprovar, no inclouen la posició de l'*ME1*.

Hem pogut genotipar també una part dels animals d'aquest estudi, i com en la nostra població, en els Landrace els polimorfismes segregaven, en canvi en els Ibèrics no (Taula 4.4). Tot i tractar-se d'un material molt interessant, el reduït

número d'animals disponibles no ens ha permès de realitzar cap anàlisi estadística.

Taula 4.4. Freqüències al·lèliques dels polimorfismes del gen *ME1* en material animal descrit per Morales *et al.* (2002). Les freqüències de l'SNP1 són les mateixes que les dels SNP2, SNP3 i SNP4.

Mutació		SNP1		SNP5	
		C	T	T	A
Raça	Ibèric (N=20)	1	0	1	0
	Landrace (N=50)	0,84	0,16	0,96	0,04

Amb les mateixes mesures fenotípiques també hem estudiat l'efecte dels tres diferents haplotipus *ME1* que segreguen a la nostra població. L'anàlisi en aquest cas és més difícil d'interpretar, perquè hem comparat cadascuna de les combinacions d'haplotipus existents amb tota la resta.

De fet, en una anàlisi d'aquest tipus el que fem és redistribuir les categories dels animals, distingint uns altres subgrups dins del total d'individus. Així, en els SNPs 1 al 4, els individus denotats CC es reparteixen entre els H1H2 i H2H2 de l'anàlisi d'haplotipus, els CT es divideixen a les categories H1H3 i H2H3 i els TT es denoten H3H3. En el cas de l'SNP5, els individus TT s'afegeixen als H2H2, H2H3 i H3H3, i els AT a H1H2 i H1H3 (veure Taula 4.5). És una anàlisi, doncs, més fina, i que pot acotar més bé la relació que hi pugui haver entre l'enzim màlic i els efectes fenotípics, perquè categoritza més bé els animals. El principal problema d'aquesta anàlisi rau precisament al mateix punt: al fer més classes perdem potència de detecció dels efectes, perquè podem comparar menys individus de cada subgrup.

Taula 4.5. Correspondència entre els genotipus i els haplotipus per les mutacions del gen *ME1*. A la fila superior hi ha els genotipus de l'SNP1, i a la columna de l'esquerra els genotipus de l'SNP5. Entre parèntesi s'indica el número d'animals de cada categoria.

SNP5\SNP1	CC (279)	CT (178)	TT(11)
AT(55)	H1H2 (48)	H1H3 (7)	*
TT(413)	H2H2(231)	H2H3 (171)	H3H3 (11)

Els resultats d'aquesta anàlisi dels haplotipus per caràcters de greix confirma les associacions que hem trobat analitzant els SNP per separat (Taula 2 de Polimorfismes i estudi d'associació del gen *ME1*, pàg 135), i, a part d'observar que els efectes són més importants quan comparem subgrups amb un major número d'animals, també podem observar que són els genotipus diferents als SNP1, SNP2, SNP3 i SNP4 els que presenten més diferències. Així, els genotipus que es comparen en les tres últimes columnes de la taula són, per l'SNP5, homozigots TT en tots els casos, mentre pels SNPs 1 al 4 comparem els tres possibles genotipus (CC, CT i TT) entre ells.

Un altre grup de caràcters amb associacions importants són els de pH i conductivitat elèctrica. Aquests caràcters estan molt relacionats amb el contingut i el metabolisme *post mortem* del glicògen muscular. Tal com hem vist, l'enzim màlic és un enzim central del metabolisme cel·lular, i encara que subministra NADPH i acetil-CoA per a la síntesi d'àcids grassos, també intervé en el metabolisme dels glúcids, perquè intervé en la síntesi de piruvat. Cal tenir en compte que tant el pH com la conductivitat elèctrica del múscul estan relacionats amb la producció de lactat de la glucòlisi anaeròbia. Mitjançant l'enzim lactat deshidrogenasa, aquest lactat es transforma en piruvat, que ens connecta aquesta ruta a la de l'enzim màlic.

En aquests moments, estem reanalitzant les nostres dades per tal de solucionar alguns problemes que ens han indicat a les revisions prèvies a la publicació. Amb el model bayesià que hem presentat en aquest compendi no podem aplicar la correcció de Bonferroni (mitjançant la qual es corregeix el nivell de significació en funció del número de tests realitzats i s'eviten falsos positius), i malauradament no existeix cap metodologia anàloga en estadística bayesiana. Sense aquesta correcció, i en un sentit estadísticament estricte, hauríem de trobar 20 associacions positives quan l'HPD és al 90 % i 10 quan l'HPD és al 95 % en l'anàlisi dels SNP per separat (que implica 200 comparacions). Per tant sembla interessant acotar el número de mesures que s'analitzen, per tal d'evitar aquests problemes. Així, en el cas de l'enzim màlic, central en el metabolisme de lípids i glúcids sembla força coherent estudiar-ne els efectes en caràcters tant de dipòsit de greix com les mesures *post mortem* que depenen de la degradació del glucògen muscular.

A més a més, les mesures de registre del color, que estan preses per duplicat, s'han de considerar conjuntament. Això es fa amb una metaanàlisi, tal com es descriu a Varona *et al.* (2001). Amb aquest mètode s'inclou com *prior* d'un dels duplicats l'anàlisi de l'altre, cosa que formalment passa per multiplicar els factors de Bayes dels duplicats. Cal comentar que els resultats no canvien substancialment.

4.4.4.- La 2,4-dienoil-CoA-reductasa

L'elecció del gen de la 2,4-dienoil-CoA-reductasa (*DECR*) per a l'estudi de gens candidats es va fer basant-nos tant en la seva funció com en la seva posició. Aquest gen està localitzat al cromosoma 4 i coincideix amb la posició

d'un QTL sobre el contingut en àcid linolèic al greix i dos índexs de composició d'àcids grassos (Clop *et al.* 2003, Pérez-Enciso *et al.* 2000). A més a més, l'enzim DECR participa en la β oxidació dels àcids grassos polinsaturats, fet que reforça l'interès de caracteritzar-lo a nivell molecular.

Vam trobar dos polimorfismes en aquest gen, una transversió G \rightarrow C₁₈₁ a l'exó 2 i un altra transversió G \rightarrow C₄₅₈ a l'exó 5. Aquestes dues mutacions són a la seqüència codificant i provoquen canvis aminoacídics, i com en el cas anterior segregaven a la població comercial del porcs Landrace del projecte FEDER. La mutació de l'exó 2 provoca un canvi Val \rightarrow Leu a la seqüència aminoacídica (posició 63) i la mutació de l'exó 5 provoca un canvi Ser \rightarrow Thr (posició 153). En el primer cas tots dos aminoàcids són alifàtics (apolars), i en el segon tots dos són polars i tenen un grup hidroxil. Són, doncs, canvis conservatius de la cadena peptídica, que probablement no tenen un gran efecte funcional.

Els resultats de l'anàlisi d'associació d'aquestes dues mutacions (que sempre es troben en la mateixa combinació GG o CC, i per tant s'han analitzat conjuntament) només són significatius en tres caràcters de qualitat de la carn: color (component Minolta a2), ICDH i pH al múscul longissimus dorsi a les 24 h post mortem. El color i el pH tenen una relació funcional que, tal com comentem a l'article, fa particularment interessants aquests efectes. A més a més, la manipulació del contingut en àcids grassos mitjançant la dieta s'ha demostrat que afecta tant el color de la carn com el pH, entre d'altres mesures (D'Souza i Mullan 2002, Tischendorf *et al.* 2002). Així, els àcids grassos i la DECR ocupen un punt central d'aquesta xarxa de relacions.

Pel que fa a l'associació amb l'ICDH, és fisiològicament explicable gràcies a què les funcions dels dos enzims estan relacionades, i és possible que modulacions en l'activitat de la DECR puguin afectar també l'activitat de la ICDH (Shechter *et al.* 2003).

Clop *et al.* (2002) han determinat la posició del gen *DECR* i han analitzat la mutació de l'exó 2 en l'encreuament IBMAP, en el qual s'han descrit els QTL que comentàvem sobre contingut en àcids grassos. Encara que la posició del gen els coincideix amb l'interval de confiança del QTL, les freqüències de la mutació a les dues races parentals de l'encreuament (Landrace de la mateixa població que hem analitzat nosaltres i Ibèrics) no concorden amb els resultats dels QTL. Així, mentre que a l'anàlisi de QTL es demostrava l'existència d'un al·lel ibèric i d'un al·lel Landrace, la mutació és poc informativa i segrega a freqüències similars en les dues poblacions, i sembla poc probable que el *DECR* sigui el responsable dels QTL d'aquest encreuament.

4.4.5.- La sintasa d'acil-coenzim A de cadena llarga 1

Hem escollit el gen de la sintasa d'acil-coenzim A (*ACLS1*) per la seva funció en la síntesi dels acil-coA, que, entre moltes altres, és imprescindible per a la síntesi de triglicèrids. En aquest cas no es va poder tenir en compte ni la bibliografia prèvia ni la posició del gen, perquè a l'espècie porcina aquest gen no s'havia descrit.

En mamífers hi ha cinc isoformes diferents d'aquest enzim, que s'han denominat de força maneres diferents (FACL, ACS, LACS...) fins que la nomenclatura s'ha unificat. Per evitar problemes derivats de la confusió de noms i de la localització errònia d'algun dels gens s'ha establert una

nomenclatura oficial segons la qual les cinc isoformes són l'ACLS1 (abans FACL2), ACLS3, ACLS4, ACLS5 i ACLS6.

En aquest compendi presentem dos treballs sobre el gen *ACLS1* que inclouen la localització cromosòmica, la seqüenciació i la descripció de 5 polimorfismes. Hem seqüenciat 3.013 pb del gen *ACLS1*. D'aquest fragment de 3 kb, 2.049 pb pertanyen a la regió codificant i 964 pb a la regió 3'UTR. Aquesta seqüència ens ha servit per a dissenyar un joc de primers per fer la cartografia RH i per buscar polimorfismes a 6 races porcines diferents: Piétrain, Large White, Landrace, Porc Ibèric, Vietnamita i Duroc.

La localització cromosòmica amb el panell RH de l'INRA ens ha permès situar aquest gen al cromosoma 15, a una distància de 45 cR del microsatèl·lit SW1989. Aquesta posició és propera a un QTL que afecta el contingut en glicògen i el pH del múscul (Malek *et al.* 2001b).

Tant a humà com a ratolí s'han descrit, fins ara, cinc membres d'aquesta família (*ACLS1*, *ACLS3*, *ACLS4*, *ACLS5* i *ACLS6*), amb funcions similars però amb diferents patrons d'expressió tissular. Aquest gran nombre de variants, més la confusió de noms que hi ha hagut han complicat força la tasca de classificació de la nostra seqüència. Per això hem dut a terme una anàlisi filogenètica amb el programa MEGA v2.1 (<http://www.megasoftware.net>), fent servir la distància genètica de Kimura amb 2 paràmetres per construir un arbre *neighbor-joining*. Amb aquest estudi hem aconseguit demostrar la pertinença del nostre gen al grup de les ACSL1.

Aquesta classificació concorda a més a més amb la posició en el mapa comparatiu humà. No tenim coneixement de cap estudi filogenètic de les ACSL, però l'agrupació del nostre arbre filogenètic ens permet d'afirmar que la

diferenciació de la ACLS ancestral en 5 isoformes és anterior a la separació d'humà i ratolí. A més a més hem trobat i confirmat a diferents races de porcs 6 mutacions, cap de les quals provoca canvi aminoacídic, encara que 3 estiguin a la regió codificant (Taula 4.6). A la taula hi hem inclòs les freqüències al·lèliques dels porcs Meishan que hem pogut genotipar (i que no hem inclòs a l'article perquè eren pocs animals) i una mutació nova, a l'exó 4, que només hem trobat en aquesta raça i que tampoc provoca canvis en la seqüència de la proteïna.

Taula 4.6. Taula de freqüències dels 7 polimorfismes del gen *ACLS1* a 6 races (P: Piétrain, LW: Large White, LD: Landrace, IB: Ibèric, DU: Duroc i ME: Meishan). La posició està indicada segons la seqüència AY690660, i la N indica el número d'animals que s'han genotipat en cada cas.

Mutació	SNPe4			SNPe16			SNPe17			SNPa			SNPb			SNPc			SNPd			
	363		N	1,554		N	1,639		N	2,084		N	2,126		N	2,266		N	2,597		N	
	G	A		T	C		T	C		C	T		G	A		T	C		T	C		
Raça	P	1	0	29	1	0	27	1	0	27	1	0	29	0,5	0,5	29	1	0	29	1	0	29
	LW	1	0	26	0,9	0,1	26	1	0	26	1	0	29	0,7	0,3	29	1	0	29	1	0	29
	LD	1	0	26	0,9	0,1	26	1	0	26	0,8	0,2	25	1	0	25	0,8	0,2	25	0,8	0,2	25
	IB	1	0	19	1	0	18	0,7	0,3	18	1	0	19	1	0	19	1	0	19	1	0	19
	DU	1	0	48	1	0	48	0,7	0,3	48	1	0	58	0,6	0,4	58	1	0	55	0,9	0,1	57
	ME	0,3	0,7	15	1	0	5	0,2	0,8	5	0,9	0,1	20	1	0	20	1	0	9	0,2	0,8	9

El genotipatge de tots aquests animals demostra una distribució prou àmplia de les mutacions. Així, aquests polimorfismes semblen adequats per poder-se fer servir de marcadors moleculars en estudis d'associació amb caràcters fenotípics, encara que caldria verificar unes freqüències de segregació adequades a la població objecte d'estudi.

A part dels quatre gens que hem presentat en el compendi, també hem estudiat el gen de l'esteroil coenzima A desaturasa (SCD), ja cartografiat i seqüenciat en porcí (Ren *et al.* 2003, Wimmers *et al.* 2002b). En aquest cas, hem seqüenciat 1 kb del cDNA de 12 porcs de 6 races diferents: Ibèric,

Piétrain, Large White, Vietnamita, Landrace i Meishan, i no hi hem trobat cap polimorfisme. No obstant això, la seqüència sencera del gen no ha estat seqüenciada fins fa poc (Ren *et al.* 2004), en un estudi en què han trobat cinc polimorfismes.

4.4.6.- Polimorfisme dels gens del metabolisme lipídic

Tant en el cas de l'*ACLS1* com en el del *ME1* hem pogut comprovar doncs, la rellevància de la regió 3'UTR pel que fa al nombre de polimorfismes. Tot i que les mutacions en aquesta regió no provoquen canvis aminoacídics, estudis recents han demostrat la importància que pot tenir en la regulació de l'expressió gènica. Aquestes mutacions poden afectar la vida mitjana de l'RNA, en el que seria un control post-transcripcional (Day i Tuite 1998) com ja s'ha demostrat en la regulació del factor de necrosi tumoral α (Di Marco *et al.* 2001) i la β globina humana (Bilenoglu *et al.* 2002).

En general podem dir que els polimorfismes que hem detectat en els gens relacionats amb el metabolisme lipídic generalment no impliquen un canvi de la seqüència aminoacídica. També hem pogut observar que les races comercials tenen més mutacions que no pas algunes races més consanguínies. De fet, només una mutació del gen *ACSL1* segrega al Porc Ibèric, tota la resta estan fixades. Encara que cal tenir en compte el reduït nombre total d'animals de cada raça que s'han genotipat per a totes les mutacions, aquest fet concorda amb les aportacions que poblacions molt diverses han fet a les races que actualment s'exploten.

4.5.- Perspectives de futur i selecció assistida per marcadors

L'objectiu final de tots aquests estudis és l'aplicació del coneixement adquirit a la pràctica de la producció porcina. Cal, per tant, o acotar molt bé la posició i els marcadors adjacents d'un QTL o trobar-ne la mutació causal. Llavors aquesta informació es pot incloure en els esquemes de selecció, en el que seria una selecció assistida per marcadors (*marker assisted selection*, MAS) o una selecció assistida per gens (*gene assisted selection*, GAS). La GAS es pot fer servir ja com a mínim per tres gens en els quals s'ha descobert la mutació associada als efectes: el gen *Ryr1* per caràcters de conformació i de qualitat de la carn (Fujii *et al.* 1991), el gen *PRAKG3* per contingut de glicògen del múscul (Milan *et al.* 2000) i el gen *IGF2* (van Laere *et al.* 2003).

Encara que la GAS sigui el mètode òptim perquè seleccionem realment la mutació causal, la MAS permet aprofitar la informació dels QTL sense necessitat d'haver trobat la mutació. Després de determinar en la població comercial sota selecció les fases entre els marcadors adjacents a la posició del QTL i l'estima que s'ha fet dels al·lels del QTL (favorable i no favorable) es pot implementar un sistema de MAS. Aquesta informació també es pot fer servir per fer la introgressió del QTL en una població (*marker assisted introgression*, MAI).

L'increment de potència teòric dels programes que incorporen MAS per a un caràcter (combinant, per tant, la informació molecular amb la informació fenotípica) depèn de l'heretabilitat del caràcter, de la proporció de variància additiva associada amb el marcador i del mateix esquema de selecció (Lande i Thompson 1990). L'eficiència relativa de la MAS és més gran per caràcters

amb heretabilitats baixes si una fracció elevada de la variància additiva està significativament associada amb el marcador i quan els caràcters fenotípics que volem seleccionar no s'expressen a tots els individus, com per exemple el cas dels caràcters limitats pel sexe.

El nostres treballs, doncs, ens han servit per confirmar l'existència de QTL d'efectes importants en una població Landrace altament seleccionada. Aquest fet posa en evidència els límits de la selecció fenotípica, i prediu els beneficis que l'ús de la genètica molecular pot aportar al món de la producció porcina. A més a més, hem pogut confirmar l'existència de variabilitat genètica en *loci* que intervenen en el metabolisme lipídic. Encara que no hem pogut confirmar que aquesta variabilitat tingui repercussions en els caràcters de dipòsit de greix, no podem descartar que en alguns casos hi hagi un efecte real sobre la regulació o la funció del gen. Hem comprovat també la segregació d'aquests polimorfismes en diferents races, cosa que en permet l'ús com a marcadors moleculars en estudis d'associació.

CONCLUSIONS

1.- La població comercial de porcs Landrace analitzada presenta variabilitat fenotípica pels caràcters estudiats, amb coeficients de variació que oscil·len entre l'1,07% (percentatge d'aigua del múscul) i el 51,44% (percentatge de la cadena pesada de la mioglobina).

2.- S'ha observat un grau notable de variabilitat genètica a la població Landrace. El contingut d'informació polimòrfica (PIC) per 23 microsatèl·lits seleccionats per la seva informativitat a la generació F_0 va ser de 0,63.

3.- S'ha identificat l'existència de diversos QTL relacionats amb el creixement, l'engreixament i la qualitat de la carn a la població Landrace. El cromosoma 2 concentra els efectes més importants, amb HPD superiors a 0,99 en pes de les espatlles, pes del costellam i la fermesa de la carn. En general, aquests resultats demostren que en nombrosos casos els al·lels favorables dels QTL no s'han fixat malgrat l'efecte de la selecció.

4.- La seqüenciació del gen *MDH1* ha permès identificar 2 polimorfismes: una transició C→T a l'exó 7 i una inserció LINE 1 del tipus L1Ss localitzada a l'intró 6. A més a més s'ha identificat una seqüència anomenada *MDH1 Ψ* que es podria correspondre a un pseudogen no processat.

5.- S'han identificat cinc polimorfismes SNP1 (C→T₁₇₀₆), SNP2 (G→T₁₇₆₂), SNP3 (A→C₁₈₀₇), SNP4 (C→A₁₈₅₇) i SNP5 (T→A₁₈₈₀) a la regió 3'UTR del gen

ME1, que s'han fet servir de marcadors moleculars en un estudi d'associació. Les associacions més significatives corresponen al gruix del greix dorsal a 171 d i al pH muscular, amb HPD d'entre 0,9 i 0,95.

6.- S'ha identificat un polimorfisme C→G₄₅₈ (Ser₁₅₃→Thr₁₅₃) a l'exó 5 del gen *DECR*, que juntament amb un polimorfisme C→G₁₈₁ (Val₆₁→Leu₆₁) de l'exó 2 prèviament descrit s'han fet servir de marcadors moleculars en un estudi d'associació. Les associacions més importants són per pH muscular i color de la carn, amb HPD entre 0,9 i 0,95.

7.- S'han seqüenciat 3.041 pb del gen *ACLS1*, corresponents a gairebé tota la regió codificant (2.049 pb, de l'exó 1 al 20) i 964 pb de la regió 3'. Així mateix, hem identificat 6 polimorfismes silencis. A més hem cartografiat aquest gen al cromosoma 15 porcí i hem comprovat que s'expressa a diferents teixits, incloent melsa, estómac, pàncreas, fetge, greix dorsal, cor, múscul, testicle, ovari, úter, pulmó i ronyó.

Bibliografia

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

Andersson-Eklund L., L. Marklund, K. Lundström, C. S. Haley, K. Andersson, I. Hansson, M. Moller i L. Andersson (1998). Mapping quantitative trait loci for carcass and meat quality traits in a Wild Boar x Large White intercross. *Journal of Animal Science* 76:694-700.

Andersson-Eklund L., H. Uhlhorn, N. Lundeheim, G. Dalin i L. Andersson (2000). Mapping quantitative trait loci for principal components of bone measurements and osteochondrosis scores in a wild boar x large white intercross. *Genetical Research* 75:223-230.

Archibald A. L., C. S. Haley, J. F. Brown, S. Couperwhite, H. A. McQueen, D. Nicholson, W. Coppeters, W. A. Van de, A. Stratil, A. K. Wintero i . (1995). The PiGMAP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mammalian Genome* 6:157-175.

Arnau J., L. Guerrero i P. Pou (1993). La calidad de la carne para la elaboración del jamón curado. *Porci* 13:55-63.

Aumaitre A. L. (2001). Technical and economic changes in pig production in the European Union: past, present and future trends. *Pig News and Information* 22:11-20.

Babicz M., J. Kuryl i A. Walkiewicz (2003). Evaluation of the genetic profile of the Pulawska breed. *Journal of Applied Genetics* 44:497-508.

Beaumont M. A. i B. Rannala (2004). The Bayesian revolution in genetics. *Nature Reviews Genetics* 5:251-261.

Beeckmann P., G. Moser, H. Bartenschlager, G. Reiner i H. Geldermann (2003a). Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 8. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120:66-173.

Beeckmann P., J. Schröffel, G. Moser, H. Bartenschlager, G. Reiner i H. Geldermann (2003b). Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 1. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120:1-10.

Beeckmann P., J. Schröffel, G. Moser, H. Bartenschlager, G. Reiner i H. Geldermann (2003c). Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 3. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120:20-27.

Bennett P. (2000). Demystified ... microsatellites. *Molecular Pathology* 53:177-183.

- Bidanel J. P., D. Milan, N. Iannuccelli, Y. Amigues, M. Y. Boscher, F. Bourgeois, J. C. Caritez, J. Gruand, P. Le Roy, H. Lagant, R. Quintanilla, C. Renard, J. Gellin, L. Ollivier i C. Chevalet (2001). Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Genetics Selection and Evolution* 33:289-309.
- Bidanel J. P. i M. F. Rothschild (2002). Current status of quantitative trait locus mapping in pigs. *Pig News and Information* 23:39N-54N.
- Bilenoglu O., A. N. Basak i J. E. Russell (2002). A 3'UTR mutation affects α globin expression without altering the stability of its fully processed mRNA. *British Journal of Haematology* 119:1106-1114.
- Botstein D., R. L. White, M. Skolnick i R. W. Davis (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.
- Broman K. W. (2001). Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. *Lab Animal* 30:44-52.
- Campbell E. M., D. Nonneman i G. A. Rohrer (2003). Fine mapping a quantitative trait locus affecting ovulation rate in swine on chromosome 8. *Journal of Animal Science* 81:1706-1714.
- Casas-Carrillo E., A. Prill-Adams, S. G. Price, A. C. Clutter i B. W. Kirkpatrick (1997). Mapping genomic regions associated with growth rate in pigs. *Journal of Animal Science* 75:2047-2053.
- Cassady J. P., R. K. Johnson, D. Pomp, G. A. Rohrer, L. D. Van Vleck, E. K. Spiegel i K. M. Gilson (2001). Identification of quantitative trait loci affecting reproduction in pigs. *J. Anim Sci.* 79:623-633.
- Castellanos C., C. Barragan i M. C. Rodriguez (1996). Detection of four porcine Y-specific markers by RAPD. *Animal Genetics* 27:433-434.
- Chambers G. K. i E. S. MacAvoy (2000). Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative biochemistry and physiology part B* 126:455-476.
- Clop A., A. Cercos, A. Tomas, M. Perez-Enciso, L. Varona, J. L. Noguera, A. Sanchez i M. Amills (2002). Assignment of the 2,4-dienoyl-CoA reductase (DECR) gene to porcine chromosome 4. *Animal Genetics* 33:164-165.
- Clop A., C. Óvilo, M. Pérez-Enciso, A. Cercós, A. Tomàs, A. Fernández, A. Coll, J. M. Folch, C. Barragán, I. Díaz, M. A. Oliver, L. Varona, L. Silió, A. Sanchez i J. L. Noguera (2003). Detection of QTL affecting fatty acid composition in the pig. *Mammalian Genome* 14:650-656.

Clop A., M. Amills, J. L. Noguera, A. Fernandez, J. Capote, M. M. Ramon, L. Kelly, J. M. Kijas, L. Andersson i A. Sanchez (2004). Estimating the frequency of Asian cytochrome B haplotypes in standard European and local Spanish pig breeds. *Genetics Selection and Evolution* 36:97-104.

Clutter i Brascamp (1998). Genetics of meat and carcass traits, in *The Genetics of the Pig*. M.F. Rothschild and A. Ruvinsky, ed. Cab International, New York.

Coma J. (2001). Meat quality in pigs: effect of nutrition and feeding. *Pig News and Information* 22:87N-99N.

D'Souza D. N. i B. P. Mullan (2002). The effect of genotype, sex and management strategy on the eating quality of pork. *Meat Science* 60:95-101.

DARP (2000). *El sector agrari a Catalunya (1986-2000)*.

Dávalos G., A. Sánchez, O. Vidal, J. L. Noguera i M. Amills (2003). Structural characterization of the porcine pyruvate carboxylase (*PC*) gene. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120:338-345.

Day D. A. i M. F. Tuite (1998). Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *Journal of Endocrinology* 157:361-371.

De Koning D. J., L. L. G. Janss, A. P. Rattink, P. A. M. von Oers, B. J. de Vries, M. A. M. Groenen, J. J. van der Poel, P. N. de Groot, E. W. Brascamp i J. A. M. van Arendonk (1999). Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). *Genetics* 152:1679-1690.

De Koning D. J., A. P. Rattink, B. Harlizius, J. A. van Arendonk, E. W. Brascamp i M. A. Groenen (2000). Genome-wide scan for body composition in pigs reveals important role of imprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:7947-7950.

De Koning D. J., B. Harlizius, A. P. Rattink, M. A. M. Groenen, E. W. Brascamp i J. A. M. van Arendonk (2001). Detection and characterization of quantitative trait loci for meat quality traits in pigs. *Journal of Animal Science* 79:2812-2819.

De Koning D. J., R. Pong-Wong, L. Varona, G. J. Evans, E. Giuffra, A. Sanchez, G. Plastow, J. L. Noguera, L. Andersson i C. S. Haley (2003). Full pedigree quantitative trait locus analysis in commercial pigs using variance components. *Journal of Animal Science* 81:2155-2163.

Delahunty C., W. Ankener, Q. Deng, J. Eng i D. A. Nickerson (1996). Testing the feasibility of DNA typing for human identification by PCR and an oligonucleotide ligation assay. *American Journal of Human Genetics* 58:1239-1246.

Desautels C., J. P. Bidanel, D. Milant, N. Iannuccelli, Y. Amigues, F. Bourgeois, J. C. Caritez, C. Renard, C. Chevalet i P. Mormede (2002). Genetic linkage mapping of quantitative trait loci for behavioral and neuroendocrine stress response traits in pigs. *Journal of Animal Science* 80:2276-2285.

Di Marco S., Z. Hel, C. Lachance, H. Furneaux i D. Radzioch (2001). Polymorphism in the 3'-untranslated region of TNF α mRNA impairs binding of the post-transcriptional regulatory protein HuR to TNF α mRNA. *Nucleic Acids Research* 29:863-871.

Diestre A. i M. Gispert (1993). El sistema de clasificación de canales porcinos en la CEE. *Porci* 13:19-24.

Dragos-Wendrich M., G. Moser, H. Bartenschlager, G. Reiner i H. Geldermann (2003a). Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 10. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120:82-88.

Dragos-Wendrich M., G. Moser, H. Bartenschlager, G. Reiner i H. Geldermann (2003b). Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 11. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120:89-94.

Dragos-Wendrich M., I. Sternstein, C. Brunsch, G. Moser, H. Bartenschlager, G. Reiner i H. Geldermann (2003c). Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 14. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120:111-118.

Dragos-Wendrich M., A. Stratil, J. Hojny, G. Moser, H. Bartenschlager, G. Reiner i H. Geldermann (2003d). Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 18. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120:138-143.

Edfors-Lilja I., E. Wattring, L. Marklund, M. Moller, L. Andersson-Eklund, L. Andersson i C. Fossum (1998). Mapping quantitative trait loci for immune capacity in the pig. *The Journal of Immunology* 161:829-835.

Edfors-Lilja I., E. Wattring, L. Andersson i C. Fossum (2000). Mapping quantitative trait loci for stress induced alterations in porcine leukocyte numbers and functions. *Animal Genetics*. 31:186-193.

Ellegren H., B. Chowdhary, M. Johansson i L. Andersson (1994). Integrating the porcine physical and linkage map using cosmid-derived markers. *Animal Genetics* 25:155-164.

Escribano (1995). El sector porcino en la Unión Europea. *Porci* 30:11-25.

Evans G. J., E. Giuffra, A. Sánchez, S. Kerje, G. Dávalos, O. Vidal, S. Illán, J. L. Noguera, L. Varona, I. Velander, O. I. Southwood, D. J. de Koning, C. S. Haley, G. Plastow i L. Andersson

(2003). Identification of quantitative trait loci for production traits in commercial pig populations. *Genetics* 164:621-627.

Falconer D. S. i T. F. C McKay (1996). *Introduction to quantitative genetics*, 4th edition. Ed. Harlow Longman.

Fujii J., K. Otsu, F. Zorzato, S. de Leon, V. K. Khanna, J. E. Weiler, P. J. O'Brien i D. H. MacLennan (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253:448-451.

Geldermann H., E. Müller, P. Beeckmann, C. Knorr, G. Yue i G. Moser (1996). Mapping of quantitative-trait loci by means of marker genes in F₂ generations of Wild Boar, Pietrain and Meishan pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 113:381-387.

Geldermann H., E. Müller, G. Moser, G. Reiner, H. Bartenschlager, S. Cepica, A. Stratil, J. Kuryl, C. Moran, R. Davoli i C. Brunsch (2003). Genome-wide linkage and QTL mapping in porcine F₂ families generated from Pietrain, Meishan and Wild Boar crosses. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120:363-393.

Giuffra E., J. M. Kijas, V. Amarger, O. Carlborg, J. T. Jeon i L. Andersson (2000). The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* 154:1785-1791.

Green P., K. Falls and S. Crooks (1990). *Documentation for CRI-MAP, version 2.4*. Washington University School of Medicine, St Louis, MO.

Grindflek E., J. Szyda, Z. Liu i S. Lien (2001). Detection of quantitative trait loci for meat quality in a commercial slaughter pig cross. *Mammalian Genome* 12:299-304.

Haldane J. B. S. (1919). The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. *Journal of Genetics* 8:299-309.

Haley C. S. i S. A. Knott (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69: 315-324.

Hamasima N., H. Suzuki, A. Mikawa, T. Morozumi, G. Plastow i T. Mitsuhashi (2003). Construction of a new porcine whole-genome framework map using a radiation hybrid panel. *Animal Genetics*. 34:216-220.

Harley L. (2004). Survey of pig population in spring 2003, and production forecasts for 2004. *Statistics in Focus* May 2004.

Harlizius B., A. P. Rattink, D. J. de Koning, M. Faivre, R. G. Joosten, J. A. M. van Arendonk i M. A. M. Groenen (2000). The X chromosome harbors quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs. *Mammalian Genome* 11:800-802.

Hazel L. N., G. E. Dickerson i A. E. Freeman (1994). The selection index--then, now, and for the future. *Journal of Dairy Science* 77:3236-3251.

Hirooka H., D. J. De Koning, B. Harlizius, J. A. van Arendonk, A. P. Rattink, M. A. Groenen, E. W. Brascamp i H. Bovenhuis (2001). A whole-genome scan for quantitative trait loci affecting teat number in pigs. *Journal of Animal Science*. 79:2320-2326.

Hsu T. M., S. M. Law, S. Duan, B. P. Neri i P. Y. Kwok (2001). Genotyping single-nucleotide polymorphisms by the invader assay with dual-color fluorescence polarization detection. *Clinical Chemistry* 47:1373-1377.

Jeon J. T., Ö. Carlborg, A. Törnsten, E. Giuffra i V. Amarger (1999). A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the *IFG2* locus. *Nature Genetics* 21:157-158.

King A. H., Z. Jiang, J. P. Gibson, C. S. Haley i A. L. Archibald (2003). Mapping quantitative trait loci affecting female reproductive traits on porcine chromosome 8. *Biology of Reproduction* 68:2172-2179.

Kinghorn, B. i J. van der Werf (2000). Identifying and incorporating genetic markers and major genes in animal breeding programs. Course notes, Belo Horizonte.

Knap P. W. (2002). Genetic influences on lean growth, maintenance requirements and nutrient intake in growing pigs. *Pig News and Information* 23:55N-58N.

Knott S. A., L. Marklund, C. S. Haley, K. Andersson, W. Davies, H. Ellegren, M. Fredholm, I. Hansson, B. Hoyheim, K. Lundström, M. Moller i L. Andersson (1998). Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred Wild Boar and Large White pigs. *Genetics* 149:1069-1080.

Kosambi D. D. (1944). The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenetics* 12:172-175.

Lande R. i R. Thompson (1990). Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124:743-756.

Lander E. S. i D. Botstein (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199.

Lander E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.

Laval G., N. Iannuccelli, C. Legault, D. Milan, M. A. Groenen, E. Giuffra, L. Andersson, P. H. Nissen, C. B. Jorgensen, P. Beeckmann, H. Geldermann, J. L. Foulley, C. Chevalet i L. Ollivier (2000). Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genetics Selection and Evolution* 32:187-203.

Lee C., Y. Chung i J. H. Kim (2003). Quantitative trait loci mapping for fatty acid contents in the backfat on porcine chromosomes 1, 13, and 18. *Molecular Cell* 15:62-67.

Li S. J., S. H. Yang, S. H. Zhao, B. Fan, M. Yu, H. S. Wang, M. H. Li, B. Liu, T. A. Xiong i K. Li (2004). Genetic diversity analyses of 10 indigenous Chinese pig populations based on 20 microsatellites. *Journal of Animal Science* 82:368-374.

Livak K. J. (1999). Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Analysis* 14:143-149.

Lizardi P. M., X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D. C. Thomas i D. C. Ward (1998). Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nature Genetics* 19:225-232.

Malek M., J. C. M. Dekkers, H. K. Lee, T. J. Bass i M. F. Rothschild (2001a). A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. I. Growth and body composition. *Mammalian Genome* 12:630-636.

Malek M., J. C. M. Dekkers, H. K. Lee, T. J. Bass, K. Prusa, E. Huff-Lonergan i M. F. Rothschild (2001b). A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. *Mammalian Genome* 12:637-645.

Marklund L., M. M. Johansson, B. Hoyheim, W. Davies, M. Fredholm, R. K. Juneja, P. Mariani, W. Coppieters, H. Ellegren i L. Andersson (1996). A comprehensive linkage map of the pig based on a wild pig-Large White intercross. *Animal Genetics* 27:255-269.

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

Martinez A. M., J. V. Delgado, A. Rodero i J. L. Vega-Pla (2000). Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. *Animal Genetics* 31:295-301.

Milan D., J. T. Jeon, C. Looft, V. Amarger, A. Robic, M. Thelander, C. Rogel-Gaillard, S. Paul, N. Iannuccelli, L. Rask, H. Ronne, K. Lundstrom, N. Reinsch, J. Gellin, E. Kalm, P. L. Roy, P.

- Chardon i L. Andersson (2000). A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science* 288:1248-1251.
- Milan D., J. P. Bidanel, N. Iannuccelli, J. Riquet, Y. Amigues, J. Gruand, P. Le Roy, C. Renard i C. Chevalet (2002). Detection of quantitative trait loci for carcass composition traits in pigs. *Genetics Selection and Evolution* 34:705-728.
- Morales J., J. F. Perez, S. M. Martin-Orue, M. Fondevila i J. Gasa (2002). Large bowel fermentation of maize or sorghum-acorn diets fed as a different source of carbohydrates to Landrace and Iberian pigs. *British Journal of Nutrition* 88:489-498.
- Mourot J. i M. Kouba (1999). Development of intra and intermuscular adipose tissue in growing large white and Meishan pigs. *Reproduction Nutrition Development* 39:125-132.
- Nagamine Y., C. S. Haley, A. Sewalem i P. M. Visscher (2003). Quantitative trait loci variation for growth and obesity between and within lines of pigs (*Sus scrofa*). *Genetics* 164:629-635.
- Nagamine Y., P. M. Visscher i C. S. Haley (2004). QTL detection and allelic effects for growth and fat traits in outbred pig populations. *Genetics Selection and Evolution* 36:83-96.
- Nezer C., L. Moreau, B. Brouwers, W. Coppieters, J. Dettleux, R. Hanset, L. Karim, A. Kvasz, P. Leroy i G. Michel (1999). An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the *IGF2* locus in pigs. *Nature Genetics* 21:155-156.
- Nezer C., L. Moreau, D. Wagenaar i M. Georges (2002). Results of a whole genome scan targeting QTL for growth and carcass traits in a Piétrain x Large White intercross. *Genetics Selection and Evolution* 34:371-387.
- Nunes M., Y. Lahbib-Mansais, C. Geffrotin, M. Yerle, M. Vaiman i C. Renard (1996). Swine cytosolic malic enzyme: cDNA cloning, sequencing, and localization. *Mammalian Genome* 7:815-821.
- Óvilo C., M. Pérez-Enciso, C. Barragán, A. Clop, C. Rodríguez, M. A. Oliver, M. A. Toro i J. L. Noguera (2000). A QTL for intramuscular fat and backfat thickness is located on porcine chromosome 6. *Mammalian Genome* 11:344-346.
- Óvilo C., A. Clop, J. L. Noguera, M. A. Oliver, C. Barragán, C. Rodríguez, L. Silió, M. A. Toro, A. Coll, J. M. Folch, A. Sánchez, D. Babot, L. Varona i M. Pérez-Enciso (2002a). Quantitative trait locus mapping for meat quality traits in an Iberian x Landrace F₂ pig population. *Journal of Animal Science* 80:2801-2808.
- Óvilo C., M. A. Oliver, J. L. Noguera, A. Clop, C. Barragán, L. Varona, C. Rodríguez, M. A. Toro, A. Sánchez, M. Pérez-Enciso i L. Silió (2002b). Test for positional candidate genes for body composition on pig chromosome 6. *Genetics Selection and Evolution* 34:465-479.

Pastinen T., M. Raitio, K. Lindroos, P. Tainola, L. Peltonen i A. C. Syvanen (2000). A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome Research* 10:1031-1042.

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

Paszek A. A., P. J. Wilkie, G. H. Flickinger, L. M. Miller, C. F. Louis, G. A. Rohrer, L. J. Alexander, C. W. Beattie i L. B. Schook (2001). Interval mapping of carcass and meat quality traits in a divergent swine cross. *Animal Biotechnology* 12:155-165.

Paterson A. H., E. S. Lander, J. D. Hewitt, S. Peterson, S. E. Lincoln i S. D. Tanksley (1988). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335:721-726.

Pérez-Enciso M., A. Clop, J. L. Noguera, C. Óvilo, A. Coll, J. M. Folch, D. Babot, J. Estany, M. A. Oliver, I. Díaz i A. Sánchez (2000). A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: Evidence from and Iberian by Landrace intercross. *Journal of Animal Science* 78:2525-2531.

Quintanilla R., D. Milan i J. P. Bidanel (2002). A further look at quantitative trait loci affecting growth and fatness in a cross between Meishan and Large White pig populations. *Genetics Selection and Evolution* 34:193-210.

Quintanilla R., O. Demeure, J. P. Bidanel, D. Milan, N. Iannuccelli, Y. Amigues, J. Gruand, C. Renard, C. Chevalet i M. Bonneau (2003). Detection of quantitative trait loci for fat androstenone levels in pigs. *Journal of Animal Science* 81:385-394.

Rathje T. A., G. A. Rohrer i R. K. Johnson (1997). Evidence for quantitative trait loci affecting ovulation rate in pigs. *Journal of Animal Science* 75:1486-1494.

Rattink A. P., D. J. de Koning, M. Faivre, B. Harlizius, J. A. M. van Arendonk i M. A. M. Groenen (2000). Fine mapping and imprinting analysis for fatness trait QTLs in pigs. *Mammalian Genome* 11:656-661.

Rattink A. P., M. Faivre, B. J. Jungerius, M. A. Groenen i B. Harlizius (2001). A high-resolution comparative RH map of porcine chromosome (SSC) 2. *Mammalian Genome* 12:366-370.

Ren J., C. Knorr, F. Habermann, R. Fries, L. S. Huang i B. Brenig (2003). Assignment of the porcine stearoyl-CoA desaturase (SCD) gene to SSC14q27 by fluorescence in situ hybridization and by hybrid panel mapping. *Animal Genetics* 34:471-473.

- Ren J., C. Knorr, Y. M. Guo, N. S. Ding, H. S. Ai, B. Brenig i L. S. Huang (2004). Characterization of five single nucleotide polymorphisms in the porcine stearoyl-CoA desaturase (SCD) gene. *Animal Genetics* 35:255-257.
- Rohrer G. A., L. J. Alexander, J. W. Keele, T. P. Smith i C. W. Beattie (1994). A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics* 136:231-245.
- Rohrer G. A., L. J. Alexander, Z. Hu, T. P. Smith, J. W. Keele i C. W. Beattie (1996). A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Research* 6:371-391.
- Rohrer G. A. i J. W. Keele (1998a). Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: I. Fat deposition traits. *Journal of Animal Science* 76:2247-2254.
- Rohrer G. A. i J. W. Keele (1998b). Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: II. Muscling and wholesale product yield traits. *Journal of Animal Science* 76:2255-2262.
- Rohrer G. A., J. J. Ford, T. H. Wise, J. L. Vallet i R. K. Christenson (1999). Identification of quantitative trait loci affecting female reproductive traits in a multigeneration Meishan-White composite swine population. *Journal of Animal Science* 77:1385-1391.
- Rohrer G. A. (2000). Identification of quantitative trait loci affecting birth characters and accumulation of backfat and weight in a Meishan-White Composite resource population. *Journal of Animal Science* 78:2547-2553.
- Rohrer G. A., T. H. Wise, D. D. Lunstra i J. J. Ford (2001). Identification of genomic regions controlling plasma FSH concentrations in Meishan-White Composite boars. *Physiological Genomics* 6:145-151.
- Rohrer G. A., J. E. Beever, M. F. Rothschild, L. Schook, R. Gibbs i G. Weinstock (2003). *Porcine Genome Sequencing Initiative*.
- Ronaghi M., M. Uhlen i P. Nyren (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281:363, 365-
- Rothschild M. F., H. C. Liu, C. K. Tuggle, T. P. Yu i L. Wang (1995). Analysis of pig chromosome 7 genetics markers for growth and carcass performance traits. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 112:341-348.
- Rothschild M. F. (2003). Advances in pig genomics and functional gene discovery. *Comparative and Functional Genomics* 4:266-270.
- Rosenvold i Andersson (2003). Factors of significance for pork quality – a review. *Meat Science* 64:219-237.

- Saiki R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich i N. Arnheim (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Sanchez M. P., J. P. Bidanel, S. Zhang, J. Naveau, T. Burlot i P. Le Roy (2003). Likelihood and Bayesian analyses reveal major genes affecting body composition, carcass, meat quality and the number of false teats in a Chinese European pig line. *Genetics Selection and Evolution* 35:385-402.
- Sato S., Y. Oyamada, K. Atsuji, T. Nade, S. Sato, E. Kobayashi, T. Mitsuhashi, K. Nirasawa, A. Komatsuda, Y. Saito, S. Terai, T. Hayashi i Y. Sugimoto (2003). Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a Meishan x Duroc F2 resource population. *Journal of Animal Science* 81:2938-2949.
- Sax K. (1923). The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8:552-552.
- Sellier, P. (1998). Genetics of meat and carcass traits, in *The Genetics of the Pig*. M.F. Rothschild and A. Ruvinsky, ed. Cab International, New York.
- Shi M. M. (2001). Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clinical Chemistry* 47:164-172.
- Shechter, I., P. Dai, L. Huo i G. Guan (2003). IDH1 gene transcription is sterol regulated and activated by SREBP-1a and SREBP-2 in human hepatoma HepG2 cells: evidence that IDH1 may regulate lipogenesis in hepatic cells. *Journal of Lipid Research* 44:2169-2180.
- Singer D.S., L. J. Parent i R. Ehrlich (1987). Identification and DNA sequence of an interspersed repetitive DNA element in the genome of the miniature swine. *Nucleic Acids Research* 15:2780.
- Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98:503-517.
- Szyda J., E. Grindflek, Z. Liu i S. Lien (2003). Multivariate mixed inheritance models for QTL detection on porcine chromosome 6. *Genetical Research* 81:65-73.
- Tan W., X. Fang, J. Li i X. Liu (2000). Molecular beacons: a novel DNA probe for nucleic acid and protein studies. *Chemistry*. 6:1107-1111.
- Tibau J. (1992). Mejora de los caracteres productivos en el ganado porcino. *Porci* 7:11-21.
- Tischendorf F., P. Mockel, F. Schone, M. Plonne i G. Jahreis (2002). Effect of dietary conjugated linoleic acids on the distribution of fatty acids in serum lipoprotein fractions and

different tissues of growing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)* 86:313-325.

Tomàs A., J. Estelle, A. Clop, L. Gomez-Raya, J. L. Noguera, A. Sanchez i M. Amills (2003). Assignment of the mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) gene to porcine chromosome 14. *Animal Genetics*. 34:387-

Toro M. A. i L. Silió (1992). La mejora de la selección porcina. *Porci* 7:69-78.

Van Laere A. S., M. Nguyen, M. Braunschweig, C. Nezer, C. Collette, L. Moreau, A. L. Archibald, C. S. Haley, N. Buys, M. Tally, G. Andersson, M. Georges i L. Andersson (2003). A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature* 425:832-836.

Van Oeckel M. J., N. Warnants i Ch. V. Bouqué (2000). Factors affecting the eating quality of pork. *Annual BSAS Meetings*, pàg. 122.

Varona L., L. A. Garcia-Cortes i M. Perez-Enciso (2001). Bayes factors for detection of quantitative trait loci. *Genetics Selection and Evolution* 33:133-152.

Varona L., C. Óvilo, A. Clop, J. L. Noguera, M. Pérez-Enciso, A. Coll, J. M. Folch, C. Barragán, M. A. Toro, D. Babot i A. Sánchez (2002). QTL mapping for growth and carcass traits in an Iberian by Landrace pig intercross: additive, dominant and epistatic effects. *Genetical Research* 80:145-154.

Varona L., L. Gomez-Raya, W. M. Rauw, A. Clop, C. Ovilo i J. L. Noguera (2004). Derivation of a Bayes factor to distinguish between linked or pleiotropic quantitative trait loci. *Genetics* 166:1025-1035.

Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, L. T. van de, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper i . (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.

Wada Y., T. Akita, T. Awata, T. Furukawa, N. Sugai, Y. Inage, K. Ishii, Y. Ito, E. Kobayashi, H. Kusumoto, T. Matsumoto, S. Mikawa, M. Miyake, A. Murase, S. Shimanuki, T. Sugiyama, Y. Uchida, S. Yanai i H. Yasue (2000). Quantitative trait loci (QTL) analysis in a Meishan x Gottingen cross population. *Animal Genetics*. 31:376-384.

Walling G. A., A. L. Archibald, J. A. Cattermole, A. C. Downing, H. A. Finlayson, D. Nicholson, P. M. Visscher, C. A. Walker i C. S. Haley (1998). Mapping of quantitative trait loci on porcine chromosome 4. *Animal Genetics* 29:415-424.

Walling G. A., P. M. Visscher, L. Andersson, M. F. Rothschild, L. Wang, G. Moser, M. A. M. Groenen, J. P. Bidanel, S. Cepica, A. L. Archibald, H. Geldermann, D. J. de Koning, D. Milan i

C. S. Haley (2000). Combined analyses of data from quantitative trait loci mapping studies: chromosome 4 effects on porcine growth and fatness. *Genetics* 155:1369-1378.

Wang L., T. P. Yu, C. K. Tuggle, H. C. Liu i M. F. Rothschild (1998). A direct search for quantitative trait loci on chromosomes 4 and 7 in pigs. *Journal of Animal Science* 76:2560-2567.

Weiler F. i R. Poschacher (2003). Estimated pig production to the second quarter of 2003 and survey on pig populations in April, May and June 2002. *Statistics in Focus* March 2004.

Whittemore, C. (1993). *Ciencia y práctica de la producción porcina*. Ed. Acribia S.A., Zaragoza, España.

Wilkie P. J., A. A. Paszek, C. W. Beattie, L. J. Alexander, M. B. Wheeler i L. B. Schook (1999). A genomic scan of porcine reproductive traits reveals possible quantitative trait loci (QTLs) for number of corpora lutea. *Mammalian Genome* 10:573-578.

Williams J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski i S. V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.

Wimmers K., E. Murani, S. Ponsuksili, M. Yerle i K. Schellander (2002a). Detection of quantitative trait loci for carcass traits in the pig by using AFLP. *Mammalian Genome* 13:206-210.

Wimmers K., S. Ponsuksili, U. Blaser, J. Gellin i K. Schellander (2002b). Chromosomal assignments for porcine genes encoding enzymes in hepatic metabolic pathways. *Animal Genetics* 33:255-263.

Wintero A. K., C. B. Jorgensen, A. Robic, M. Yerle i M. Fredholm (1998). Improvement of the porcine transcription map: localization of 33 genes, of which 24 are orthologous. *Mammalian Genome* 9:366-372.

Yasue H., S. Mikawa, H. Uenishi i Y. Wada (1999). Analysis of allele segregation distortion in a swine resource family. *Animal Biotechnology* 10:147-152.

Yerle M., P. Pinton, C. Delcros, N. Arnal, D. Milan i A. Robic (2002). Generation and characterization of a 12,000-rad radiation hybrid panel for fine mapping in pig. *Cytogenetic and Genome Research* 97:219-228.

Yerle M., P. Pinton, A. Robic, A. Alfonso, Y. Palvadeau, C. Delcros, R. Hawken, L. Alexander, C. Beattie, L. Schook, D. Milan i J. Gellin (1998). Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs. *Cytogenetic and Genome Research* 82:182-188.

Yue G. H., H. Bartenschlager, G. Moser i H. Geldermann (2000). Identification of QTL affecting important traits on porcine chromosome 12. *Yi Chuan Xue Bao* 27:858-865.

Yue G. H., V. Russo, R. Davoli, I. Sternstein, C. Brunsch, D. Schröffelova, A. Stratil, G. Moser, H. Bartenschlager, G. Reiner, H. Geldermann (2003). Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 13. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120:103.