

MASTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y
BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

***“Análisis de asociación genómico de caracteres
relacionados con la calidad de la carne y la grasa
intramuscular en cerdos Duroc”.***

Tesis de Máster
Barcelona, Septiembre 2013

Rayner González Prendes

Director:

Dr. Marcel Amills Eras

Dra. Arianna Manunza

El Dr. **Marcel Amills Eras**, profesor agregado del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona e investigador del Centre de Recerca en Agrigenòmica y la Dra. **Arianna Manunza**, investigadora del Centre de Recerca en Agrigenòmica.

Certifican que **Rayner González Prendes**, ha realizado bajo su supervisión, el trabajo de investigación titulado "*Análisis de asociación genómico de caracteres relacionados con la calidad de la carne y la grasa intramuscular en cerdos Duroc*". La culminación y defensa del trabajo forma parte del ejercicio final para la obtención del título de Máster Interuniversitario en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción impartido por la Universidad Autónoma de Barcelona y la Universidad Politécnica de Valencia.

Bellaterra, 30 de Julio de 2013.

Dr. Marcel Amills Eras.



Dra. Arianna Manunza



AGRADECIMIENTOS

En la vida se está en constante intercambio con personas que de una forma u otra aportan valiosas enseñanzas; por tal motivo, aprovecho estas líneas para agradecer a todos los que han hecho posible la realización y culminación de esta tesina de Máster.

En primer lugar quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Marcel Amills por aceptarme en su grupo de investigación para realizar esta tesina y por el importante aporte realizado a mi formación, tanto profesional como personal, con sus correcciones, consejos, paciencia, profesionalidad y exigencia ante al trabajo.

Agradezco a mi codirectora Arianna Manunza por la correcta orientación, por la inmensa paciencia que ha tenido ante mis interminables preguntas y por el conocimiento que no ha dudado en brindarme.

Deseo manifestar mi agradecimiento y admiración a todos los integrantes del grupo de Genética Animal del Centre de Recerca en Agrigènomic (Ana Puig, Sandra Contreras, Antonia Noce, María Ballester, Verónica Martínez, Sarai Córdoba, Tania Guil, Jordi Corominas, Yulixis Ramayo, Alex Clop, Armand Sánchez, Josep M. Folch, Sebastián Ramos, Miguel Pérez- Enciso) por la calidad humana que han mostrado. Un particular reconocimiento de mi parte llegue a la ayuda y a la amistad brindada por Erica Bianco y William O. Burgos.

Del mismo modo agradezco a todos mis compañeros de máster con los que he convivido durante casi un año, en especial a Marcia, Marina Tomsic, Marina Martínez, Flavia, Manuel y Antonio, los llevaré siempre presentes como amigos incondicionales.

Mis más profundas muestras de agradecimiento lleguen a la Fundación Carolina y al Instituto Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ) por las becas otorgadas en el primer y segundo año, respectivamente, para cursar el Máster, y a todos los profesores por poner sus conocimientos a nuestra disposición.

También quiero hacer llegar mi gratitud a las personas que son el sustento que mantiene mi espíritu: a mi madre, Maura Prendes, por el amor inmenso e infinito que tiene para con sus hijos; a mi padre, Ramón González, que siempre me ha apoyado en todo; y a mi querida hermana, Maybel González, que es un ejemplo de perseverancia y dedicación.

Gracias a mi bella esposa Yinette Cala por estar a mi lado durante todo este tiempo y por su inmenso apoyo durante los momentos más difíciles.

Quiero agradecer a mis amigos en Cuba: Biacheslav y Leandro, y a mis amigos de la infancia por su permanente amistad.

A todos los citados y a los que no he podido incluir pero que han aportado algo de una forma u otra a la realización de este trabajo, les doy mi agradecimiento más profundo.

Rayner.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo consiste en realizar un análisis de asociación genómico (GWAS) para identificar regiones genómicas relacionadas con la variación fenotípica de dos grupos de caracteres medidos en los músculos *longissimus dorsi* y *gluteus medius*: 1) Porcentaje y composición (palmítico, esteárico, oleico y linoleico) de la grasa intramuscular; 2) Calidad de la carne: pH a las 24 horas post-mortem (pH₂₄), conductividad eléctrica y tres valores Minolta (rojez a*, luminosidad L* y amarillez b*). Cabe destacar que aunque el contenido y la composición de la grasa intramuscular también pueden entenderse como fenotipos de calidad de la carne, en el presente trabajo los hemos tratado de forma separada.

Se genotiparon 352 cerdos *Duroc* (Población Lipgen) con el *PorcineSNP60 BeadChip* (*Illumina*), el cual permite analizar en formato multiplex 62,163 polimorfismos nucleotídicos sencillos (SNPs), y se llevaron a cabo los análisis de asociación con los programas GenABEL y EMMAX. La proporción de la varianza fenotípica explicada por los SNPs para el contenido de la grasa intramuscular (h^2_{SNP}), estimada con tres programas distintos (GenABEL, EMMAX y GEMMA), fluctuó entre 0.48-0.61 (*longissimus dorsi*) y 0.47-0.52 (*gluteus medius*). Para la composición de la grasa intramuscular, en cambio, las estimaciones oscilaron entre 0 y 0.32. En cuanto a los caracteres de calidad de la carne, las h^2_{SNP} tomaron valores entre 0 y 0.31 excepto para el color rojo a* ($h^2_{\text{SNP}} = 0.42-0.48$ en *longissimus dorsi* y 0.47-0.55 en *gluteus medius*).

Las principales asociaciones descritas en este trabajo (es decir, aquellas que son significativas a nivel genómico y son detectadas tanto por GenABEL como por EMMAX) corresponden al porcentaje de ácido esteárico en el cromosoma porcino 14 (SSC14, 120.9-124.4 Mb, para ambos músculos) y en el SSC4 (63.9 Mb, sólo para el músculo *gluteus medius*). Se han hallado también asociaciones significativas a nivel genómico para el ácido palmítico (SSC5, 71.7-80.1 Mb; SSC6, 135.1-136.0 Mb) y para el contenido de grasa intramuscular (SSC6, 135.0-

136.0 Mb), aunque en estos casos no hubo coincidencia entre ambos programas. A nivel cromosómico, EMMAX y GenABEL coincidieron en la detección de asociaciones para los porcentajes de esteárico de *gluteus medius* (SSC4 y SSC14) y *longissimus dorsi* (SSC14), así como para palmítico de *gluteus medius* (SSC5). En cuanto a fenotipos relacionados con la calidad de la carne, únicamente se hallaron asociaciones significativas a nivel cromosómico. GenABEL y EMMAX mostraron resultados concordantes para la rojez de la carne (músculo *gluteus medius*) en el SSC3 (16.6-16.7 Mb y 50.2-56.1 Mb), para la conductividad eléctrica del músculo *longissimus dorsi* en el SSC4 (104.2-106.5 Mb) y en el SSC5 (14.4-16.1Mb), y para la conductividad eléctrica del músculo *gluteus medius* también en el SSC5 (13.0-15.7 Mb).

En general, y tanto para los caracteres vinculados a la calidad de la carne como para los relacionados con la grasa intramuscular, se observó muy poca concordancia posicional en cuanto a las asociaciones obtenidas para *gluteus medius* y *longissimus dorsi*, lo cual sugiere que la variación de estos fenotipos está influida por factores genéticos músculo-específicos. Por último se realizó una lista de los genes candidatos situados en las distintas regiones descritas anteriormente. Cabe destacar el gen de la *estearoil-CoA desaturasa*, que se encuentra a solo 5.9 kb del SNP más significativo de la región de SSC14 asociada, a nivel genómico, con el ácido esteárico.

SUMMARY

The goal of the current work was to perform a genome-wide association analysis (GWAS) in order to identify genomic regions associated with the phenotypic variation of two groups of traits measured in the *longissimus dorsi* and *gluteus medius* muscles: 1) Intramuscular fat content and composition (palmitic, stearic, oleic and linoleic); 2) Meat quality: pH at 24 hours post-mortem (pH₂₄), electric conductivity and three Minolta values (redness a*, lightness L* and yellowness b*). Although intramuscular fat phenotypes can be considered as meat quality traits, in this study we have treated them separately.

About 352 *Duroc* pigs (Lipgen population) were typed with the *PorcineSNP60 BeadChip* (Illumina), that allows the multiplexed analysis of 62,163 single nucleotide polymorphisms (SNPs). Association analyses were carried out with the GenABEL and EMMAX softwares. The amount of phenotypic variance explained by the SNPs for intramuscular fat content (h^2_{SNP}), estimated with three different softwares (GenABEL, EMMAX and GEMMA), ranged between 0.48-0.61 (*longissimus dorsi*) and 0.47-0.52 (*gluteus medius*). For intramuscular fat composition, h^2_{SNP} estimates ranged between 0 and 0.32. In the case of meat quality traits, h^2_{SNP} took values between 0 and 0.31 except for redness ($h^2_{\text{SNP}} = 0.42-0.48$ for the *longissimus dorsi* and 0.47-0.55 for the *gluteus medius*).

The main associations described in the current work (i.e. those that are genome-wide significant and that are consistently detected by GenABEL and EMMAX) correspond to stearic content at SSC14 (120.9-124.4 Mb, both muscles) and at SSC4 (63.9 Mb, only in the *gluteus medius*). We have also found genome-wide significant associations for palmitic content (SSC5, 71.7-80.1 Mb; SSC6, 135.1-136.0 Mb) and intramuscular fat percentage (SSC6, 135.0-136.0 Mb), but these associations were not confirmed by both programs. Chromosome-wide significant associations were detected by both EMMAX and GenABEL for stearic content in the *gluteus medius* (SSC4 and SSC14) and *longissimus dorsi* (SSC14) as well as for the palmitic content of the *gluteus medius* (SSC5). With regard to

meat quality traits, we only found chromosome-wide significant associations. GenABEL and EMMAX showed concordance for redness (*gluteus medius*) at the SSC3 (16.6-16.7 Mb, 50.2-56.1 Mb), electric conductivity of the *longissimus dorsi* at SSC4 (104.2-106.5 Mb) and at SSC5 (14.4-16.1 Mb) as well as for the electric conductivity of the *gluteus medius*, also at SSC5 (13.0-15.7 Mb).

In general, we observed a limited positional concordance between the GWAS maps generated for the *gluteus medius* and *longissimus dorsi* muscles, suggesting that the variation of these phenotypes is influenced by muscle-specific genetic factors. Finally, we have made a list of candidate genes mapping to the trait-associated regions. In this regard, it is worth to mention the *stearoyl-CoA desaturase* gene located at 5.9 kb of the SSC14 SNP most significantly associated with stearic content.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS:	I
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. IMPORTANCIA NUTRICIONAL Y TECNOLÓGICA DE LOS CARACTERES VINCULADOS AL PORCENTAJE Y A LA COMPOSICIÓN DE LA GRASA.	1
1.2. ABSORCIÓN Y DEPÓSITO DE LÍPIDOS EN LA CÉLULA MUSCULAR ESQUELÉTICA.	3
1.3. IMPORTANCIA DE LOS CARACTERES DE LA CALIDAD DE LA CARNE Y SU RELACIÓN CON LA ACEPTABILIDAD DE LA MISMA POR EL CONSUMIDOR.	5
1.4. HEREDABILIDADES DE LOS CARACTERES VINCULADOS A LA CALIDAD DE LA CARNE Y A LA GRASA INTRAMUSCULAR.....	8
1.5. ESTUDIOS DE QTL PARA FENOTIPOS RELACIONADOS CON LA GRASA INTRAMUSCULAR Y LA CALIDAD DE LA CARNE.	10
1.6. GENES CANDIDATOS.....	13
1.7. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN GENÓMICO (GWAS).....	17
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. MATERIAL ANIMAL.	35
3.2. DATOS GENOTÍPICOS.....	37
3.3. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN GENÓMICO (GWAS).....	38
3.4. ESTIMACIÓN DE LA HEREDABILIDAD.....	43
4. RESULTADOS	45
4.1. REGISTROS FENOTÍPICOS.....	45
4.2. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN GENÓMICO PARA CARACTERES RELACIONADOS CON EL PORCENTAJE Y LA COMPOSICIÓN DE LA GRASA INTRAMUSCULAR.	46
4.3. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN PARA CARACTERES RELACIONADOS CON LA CALIDAD DE LA CARNE.....	53
4.4. VARIANZA FENOTÍPICA EXPLICADA POR LOS MARCADORES.....	54

5. DISCUSIÓN.....	57
5.1. PROPORCIÓN DE LA VARIANZA FENOTÍPICA EXPLICADA POR LOS MARCADORES.....	57
5.2. CONCORDANCIA POSICIONAL CON OTROS ESTUDIOS GWAS REALIZADOS EN PORCINO.....	59
5.3. CONCORDANCIA POSICIONAL CON OTROS ESTUDIOS DE DETECCIÓN DE QTL REALIZADOS EN PORCINO.....	64
5.4. SEGREGACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS A CARACTERES BAJO ELECCIÓN EN POBLACIONES COMERCIALES.....	68
5.5. DIFERENCIAS ENTRE MAPAS GWAS PARA DOS MÚSCULOS PORCINOS.....	69
5.6. DETECCIÓN DE REGIONES PLEIOTRÓPICAS PARA CARACTERES LIPÍDICOS.....	70
5.7. GENES CANDIDATOS.....	71
6. CONCLUSIONES.....	75
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

Lista de abreviaturas:

p.e.	por ejemplo
i.e.	es decir (<i>id est</i>)
PUFA	ácidos grasos poliinsaturados (<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>)
MUFA	ácidos grasos monoinsaturados (<i>Monounsaturated Fatty Acid</i>)
SFA	ácidos grasos saturados (<i>Saturated Fatty Acid</i>)
TG	triacilglicerol
LPL	lipoproteína lipasa
DFD	carnes negras, firmes y secas (<i>Dark, Firm and Dry</i>)
PSE	carnes pálidas, blandas y exudativas (<i>Pale, Soft, Exudative</i>)
CE	conductividad eléctrica
LD	<i>longissimus dorsi</i>
GM	<i>gluteus medius</i>
QTL	Loci de caracteres cuantitativos (<i>Quantitative Trait Loci</i>)
GIM	grasa intramuscular
pH ₂₄	pH a las 24 horas post-sacrificio
aprox.	aproximadamente
cM	centimorgan
SSC	cromosoma de la especie porcina (<i>Sus Scrofa Chromosome</i>)
SNP	polimorfismo de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
GWAS	estudios de asociación del genoma completo (<i>Genome-wide association study</i>)
Pb	pares de base (<i>base pairs</i>)
Kb	kilo bases (<i>kilobase pairs</i>)
C14:0	ácido mirístico
C16:0	ácido palmítico
C16:1	ácido palmitoleico
C18:0	ácido esteárico
C18:1n9c	ácido oleico
C18:2n6c	ácido linoleico
C18:3	ácido alfa linolénico
C20:1	ácido eicosenoico
C20:2	ácido eicosadienoico
C20:4	ácido eicosatetraenoico

Capítulo I. Introducción.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Importancia nutricional y tecnológica de los caracteres vinculados al porcentaje y a la composición de la grasa.

Uno de los factores que más ha contribuido al incremento de la eficiencia de los sistemas de producción porcina ha sido la mejora genética centrada en caracteres de gran importancia económica como por ejemplo (p.e.) la productividad numérica, el crecimiento y la calidad de la canal. La selección a favor de canales más magras ha propiciado que el porcentaje de grasa de la canal experimentara una reducción de, aproximadamente, un 15% desde los años 60 hasta la actualidad (Wood y Whittemore, 2007). El acelerado crecimiento alcanzado en algunas razas porcinas ha conllevado a una disminución del porcentaje de grasa intramuscular (GIM) afectando negativamente a las características organolépticas de la carne (Wood et al., 2008)

El efecto del contenido de la GIM en la percepción de la calidad de la carne por parte de los consumidores fue evaluado por Brewer et al. (2001). Pudo verse que las chuletas con mayor aceptabilidad fueron las que presentaron un nivel de infiltración grasa entre bajo y medio, mientras que las chuletas con un contenido alto de grasa fueron más jugosas, tiernas y sabrosas que las correspondientes a carnes magras. Por el contrario Rincker et al. (2008) encontraron efectos opuestos en un trabajo similar (p.e. efecto limitado de la GIM en la jugosidad y sabor de la carne). El efecto de la GIM sobre las características organolépticas de la carne también puede variar según la raza p.e. Fernandez et al. (1999) en cerdos *Meslan* x *Landrace* detectaron asociaciones significativas entre la GIM y la jugosidad y el sabor de la carne, mientras que en cerdos *Duroc* x *Landrace* la asociación fue moderada. Por su parte, Blanchard et al. (2000) detectaron correlaciones cercanas a 0 entre la GIM y la jugosidad, ternura y sabor de la carne en las razas *Large White*, *British Landrace* y *Duroc*. Estas discrepancias evidencian que la percepción, por parte de los consumidores, de la calidad de la carne es muy

subjetiva y su variación depende de ciertos factores no contemplados en el diseño de los experimentos.

La composición de la GIM tiene un efecto importante a nivel tecnológico, dado que un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados tiene como consecuencia un aumento de la oxidación de los lípidos. A su vez, ello propicia la modificación del color de la carne, la aparición de un sabor rancio, el incremento de la pérdida de agua durante la cocción, y una disminución del tiempo de conservación (Wood et al., 2008). Se ha destacado la existencia de una relación entre GIM y los caracteres de firmeza, durabilidad y sabor de la carne. Se ha demostrado que el ratio de ácido esteárico/linoleico es el mejor predictor de la firmeza (Whittington et al., 1986). El punto de fusión de los ácidos grasos y las variaciones en su estructura molecular son los principales factores que explican el efecto de la composición de la GIM sobre la firmeza, viéndose que un incremento de los ácidos grasos insaturados conlleva a una disminución del punto de fusión de las grasas (Enser, 1984).

Desde el punto de vista de la salud humana, se ha descrito el efecto beneficioso de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, de su siglas en inglés) sobre la susceptibilidad a sufrir enfermedades alérgicas y autoinmunes como el asma, la enfermedad de Crohn (o colitis ulcerosa) y la artritis reumatoide (Calder, 2005). También se ha relacionado el consumo de PUFA con la reducción de la concentración de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y del colesterol total, disminuyendo el riesgo a sufrir patologías coronarias como el infarto del miocardio (Astrup et al., 2011). Por el contrario, los ácidos grasos saturados (SFA, de sus siglas en inglés) presentan una asociación de signo positivo con el riesgo de padecer enfermedades coronarias (Keys et al., 1986 y Wood et al., 2008) y de algunos tipos de cáncer como p.e. cáncer de colon y cáncer mamario (Wynder et al., 1997). A partir del estudio epidemiológico *Seven Countries Study*, se estableció la hipótesis “Dieta-Corazón” que plantea que altas ingestas de SFA y colesterol, combinadas con bajas ingestas de PUFA, aumentan el nivel de

colesterol total y con el tiempo, dan lugar al desarrollo de enfermedades coronarias (Keys et al., 1986).

1.2. Absorción y depósito de lípidos en la célula muscular esquelética.

Desde un punto de vista químico, la GIM está compuesta por fosfolípidos, triacilgliceroles (TG), mono- y diacilgliceroles, colesterol y ácidos grasos libres. En el miocito, la grasa se almacena preferentemente bajo la forma de TG, siendo la principal fuente de energía en el proceso de contracción muscular (Kiens, 2006). La absorción de los ácidos grasos (**Figura 1**) en el músculo esquelético se ve favorecida por la acción de la enzima lipoproteína lipasa (LPL), localizada en los capilares endoteliales. Esta enzima cataliza la hidrólisis de los TG, presentes en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-TGs) y en los quilomicrones (Kiens, 2006). En un principio, se asumió que el transporte a través de la membrana celular del miocito tenía lugar mediante un proceso de difusión pasiva (Hamilton et al., 2001). No obstante, estudios posteriores de Bonen et al. (2007) y Kampf et al. (2007) evidenciaron que este mecanismo no puede compensar la elevada demanda metabólica de las células musculares, e infirieron la existencia de un segundo mecanismo de transporte activo basado en la intervención de ciertas moléculas como p.e. *fatty acid binding protein* (FABP), *fatty acid translocase* (FAT) y *fatty acid transporter protein* (FATP). En la actualidad, se sabe que ambos mecanismos participan en la absorción de lípidos, aunque el proceso de transporte activo sería el más importante (Glatz et al., 2010).

Se ha observado que una elevada concentración de ácidos grasos libres en el plasma de individuos obesos, unido a la reducción de la oxidación de lípidos, comporta un aumento de TG (Corcoran et al., 2007). De este modo, el exceso de ácidos grasos libres es convertido en TG y almacenado para posteriormente, ser utilizado para la producción de energía mediante la β -oxidación de los ácidos grasos (Corcoran et al., 2007). La variación de la concentración de los transportadores de ácidos grasos libres en el sarcolema puede contribuir a regular

la absorción de ácidos grasos de forma transitoria, p.e. como consecuencia de la contracción muscular, se observa una disminución intracelular de la molécula FAT/CD36 en el sarcolema, por lo que se reduce el transporte de ácidos grasos hacia el interior de la célula (Bonen et al., 2000).

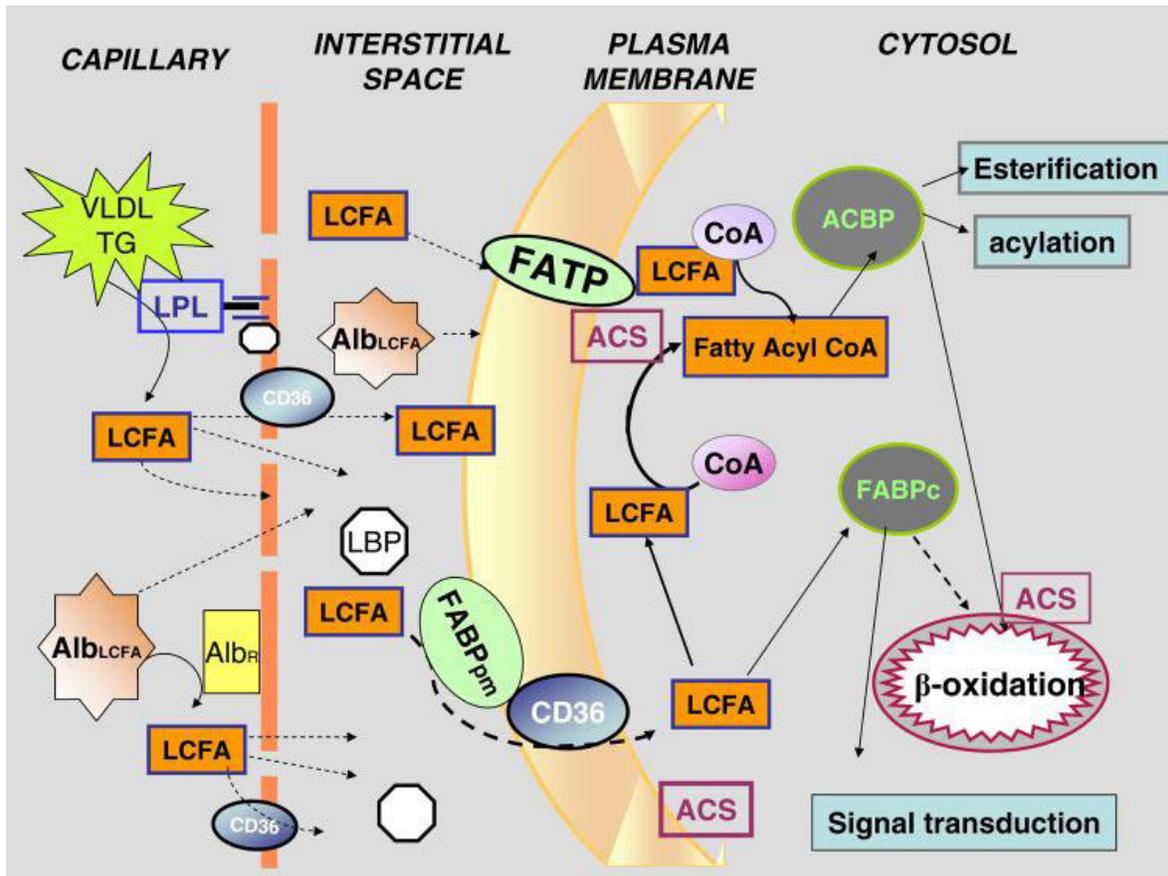


Figura 1. Representación esquemática de la absorción y transporte de los ácidos grasos desde los capilares al interior del miocito. VLDL, proteína de muy baja densidad; ALBFA, ácidos grasos unidos a albúmina; LPL, lipoproteína lipasa; ALBR receptor de la albúmina; LBP, proteína de unión a lípidos; ACS, acil-CoA sintetasa; FABP_c, proteína de unión de ácidos grasos citosólica ; ACBP, proteína de unión con el acil-CoA; TG, triacilglicérol ; LCFA, ácidos grasos de cadena larga; CD36, translocasa de ácidos grasos; FABP_{pm}, proteína de unión de ácidos grasos (Fuente: Kiens, 2006)

1.3. Importancia de los caracteres de la calidad de la carne y su relación con la aceptabilidad de la misma por el consumidor.

La calidad de la carne debe entenderse como un concepto complejo cuya definición depende del destino comercial de la misma (Cameron, 1990). La importancia de los caracteres relacionados con la calidad de la carne varía dependiendo de los intereses de los productores, la industria transformadora y los consumidores (Sellier, 1998). Así, para la carne procesada son importantes caracteres como el pH, la capacidad de retención de agua, la estabilidad oxidativa y la ausencia de sabores anómalos (Maltin et al., 2003). La carne fresca debe resultar atractiva para el consumidor, tanto a nivel visual como de palatabilidad, por lo que atributos como el color, la cantidad de grasa, la ternura, el sabor y la jugosidad resultan fundamentales (Gao y Zhao, 2009).

Los caracteres de la calidad de la carne están influidos por un elevado número de factores como p.e. las características del músculo (tipo y tamaño de fibra), las condiciones ambientales y de producción (tasa de crecimiento, nutrición, edad), las condiciones antes del sacrificio y post-mortem, así como factores genéticos (Ciobanu et al., 2011). Como se ha comentado, los programas de selección dirigidos a la obtención de una carne más magra han implicado una disminución de la GIM y por tanto, un deterioro de la calidad cárnica (Wood et al., 2008). Este empeoramiento de la calidad de la carne se traduce en la aparición de carnes negras, firmes y secas (DFD) o bien pálidas, blandas y exudativas (PSE), lo que conlleva costosas pérdidas económicas (Person, 2003), p.e. sólo las pérdidas atribuidas a la PSE en el año 2002 en los Estados Unidos de América se llegaron a estimar en aproximadamente 90 millones de dólares (Martínez y Zering, 2004).

1.3.1 Efecto del pH sobre la calidad de la carne.

El valor del pH en el músculo después del sacrificio es uno de los factores más importantes que inciden sobre la calidad de carne. Así pues, su variación determina en gran medida la aparición de carnes PSE y DFD (**Figura 2**, Van Laack et al., 2001). Después del sacrificio, las células musculares procuran mantener la homeostasis energética para lo cual es necesaria la producción de adenosín trifosfato (ATP). En un inicio, la fosfocreatina es la principal fuente de fósforo en la síntesis de ATP a partir del adenosín trifosfato. Una vez agotado el 70% de las reservas de fosfocreatina, los niveles de ATP comienzan a decrecer con mayor velocidad (Bendall y Swatland, 1988). A partir de ahí, se emplea el glucógeno muscular, mediante el mecanismo de la glucólisis anaeróbica, para mantener los niveles de ATP. El lactato procedente de la glucólisis anaeróbica se acumula y contribuye a disminuir el pH intracelular. En vida, el pH del músculo tiene un valor aproximado de 7.4 mientras que a las 6-8 horas post-mortem cae hasta 5.6-5.7. Al cabo de 24 horas, el pH desciende a 5.3-5.7 (Scheffler y Gerrard, 2007).

La velocidad y el tiempo de descenso de los niveles de pH durante el proceso de conversión del músculo a carne tienen un impacto significativo en los atributos de la misma. Un decrecimiento rápido del pH a temperaturas elevadas causa la desnaturalización del 20% de las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares, lo cual es responsable del color pálido de la carne. Por otro lado, esta disminución del pH provoca una reducción de la longitud de la cabeza de la miosina y da lugar a miofilamentos más gruesos, lo cual disminuye la capacidad de retención de agua en las carnes PSE (Joo et al., 1999). También la solubilidad de las proteínas sarcoplasmáticas disminuye con la reducción del pH a las 24 horas (4.8 a 5.0) y contribuye a la aparición del color pálido de la carne (Joo et al., 1999 y Warriss, 2000). La coloración amarilla de las carnes PSE se debe, en parte, a las diferencias entre los índices de refracción del sarcoplásma y las miofibrillas. Cuanto mayor sean las diferencias, mayor es la dispersión de la luz y las carnes son más pálidas. El bajo pH de las carnes PSE también facilita la

oxidación de los pigmentos hemo, de color púrpura o rojo (mioglobina y oximioglobina) a metmioglobina (Warriss y Brown, 1987). Por el contrario, si las reservas de glucógeno muscular son bajas, se reduce la posibilidad de sintetizar lactato mediante la glucólisis anaeróbica. Ello provoca un marcado aumento del pH (> 6.4) y una escasa desnaturalización de las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares (Bendall y Swatland, 1988). El agua es retenida en el músculo por la relajación de los miofilamentos, y las diferencias en el índice de refracción entre las miofibrillas y el sarcoplasma se reducen. De este modo, las células adquieren una mayor capacidad de absorción de la luz y la carne toma un color negro (Warriss, 2000).

1.3.2 Color y conductividad de la carne.

El color de la carne es un atributo de calidad relacionado con la capacidad de retención de agua en el músculo, con el pH y con el grado de oxigenación de la mioglobina (Bendall y Swatland, 1988 y Lee et al., 2000). Una medida objetiva del color puede obtenerse mediante un equipo Minolta Chroma-meter que proporciona valores de color que oscilan entre 0 (color blanco) y 100 (color negro) para la luminosidad (L^*). Los valores de rojez de la carne (a^*) y de amarillez (b^*) representan las coordenadas de cromaticidad: rojo-verdoso y amarillo-azulado, respectivamente. El conjunto de los valores L^* , a^* y b^* representan de forma objetiva un color. Son deseables las carnes con valores de Luminosidad (L^*) entre 43 y 49 (Warriss, 2000).

Otro carácter de gran importancia es la conductividad eléctrica (CE) de la carne. Según Swatland (1982) su utilidad viene explicada, entre otros factores, por su correlación con el valor de pH del músculo ($r=0.71$) y con la luminosidad ($r=0.71$). En las carnes PSE, la medida de CE está relacionada con el grado de afectación de las membranas celulares. En particular, las membranas dañadas de las células musculares pierden su capacitancia y en consecuencia aumenta la

resistencia eléctrica de las mismas, pudiendo medirse y emplearse este criterio para la detección temprana de este defecto (Swatland, 1982).

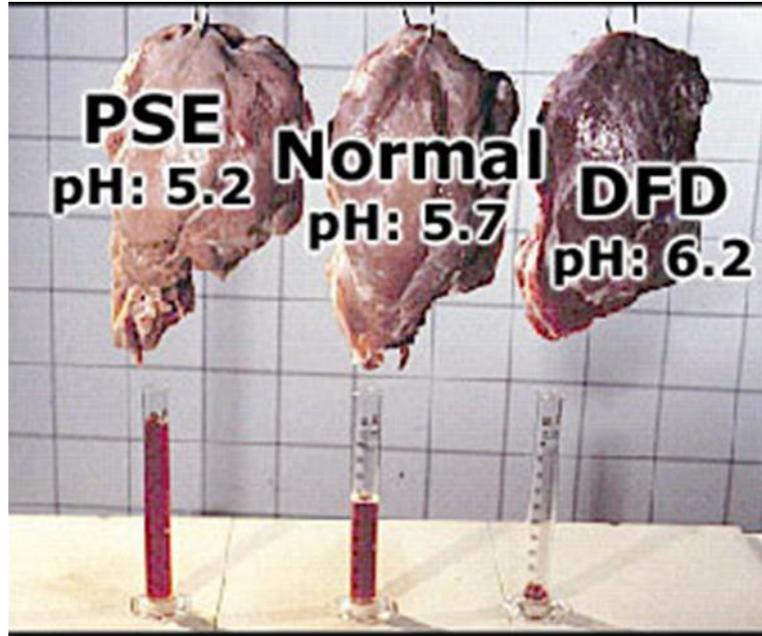


Figura 2. Variación de la calidad de la carne de acuerdo al pH. PSE, carnes pálidas, blandas y exudativas; DFD, carnes secas, firmes y negras (Fuente: http://qpc.adm.slu.se/Driving_to_stunning/page_10.htm).

1.4. Heredabilidades de los caracteres vinculados a la calidad de la carne y a la grasa intramuscular.

La heredabilidad (h^2) de un carácter se define como la proporción de la variación fenotípica explicada por los efectos genéticos aditivos (Falconer y Mackay, 1996). Así, los caracteres con h^2 altas son más fáciles de mejorar mediante métodos basados en la selección. Los valores de h^2 dependen de las frecuencias alélicas y de los efectos alélicos específicos de cada población y carácter (Falconer y Mackay, 1996). En general (**Tabla 1**), los caracteres reproductivos presentan heredabilidades bajas, los productivos moderadas y los de calidad de la carne y composición de la GIM presentan h^2 moderadas–bajas,

aunque sus valores son bastante heterogéneos en las diferentes poblaciones (Casellas et al., 2013). Como ejemplo, se puede destacar que para el porcentaje del ácido palmítico en el músculo *longissimus dorsi* (LD) se han descrito heredabilidades en el rango de 0.07 (Yang et al., 2013) a 0.47 (Casellas et al., 2010). Similar comportamiento se ha observado para los valores de h^2 de diversos ácidos grasos como el esteárico y el oleico. Por el contrario, los valores de porcentaje de la GIM presentan, en general, heredabilidades altas (Ciobanu et al., 2011).

Tabla 1. Heredabilidades de caracteres de interés productivo en el ganado porcino. Fuente: Enger et al. (2010); Casellas et al. (2010); Ciobanu et al. (2011).

Carácter	Heredabilidad
Prolificidad	0.05-0.1
Lechones destetados	0.04-0.07
Crecimiento	0.3-0.4
Edad a los 100 kg	0.1-0.3
Índice de conversión	0.25-0.35
Rendimiento de la canal	0.2-0.25
Porcentaje de magro	0.55-0.65
Grasa intramuscular	0.26-0.86
Longitud de la canal	0.55-60
Espesor de la grasa dorsal	0.12-0.74
Porcentaje de magro	0.48-0.54
Terneza (panel sensorial)	0.18-0.70
Jugosidad	0.0-0.28
Aroma y sabor (<i>Flavour</i>)	0.01-0.16
Rojez de la carne (a^*)	0.43-0.46
Amarillez de la carne (b^*)	0.14
Luminosidad de la carne (L^*)	0.15-0.57
Firmeza de la grasa dorsal	0.43
GIM ácido palmítico (C16:0)	0.07-0.71
GIM ácido esteárico (C18:0)	0.24-0.45
GIM ácido linoleico (C18:2)	0.47-0.67
GIM ácido oleico (C18:1n9c)	0.25-0.40
pH	0.1-0.3
Color	0.15-0.57

1.5. Estudios de QTL para fenotipos relacionados con la grasa intramuscular y la calidad de la carne.

Con el desarrollo de los marcadores moleculares y mapas genómicos, se han obtenido importantes avances en la detección de regiones del genoma que contienen uno o más polimorfismos con efectos significativos sobre la variabilidad de los caracteres cuantitativos (QTLs). El primer estudio de análisis de QTLs en cerdos fue realizado por Andersson et al. (1994), quienes detectaron en el cromosoma porcino 4 (SSC4) una región con efecto sobre el depósito de grasa. Desde entonces se han detectado miles de QTLs porcinos que se encuentran publicados en la base de datos PigQTLdb (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/summary>). Hasta el 27 de junio de 2013, fueron registradas un total de 356 publicaciones describiendo 8,411 QTLs para 629 caracteres distintos (Hu et al., 2013). Especialmente importantes son los QTLs que afectan a caracteres vinculados a la calidad de la canal y de la carne (5,406 QTLs, aunque debe recalcar que se trata de una base de datos redundante), que son los más abundantes debido a que estos fenotipos han sido estudiados de manera muy intensiva (**Figura 3**). En particular se pueden observar 1,378 QTLs con efectos sobre el depósito de la grasa y un total de 442 QTLs para la composición de la misma.

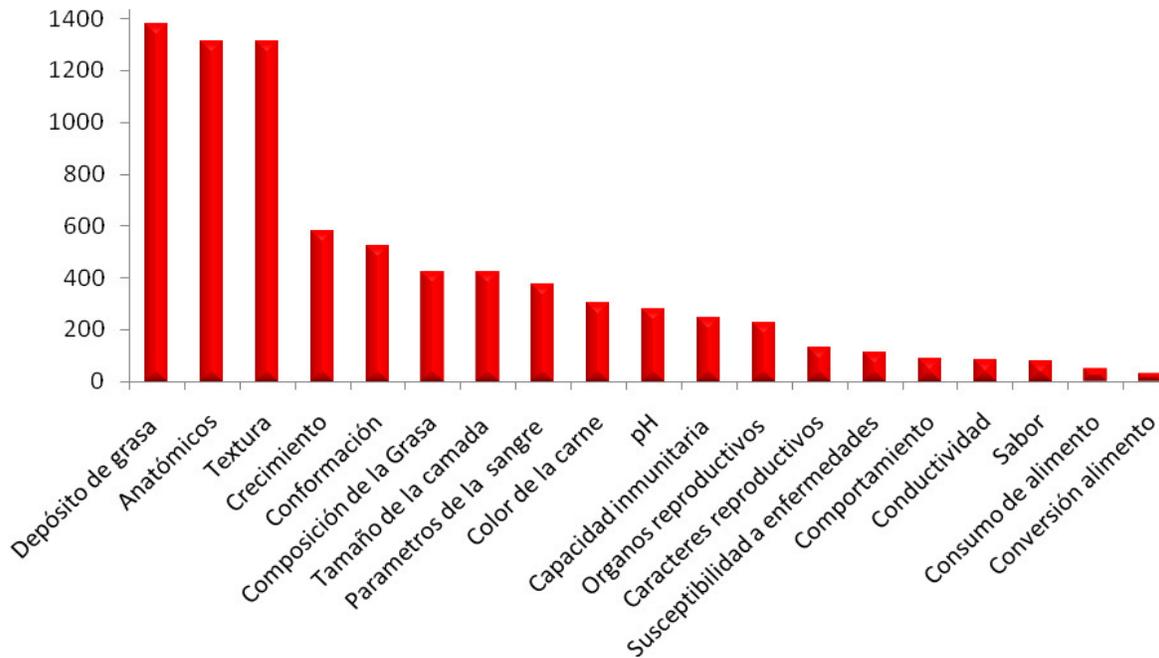


Figura 3. Número de QTLs detectados para distintos fenotipos porcinos.

En cuanto a la GIM, hay descritos 92 QTLs (PigQTLdb) que están distribuidos (**Figura 4**) en la mayor parte de los cromosomas, con la única excepción de SSC11, SSC14, SS16 y SSCY. Particular importancia presenta la región de SSC6 situada entre las posiciones 14 cM y 159 cM, donde se han obtenido las mayores coincidencias entre los diferentes estudios de QTL para la GIM (De Koning et al., 2000; Ovilo et al., 2000 y 2002^a; Ovilo et al., 2005; Grindflek et al., 2001; Paszek et al., 2001; Szyda et al., 2002 y 2003; Uleberg et al., 2005; Mohrmann et al., 2006 y Quintanilla et al., 2011). También resultan interesantes los cromosomas SSC4 y SSC7, donde se han detectado 30 QTLs (SSC4 región 60–80 cM) y 22 QTLs (SSC7 región 60 a 90 cM), relacionados con la composición de la GIM (Pérez-Enciso et al., 2000; Clop et al., 2003; Kim et al., 2006; Nii et al., 2006; Guo et al., 2009; Uemoto et al., 2009; Quintanilla et al., 2011).

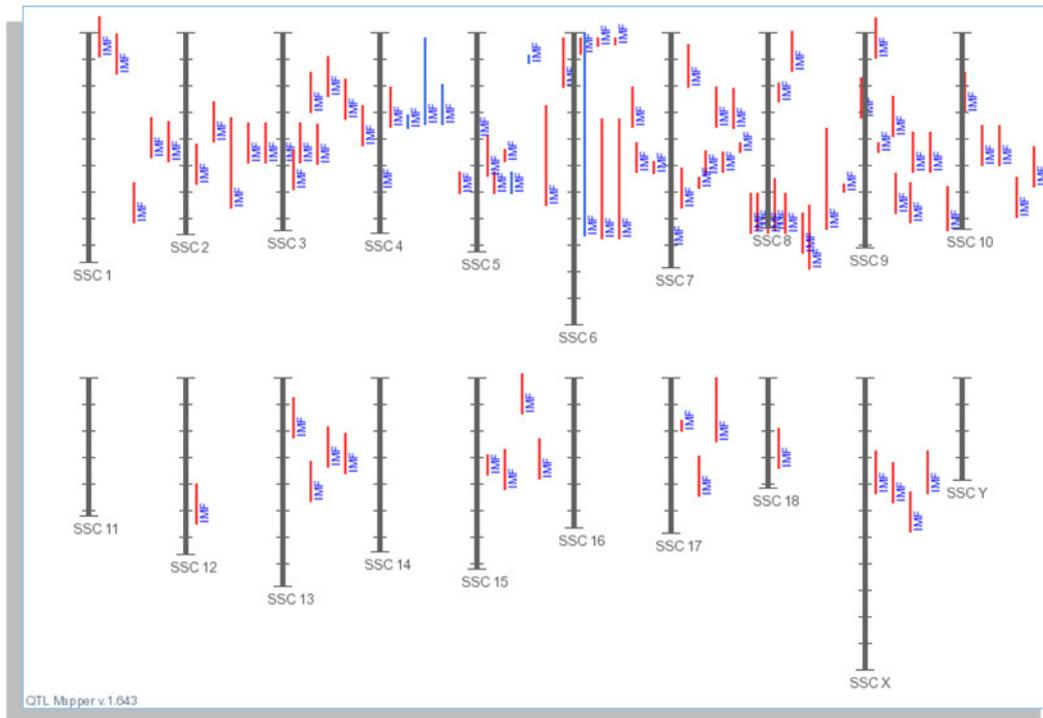


Figura 4. Distribución genómica de QTLs identificados en distintos estudios para el contenido de GIM (PigQTLdb).

Se ha detectado un menor número de QTLs relacionados con la calidad de la carne (pH: 279 QTL, color: 301 QTL y CE: 81 QTL), aunque hay que señalar que se han identificado distintas mutaciones causales p.e. la mutación intrónica del gen *insulin-like growth factor 2 (IGF2)*, relacionada con el crecimiento muscular (Van Laere et al., 2003). También las mutaciones no-sinónimas en los genes del receptor de la rianodina 1 (Fujii et al., 1991) y del gen *protein kinase AMP-activated gamma 3* (Milan et al., 2000), con importantes efectos sobre la aparición de carnes PSE y el fenotipo Rendimiento Napole respectivamente.

Cabe destacar que en la población *Duroc* bajo estudio, se ha realizado un barrido genómico para los caracteres de GIM y su composición (Quintanilla et al., 2011), así como para diversos fenotipos relacionados con la calidad de la carne (Gallardo et al., 2012). Entre los principales resultados obtenidos destaca la falta

de concordancia posicional entre los mapas de QTLs generados para los músculos *gluteus medius* (GM) y LD, lo cual sugeriría que la penetrancia de los QTLs viene modulada por factores músculo-específicos. Cabe mencionar también que parte de los resultados de Quintanilla et al. (2011) coinciden con datos publicados en trabajos previos p.e. tanto Sanchez et al. (2007) como Quintanilla et al. (2011) detectan un QTL muy significativo para la GIM en el SSC7.

Los métodos de detección de QTLs presentan limitaciones evidentes (Davoli y Braglia, 2007; Mackay et al., 2009; Ledur et al., 2010), sobre todo en cuanto al bajo número de marcadores empleados, lo cual hace que los intervalos de confianza de los QTLs sean muy grandes. Asimismo, los tamaños poblacionales utilizados en especies de interés ganadero son relativamente bajos, lo cual limita la potencia de estos estudios de detección de QTLs. Todo ello justifica que sólo en casos muy contados se haya alcanzado identificar la mutación causal que explica la segregación del QTL.

1.6. Genes candidatos.

El enfoque de genes candidatos seleccionados por su relación con la fisiología del carácter o de acuerdo a la posición que ocupan en el genoma (es decir, dentro de los intervalos de confianza de los QTLs) es una de las estrategias a seguir para detectar mutaciones causales responsables de ciertos fenotipos complejos (Georges, 2007). Una vez elegido el gen candidato, este debe ser secuenciado para identificar polimorfismos que puedan ser empleados como marcadores en estudios de asociación, y en el caso de que se juzgue necesario, ser validados funcionalmente (George, 2007). Mediante este enfoque se ha obtenido algún éxito como p.e. la identificación de la mutación del gen del receptor de estrógenos (*ESR*) asociada al tamaño de camada en cerdos (Rothschild et al., 1996). Un importante gen candidato para la GIM es el *heart fatty acid-binding protein* (*H-FABP*) que explica parte de la variación de la GIM (Ovilo et al., 2002^b). Este gen es miembro de la familia de *FABP* y se expresa en el músculo cardíaco y

esquelético. Su función está relacionada con el transporte de los ácidos grasos en el músculo esquelético (Glatz et al., 2003). Aunque se encontraron asociaciones significativas con el contenido de GIM en una población *Duroc x Meishan* (Gerbens et al., 1999; Gerbens et al., 2001 y Lee^a et al., 2010), no se ha detectado aún la mutación que explica dicha asociación. Varios genes candidatos han sido propuestos para el contenido y la composición de la GIM. En las **Tablas 2 y 3** se muestra una lista representativa de genes candidatos recopilados por Casellas et al. (2013).

Tabla 2. Lista de genes candidatos y su asociación con el contenido de GIM en porcino (Fuente: Casellas et al., 2013).

Gen	Polimorfismo	Raza ¹	Significación	Referencia
<i>ACACA</i>	c.4899G>A y c.5196T>C	DU	PPN0 >0.90	Gallardo et al. (2009)
<i>CMYA5</i>	A7189C	ME, DU, LW, LD, TO, QI	*	Xu et al. (2011)
<i>ENO3</i>	g.404delT	YK, LD, YK x LD, YK x ME	**	Wu et al. (2008)
<i>FTO</i>	c.594C>G, c.1119- 261A>G	BE x YK	*	Fan et al. (2009 ^a)
	g.276T>G	razas comerciales	*	Fontanesi et al. (2010)
<i>HDLBP</i>	c.3120G>A	DU	***	Cánovas et al. (2009)
<i>LEPR</i>	<i>Hpa</i> II RFLP	IB x LD	NS	Ovilo et al. (2002 ^b)
	c.221C>T, c.1160A>C, c.2002C>T	IB x LD	NS	Ovilo et al. (2005)
	T232A	LD	NS	Mackowski et al. (2005)
	c.2002C>T	IB x DU	***	Muñoz et al. (2011)
<i>LPIN1</i>	C93T	LW, TO and cross-breds	**	He et al. (2009)
<i>MASTR</i>	c.187 C>T	LW	*	Han et al. (2012)
<i>MC4R</i>	c.1426A>G	IB x DU	NS	Muñoz et al. (2011)
		DU	NS	Schwab et al. (2009)
<i>MYOD1</i>	<i>Ddel</i> RFLP	LW, LD	***	Verner et al. (2007)
	<i>Ddel</i> RFLP	LW x ME	NS	Liu et al. (2008)

¹BE, *Berkshire*; DU, *Duroc*; IB, *Ibérico*; ME, *Meishan*; LD, *Landrace*; LW/YK, *Large White*; TO, *Tongcheng*; NS, no significativo; PPN0, probabilidad de que el efecto de sustitución alélica sea distinto de cero, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Tabla 3. Genes candidatos para la composición de la GIM en porcino (Fuente: Casellas et al., 2013).

Gen	Polimorfismo	Raza ¹	Ácido graso asociado	Referencia
ACACA	<i>c.5634T>C,</i> <i>c.6681G>T</i>	IB × LD	C16:1, C18:0, C18:1n9c	Muñoz et al. (2007)
	<i>c.4899G>A,</i> <i>c.5196T>C</i>	DU	C14:0, C16:0, C18:0, C18:1n9c, C20:4	Gallardo et al. (2009)
ACSL4	<i>c.2645G>A</i>	IB × LD	MUFA	Mercadé et al. (2006)
FASN	<i>c.1254A>G</i>	IB × LD	C20:1	Muñoz et al.(2007)
GIP	<i>c.77A>G,</i> <i>c.394A>C</i>	IB × LD	C16:1, C18:0	Muñoz et al.(2007)
MTTP	<i>c.2573T>C</i>	IB × LD	C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1n9c, C18:3, C20:1, C20:2	Estellé et al. (2009)

¹DU, *Duroc*; IB, *Ibérico*; LD, *Landrace*. MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; SFA, ácidos grasos saturados.

En la **Tabla 4** se muestran algunos genes candidatos para diversos caracteres relacionados con la calidad de la carne. En particular, en el gen receptor de la rianodina 1 (*RYR1*) se ha detectado la mutación causal responsable del síndrome del estrés porcino, que provoca la aparición de carnes PSE (Fujii et al., 1991). El receptor de la rianodina tiene una función importante en el proceso de la contracción muscular, ya que regula la liberación del calcio del retículo sarcoplasmático del músculo esquelético. La sustitución aminoacídica arginina por cisteína, en la proteína *RYR1* trae como consecuencia la liberación desregulada de Ca²⁺ hacia el citoplasma (Fujii et al., 1991). Esto provoca que ante una situación de estrés se desencadenen intensas contracciones con el consecuente aumento del metabolismo basal y la temperatura corporal. Otro importante gen candidato para la calidad de la carne es el *melanocortin 4 receptor (MC4R)*. El receptor de la melanocortina 4 acoplado a las proteínas G, participa en la ruta de

señalización hipotalámica mediada por el eje leptina-melanocortina y es un regulador de la ingesta de alimento y el balance energético. Varios polimorfismos próximos al gen *MC4R* han mostrado asociaciones con la predisposición a la obesidad, el crecimiento y el almacenamiento de grasa en humanos (Chambers et al., 2008 y Loos et al., 2008). En cerdos se ha demostrado la asociación de la mutación *Asp298Asn*, en el gen *MC4R*, con el depósito de grasa, el crecimiento y la ingesta de alimento (Kim et al., 2000 y Houston et al., 2004). Por otro lado Fan et al. (2009^b) publicaron que dos SNPs identificados en el gen *MC4R* presentan diferentes asociaciones con caracteres productivos p.e. el polimorfismo *Arg236His* está asociado con la grasa dorsal y el crecimiento, y el *p.Asp298Asn* con la variación del crecimiento en una población *Berkshire x Yorkshire*.

1.7. Análisis de asociación genómico (GWAS).

El análisis genético de los caracteres complejos puede realizarse mediante las siguientes aproximaciones: 1) análisis de ligamiento, en el que se estudia la co-segregación de fenotipos y marcadores en familias (por lo tanto es necesario disponer de genealogías), y 2) análisis de asociación, en el que se investiga la co-ocurrencia de los fenotipos y de los marcadores en individuos no necesariamente emparentados, pertenecientes a una determinada población (en consecuencia no hace falta conocer los pedigrís). Ambas aproximaciones explotan el desequilibrio de ligamiento existente entre el marcador y la mutación causal. Los estudios de asociación genómico (o GWAS, de sus siglas en inglés) básicamente son análisis donde se estudia el grado de asociación entre los marcadores y uno o más caracteres. El objetivo es examinar, de forma independiente, la asociación de cada polimorfismo nucleotídico sencillo (SNP, de sus siglas en inglés) con el fenotipo estudiado (Bush y Moore, 2012). Se asume que las asociaciones estadísticas significativas entre el carácter y el marcador SNP son detectadas porque el marcador está en desequilibrio de ligamiento con la mutación causal.

Tabla 4. Genes candidatos para caracteres relacionados con la calidad de la carne (Fuente: Ernst y Steibel, 2013).

Nombre del Gen	Símbolo del gen	Carácter	Referencia
<i>Calpastatin</i>	<i>CAST</i>	Calidad de la carne	Ciobanu et al. (2004) y Nonneman et al. (2011)
<i>Carbonic anhydrase III</i>	<i>CA3</i>	Calidad de la carne	Wimmers et al. (2007)
<i>Cholecystokinin type A receptor</i>	<i>CCKAR</i>	Consumo de alimento	Houston et al. (2008)
<i>Fatty acid binding protein 3</i>	<i>FABP3</i>	Composición de la canal	Gerbens et al. (1999)
<i>Growth hormone</i>	<i>GH</i>	Composición de la canal y Calidad de la carne	Franco et al. (2005)
<i>Growth hormone-releasing hormone</i>	<i>GHRH</i>	Crecimiento y Composición de la canal	Franco et al. (2005)
<i>Insulin-like growth factor 2</i>	<i>IGF2</i>	Crecimiento y Composición de la canal	Van Laere et al. (2003) y Aslan et al. (2012)
<i>Leptin</i>	<i>LEP</i>	Crecimiento y Composición de la canal	Peixoto et al. (2006)
<i>Melanocortin 4 receptor</i>	<i>MC4R</i>	Crecimiento y Composición de la canal	Kim et al. (2000); Markljung et al. (2008) y Fan et al. (2009 ^b)
<i>Myopalladin</i>	<i>MYPN</i>	Composición de la canal	Wimmers et al. (2007)
<i>Myostatin</i>	<i>MSTN</i>	Crecimiento	Yu et al. (2007)
<i>Pituitary-specific transcription factor 1</i>	<i>POU1F1</i>	Crecimiento y Composición de la canal	Kurył y Pierzchała (2001) y Song et al. (2007)
<i>Protein kinase adenosine monophosphate-activated gamma subunit</i>	<i>PRKAG3</i>	Calidad de la carne	Milan et al. (2000) y Ciobanu et al. (2001)
<i>Ryanodine receptor 1</i>	<i>RYR1</i>	Susceptibilidad al estrés, magrez y Calidad de la carne	Fujii et al. (1991)
<i>Titina</i>	<i>TTN</i>	Calidad de la carne	Wimmers et al. (2007)

Para caracteres cuantitativos, se analiza la asociación de cada SNP con el fenotipo mediante la correlación de Spearman o la regresión lineal, mientras que para fenotipos categóricos (p.e. estudios caso-control) se usan tests de chi-cuadrado, tablas de contingencia o regresión logística (Stranger et al., 2011). Recientemente se ha introducido la implementación de métodos bayesianos (Zhou y Stephens, 2012). En cualquier caso, siempre hay que tener en cuenta la posible estratificación de la población (Stranger et al., 2011).

La implementación de los GWAS en humano ha permitido la identificación de factores genéticos que determinan la susceptibilidad a enfermedades mendelianas y complejas (Bush y More, 2012). En el área de la farmacogenética, se ha determinado que hay factores genéticos relacionados con la farmacocinética de los medicamentos, p.e. Cooper et al. (2008) demostraron la influencia de SNPs, localizados en los genes *CYP2C9* y *VKORC1*, sobre la estandarización de las dosis de Warfarina en grupos de pacientes. Desde la implementación de los GWAS, se han descrito cerca de 2000 loci (**Figura 5**) asociados significativamente (p -valores $< 5 \times 10^{-8}$) con la variación fenotípica de diversos caracteres complejos, principalmente aquellos relacionados con enfermedades inflamatorias, degenerativas y autoinmunes (Bush y More, 2012).

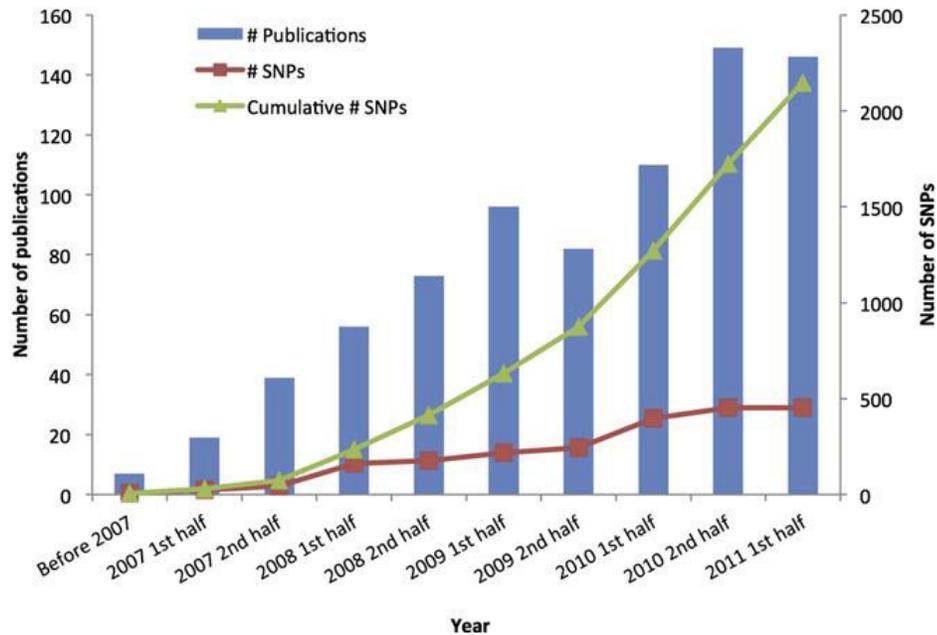


Figura 5. Descubrimiento de SNPs asociados (p -valores $< 5 \times 10^{-8}$) a diversos fenotipos medidos en poblaciones humanas, desde 2007 a 2011 (Fuente: Visscher et al., 2012).

La compañía *Illumina* (<https://www.illumina.com>) ha desarrollado plataformas de genotipado de alta densidad (chips de SNPs) para varias especies domésticas, p.e. caballo, cabra, cerdo, bovino perro, entre otros. En particular, en cerdos, con la implementación del *Illumina PorcineSNP60 BeadChip*, se han llevado a cabo varios estudios GWAS que han permitido analizar la arquitectura genética de diversos fenotipos de interés económico como p.e. depósito de grasa (Duijvesteijn et al., 2010), el contenido y composición de la GIM (Hernández-Sánchez et al., 2012; Ramayo-Caldas et al., 2012 y Yang et al., 2013), la calidad de la carne (Luo et al., 2012^a y Ma et al., 2013), y la reproducción (Onteru et al., 2011 y 2012; Schneider et al., 2012), así como parámetros clínicos (Fu et al., 2012 y Boddicker et al., 2012). De modo similar, en bovino también se han descrito varias asociaciones significativas entre SNPs y diversos caracteres como p.e. porcentaje de proteína y grasa de la leche (Hayes et al., 2010 y Schopen et al., 2011), índices reproductivos (Sahana et al., 2010; Huang et al., 2010 y Hawken et

al., 2012) y enfermedades diversas, como p.e. queratoconjuntivitis infecciosa bovina, mastitis y tuberculosis (Finlay et al., 2012; Minozzi et al., 2012; Kizilkaya et al., 2013 y Sahana et al., 2013). En el caballo, se han logrado importantes avances con la aplicación del chip de alta densidad p.e. Raudsepp et al. (2012) detectaron la mutación causal para cierta anomalía reproductiva (reacción defectuosa del acrosoma) en el exón 4 del gen *FK506 binding protein 6 (FKBP6)*. Hauswirth et al., (2012) publicaron que, además de las variantes conocidas en los genes *EDNRB* y *KIT*, existen otras mutaciones independientes en los loci *MITF* y *PAX3* que consideradas conjuntamente, explican una elevada proporción de la variabilidad de las manchas blancas de la capa. En ovino, Demars et al., (2013) identificaron dos mutaciones en el gen *BMP15*, en una región muy conservada del cromosoma X, vinculadas a una alta prolificidad. También en ovejas se han detectado genes que pueden ser importantes candidatos para caracteres de crecimiento y producción de carne (Zhang et al., 2013).

En perro, los estudios GWAS han mostrado asociaciones relevantes para enfermedades complejas, p.e. Karyadi et al. (2013) encontraron una variación en el número de copias localizada en el locus *KITLG*, que probablemente es la responsable del carcinoma de células escamosas dactilar de la raza *Standard Poodle*. Curiosamente, solo los perros de capa negra padecen la enfermedad. El descubrimiento, por parte de estos autores, de una mutación en el gen *MC1R*, presente solo en los *Standard Poodles* de capa blanca, indicaría que dicho polimorfismo confiere cierta protección para este tipo de cáncer (tendría un efecto compensatorio sobre la mutación de *KITLG*). Otro aporte importante fue la detección, mediante GWAS y análisis de ligamiento, de una mutación *Ser658Pro* en el gen *SEL1L*. Este gen, que está vinculado a la translocación de proteínas mal plegadas, determinaría la susceptibilidad a la ataxia cerebelosa progresiva de la raza *Finnish Hound*. Este descubrimiento permitió la identificación de un nuevo gen candidato para la ataxia en humanos Kyöstiä et al. (2012). Otro estudio GWAS relevante fue la detección de una mutación no-sinónima en el gen *BMP3*,

que provoca el cambio de fenilalanina por leucina, con importantes efectos sobre la forma del cráneo (Schoenebeck et al., 2012).

En resumen, los estudios GWAS no se han limitado a aumentar de forma significativa la resolución de los mapas de QTLs (Ramos et al., 2009), sino que además han permitido identificar las mutaciones causales para ciertos fenotipos (principalmente mendelianos). Cabe destacar que algunos de los resultados obtenidos en especies domésticas han tenido importante repercusión en la medicina humana, sobre todo en el estudio de las enfermedades complejas como el cáncer (Karyadi et al., 2013).

Como ya se ha comentado, con la aplicación de los GWAS se ha logrado cierto éxito en detectar SNPs que están asociados a la variación de caracteres mendelianos y cuantitativos, pero en general solo explican una parte de la varianza genética aditiva de dichos caracteres (**Tabla 5**). Aunque no están del todo claras las causas por las que no se puede detectar esta “heredabilidad perdida”, Manolio et al. (2009) exponen algunos de los posibles motivos: 1) se puede estar subestimando la magnitud de los efectos alélicos debido a un desequilibrio de ligamiento incompleto entre el marcador y la mutación causal; 2) existe una baja frecuencia del polimorfismo causal o se trata de una variante rara que no es detectada por las plataformas de genotipado; 3) las estimaciones de heredabilidades calculadas mediante métodos clásicos pueden estar sobreestimadas debido a que las interacciones entre genes o genotipo-ambiente pueden contribuir al parecido entre parientes (Zuk et al., 2012); 4) puede que exista una contribución importante a la heredabilidad por parte de alelos con efectos tan pequeños que no son detectables (no superan el umbral de significación tras realizar la corrección para “*multiple testing*”). En estudios recientes, Bloom et al. (2013) sugirieron que la “heredabilidad perdida” surge principalmente por la existencia de muchos loci con efectos pequeños. Además plantean que esta “heredabilidad perdida” puede ser detectada en estudios con tamaños poblacionales suficientemente grandes. Yang et al. (2010) lograron

explicar el 45 % de la variabilidad de la altura en humanos ($h^2 = 0.45$) con un panel de 294,831 SNPs genotipados en 3,925 individuos. Esto demostró que la “heredabilidad perdida”, para este carácter, se debe al incompleto desequilibrio de ligamiento entre la variante causal y los SNPs.

Tabla 5. Heredabilidad estimada y número de loci para diversos caracteres complejos medidos en la especie humana (Fuente: Manolio et al., 2009).

Carácter	Número de loci	Proporción de la heredabilidad explicada	Referencias
Degeneración macular relacionada con la edad	5	50%	Maller et al. (2006)
Enfermedad de Crohn	32	20%	Barrett et al. (2008)
Lupus eritematoso sistémico	6	15%	International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN) et al. (2008)
Diabetes tipo 2	18	6%	Zeggini et al. (2008)
Colesterol HDL	7	5.2%	Kathiresan et al. (2008)
Altura	40	5%	Visscher (2008)
Inicio temprano del infarto de miocardio	9	2.8%	Myocardial Infarction Genetics Consortium et al. (2009)

Tal como se ha comentado anteriormente, el desarrollo por parte de la compañía de *Illumina* del chip *PorcineSNP60 BeadChip*, con un total de 64,232 SNPs ha resultado fundamental para llevar a cabo los genotipados de alta densidad que requiere el análisis GWAS. La identificación de los SNPs incluidos en el chip se realizó mediante la secuenciación masiva de individuos pertenecientes a diversas razas porcinas (*Duroc*, *Pietrain*, *Large White* y *Landrace*), así como jabalíes europeos y japoneses. La distancia promedio entre los SNPs incluidos en el chip fue de 30 kb y estaban distribuidos a lo largo de todo el genoma aunque había distancias mayores de 250 kb en los cromosomas SSC15, SSC14 y SSCX (Ramos et al., 2009).

La creación del *PorcineSNP60 BeadChip* también ha permitido la introducción de la selección genómica en los sistemas de producción porcina. La

selección genómica se basa en la estimación del valor mejorante de un animal mediante una ecuación de predicción calculada a partir de los datos genotípicos y fenotípicos de una población de referencia (Ibañez-Escriche y Gonzalez-Recio, 2011). Los individuos mejoradores pueden ser seleccionados a edades muy tempranas sin necesidad de disponer de información fenotípica (del mismo individuo o de otros emparentados con el mismo), lo cual implica una importante reducción del intervalo generacional (Hayes et al., 2009). De todos modos, en porcino, el intervalo generacional es de por sí bastante bajo, por lo que la principal aplicación de la selección genómica se centraría en la mejora de caracteres de baja heredabilidad, de obtención tardía (p.e. después del sacrificio) o difíciles de medir. Como ejemplo de aplicaciones prácticas de esta herramienta, se puede mencionar que la empresa Hypor utiliza la selección genómica en sus programas de mejora, y que la empresa belga Hyvar Select está introduciendo dicha herramienta para seleccionar los animales de reemplazo en el núcleo genético.

Los primeros resultados GWAS obtenidos en cerdos fueron publicados por Duijvesteijn et al. (2010), quienes detectaron en los cromosomas SSC1 y SSC6, 37 SNPs relacionados con los niveles de androstenona en la grasa. Desde entonces su aplicación se ha extendido a otras áreas relacionadas con la producción y la sanidad porcina. En la **Tabla 6** se muestra una relación de los estudios GWAS realizados en el cerdo hasta la fecha.

Tabla 6. Análisis de asociación genómicos realizados en porcino hasta 2013.

Caracteres	Referencia
Niveles de androstenona en la grasa.	Duijvesteijn et al. (2010)
Vida reproductiva.	Onteru et al. (2011 y 2012)
Parámetros reproductivos en los tres primeros partos.	Schneider et al. (2012)
Susceptibilidad del lechón a las cepas F4ab y F4ac de <i>Echerichia coli</i> .	Fu et al. (2012)
Grasa dorsal, área del músculo del lomo y conformación corporal.	Fan et al. (2011)
Susceptibilidad al Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (<i>PRRS</i>).	Boddicker et al. (2012)
Parámetros hematológicos.	Luo et al. (2012 ^b) y Wang et al. (2013)
GIM y Grasa dorsal.	Hernández-Sánchez et al. (2012)
Calidad de la carne (infiltración grasa, color, pH) y GIM.	Luo et al. (2012 ^a) y Ma et al. (2013)
Porcentaje y composición de la GIM.	Ramayo-Caldas et al. (2012)
	Yang et al. (2013)

Varios de estos estudios se han realizado para conocer la base genética del contenido y la composición de la GIM p.e. Ramayo-Caldas et al. (2012) evaluaron 32 caracteres relacionados con la composición de los ácidos grasos en la GIM en una población *backcross* (25% *Ibérico* x 75% *Landrace*). Estos autores detectaron 813 SNPs asociados significativamente con la composición de la GIM, distribuidos en 43 intervalos cromosómicos. Específicamente en el SSC8 (**Figura 6**) se encontraron múltiples asociaciones para los ácidos grasos palmítico y palmitoleico, así como para las ratios: palmitoleico/palmítico, oleico/palmitoleico y el porcentaje de ácidos grasos saturados.

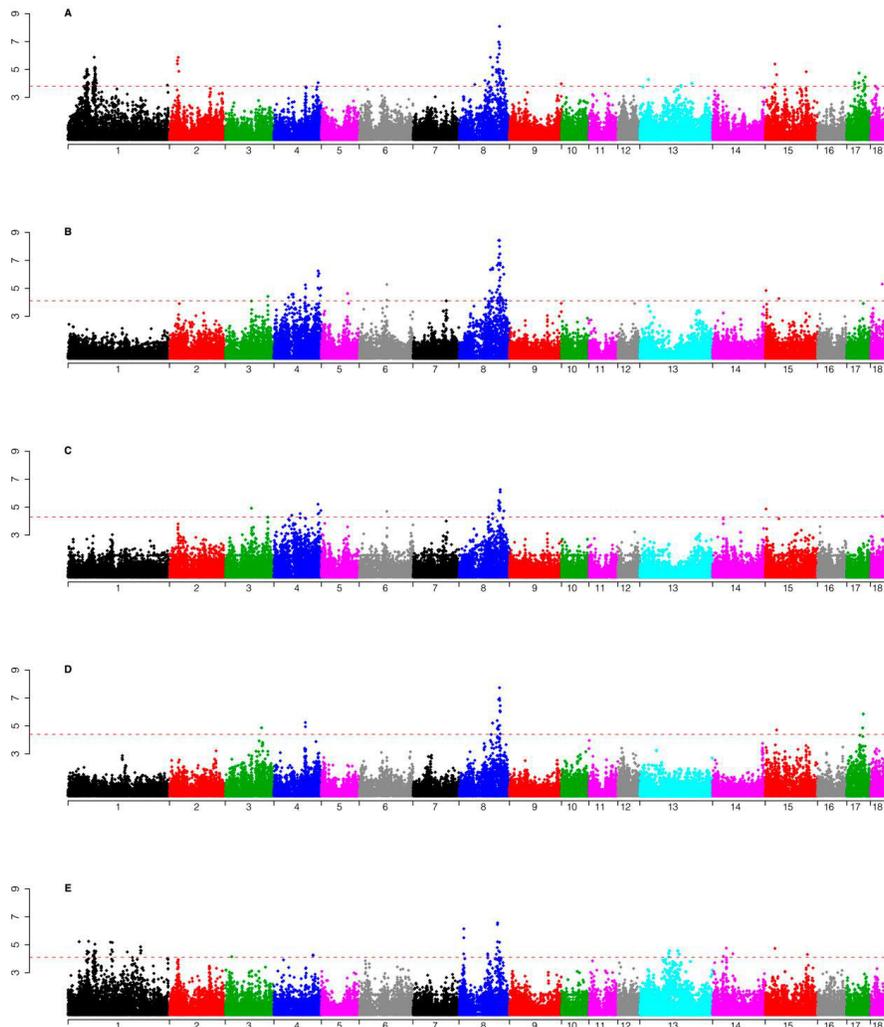


Figura 6. Diagrama *Manhattan plot* de las asociaciones genómicas observadas en un análisis GWAS para los caracteres: A) porcentaje de ácido palmítico, B) porcentaje de ácido palmitoleico, C) ratio de palmitoleico/palmítico, D) ratios de oleico/palmitoleico, y E) ácidos grasos saturados. La línea horizontal representa el umbral de significación a nivel genómico (q -valor < 0.05). Fuente: Ramayo-Caldas et al. (2012).

En un trabajo posterior, Corominas et al. (2013) indicaron que el gen *ELOVL6* podría contener una mutación causal, a nivel del promotor, que explicaría la segregación del QTL de SSC8 para los ácidos grasos palmítico y palmitoleico. Por su parte Yang et al. (2013) evaluaron, mediante un GWAS, la composición de los ácidos grasos de la GIM de dos tejidos (músculo LD y grasa abdominal) en dos poblaciones: un cruce *White Duroc* x *Erhualian* F₂ y otra población de raza pura *Sutai*. En este análisis, se obtuvo evidencias de una fuerte asociación entre ciertas regiones genómicas de SSC6 y SSC14 y los porcentajes de ácido esteárico y araquídico, respectivamente (**Figura 7**).

El contenido de la GIM y el espesor de la grasa dorsal en los músculos LD y GM fueron evaluados por Hernández-Sánchez et al. (2012) en la población Lipgen. Las principales asociaciones se identificaron en los cromosomas SSC6 y SSC14, aunque es importante resaltar que los resultados variaron entre los diferentes métodos utilizados para la corrección del efecto de la estructura poblacional (**Tabla 7**).

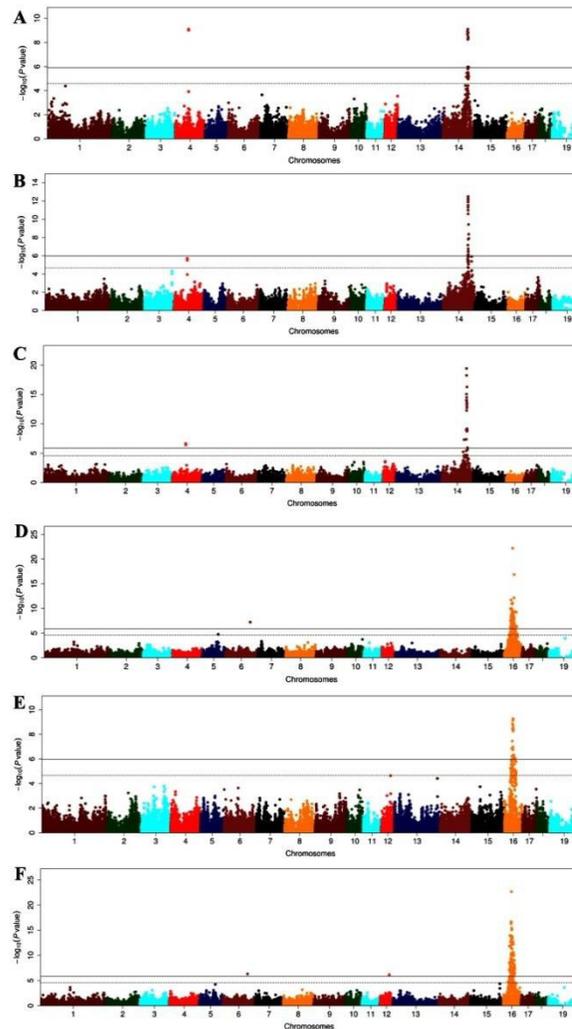


Figura 7. Diagrama *Manhattan plot* de las asociaciones genómicas observadas en un análisis GWAS de los ácidos grasos esteárico y araquídico en el músculo *longissimus dorsi*. (A–C) GWAS del ácido esteárico en la población F₂ (A) y *Sutai* (B) y el meta-análisis de la población F₂ y *Sutai* (C). (D–F) GWAS del ácido araquídico en la población F₂ (D), *Sutai* (E) y el meta-análisis de F₂ y *Sutai* (F). Las líneas superior e inferior indican los umbrales de significación al 5% a nivel genómico y sugestivo, respectivamente, después de la corrección de Bonferroni (Fuente: Yang et al., 2013).

Tabla 7. Resultados del análisis GWAS del contenido de la GIM en el músculo LD utilizando dos modelos para corregir la estructura poblacional (PC1G y STRATA-PED). Fuente: Hernández-Sánchez et al. (2012).

SSC	SNPs significativos a nivel genómico.	
	PC1G	STRATA-PED
1	8	1
2	1	0
3	2	1
4	0	0
5	0	2
6	4	32
7	0	0
8	2	0
9	1	2
10	1	0
11	0	0
12	0	0
13	1	1
14	8	6
15	0	0
16	6	0
17	3	0
18	0	0

Luo et al. (2012^a) realizaron un GWAS para los caracteres de contenido de GIM (LD) y de la calidad de la carne en una población cruzada *Duroc x Erhualian*, y encontraron que la mayor parte de asociaciones estaban localizadas en el SSC12 (**Figura 8**). También Ma et al. (2013) analizaron en dos poblaciones, una *Duroc x Erhualian* F₂ y otra de raza pura *Sutai*, los caracteres de contenido de la GIM y de la calidad de la carne en dos músculos (LD y semimembranoso). Dichos autores obtuvieron, a nivel genómico, 1 SNP de SSC3 asociado con el pH₂₄, 3 SNPs (no mapeados) con la rojez a*, 3 SNPs de SSC15 con la pérdida de agua y 2 SNPs con el contenido de la GIM (uno en el SSC9 y otro en el SSCX). En general, los resultados de los estudios GWAS realizados hasta la fecha han mostrado poca concordancia posicional.

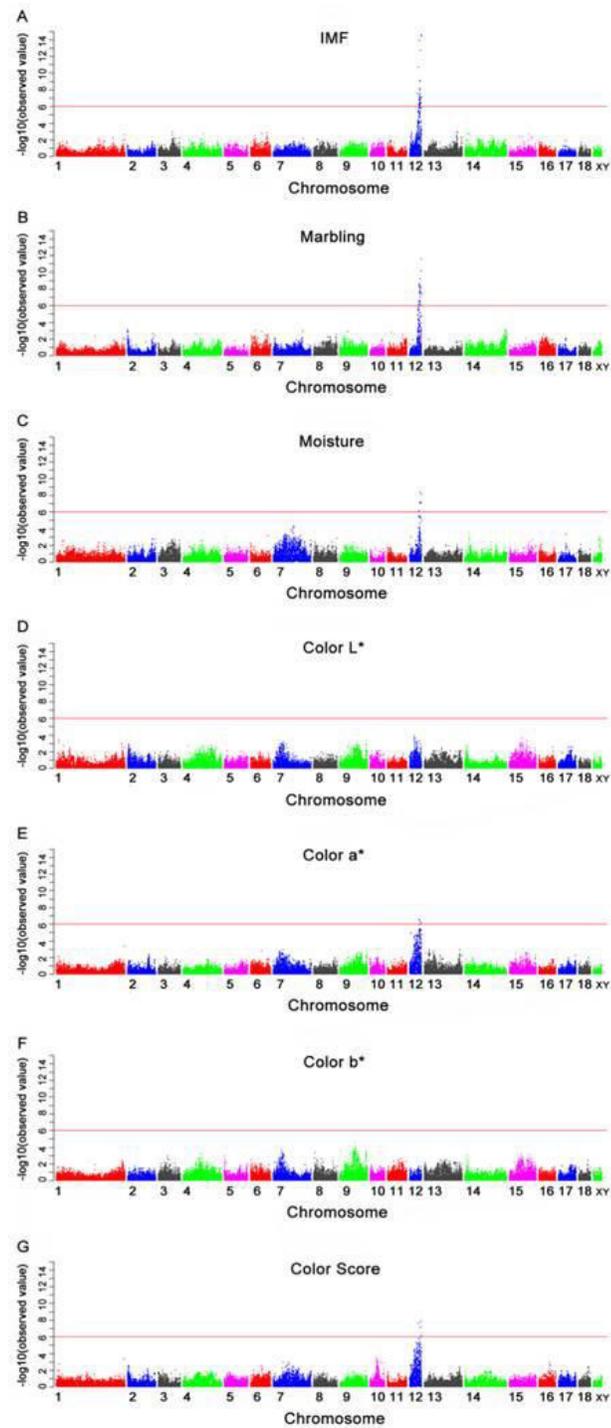


Figura 8. Diagrama *Manhattan plot* de las asociaciones genómicas observadas en un análisis de asociación GWAS para 7 caracteres de calidad de la carne: A) GIM, B) infiltración grasa, C) humedad, D) luminosidad L*, E) rojez a*, F) amarillez b* y G) puntuación de color. La línea superior indica la significación a nivel genómico con un p-valor ≤ 0.01 (Fuente: Luo et al., 2012^a).

De forma reciente, se ha logrado obtener la secuencia del genoma porcino, lo que ha permitido profundizar en el conocimiento de los procesos evolutivos que han modelado el patrimonio genético de esta especie (Groenen et al., 2012). Entre otros avances, se ha determinado que los genes relacionados con la respuesta inmune y el olfato son los que exhiben una tasa evolutiva más acelerada y que el cerdo es la especie, de entre las secuenciadas hasta la fecha, que posee un repertorio mayor de genes relacionados con la olfacción (1301 loci). Un aporte relevante fue la existencia de una baja cantidad de retrovirus endógenos, lo que convierte a la especie porcina como candidata ideal para los xenotransplantes (Groenen et al., 2012). Sin lugar a dudas, el hecho de disponer de la secuencia del genoma porcino constituye un recurso indispensable para profundizar en el conocimiento de la arquitectura genética de los caracteres complejos, permitiendo conocer el contenido génico (proteínas, microRNAs, RNAs largos no-codificantes, entre otros) de las regiones cromosómicas asociadas a fenotipos productivos. Ello puede resultar fundamental para identificar genes candidatos y desarrollar paneles de SNPs que permitan el mapeo fino de las asociaciones encontradas.

Capítulo II. Objetivos.

2. OBJETIVOS.

El presente trabajo forma parte del proyecto “Estudio de caracteres relacionados con el metabolismo lipídico y la calidad en porcino mediante el análisis integral de datos masivos de genotipos y expresión génica” (AGL2010-22208-C02-02), cuya finalidad general consiste en analizar la arquitectura genética de diversos caracteres de interés productivo en una población comercial *Duroc*. Así, los objetivos específicos de la presente tesis son los siguientes:

1. Identificar mediante una aproximación GWAS regiones genómicas asociadas significativamente a la variación fenotípica del contenido de la grasa intramuscular y su composición (porcentaje de ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico), en los músculos *gluteus medius* y *longissimus dorsi*.
2. Mediante dicha aproximación, también se procederá a identificar regiones del genoma asociadas a caracteres de calidad de la carne, como son el pH y la conductividad eléctrica a las 24 horas post-mortem y el color de la carne (rojez, amarillez y luminosidad). Dichos fenotipos se medirán en los músculos *gluteus medius* y *longissimus dorsi*.
3. Determinar si existe concordancia posicional entre las regiones asociadas a caracteres identificadas para los músculos *gluteus medius* y *longissimus dorsi*.

Capítulo III. Materiales y Métodos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Material animal.

Se analizaron los datos fenotípicos de una población de 352 cerdos pertenecientes a una línea comercial *Duroc* (Población Lipgen). Dichos cerdos descienden del apareamiento de 5 machos y 400 hembras y nacieron en tres granjas distintas de la empresa Selección Batallé S.A, siendo castrados y criados bajo las mismas condiciones intensivas de alimentación y manejo.

En la empresa Selección Batallé S.A, el núcleo genético *Duroc* ha sido seleccionado fundamentalmente para los caracteres de ganancia diaria de peso (peso relativo: 5%), el espesor de la grasa dorsal (15%), el porcentaje de la grasa intramuscular (20%), el número de lechones nacidos vivos (45%) y el número de tetinas (15%). Las hembras *Duroc* destacan por su aptitud reproductiva y maternal, entre otros caracteres. El producto final destinado al matadero se obtiene mediante un cruzamiento a tres vías (**Figura 9**), donde se aprovecha la heterosis de las madres híbridas y sus crías, además de la complementariedad con la línea de machos finalizadores.

Los cerdos de la población Lipgen fueron trasladados, una vez finalizada la etapa de amamantamiento (3-4 semanas de edad), a la estación experimental IRTA-CCP para iniciar su etapa de cebo. En esta fase, se separaron en cuatro lotes y fueron alimentados *ad libitum* durante toda la crianza. Inicialmente, les fue suministrada una dieta con un aporte energético de 2450 kcal/kg (composición: 18% proteína, 3.8% fibra, 7 % grasa, 1 % lisina y 0.3% metionina), hasta que los cerdos alcanzaron los 150 días de edad y aproximadamente 90 kg de peso vivo. La dieta fue modificada durante los últimos 30-40 días previos al sacrificio (composición de 15.9% proteína, 4.5% fibra, 5.2% grasa, 0.7% lisina y 0.2% metionina), disminuyendo el aporte energético hasta las 2375 kcal/kg. Durante

todo el período de cebo, se midió de forma periódica el peso y el espesor del tocino dorsal.

El manejo de los animales durante la crianza y el sacrificio fueron realizados siguiendo las directrices nacionales e institucionales para las Buenas Prácticas Experimentales, aprobadas por el Comité Ético del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA).

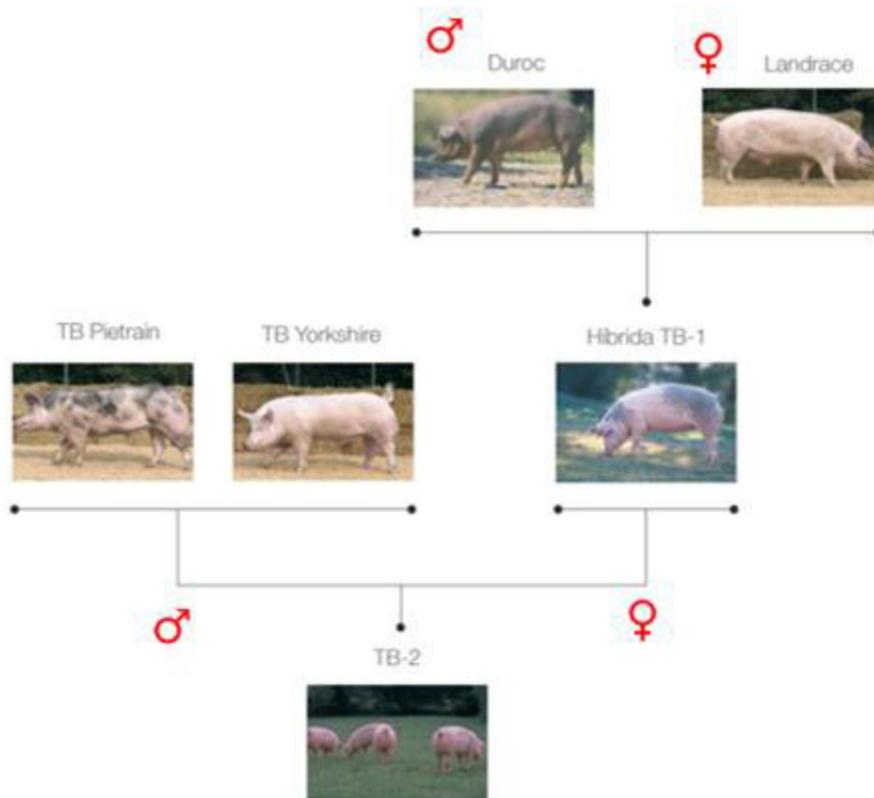


Figura 9. Cruce a tres vías para la obtención del producto final en la empresa Selección Batallé S.A. <http://www.batalle.com/es/node/97>.

Los cerdos Lipgen se sacrificaron en un matadero comercial a los 190 días de edad (aproximadamente a los 122 kg de peso vivo). Se recogió muestras (200 gramos aprox.) de los músculos GM y LD y se midieron distintos fenotipos relacionados con la calidad de la carne. Los caracteres medidos incluyeron el pH a las 24 horas post-sacrificio (pH_{24}) y la conductividad eléctrica (CE), midiéndose el primero con un pH-metro con un electrodo *Xerolyte* (Crison) y el segundo con un aparato *Pork Quality Meter* (Intek GmbH). Asimismo, se determinaron, mediante medición con un equipo Minolta Chroma-Meter CR-200 (Konica Minolta), tres parámetros CIELAB relacionados con el color de la carne: luminosidad (L^*), rojez (a^*) y amarillez (b^*). Todos los fenotipos fueron medidos a las 24 horas post-sacrificio.

El porcentaje de GIM fue estimado mediante la técnica de *Near Infrared Transmittance* (NIT, *Infratec 1625, Tecator Hoganas, Sweden*), la cual básicamente infiere el contenido de GIM a partir de las características de absorción y transmisión de la luz que varían según la composición de los tejidos. Los ácidos grasos fueron separados y cuantificados como ésteres metílicos preparados mediante el método AOAC (1990), de acuerdo a un protocolo de cromatografía líquida de gases publicado por Mach et al. (2006). El contenido de colesterol fue medido mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) tal como describe Cayuela et al. (2003).

3.2. Datos genotípicos.

Fueron genotipados un total de 352 animales mediante el chip *Illumina PorcineSNP60 BeadChip* (*Illumina Inc., San Diego, CA*), empleando para ello el protocolo *Infinium HD Assay Ultra* (**Figura 10**). Los SNPs fueron visualizados y analizados, en un primer control de calidad, con el programa *Genome Studio* (*Illumina*). Asimismo, se llevó a cabo un filtrado de los 62,163 SNPs incluidos en el

chip y de los individuos con una tasa elevada de genotipos faltantes mediante la herramienta informática PLINK *Whole Genome Association Analysis Toolset* (Purcell et al., 2007). Los criterios de exclusión de SNP e individuos fueron los siguientes:

- Los SNPs localizados en los cromosomas sexuales X e Y no se tomaron en consideración.
- Tasa de genotipos faltantes: (--mind 0.1). Individuos con más del 10 % de genotipos faltantes.
- Frecuencia alélica menor: (--maf 0.05). Los SNPs con una frecuencia alélica menor (MAF), igual o inferior al 5%.
- Tasa de genotipado: (--geno 0.05). Los marcadores con una tasa de genotipados correctos menor del 95%.
- Equilibrio de Hardy-Weinberg: (--hwe 0.001). Los marcadores cuya segregación no se ajustó de forma significativa (p -valor < 0.001) a las proporciones predichas por el test de Hardy-Weinberg.

Una vez realizados los controles de calidad, un total de 38,544 SNPs y 352 individuos quedaron disponibles para llevar a cabo los análisis GWAS.

3.3. Análisis de asociación genómico (GWAS).

Los análisis de asociación genómico se realizaron con el programa GenABEL (v.1.7-4) usando el método Grammar-gamma (*Genome-wide Rapid Analysis using Mixed Models and Score Test*) descrito por Amin et al. (2007) y Svishcheva et al. (2012). Asimismo, se empleó el programa *Efficient Mixed-Model Association eXpedited* (EMMAX) descrito por Kang et al. (2010). Ambos métodos permiten realizar la corrección de los datos por estructura familiar.

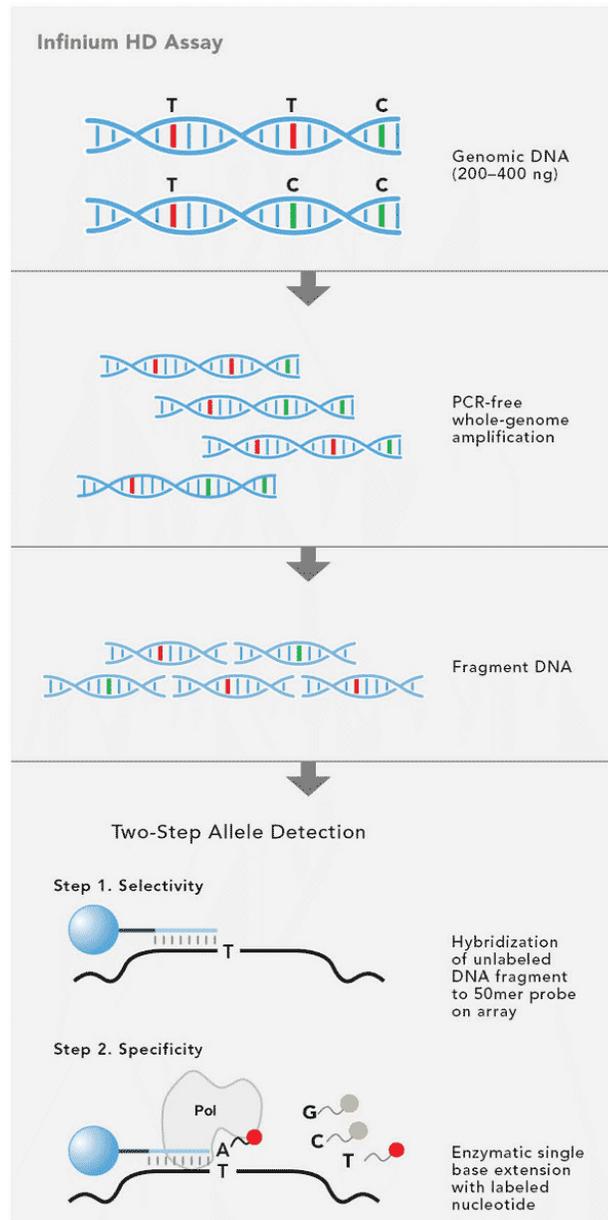


Figura 10. El protocolo *Infinium HD assay* está basado en la técnica de *primer-extension analysis*. Cada SNP viene definido por una sonda. El DNA problema es hibridado con el chip, uniéndose a la sonda para la que hay complementariedad. Luego se realiza la reacción de extensión con dideoxinucleótidos marcados con distintos fluoróforos. Dependiendo del color de la señal observada, puede determinarse el genotipo del individuo.

3.3.1. Modelos lineales empleados en los análisis de asociación genómicos

1-Modelo para análisis de los caracteres de grasa intramuscular y su composición:

- $y_{ijk}(GIM) = \mu + l_i + \beta_t t_j + \beta_a a_k + e_{ijk}$
- $y_{ijk}(Chol) = \mu + l_i + \beta_t t_j + \beta_a a_k + e_{ijk}$
- $y_{ijk}(\%AG) = \mu + l_i + \beta_f f_j + \beta_a a_k + e_{ijk}$

donde:

y_{ijk} : es el vector de los diferentes registros fenotípicos (GIM, colesterol o % de ácidos grasos) del j-ésimo animal con el k-ésimo genotipo perteneciente al i-ésimo lote.

μ : Media general de las observaciones.

l_i : Efecto fijo del i-ésimo lote (4 niveles).

t_j : Covariable del espesor del tocino dorsal.

f_j : Covariable de GIM.

a_k : Efecto genético aditivo del k-ésimo marcador (0, 1, 2).

β_t : Coeficiente de regresión parcial de y en t_j .

β_f : Coeficiente de regresión parcial de y en f_j .

β_a : Coeficiente de regresión parcial de y en a_k .

e_{ijk} : Error del modelo (parte de la observación no explicada por los factores del modelo).

2-Modelo para los caracteres de calidad de la carne (pH_{24} , CE, valores Minolta: rojez a^* , amarillez b^* , luminosidad L^*):

- $y_{ijk} = \mu + l_i + \beta_p p_j + \beta_a a_k + e_{ijk}$

donde:

y_{ijk} : es el vector de los diferentes registros fenotípicos (pH_{24} , CE, a^* , b^* , L^*) del j -ésimo animal con el k -ésimo genotipo perteneciente al i -ésimo lote.

μ : Media general de las observaciones.

l_i : Efecto fijo del i -ésimo Lote (4 niveles).

p_j : Covariable de peso vivo al sacrificio.

a_k : Efecto genético aditivo del k -ésimo marcador (0, 1, 2).

β_p : Coeficiente de regresión parcial de y en p_j .

β_a : Coeficiente de regresión parcial de y en a_k .

e_{ijk} : Error del modelo (parte de la observación no explicada por los factores del modelo).

3.3.2. Matriz de parentesco genómico (**G**).

La matriz de parentesco genómico (**G**) para corregir el efecto de la estructura familiar y realizar el cálculo de la heredabilidad, fue construida mediante la información obtenida a partir de los marcadores moleculares:

$$G_{(i,j)} = \frac{1}{L} \sum_{k=1}^L \frac{(g_{ki} - p_k)(g_{kj} - p_k)}{p_k(1 - p_k)}$$

donde:

$G_{(i,j)}$ es el parentesco molecular entre los individuos (i,j) ; L es el número de loci; p_k es la frecuencia alélica del k -ésimo locus y $p_{k,j}$ es el genotipo del j -ésimo individuo en el k -ésimo locus, que toma valores de 0, $\frac{1}{2}$ y 1 correspondientes a los genotipos AA, AB y BB (Price et al., 2006; Amin et al., 2007 y Astle y Balding, 2010).

3.3.3. *Genome-Wide Rapid Analysis Using Mixed Models and Score Test (GRAMMAR).*

Primero se realizó el análisis GWAS mediante el método Grammar-gamma incluido en GenABEL (v.1.7-4) y recomendado por Aulchenko et al. (2007) para el análisis de poblaciones con estructura familiar. Este procedimiento, descrito por Svishcheva et al. (2012), es una aproximación al método *Family-Based Score Test for Association* (FASTA) de (Chen y Abecasis, 2007), y está basado en un análisis de componentes de varianza mediante el empleo de modelos mixtos. El GWAS se lleva a cabo en dos etapas: primero se estiman los parámetros de segregación y el factor Grammar-gamma (constante obtenida a partir del ratio entre los test GRAMMAR y FASTA), incluyendo en el modelo los efectos fijos, las covariables y la matriz de parentesco entre los individuos. En la segunda etapa, se realiza un *score test* para determinar la asociación entre los valores transformados que fueron obtenidos en el primer paso y el genotipo. Finalmente, el efecto estimado de los SNPs y los valores del *test* estadístico se corrigen por el factor de corrección Grammar-gamma.

3.3.4. *Efficient Mixed-Model Association eXpedited (EMMAX).*

También se realizó el análisis de asociación genómico con el método propuesto por Kang et al. (2010) y desarrollado en el programa EMMAX. Este método permite llevar a cabo el estudio de asociación en tres etapas: primero se estima la matriz **G** la cual representa la estructura familiar de la muestra. A continuación se estima la contribución de dicha estructura al fenotipo mediante un modelo de componentes de varianza, obteniéndose una matriz de covarianza de los fenotipos que tiene en cuenta el efecto de las relaciones genéticas entre los individuos sobre el fenotipo. Finalmente, en la tercera etapa, mediante el procedimiento de mínimos cuadrados generalizado (*F-test*) o *test score*, se realiza

el test de asociación para cada marcador, evaluando la relación de los marcadores con el fenotipo y teniendo en cuenta la estructura de la población a través de la matriz de covarianza de los fenotipos previamente calculada.

La función `qvaluebh95` de GenABEL (v.1.7- 4) fue usada para calcular el *false discovery rate* (FDR), estableciendo un umbral de significación correspondiente a un q-valor ≤ 0.05 .

3.4. Estimación de la heredabilidad.

Los métodos empleados para los análisis de asociación realizan estimas de la heredabilidad utilizando la información de los marcadores moleculares (h^2_{SNP}) para la construcción de la matriz de parentesco entre individuos. Los parámetros del modelo se obtienen a través de estimas de máxima verosimilitud mediante la utilización de modelos mixtos lineales y teniendo en cuenta los efectos fijos y covariables expuestos anteriormente para cada carácter.

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_e^2} \quad \text{Falconer y Mackay (1996).}$$

Donde: σ_a^2 es la varianza genética aditiva y σ_e^2 la varianza de los efectos no-aditivos.

También se estimó la proporción de la varianza fenotípica (PVE) explicada por los marcadores mediante el modelo *Bayesian Sparse Linear Mixed Model* propuesto por Zhou et al. (2013):

$$PVE(\beta, u, \tau) := \frac{V(X\beta + u)}{V(X\beta + u) + \tau^{-1}}$$

Donde: β es el vector del efecto de los SNPs, u es un n-vector de los efectos aleatorios y τ^{-1} es la varianza de los residuos del error.

Capítulo IV. Resultados.

4. RESULTADOS.

4.1. Registros fenotípicos.

Los valores estadísticos de media y desviación estándar para diversos caracteres relacionados con el contenido y la composición de la GIM se muestran en la **Tabla 8**. El porcentaje de GIM y el contenido de colesterol fueron superiores en el músculo GM respecto al LD. Los porcentajes de los ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico y linoleico, presentaron valores similares en ambos músculos. Asimismo, las medias y desviaciones estándar de los distintos caracteres relacionados con la calidad de la carne fueron bastante parecidas en ambos músculos (**Tabla 9**).

Tabla 8. Registros fenotípicos de caracteres relacionados con el porcentaje y la composición de la GIM en los músculos GM y LD

Fenotipo	N	<i>longissimus dorsi</i>				<i>gluteus medius</i>			
		media	SD	min	max	media	SD	min	max
% Grasa intramuscular	352	3.9	1.5	1.07	12.9	5.24	2.0	1.3	15.1
Colesterol (mg/g)	352	58.6	9.5	25.3	97.2	64.6	11.1	29.4	111.6
% ácido palmítico	352	23.4	1.6	17.4	27.3	23.2	1.4	13.1	26.6
% ácido esteárico	352	11.7	1.2	9.1	16.1	11.2	1.1	7.9	14.8
% ácido oleico	352	34.9	5.1	20.7	45.6	35.1	4.4	20.1	45.7
% ácido linoleico	352	14.1	5.0	4.8	30.2	14.9	4.1	6.9	31.6

SD: desviación estándar, **Min**: valor mínimo de las observaciones, **Max**: valor máximo de las observaciones.

Tabla 9. Registros fenotípicos de los caracteres de calidad de la carne en los músculos GM y LD.

Fenotipo	N	<i>longissimus dorsi</i>				<i>gluteus medius</i>			
		media	SD	min	max	media	SD	min	max
pH ₂₄	352	5.8	0.2	5.4	6.6	5.7	0.2	3.9	6.4
Conductividad (mS/cm)	352	2.9	0.8	0.8	5.7	3.5	1.1	0.9	7.5
luminosidad L*	352	45.9	3	37.5	54.7	46.7	3.4	37.2	55.9
rojez a*	352	7	1.3	3.8	11.7	7.8	1.4	3.6	12.2
amarillez b*	352	0.2	0.9	-2.2	3.5	0.8	1.2	-1.8	4.9

mS/cm: millisiemens/centímetro, **SD:** desviación estándar, **Min:** valor mínimo de las observaciones, **Max:** valor máximo de las observaciones. *Valores Minolta relativos al color de la carne.

4.2. Análisis de asociación genómico para caracteres relacionados con el porcentaje y la composición de la grasa intramuscular.

4.2.1. Asociaciones significativas a nivel genómico.

Los resultados de los análisis de asociación con el contenido y la composición de la GIM, obtenidos con el método Grammar-gamma, se muestran en la **Figura 11** y en la **Tabla 10**. Un total de 85 SNPs presentaron asociaciones significativas a nivel genómico, siendo el porcentaje de esteárico el fenotipo para el cual se observó un mayor número de asociaciones significativas: tres SNPs en SSC4 (GM) y 70 SNPs en SSC14 (20 en LD y 50 en GM). También se detectaron asociaciones significativas con el ácido palmítico (GM) en SSC5.

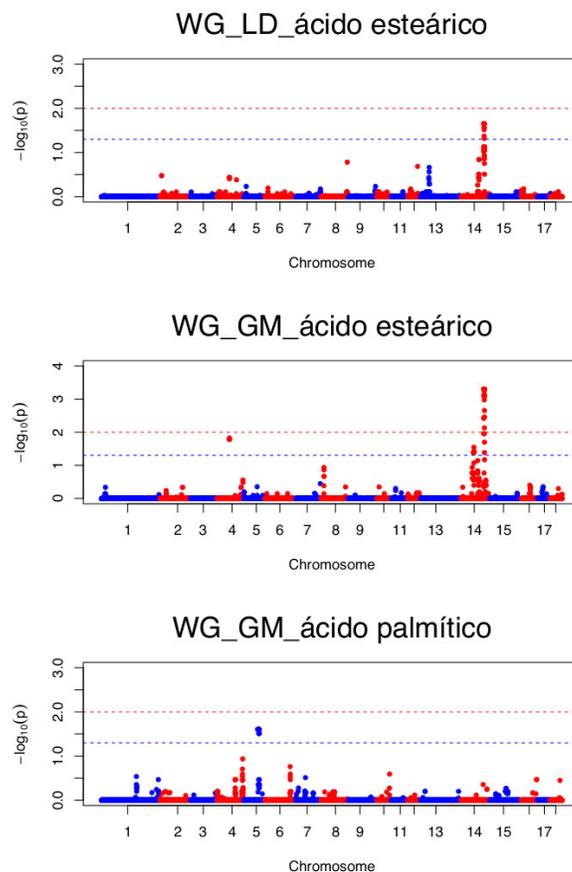


Figura 11. Detección de regiones asociadas a nivel genómico con los caracteres de contenido y composición de la GIM mediante el método Grammar-gamma. WG: asociación a nivel genómico, GM: músculo *gluteus medius*, LD: músculo *longissimus dorsi*. La línea azul es el nivel de significación con un q-valor ≤ 0.05 y la línea roja es el nivel de significación con un q-valor ≤ 0.01 .

Tabla 10. Asociaciones significativas a nivel genómico para el porcentaje y la composición de la GIM (método Grammar-gamma).

CROM	Fenotipo	N	SNP¹	Reg (Mb)	p	q	E	A1	MAF
SSC4	GM_18:0	3	DIAS0001351	63.9-63.9	<0.001	0.01	0.53	A	0.28
SSC5	GM_C16:0	12	H3GA0016883	71.7-80.1	<0.001	0.02	0.49	A	0.07
SSC14	GM_18:0	50	ALGA0081091	120.9-124.4	<0.001	<0.001	-0.51	A	0.35
	LD_C18:0	20	ALGA0081091	120.4-123.4	<0.001	0.02	-0.57	A	0.35

GM: *gluteus medius*, **LD:** *longissimus dorsi*, **N:** número de SNPs en la región, **CROM:** cromosoma, **SNP¹:** SNP más significativo, **Reg (Mb):** región donde se localizan los SNPs significativos según Ensembl (*S.scrofa* 10.2), **p:** p-valor nominal, **q:** q-valor con **FDR** \leq 0.05, **E:** efecto alélico (%), **A1:** alelo minoritario, **MAF:** frecuencia del alelo minoritario.

En la **Figura 12** y **Tabla 11** se muestran las regiones que el programa EMMAX detectó como significativamente asociadas, a nivel genómico, con el porcentaje y la composición de la GIM. Más concretamente, se identificó un total de 108 SNPs, siendo el ácido esteárico el fenotipo que presentó un mayor número de asociaciones significativas con 96 SNPs localizados en el cromosoma SSC14 (55 SNPs para GM y 41 para LD). En el SSC4 se observaron los mismos resultados que los previamente generados con el método Grammar-gamma (3 SNPs asociados con el ácido esteárico en GM). Además, se encontraron nuevas asociaciones significativas en el SSC6: 2 SNPs de GM con el ácido palmítico, y 6 y 1 SNPs con el contenido de GIM a nivel de GM y LD respectivamente.

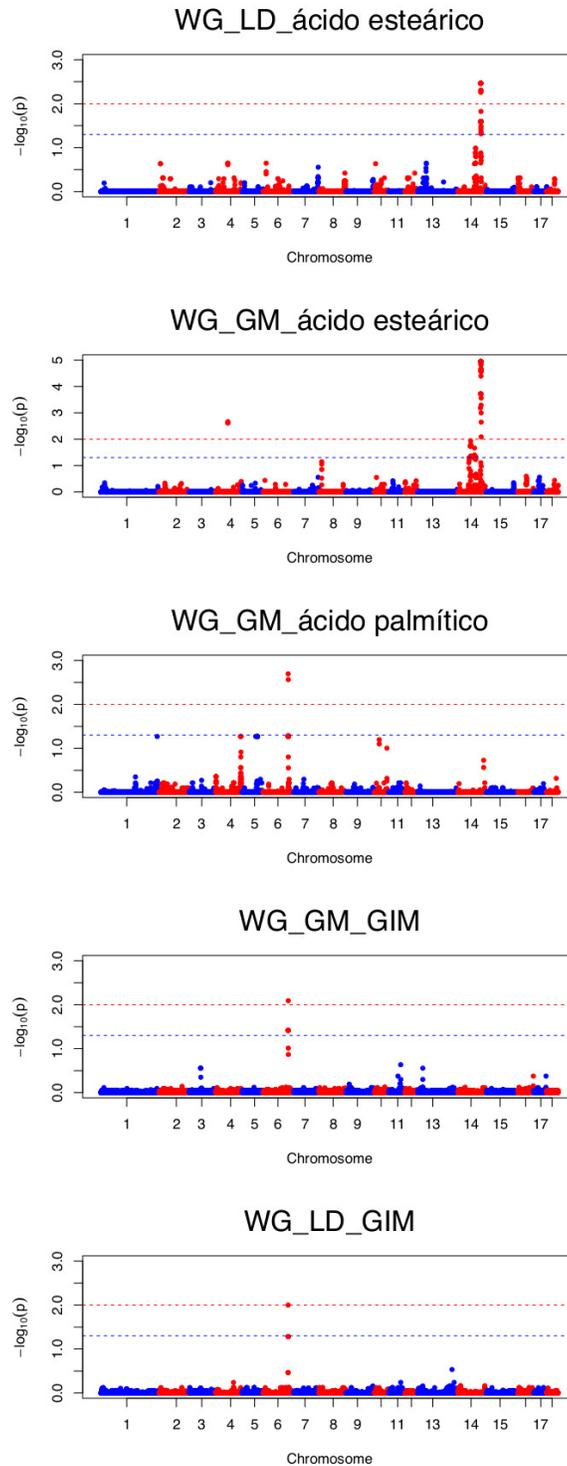


Figura 12. Regiones asociadas a nivel genómico con los caracteres de contenido y composición de la GIM mediante el programa EMMAX. WG: asociación a nivel genómico, GM: músculo *gluteus medius*, LD: músculo *longissimus dorsi*. La línea azul es el nivel de significación con un q-valor ≤ 0.05 y la línea roja es el nivel de significación con un q-valor ≤ 0.01 .

Tabla 11. Resultado del análisis de asociación a nivel genómico con el porcentaje y la composición de la grasa intramuscular llevado a cabo con el método EMMAX.

CROM	Fenotipo	N	SNP ¹	Reg (Mb)	p	q	E	A1	MAF
SSC4	GM_18:0	3	MARC0050687	63.9-63.9	<0.001	<0.001	0.49	A	0.28
SSC6	GM_GIM	6	H3GA0053839	135.0-136.0	<0.001	0.02	0.57	G	0.47
	LD_GIM	1	MARC0025443	135.1	<0.001	0.009	0.64	A	0.32
	GM_C16:0	2	MARC0025443	135.1-136.0	<0.001	0.02	0.64	A	0.32
SSC14	LD_C18:0	41	MARC0111695	120.4-123.4	0.003	0.003	0.63	C	0.35
	GM_18:0	11	H3GA0040656	63.5-67.2	<0.001	0.01	0.47	A	0.33
		1	ASGA0064951	94.9	0.003	0.04	0.39	A	0.31
		43	ALGA0081091	120.4-124.4	<0.001	<0.001	0.63	A	0.35

GM: *gluteus medius*, **LD:** *longissimus dorsi*, **N:** número de SNPs en la región, **CROM:** cromosoma, **SNP¹:** SNP más significativo, **Reg (Mb):** región donde se localizan los SNPs significativos según Ensembl (*S.scrofa* 10.2), **p:** p-valor nominal, **q:** q-valor con **FDR** \leq 0.05, **E:** efecto alélico (%), **A1:** alelo minoritario, **MAF:** frecuencia del alelo minoritario.

4.2.2. Asociaciones significativas a nivel cromosómico.

En el análisis de asociación a nivel cromosómico, se detectaron varias regiones asociadas al porcentaje y la composición de GIM, con un total de 186 SNPs. Los resultados de estos análisis, llevados a cabo mediante el método Grammar-gamma se muestran en la **Tabla 12**. Se encontraron asociaciones significativas en el cromosoma SSC5 con el porcentaje de ácido linoleico (GM). Además, se encontraron asociaciones en SSC11 con la GIM en los dos músculos GM y LD; y en el SSC17, también con la GIM en el músculo GM. En SSC14, se identificaron varias regiones adicionales a las ya identificadas a nivel genómico, que presentaban asociaciones significativas con el porcentaje de ácido esteárico.

Tabla 12: Resultado del análisis de asociación a nivel cromosómico con el porcentaje y la composición de la GIM llevado a cabo con el método Grammar-gamma.

CROM	Fenotipo	N	SNP¹	Reg (Mb)	p	q	E	A1	MAF
SSC4	GM_C18:0	3	MARC0050687	63.9-63.9	<0.001	0.002	0.49	A	0.28
SSC5	GM_C18:2n6c	6	ASGA0085283	71.7- 79.8	<0.001	<0.001	-1.06	C	0.07
	GM_C16:0	25	H3GA0016883	71.7- 80.5	<0.001	<0.001	-1.09	A	0.07
SSC11	LD_GIM GM_GIM	1	ALGA0062557	63.2	<0.001	0.02	0.72	A	0.16
SSC13	GM_GIM	6	MARC0046697	26.9-27.1	<0.001	0.03	-0.71	G	0.36
SSC14	LD_C18:0	8	MARC0095107	93.3-94.9	<0.001	0.01	-0.41	G	0.42
		46	ALGA0081091	120.4-124.4	<0.001	<0.00	-0.51	A	0.35
	GM_C18:0	20	ALGA0078300	57.1-68.2	<0.001	0.002	-0.49	C	0.23
		13	ALGA0079209	87.9 -94.9	<0.001	0.005	0.49	G	0.48
		57	ALGA0081091	119.9-132.3	<0.001	<0.00	-0.57	A	0.35
SSC17	GM_GIM	1	MARC0015514	64.4	<0.001	0.03	0.87	G	0.21

GM: *gluteus medius*, **LD:** *longissimus dorsi*, **N:** número de SNPs en la región, **CROM:** cromosoma, **SNP¹:** SNP más significativo, **Reg (Mb):** región donde se localizan los SNPs significativos según Ensembl (*S.scrofa* 10.2), **p:** p-valor nominal, **q:** q-valor con **FDR** \leq 0.05, **E:** efecto alélico (%), **A1:** alelo minoritario, **MAF:** frecuencia del alelo minoritario.

Como se puede observar en la **Tabla 13**, con el método EMMAX se detectaron a nivel cromosómico un total de 218 SNPs asociados significativamente a la GIM y su composición, que estaban distribuidos en los cromosomas SSC4, SSC5, SSC6, SSC10 y SSC14. Se confirmaron las distintas regiones detectadas con el método Grammar-gamma y además se identificaron 4 SNPs asociados con el porcentaje de ácido palmítico en el músculo GM (SSC4). También se encontraron asociaciones significativas en los cromosomas SSC5 (GM), SSC6 (LD) y SSC10 (GM).

Tabla 13. Resultado del análisis de asociación a nivel cromosómico con el porcentaje y la composición de la GIM llevado a cabo con el programa EMMAX.

CROM	Fenotipo	N	SNP ¹	Reg (Mb)	p	q	E	A1	MAF
SSC4	GM_C16:0	4	ALGA0028963	133.4-135.1	<0.001	0.01	-0.49	G	0.35
	GM_C18:0	3	DIAS0001351	63.9-63.9	<0.001	<0.001	0.53	A	0.28
SSC5	GM_C16:0	12	ALGA0033008	71.7-80.1	<0.001	<0.001	0.85	G	0.07
SSC6	LD_GIM	6	MARC0025443	135.0-135.4	<0.001	<0.001	0.64	A	0.32
	GM_GIM	8	H3GA0053839	135.0-136.0	<0.001	<0.001	0.57	G	0.47
	LD_C16:0	3	ASGA0093565	135.1-135.4	<0.001	<0.001	0.77	A	0.34
	GM_16:0	11	MARC0025443	135.2-137.8	<0.001	<0.001	0.64	A	0.32
SSC10	GM_C16:0	2	ASGA0047035	24.9-24.9	<0.001	0.03	0.56	C	0.29
		1	H3GA0030570	66.2	<0.001	0.03	-0.53	A	0.22
SSC14	LD_C18:0	30	INRA0045411	87.8-97.0	<0.001	0.007	-0.41	A	0.41
		45	ALGA0081091	120.4-124.4	<0.001	<0.001	0.63	A	0.35
	GM_C18:0	20	ALGA0078300	57.1-68.2	<0.001	<0.00	-0.47	C	0.35
		21	ALGA0079209	87.4-97.0	<0.001	0.001	-0.41	G	0.48
		52	ALGA0081091	120.4-124.4	<0.001	<0.001	0.63	A	0.35

GM: *gluteus medius*, **LD:** *longissimus dorsi*, **N:** número de SNPs en la región, **CROM:** cromosoma, **SNP¹:** SNP más significativo, **Reg (Mb):** región donde se localizan los SNPs significativos según Ensembl (*S.scrofa* 10.2), **p:** p-valor nominal, **q:** q-valor con **FDR** ≤ 0.05, **E:** efecto alélico (%), **A1:** alelo minoritario, **MAF:** frecuencia del alelo minoritario.

Al comparar los resultados obtenidos en los dos músculos, se pudo identificar un mayor número de asociaciones en el músculo GM. Esta particularidad se observó con los dos programas, tanto a nivel genómico como cromosómico (ver **Tablas 10 a 13**). A nivel genómico, con el método Grammar-gamma se observó 65 SNPs asociados a la GIM y su composición en el músculo GM y 20 SNPs en el LD. Con el método EMMAX fueron 66 SNPs en el GM y 42 en LD. A nivel cromosómico los resultados fueron similares: con el método Grammar-gamma se obtuvieron 132 SNPs asociados en GM y 54 en el LD, y con EMMAX resultaron 134 SNPs en el GM y 84 SNPs en el LD.

4.3. Análisis de asociación para caracteres relacionados con la calidad de la carne.

En el análisis GWAS de los caracteres relacionados con la calidad de la carne, no se detectó ninguna asociación significativa a nivel genómico. A nivel cromosómico y con el método Grammar-gamma se identificó un total de 58 SNPs asociados significativamente a los caracteres bajo estudio. En la **Tabla 14** se observa que el mayor número de asociaciones afectaban al color de la carne: 37 SNPs de SSC3 asociados con la rojez a* de GM y 1 SNP de SSC10 con la rojez de LD. Asimismo, en SSC4 y SSC5 se encontraron 20 SNPs significativos relacionados con la conductividad eléctrica de GM y LD.

Tabla 14. Asociaciones significativas a nivel cromosómico para los caracteres de calidad de la carne (método Grammar-gamma).

CROM	Fenotipo	N	SNP ¹	Reg (Mb)	p	q	E	A1	MAF
SSC3	GM_a*	2	MARC0041746	16.6-16.7	<0.001	0.04	0.61	G	0.71
		25	H3GA0009489	50.2-56.1	<0.001	0.04	0.61	G	0.17
		10	ALGA0021085	119.7-120.4	<0.001	0.04	0.55	A	0.24
SSC4	LD_CE	6	H3GA0013593	104.2-105.1	<0.001	0.02	0.27	G	0.38
SSC5	LD_CE	10	ALGA0030823	14.4-16.1	<0.001	<0.001	-0.33	A	0.18
	GM_CE	4	ALGA0030823	13.0-15.7	<0.001	<0.001	-0.44	A	0.23
SSC10	LD_a*	1	ALGA0113811	70.6	<0.001	<0.001	0.57	G	0.36

GM: *gluteus medius*, **LD:** *longissimus dorsi*, **N:** número de SNPs en la región, **CROM:** cromosoma, **SNP¹:** SNP más significativo, **Reg (Mb):** región donde se localizan los SNPs significativos según Ensembl (*S.scrofa* 10.2), rojez de la carne (a*), luminosidad de la carne (L*), **p:** p-valor nominal, **q:** q-valor con **FDR** ≤ 0.05, **E:** efecto alélico (%), **A1:** alelo minoritario, **MAF:** frecuencia del alelo minoritario.

Empleando el programa EMMAX, un total de 71 SNPs presentaron asociaciones significativas con los caracteres de calidad de la carne (**Tabla 15**). Puede observarse que el carácter con un mayor número de asociaciones fue la rojez (a*) del GM con 28 SNPs, lo cual coincide con los resultados obtenidos con

el método Grammar-gamma. Además se obtuvieron asociaciones significativas con la conductividad eléctrica en los cromosomas SSC4 y SSC5. También el valor de pH del músculo, medido a las 24 horas post-sacrificio (pH₂₄) resultó estar asociado significativamente con 14 SNPs situados en los cromosomas SSC12 (GM) y SSC16 (LD).

Tabla 15. Asociaciones detectadas a nivel cromosómico para los caracteres de calidad de la carne mediante el programa EMMAX.

CROM.	Fenotipo	N	SNP ¹	Reg (Mb)	p	q	E	A1	MAF
SSC3	GM_a*	3	H3GA0009494	16.6-17.0	<0.001	0.01	-0.68	G	0.16
		25	ALGA0018939	50.2-56.1	<0.001	0.01	-0.66	G	0.17
SSC4	LD_CE	23	ASGA0021133	104.4-106.5	<0.001	0.01	-0.27	A	0.38
SSC5	GM_CE	3	ALGA0117613	13.0-15.7	<0.001	0.04	0.52	A	0.10
	LD_CE	3	ALGA0030842	15.4-16.1	<0.001	0.01	0.29	A	0.20
SSC12	LD_pH ₂₄	2	ALGA0120212	20.1-22.8	<0.001	0.03	0.06	G	0.28
SSC16	LD_pH ₂₄	12	ALGA0089269	17.3-23.5	<0.001	0.04	0.07	A	0.19

GM: *gluteus medius*, **LD:** *longissimus dorsi*, **N:** número de SNPs en la región, **CROM:** cromosoma, **SNP¹:** SNP más significativo, **Reg (Mb):** región donde se localizan los SNPs significativos según Ensembl (*S.scrofa* 10.2), rojez de la carne (**a***), luminosidad de la carne (**L***), **p:** p-valor nominal, **q:** q-valor con **FDR** ≤ 0.05, **E:** efecto alélico (%), **A1:** alelo minoritario, **MAF:** frecuencia del alelo minoritario.

4.4. Varianza fenotípica explicada por los marcadores.

En la **Figura 13**, se pueden observar las estimaciones de la proporción de la varianza fenotípica para el contenido y la composición de la GIM explicada por los marcadores SNPs. Las ratios más bajas correspondieron al contenido de colesterol medido en el músculo LD y al porcentaje de ácido oleico en GM, mientras que para el contenido de GIM en ambos músculos se observaron las ratios más elevadas.

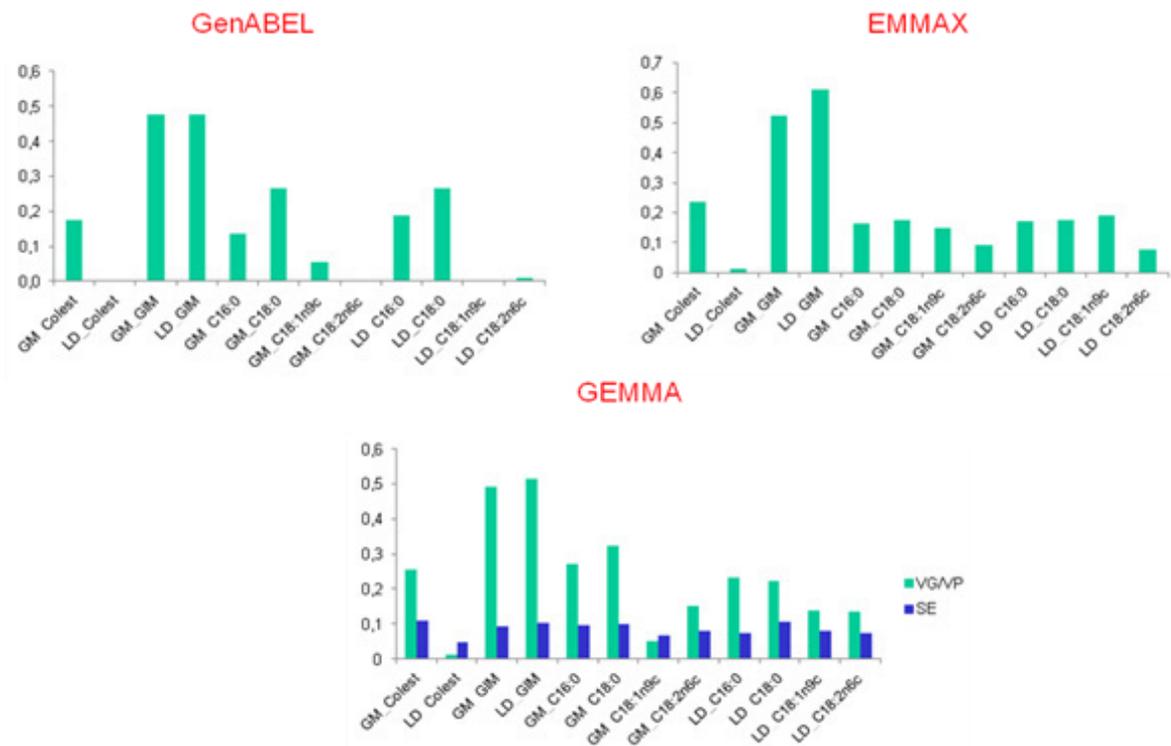


Figura 13. Varianza fenotípica explicada por los marcadores, estimada mediante los programas GenABEL, EMMAX y GEMMA para el contenido y la composición de la GIM. El color verde representa los valores de las estimaciones y el azul la desviación típica (solo estimada con GEMMA).

La proporción de la varianza fenotípica de los caracteres de calidad de la carne explicada por los marcadores SNPs se indica en la **Figura 14**. Los valores más bajos se observaron para la luminosidad (L^*) y la amarillez (b^*) del músculo GM y la luminosidad del LD, mientras que los más altos fueron para la rojez en ambos músculos.

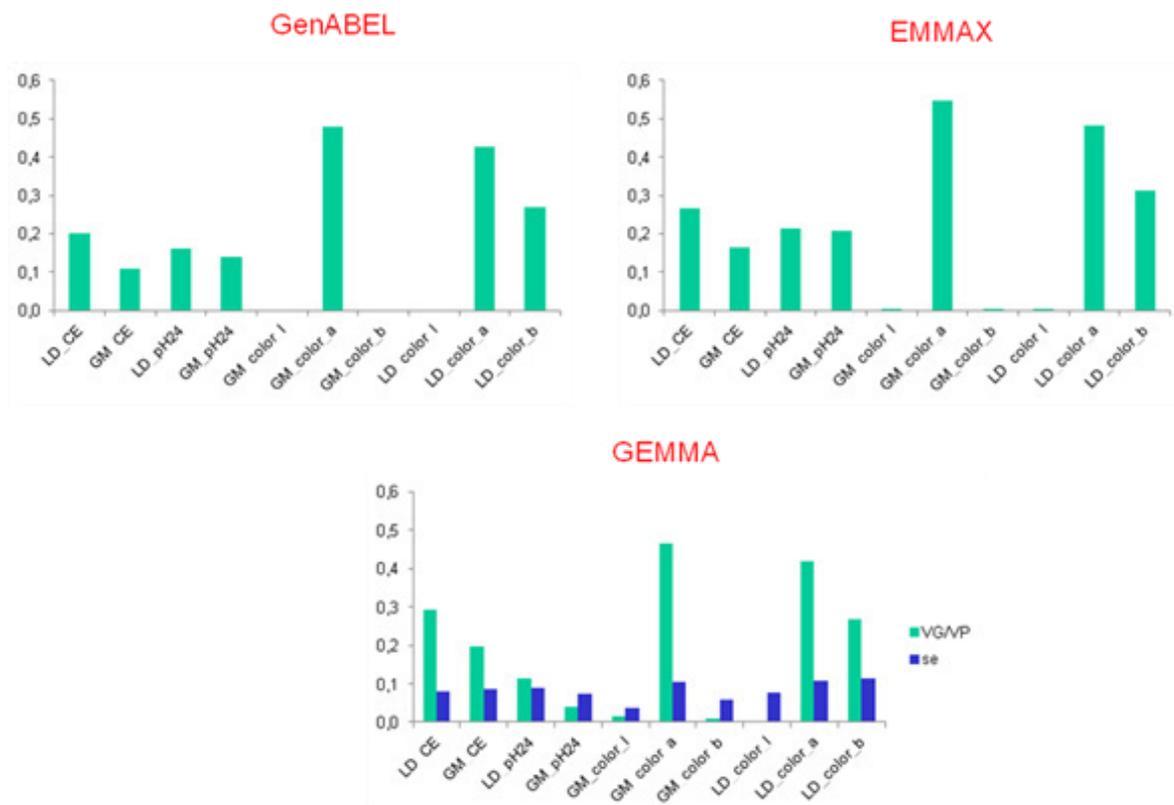


Figura 14. Proporción de la varianza fenotípica de los caracteres de calidad de la carne explicada por los marcadores SNPs. Dicha proporción se estimó mediante los programas GenABEL, EMMAX y GEMMA, y en el caso de GEMMA se obtuvo el error típico de la estimación (indicado en azul).

Capítulo V. Discusión.

5. DISCUSIÓN.

5.1. Proporción de la varianza fenotípica explicada por los marcadores.

La proporción de la varianza fenotípica explicada por los SNPs (h^2_{SNP}) y estimada con los tres programas (GenABEL, EMMAX y GEMMA) para la GIM fluctuó entre 0.48-0.61 (LD) y 0.47-0.52 (GM). Estos valores concuerdan con las heredabilidades descritas en otras poblaciones porcinas para dicho carácter: $h^2=0.26-0.86$ (Sellier, 1998) y $h^2=0.49$ (Suzuki et al., 2006). Específicamente en cerdos *Duroc*, (Solanes et al., 2009) determinaron una h^2 de 0.46 para GIM. Casellas et al. (2010), en la misma población Lipgen objeto de estudio, hallaron valores de heredabilidad de 0.55 y 0.47 para la GIM en los músculos LD y GM respectivamente. Estos valores de h^2 , calculados a partir del parecido entre parientes, no son directamente comparables a la proporción de varianza fenotípica explicada por los marcadores, aunque tienen un valor indicativo.

Las estimaciones de las h^2_{SNP} para los caracteres relacionados con la composición de GIM oscilaron entre 0-0.27 (LD) y 0-0.32 (GM). Estos caracteres presentan heredabilidades bastante heterogéneas en las diferentes poblaciones porcinas analizadas hasta la fecha: Yang et al. (2013) obtuvieron, en una población cruzada *White Duroc* x *Erhualian* F_2 , valores de h^2 entre 0.28 y 0.64 (músculo LD); y en una población de raza pura *Sutai* (músculo LD) los mismos autores observaron valores de h^2 entre 0 y 0.68. Asimismo, la h^2 del porcentaje de ácido mirístico fue de 0.39 y 0 en las poblaciones F_2 y *Sutai* respectivamente. De modo similar, las h^2 del ácido palmítico fueron de 0.36 y 0.07 para las poblaciones F_2 y *Sutai*. Casellas et al. (2010) obtuvieron también heredabilidades en el rango de 0.25-0.47 (LD) a 0.37-0.47 (GM) para la composición de los ácidos grasos, aunque los intervalos de confianza fueron bastante grandes indicando que dichas estimaciones son poco precisas (**Tabla 16**). En general, podemos concluir que los SNPs del chip 60K recogen una parte significativa de la varianza fenotípica para algunos caracteres (GIM, ácido palmítico y esteárico), mientras que para otros no

(colesterol y ácido linoleico). Estos caracteres con una baja h^2_{SNP} también presentaron factores de Bayes bajos (0.6-3.9) e intervalos de confianza que incluyeron el valor cero en el trabajo de Casellas et al. (2010), por lo que cabe concluir que en nuestra población tienen una baja determinación genética (**Tabla 16**).

Tabla 16. Valores de h^2_{SNP} obtenidos con tres programas distintos y h^2 calculadas a partir del parecido entre parientes por Casellas et al. (2010).

Fenotipo	¹ BLMM		GenABEL	EMMAX	Casellas et al., 2010		
	h^2_{SNP}	SE	h^2_{SNP}	h^2_{SNP}	Bayes factor ²	Media	HPD95
GM_Colest, mg/g	0.25	0.11	0.17	0.24	4.8	0.35	0.02 a 0.70
LD_Colest, mg/g	0.01	0.05	0.00	0.01	3.9	0.30	0.01 a 0.65
GM_GIM,%	0.49	0.09	0.47	0.52	992.9	0.47	0.18 a 0.86
LD_GIM,%	0.51	0.10	0.48	0.61	1,152.3	0.55	0.18 a 0.91
GM_C16:0, %	0.27	0.09	0.14	0.16	40.4	0.44	0.06 a 0.90
GM_C18:0, %	0.32	0.09	0.27	0.18	1,575.0	0.43	0.09 a 0.81
GM_C18:1n9c,%	0.05	0.07	0.05	0.15	1.6	0.32	0.00 a 0.73
GM_C18:2n6c,%	0.15	0.07	0.00	0.09	8.9	0.37	0.01 a 0.77
LD_C16:0, %	0.23	0.07	0.19	0.17	15.6	0.47	0.08 a 0.88
LD_C18:0, %	0.22	0.10	0.27	0.17	883.0	0.45	0.09 a 0.86
LD_C18:1n9c, %	0.14	0.08	0.00	0.19	1.3	0.30	0.00 a 0.69
LD_C18:2n6c, %	0.13	0.07	0.01	0.08	0.6	0.25	0.00 a 0.68

GM: *gluteus medius*, **LD:** *longissimus dorsi*, ¹Bayesian Sparse Linear Mixed Model.²Factor de Bayes obtenido como ratio de las probabilidades posteriores de dos modelos alternativos (con y sin efecto poligénico); **HPD95:** *Highest posterior density region at 95%*.

Las h^2_{SNP} estimadas para el pH₂₄ fluctuaron entre 0.04-0.21 (GM) y 0.11-0.21 (LD). Estos valores bajos-moderados coinciden con los descritos en la literatura por Van Wijk et al. (2005) $h^2 = 0.14$ y por Enger et al. (2010) en cerdos *Duroc* (h^2 de 0.22 y 0.27 en los músculos LD y GM respectivamente). Entre los valores Minolta, el parámetro de rojez a^* fue el que presentó las h^2_{SNP} más altas (entre 0.42-0.48 en LD y 0.47-0.55 en GM). Estas estimaciones fueron ligeramente superiores a las obtenidas por Enger et al. (2010) en *Landrace* ($h^2 = 0.46$) y en

Duroc ($h^2 = 0.43$). En cuanto a la luminosidad L^* , la h^2_{SNP} fue nula en ambos músculos, mientras que en la literatura se han descrito valores que van de 0.28 a 0.41 (Enger et al., 2010). Es importante destacar que las estimaciones de h^2 difieren entre músculos. Así pues, Larzul et al. (1999) describieron valores de luminosidad L^* de 0.23 y 0.03 en los músculos LD y *gluteus profundus* respectivamente.

Es necesario precisar, tal como se ha comentado anteriormente, que para las estimaciones de las heredabilidades se construyó la matriz de parentesco a partir de la información molecular, mientras que los autores citados en los dos párrafos anteriores calcularon dicha matriz a partir de los datos del pedigrí. Hernández-Sánchez et al. (2012) obtienen valores similares de h^2 cuando utilizan una u otra metodología (molecular vs pedigrí) para calcular la matriz de parentesco. Kan et al. (2010) también compararon ambos procedimientos y demostraron que los valores de h^2 para diferentes caracteres medidos en humanos son bastante parecidos. En cualquier caso, las estimas de h^2 pueden variar entre poblaciones, ya que dependen de las frecuencias alélicas de los genes que determinan el fenotipo analizado, así como del tamaño muestral y el diseño experimental empleado en cada estudio. Es importante destacar que en los análisis GWAS no resulta posible “capturar” toda la variabilidad aditiva de la población y además, por lo general, no se tienen en cuenta los efectos epistáticos, epigénicos y la interacción genotipo-ambiente.

5.2. Concordancia posicional con otros estudios GWAS realizados en porcino.

Comparando nuestros resultados con estudios GWAS realizados por otros autores, hemos detectado coincidencias parciales para la composición de la GIM. Cabe mencionar las asociaciones detectadas por los dos programas (GenABEL y EMMAX) a nivel genómico en el SSC14 (120.4-124.4 Mb) con el ácido esteárico

en ambos músculos. Yang et al. (2013) en un estudio similar obtienen, aproximadamente en la misma región del SSC14, 22 y 24 SNPs asociados significativamente con el ácido esteárico (músculo LD) en una población cruzada *White Duroc* x *Erhualian* F₂ y en la población *Sutai*, respectivamente. Resulta interesante que en las poblaciones donde está presente la raza *Duroc* también se hayan detectado previamente QTLs que afectan al ácido esteárico en el SSC14 (Sanchez et al., 2007; Quintanilla et al., 2011; Uemoto et al., 2012^a y Uemoto et al., 2012^b). Menores coincidencias se detectaron para otros fenotipos relacionados con la composición de la GIM, p.e. Ramayo-Caldas et al. (2012) detectaron asociaciones con el ácido palmítico en el cromosoma SSC4 (región 90.7-92.2 Mb, *assembly: S.scrofa* 9), aunque en diferentes posiciones que las nuestras (región 133.4-135.1 Mb, *assembly: S.scrofa* 10.2). Es importante resaltar que aunque son diferentes *assemblies* se ha comprobado la correspondencia entre ambos.

En la misma población Lipgen objeto de estudio, Hernández-Sánchez et al. (2012) realizaron un GWAS para el contenido de GIM y de grasa dorsal. Estos autores demostraron que el método empleado para corregir la estructura poblacional tiene un efecto muy importante sobre el número de regiones asociadas a caracteres. Hay que destacar que tanto en el trabajo de Hernández-Sánchez et al. (2012) como en el nuestro, no se obtuvieron asociaciones significativas a nivel genómico para el contenido de GIM cuando se empleó el método GRAMMAR. En cambio, cuando Hernández-Sánchez et al. (2012) corrigieron la estructura poblacional con los métodos PC1G, STRATA-IBS o STRATA-PED, el número de marcadores asociados a nivel genómico con la GIM de LD fue de 46, 13 y 57 SNPs, respectivamente. En el presente trabajo se ha usado el método GRAMMAR que es el más conservativo, principalmente porque realiza las estimas de las asociaciones entre los marcadores y el fenotipo a partir de los residuos del modelo (Aulchenko et al., 2007). Asimismo, hemos llevado a cabo un segundo análisis con EMMAX para evaluar el nivel de coincidencia entre distintas metodologías. Podemos afirmar que los resultados obtenidos con GenABEL y EMMAX son bastante consistentes, al menos en las regiones más

significativas, aunque presentan algunas diferencias (ver **Tabla 17**). Cabe resaltar que las discrepancias entre las regiones genómicas asociadas a caracteres en estudios GWAS obtenidas por distintos programas, fue descrita por Aulchenko et al. (2007) y Zhou y Stephens (2012). En particular Zhou y Stephens (2012) en un estudio donde compararon tres programas (GenABEL, EMMAX y GEMMA) observaron que existían diferencias en la significación de las asociaciones obtenidas por los programas y concluyeron que ello se debía a diferencias en el método de control de la estructura familiar.

Por otra parte, existe una baja coincidencia posicional entre nuestros resultados y los obtenidos por Luo et al. (2012^a), quienes en una población *Large White* x *Minzhu* F₂ detectaron 37 SNPs del SSC12 asociados con la GIM del músculo LD, y por Ma et al. (2013), quienes identificaron 7 SNPs del SSCX y 25 SNPs del SSC9 asociados con el contenido de GIM en la población cruzada *White Duroc* x *Erhualian* F₂ y en la raza *Sutai*, respectivamente. En resumen se puede decir que los trabajos GWAS realizados hasta la fecha para el contenido de GIM han presentado una baja concordancia posicional entre sí y respecto a nuestro estudio, lo que viene a sugerir la existencia de un notable grado de heterogeneidad genética para este carácter. También es posible la existencia de sesgos (*ascertainment bias*) en la evaluación (particularmente en poblaciones asiáticas) y que las distintas metodologías estadísticas empleadas en el análisis de los datos sean una fuente importante de discrepancias que, sin embargo, no poseerían ningún significado biológico.

Es importante tener en cuenta una serie de aspectos cuando se realiza e interpreta un estudio de GWAS. Los cruces entre razas divergentes aprovechan las diferencias genéticas entre dichas razas y por tanto se detectan muchas más regiones asociadas a caracteres que cuando se analizan poblaciones de raza pura, donde la variación genética es menor. También es necesario tener en cuenta, tal como se ha comentado anteriormente que aunque en la confección del chip se incluyeron muestras de jabalí japonés, y en la raza *Large White* existe una

fuerte introgresión de razas chinas, las principales poblaciones empleadas para su diseño tienen un origen europeo (Ramos et al., 2009). Ello hace que con el chip, de forma sistemática, se infraestime la variabilidad de otras poblaciones porcinas con patrimonios genéticos muy distintos al europeo.

Tabla 17. Coincidencias entre las regiones asociadas significativamente a caracteres de contenido y composición de GIM, detectadas por los programas GenABEL y EMMAX.

Nivel	CROM	Fenotipo	Reg (Mb)	GenABEL	EMMAX
Genómico	SSC4	GM_18:0	63.9-63.9	x	x
	SSC5	GM_C16:0	71.7-80.1	x	
	SSC6	GM_GIM	135.0-136.0		x
		LD_GIM	135.1		x
	SSC14	GM_18:0	63.5-67.2		x
			94.9		x
			120.9-124.4	x	x
	LD_C18:0	120.4-123.4	x	x	
Cromosómico	SSC4	GM_C18:0	63.9	x	x
		GM_C16:0	133.4-135.1		x
	SSC5	GM_C18:2n6c	71.7- 79.8	x	
		GM_C16:0	71.7- 80.5	x	x
	SSC6	LD_GIM	135.0-135.4		x
		GM_GIM	135.0-136.0		x
		LD_C16:0	135.1-135.4		x
		GM_C16:0	136.2-137.8		x
	SSC10	GM_C16:0	24.9		x
			66.2		x
	SSC11	LD_GIM	63.2	x	
		GM_GIM	63.2	x	
	SSC13	GM_GIM	26.9-27.1	x	
	SSC14	LD_C18:0	93.3-94.9	x	x
			120.4-124.4	x	x
		GM_C18:0	57.1-68.2	x	x
			87.9 -94.9	x	x
120.9-124.4			x	x	
SSC17	GM_GIM	64.4	x		

GM: *gluteus medius*, **LD:** *longissimus dorsi*, **CROM:** cromosoma, **Reg (Mb):** región donde se localizan los SNPs significativos según *Ensembl* (*S.scrofa* 10.2).

Los resultados obtenidos para los caracteres relacionados con la calidad de la carne no mostraron significación a nivel genómico. Se obtuvo un 55% de coincidencias entre las asociaciones obtenidas con los dos programas GenABEL y EMMAX (ver **Tabla 18**). La baja detección de asociaciones a nivel genómico para estos caracteres relacionados con la calidad de la carne es bastante común entre los trabajos GWAS realizados hasta la fecha, p.e. Luo et al. (2012^a) obtuvieron solo 2 SNPs en el SSC12 asociados significativamente, a nivel genómico, con la rojez a* del músculo LD. Asimismo, Ma et al. (2013) obtuvieron 1 SNP asociado con el pH₂₄ en el SSC3, 3 SNPs (sin mapear) con la rojez a*, 3 SNPs con la pérdida de agua en el SSC15 y 2 SNPs con el contenido de la GIM (1 en el SSC9 y 1 en el SSCX). Es importante destacar que las asociaciones detectadas a nivel cromosómico en nuestro estudio mostraron una baja similitud con las descritas por otros autores. No obstante, se apreciaron algunas coincidencias, p.e. la asociación obtenida con el programa GenABEL en el SSC10 (posición 70.6 Mb) con la rojez (a*) del músculo LD, está situada a ~2.2 Mb del SNP *ALGA0105452* identificado por Ma et al. (2013) como asociado a la rojez del músculo semimembranoso. Cabe resaltar que, al igual que en otros estudios previos, el mayor porcentaje de asociaciones significativas fueron detectadas para la rojez a*, aunque a nivel cromosómico (37 SNPs). Es posible que el bajo número de asociaciones encontradas para la calidad de la carne se deba a que la medición de estos fenotipos viene influida por numerosos factores (operario, equipo de medición, condiciones de temperatura y humedad, entre otros) difíciles de controlar. También es posible que la variabilidad genética de estos caracteres en poblaciones comerciales sea baja.

Tabla 18. Coincidencias entre las regiones genómicas detectadas por los programas GenABEL y EMMAX.

Nivel	CROM	Fenotipo	Reg (Mb)	GenABEL	EMMAX
Cromosómico	SSC3	GM_a*	16.6-16.7	x	x
			50.2-56.1	x	x
			119.7-120.4	x	
	SSC4	LD_CE	104.2-106.5	x	x
	SSC5	LD_CE	14.4-16.1	x	x
		GM_CE	13.0-15.7	x	x
	SSC10	LD_a*	70.6	x	
	SSC12	LD_pH ₂₄	20.1-22.8		x
SSC16	LD_pH ₂₄	17.3-23.5		x	

GM: *gluteus medius*, **LD:** *longissimus dorsi*, **CROM:** cromosoma, **Reg (Mb):** región donde se localizan los SNPs significativos según *Ensembl* (*S.scrofa* 10.2).

5.3. Concordancia posicional con otros estudios de detección de QTL realizados en porcino.

Al realizar la comparación con los QTLs detectados en la misma población Lipgen por Quintanilla et al. (2011), se observaron ciertas similitudes, aunque no coincidencias exactas (ver **Figura 15**), p.e. la asociación significativa obtenida por los dos programas (GenABEL y EMMAX), a nivel genómico, en ambos músculos, entre una región de SSC14 (120.9-124.4 Mb) y el porcentaje de ácido esteárico. De este modo, Quintanilla et al. (2011) detectaron en una de las familias de la población Lipgen un QTL que afecta al ácido esteárico y al *cis*-Vaccenico en el SSC14, aproximadamente en la posición 143.4 Mb. También en una población *Duroc*, Sanchez et al. (2007) detectaron un QTL en el SSC14 para el porcentaje de ácido esteárico a nivel cromosómico en 137.8 Mb. Otra similitud digna de mención se observó al comparar nuestros datos con los de Uemoto et al. (2012^a), quienes en una población de raza pura *Duroc* indicaron la presencia de un QTL (SSC14, 60 cM) con efecto sobre los ácidos grasos esteárico y linoleico. En un trabajo posterior, Uemoto et al. (2012^b) realizaron un cartografiado fino de este QTL y demostraron que tiene efectos sobre los ácidos grasos esteárico, linoleico y mirístico, así como sobre el punto de fusión de las grasas. Cabe destacar que el

intervalo de confianza del QTL contiene el gen de la *estearoil-CoA desaturasa* (*SCD*), que codifica una enzima que cataliza la transformación de ácido esteárico en oleico mediante la adición de un doble enlace. En la población Lipgen, el SNP más significativo detectado en el SSC14 se encuentra a solo 5.9 Kb de distancia del gen *SCD*, lo que viene a confirmar la importancia de las asociaciones detectadas en esta región con vistas a seguir profundizando en el estudio del metabolismo de los ácidos grasos.

Respecto al contenido de GIM, al comparar nuestros datos con los de Quintanilla et al. (2011) sólo se obtuvo una coincidencia en el SSC6 (músculo LD) que afectaba a un QTL (posición ~113.7 Mb, a ~23 Mb de las asociaciones detectadas en este trabajo a nivel genómico con EMMAX) con efecto sobre la composición de la GIM (ver **Figura 15**). Un resultado similar obtuvieron Hernández-Sánchez et al. (2012) al comparar sus resultados GWAS con los QTLs detectados previamente en la misma población Lipgen, donde solo obtuvieron coincidencias para un QTL de porcentaje de la GIM (músculo LD) en el SSC3. Es importante destacar que la baja concordancia entre los estudios GWAS realizados en porcino y otros trabajos previos de análisis de QTLs ha sido puesta de manifiesto por diversos autores, p.e. Ramayo-Caldas et al. (2012) observaron coincidencias solo en el 11% de las regiones detectadas en asociación por los análisis GWAS y de QTL. Mientras que en el caso de Yang et al. (2013) 23 QTLs, de los 63 previamente descritos en su población, coincidieron con las asociaciones obtenidas en el análisis GWAS. Al comparar nuestros datos GWAS con los almacenados en la PigQTLdb observamos varias coincidencias posicionales (ver **Figura 15**).

Para los caracteres relacionados con la calidad de la carne no se observaron coincidencias entre el análisis GWAS y los mapas de QTLs descritos en la misma población por Gallardo et al. (2012). Esta discrepancia podría tener un origen metodológico, tal como se ha comentado previamente. Por otra parte, sí se encontraron algunas similitudes con QTLs descritos en otras poblaciones porcinas,

p.e. para la CE a las 24 horas se han descrito tres QTLs en poblaciones cruzadas donde estaban presentes las razas *Meishan*, *Pietrain* y también el jabalí europeo Cepica et al. (2003) y Lee et al. (2003): uno en el SSC4 (posición ~98.2 Mb) y dos en el SSC5 (~63.1 y ~91.05 Mb). Por otro lado, Markljung et al. (2008), en una población F₂ *Landrace* x *Swedish Hampshire*, y Li^a et al. (2010), en un cruce *Duroc* x *Danish Landrace* y *Danish Large White*, indicaron la presencia de dos QTLs a nivel cromosómico con efecto sobre la rojez a* en el SSC3 en las posiciones 56.7 cM (Li^a et al., 2010) y 111.9 cM (Markljung et al., 2008). Un QTL que afecta al pH₂₄ fue detectado por Markljung et al. (2008) en el SSC16 (LD) muy próximo (~14 Mb) al SNP *ALGA0089269* (el más significativo en la región asociada a este carácter según el programa EMMAX).

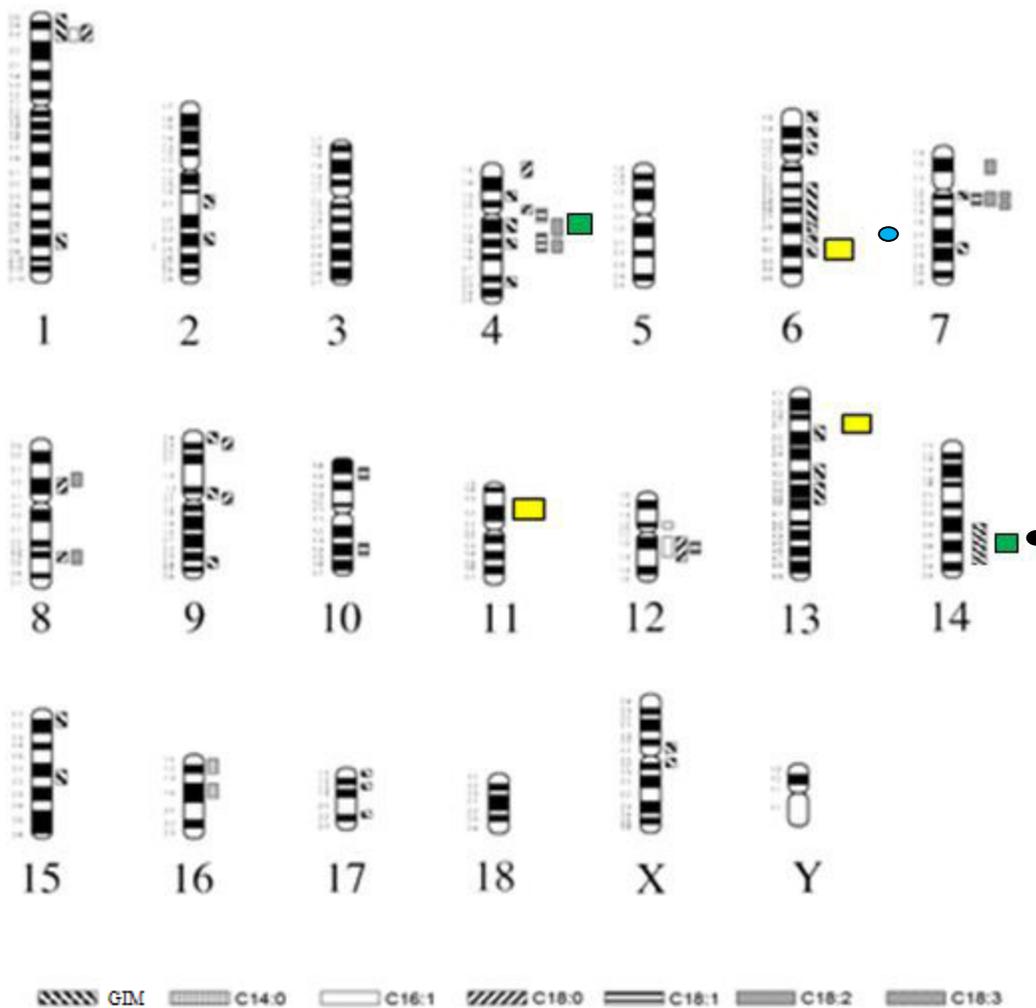


Figura 15. QTLs detectados para el contenido y la composición de la GIM (síntesis realizada a partir de la información extraída de la PigQTLdb). Rectángulo amarillo: posición aproximada de las asociaciones detectadas a nivel genómico con el programa EMMAX para la GIM. Rectángulo verde: posición aproximada de las asociaciones detectadas con GenABEL y EMMAX para la composición (ácido esteárico) de la GIM. Círculo negro: QTL detectado por Quintanilla et al. (2011) para el porcentaje de ácido esteárico. Círculo azul: QTL detectado por Quintanilla et al. (2011) para el porcentaje de GIM.

En resumen, cabe inferir que por lo general, cuando comparamos los análisis de QTLs y GWAS, incluso aquellos realizados en una misma población, las coincidencias entre ambas aproximaciones son bajas. Ello puede deberse, entre otros factores, a: 1) los análisis GWAS son realizados con un mayor número de marcadores genéticos (60,000 SNPs distribuidos en todo el genoma vs aprox. 100-120 microsatélites en los análisis de QTL); 2) los efectos que se incluyen en el modelo afectan mucho a la detección de regiones asociadas a caracteres. Incluso en una misma población considerando efectos diferentes, los resultados pueden no coincidir (Yang et al., 2013).

5.4. Segregación de variantes genéticas asociadas a caracteres bajo elección en poblaciones comerciales.

La detección de QTLs en porcino se ha realizado principalmente en poblaciones F_2 (Andersson et al., 1994; Bidanel et al., 2001; Varona et al., 2002 y Guo et al., 2009). Una década atrás, se planteó la necesidad de determinar si en las poblaciones comerciales segregan QTLs con efectos sobre caracteres para los cuales han sido seleccionadas. Los resultados obtenidos por diversos autores demostraron que sí; p.e. Evans et al. (2003) confirmaron la presencia en el SSC3 de un QTL con efecto sobre el crecimiento y el depósito de grasa en poblaciones de raza pura *Hampshire*, *Landrace* y *Pietrain*, y otro QTL en el SSC4 con efecto sobre el depósito de grasa en *Hampshire*, *Large White* y *Pietrain*. Por otra parte, estos autores confirmaron la presencia del mismo QTL (SSC4) con efecto sobre el crecimiento en la raza *Meishan*. También Nagamine et al. (2003) detectaron en el SSC7 un QTL para el depósito de grasa en 5 poblaciones comerciales. Por su parte, Vidal et al. (2005), en una línea comercial *Landrace*, detectaron, en los cromosomas SSC2 y SSC7, 2 QTLs con influencia sobre caracteres relacionados con la calidad de la carne.

En el caso de la población Lipgen, hemos identificado regiones asociadas a caracteres para fenotipos, como el contenido de GIM, para los cuales ha sido

seleccionada. Ello indica que las variantes genéticas que son beneficiosas desde un punto de vista productivo, no han sido fijadas a pesar de encontrarse bajo selección durante muchas generaciones. Esto puede deberse a varios factores: 1) la naturaleza poligénica de los caracteres productivos, por lo que la selección actúa simultáneamente sobre muchos loci y en consecuencia su efecto es menor; 2) el incluir varios objetivos de selección en un mismo índice, lo cual hace que la presión de selección sea menor para cada uno de los caracteres; 3) la baja presión selectiva sobre las hembras (si se la compara con la de los machos), y 4) la existencia de un cierto antagonismo entre la selección natural y la selección artificial.

5.5. Diferencias entre mapas GWAS para dos músculos porcinos.

Un importante resultado de este trabajo fue la constatación de que hay una baja concordancia posicional entre las asociaciones GWAS encontradas en ambos músculos, tanto a nivel genómico como cromosómico, p.e. en la **Tabla 10** se puede observar que las asociaciones detectadas a nivel genómico para el ácido palmítico, con el programa GenABEL, fueron específicas del músculo GM. De modo similar, las asociaciones detectadas con ambos programas para la rojez a* en SSC3 (**Tablas 14 y 15**) afectaban al músculo GM pero no al LD. Esto indica que el determinismo genético de los caracteres de contenido y composición de la GIM, así como los de calidad de la carne, está influido por factores músculo-específicos. La presencia de factores genéticos que actúan de forma independiente en cada músculo concuerda con resultados previos de Quintanilla et al. (2011), quienes en la misma población Lipgen detectaron una falta de concordancia entre los mapas de QTL generados en los músculos GM y LD. De forma similar, Gallardo et al. (2012) obtuvieron baja concordancia posicional entre los músculos GM y LD para los caracteres relacionados con la calidad de la carne, p.e. detectaron 3 QTLs con efecto sobre el color de la carne en los cromosomas SSC8, SSC13 y SSC15, que fueron específicos del músculo GM. Asimismo, Nii et al. (2006) demostraron que los QTLs detectados para la composición lipídica de la

grasa dorsal (SSC1p, SSC1q, SSC4, SSC5, SSC9, SSC15 y SSC17) difieren respecto a los que afectan la composición de la grasa perirrenal (SSC2, SSC3, SSC4, SSC5, SSC6, SSC14, SSC16 y SSCX).

Quintanilla et al. (2011) exponen que la falta de correspondencia entre los mapas de QTLs generados en tejidos o localizaciones anatómicas distintas podría deberse a la expresión diferencial de mRNA o RNAs reguladores (la penetrancia de los QTLs vendría modulada por la existencia de esta expresión diferencial). Varios estudios han mostrado diferencias en los perfiles de expresión génica entre músculos, p.e. Quintanilla et al. (2010) encontraron que un número elevado de genes, principalmente relacionados con los procesos de la proliferación celular, desarrollo del tejido y contracción muscular, estaban diferencialmente expresados entre los músculos GM y LD. También Li^b et al. (2010) encontraron un total de 159 transcritos implicados en diferentes funciones (estructura contráctil, matriz extracelular, metabolismo energético y estrés, entre otros), que estaban diferencialmente expresados en los músculos LD y *soleus*. En un estudio más reciente, Liu et al. (2013) describieron que también hay expresión diferencial de microRNAs (miRNAs) entre músculos, p.e. el 32.01% de los miRNAs fueron específicamente expresados en el músculo LD y un 20.15% en el *psaos mayor*. Por su parte Musunuru et al. (2010) demostraron la existencia de una penetrancia tejido-específica para una mutación causal del gen *SORT1*: esto significa que hay un SNP que crea un lugar de unión al factor de transcripción C/EBP que está fuertemente asociado a los niveles de expresión mRNA de SORT1 en el hígado pero no en el tejido adiposo o los linfocitos. Obviamente, la mutación causal de SORT1, que afecta a los niveles de colesterol, sólo puede alcanzar una penetrancia plena en aquellos tejidos en los que C/EBP se esté expresando.

5.6. Detección de regiones pleiotrópicas para caracteres lipídicos.

La existencia de pleiotropía para diversos caracteres cuantitativos se ha descrito en numerosos organismos modelo como p.e. *Drosophila melanogaster*,

ratón, levadura y *Arabidopsis thaliana* (Flint y Mackay, 2009). Una evaluación de SNPs registrados en la *National Human Genome Research Institute* (NHGRI) indicó que un 4.6% de los SNPs y un 16.9% de los genes tienen efectos pleiotrópicos (Solovieff et al., 2013). En esta tesis, el término pleiotropía lo usamos en un sentido amplio para denotar SNPs asociados a más de un fenotipo. En un estudio realizado con mil ratones F₁₆ pertenecientes a una línea *Advanced Intercross Line* (AIL), se detectaron 23 QTLs con efectos pleiotrópicos sobre diversos caracteres ligados a la obesidad, las concentraciones de lípidos séricos y la susceptibilidad a la diabetes (Lawson et al., 2011). En porcino, Corominas et al. (2013) han descrito un SNP en el promotor del gen *ELOVL6* con efectos simultáneos sobre los porcentajes de palmítico y palmitoleico. En este trabajo, solo se ha detectado una región (135.1-135.4 Mb en el SSC6) asociada simultáneamente (a nivel genómico con el programa EMMAX) con dos caracteres: porcentaje de ácido palmítico (LD) y de GIM en ambos músculos (ver **Tabla 11**). Para los caracteres relacionados con la calidad de la carne, en cambio, no se ha detectado la existencia de regiones que afecten a más de un carácter. Hernández-Sánchez et al. (2012), en la misma población Lipgen aunque con un análisis estadístico distinto al realizado en el presente trabajo (análisis bivariado), también encontraron pocos SNPs que afectaran a más de un carácter, a pesar de que se habían hallado correlaciones positivas entre los caracteres de GIM y grasa dorsal.

5.7. Genes candidatos.

Con el objetivo de identificar posibles genes candidatos relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos y con los caracteres de la calidad de la carne, se identificaron loci que estuvieran localizados en una ventana que comprende la región asociada al carácter. En la **Tabla 19** se muestran los principales genes candidatos que, según el *Gene Ontology Enrichment Analysis Software Toolkit* (Zheng y Wang, 2008), tuvieron alguna relación con fenotipos lipídicos o bien con caracteres de calidad de la carne. Cabe destacar que en el SSC14 próximo al SNP *ALGA0081091* (el más significativo a nivel genómico dentro de esta región)

está situado muy cerca (5.9 kb) del gen de la *estearoil-CoA desaturasa (SCD)*. Este gen ha sido relacionado (Enoch et al., 1976; Paton y Ntambi, 2009) con la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados, en particular la *SCD* cataliza la introducción del primer doble enlace entre los carbonos 9 y 10 del *palmitoil-CoA* y *estearoil-CoA* para formar los ésteres grasos de *acil-CoA* monoinsaturados, *palmitoleoil-CoA* y *oleoil-CoA*. Uemoto et al. (2012^b) identificaron 2 SNPs, localizados en la región promotora del gen *SCD*, que presentaban una fuerte asociación con el porcentaje de ácido esteárico intramuscular. Por otra parte, Ros-Freixedes et al. (2012) evaluaron la asociación de varios polimorfismos del gen *SCD* con el ácido oleico y detectaron que el alelo A del SNP *g.2281A>G*, situado en el promotor, está asociado a un mayor contenido de oleico y del índice oleico / esteárico (MUFA/SFA), aunque no afecta a la GIM. El polimorfismo presenta un modo de acción génica aditiva, con un efecto de sustitución para el ácido linoleico entre el 0.7% y el 0.8%, en GM y LD, respectivamente.

Otro gen localizado aproximadamente a 2 Mb del SNP más significativo, a nivel genómico, del SSC14 (120.4-123.4) fue el locus que codifica la molécula *elongation of very long-chain fatty acids 3 (ELOVL3)*. Este gen pertenece a una familia génica que codifica diversas enzimas responsables de la elongación de los ácidos grasos de cadena larga (Denic y Weissman, 2007). Específicamente han demostrado en ratones que, al suprimir los niveles de mRNA del *ELOVL3*, en adipocitos *3T3-L1*, disminuyen los TG, así como la expresión de genes relacionados con la lipogénesis. Por otra parte, Zdravec et al. (2010) describieron que ratones *knockout* para el gen *ELOVL3* presentan una reducción de los niveles de adiponectina, TG y colesterol así como una disminución de la lipogénesis hepática. Estas evidencias refuerzan la necesidad de profundizar en el análisis de esta región del SSC14, pues existen indicios de la presencia de factores genéticos que influyen en la variabilidad fenotípica de los lípidos intramusculares.

En el SSC5, y localizado a ~6.8 Kb del intervalo (71.7-80.1 Mb), donde se encuentran los SNPs asociados con el ácido palmítico del músculo GM, se

encuentra el gen que codifica el receptor de la adiponectina 2 (*ADIPOR2*). La adiponectina es una hormona secretada por los adipocitos que juega un importante papel en el metabolismo energético del organismo, ya que entre otras funciones, estimula la oxidación de los ácidos grasos, reduce los niveles plasmáticos de triglicéridos y además está implicado en el metabolismo de la glucosa a través del aumento de la sensibilidad a la insulina (Palomer et al., 2005). Se ha demostrado la implicación de la adiponectina en la reducción de los ácidos grasos libres y TG en animales obesos (Arita et al., 1999).

En cuanto a los caracteres de calidad de la carne, en SSC5, a aproximadamente una distancia de 354 Kb del SNP *ALGA0030823* asociado con la CE del LD, hemos identificado el gen *wingless-type MMTV integration site family member 10B* (*Wnt10b*). Este locus pertenece a la familia de genes *wingless-type* (*Wnt*) y su función ha sido relacionada con la regulación adipogénica y miogénica de las células musculares (Hoppler et al., 1996; Cossu y Borello, 1999). En este sentido, Vertino et al. (2005) observaron que en ratones *knockout* para el gen *Wnt10b* aumentó la expresión de genes adipogénicos y la acumulación de lípidos en los mioblastos. Muy próximo al SNP *ALGA0030823* (SSC5, 15.7 Mb), se encontró el gen que codifica la *protein kinase, AMP-activated gamma 1 non-catalytic subunit* (*PRKAG1*), una de las subunidades de la *adenosine monophosphate activated protein kinase* (*AMPK*). La AMPK es un sensor energético, y en respuesta a los niveles intracelulares de ATP, inhibe la biosíntesis de lípidos. Milan et al. (2000) describieron que la sustitución (R200Q) en el gen *PRKAG3*, afecta al metabolismo del glucógeno en el músculo. Ciobanu et al. (2001) han demostrado el importante efecto que tiene el polimorfismo del gen *PRKAG3* sobre los niveles de glucógeno y lactato, los cuales son componentes esenciales que influyen sobre el pH del músculo, la retención de agua y el color de la carne después del sacrificio.

En resumen, la identificación de genes candidatos posicionales y funcionales para los fenotipos bajo estudio es un paso más en cuanto a la localización de

posibles mutaciones causales. Una aproximación muy interesante para avanzar en este terreno consistirá en aprovechar la información generada a partir de la secuenciación del genoma de los 5 machos fundadores de la población Lipgen. De esta forma en las regiones y genes asociados significativamente a fenotipos de calidad de la carne y de GIM podremos determinar SNPs específicos de la población Lipgen, distintos de los incluidos en el chip 60K, y predecir su posible efecto funcional. Aquellos que sean más relevantes, podrían ser genotipados en toda la población Lipgen, acotando mejor los intervalos de confianza de las regiones asociadas a caracteres y estableciendo hipótesis sobre su posible causalidad. También pretendemos aprovechar la información de expresión génica (microarrays y RNAseq) para identificar posibles SNPs reguladores.

Tabla 19. Selección de genes candidatos localizados en las regiones asociadas con el contenido y la composición de la GIM y con la calidad de la carne.

CROM	Carácter	Reg (Mb)	Símbolo	Referencia
SSC3	GM_a*	17.57-17.58	<i>TRIM72</i>	Lee ^b et al. (2010); Jung y Ko (2010)
SSC4	GM_C18:0	61.91-61.94	<i>TPD52</i>	Kamili et al. (2013)
		64.72-64.74	<i>PEX2</i>	Kovacs et al. (2004)
SSC 5	GM_C16:0	70.99-71.02	<i>ADIPOR2</i>	Arita et al. (1999) y Kovacs et al. (2004)
		79.12-79.21	<i>ANO6</i>	Kmit et al. (2013)
	GM_C18:2	73.68-73.74	<i>ABCD2</i>	Liu et al. (2012)
	LD_CE	15.40-15.41	<i>Wnt10b</i>	Cossu y Borello (1999); Hoppler et al. (1996) y Vertino et al. (2005)
		15.44-15.52	<i>PRKAG1</i>	Milan et al. (2000)
SSC 14	GM_C18:0 LD_C18:0	120.96-120.98	<i>SCD</i>	Enoch et al. (1976); Paton y Ntambi (2009)
		121.49-121.57	<i>PAX2</i>	Bouchard et al. (2005)
		123.77-123.77	<i>CYP17A1</i>	Goyal et al. (2012)
		123.08-123.08	<i>ELOVL3</i>	Denic y Weissman (2007); Kobayashi y Fujimori (2012)

GM: *gluteus medius*, **LD:** *longissimus dorsi*, **CROM:** cromosoma, **Reg (Mb):** región donde se localizan el gen según Ensembl (*S.scrofa* 10.2), rojez de la carne (**a***).

Capítulo VI. Conclusiones.

6. CONCLUSIONES.

1. A pesar de tratarse de una línea comercial altamente seleccionada, la población *Duroc* objeto de estudio presenta un grado notable de variación genética para algunos de los caracteres estudiados: h^2_{snp} del porcentaje de grasa intramuscular (0.47-0.52 en *gluteus medius* a 0.48-0.61 en *longissimus dorsi*) y la rojez de la carne h^2_{snp} (desde 0.42-0.43 en *longissimus dorsi* a 0.47-0.55 en *gluteus medius*). En cambio, para otros fenotipos la variación genética explicada por los marcadores SNP fue baja: porcentaje de ácido linoleico h^2_{snp} (desde 0-0.15 en *gluteus medius* a 0-0.19 en *longissimus dorsi*) y la luminosidad de la carne h^2_{snp} (desde 0 en *longissimus dorsi* a 0-0.02 en *gluteus medius*).

2. En cuanto a los caracteres vinculados al porcentaje y composición de la grasa intramuscular, con los programas GenABEL y EMMAX se han encontrado asociaciones coincidentes y significativas, a nivel genómico, para el porcentaje de ácido esteárico (músculos *gluteus medius* y *longissimus dorsi*) en el SSC14 (120.9-124.4 Mb). Esta región genómica contiene el gen de la *estearoil-CoA desaturasa*, el cual tiene una función clave en la síntesis de ácidos grasos insaturados. Asimismo, se ha detectado otra asociación significativa para este mismo fenotipo (aunque sólo para el músculo *gluteus medius*) en el SSC4 (63.9 Mb). Por otra parte, se han hallado otras asociaciones significativas a nivel genómico, aunque no hay coincidencia entre los programas GenABEL (ácido palmítico en SSC5) y EMMAX (ácido palmítico y GIM en SSC6).

3. Para este mismo grupo de caracteres, a nivel cromosómico se detectaron asociaciones coincidentes (GenABEL+EMMAX) para los porcentajes de ácido esteárico de *gluteus medius* (SSC4 y SSC14) y *longissimus dorsi* (SSC14), así como para el porcentaje de ácido palmítico de *gluteus medius* (SSC5). Por otra parte, se han hallado diversas asociaciones significativas a nivel cromosómico,

aunque no hay coincidencia entre los programas GenABEL (SSC5, SSC11, SSC13 y SSC17) y EMMAX (SSC4, SSC6 y SSC10).

4. Para caracteres relacionados con la calidad de la carne, sólo se han hallado asociaciones significativas a nivel cromosómico. GenABEL y EMMAX han proporcionado resultados coincidentes para la rojez de la carne (músculo *gluteus medius*) en el SSC3 (16.6-16.7 Mb y 50.2-56.1 Mb), la conductividad eléctrica del músculo *longissimus dorsi* en el SSC4 (104.2-106.5 Mb) y en el SSC5 (14.4-16.1Mb), y para la conductividad eléctrica del músculo *gluteus medius* también en el SSC5 (13.0-15.7 Mb). Ha existido falta de concordancia para otras asociaciones detectadas específicamente por GenABEL (rojez de la carne en el SSC10) o EMMAX (pH₂₄ del músculo *longissimus dorsi* en SSC12 y SSC13).
5. Tanto para caracteres de calidad de la carne como de porcentaje y composición de la GIM, se han encontrado muy pocas regiones simultáneamente asociadas a más de un fenotipo. Solo con el programa EMMAX en el SSC6 fue detectada una región en asociación significativa con el porcentaje de ácido palmítico del *gluteus medius* y con el contenido de grasa intramuscular de los músculos *gluteus medius* y *longissimus dorsi*.
6. La localización genómica de las asociaciones significativas, para ambos grupos de caracteres, difiere de forma muy marcada para los músculos *gluteus medius* y *longissimus dorsi*, tal como ya se había evidenciado previamente en diversos estudios de QTLs. Ello indica la existencia de factores músculo-específicos que regulan la penetrancia o expresividad de las correspondientes mutaciones causales.

Capítulo VII. Referencias
Bibliográficas.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Amin, N., van Duijn, C. M., & Aulchenko, Y. S. (2007). A genomic background based method for association analysis in related individuals. *PLoS ONE*, 2(12), e1274.
- Andersson, L., Haley, C. S., Ellegren, H., Knott, S. A., Johansson, M., Andersson, K., et al. (1994). Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science*, 263(5154), 1771–1774.
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. Fatty acids in oils and fats. Preparation of methyl esters, method 969.33, and methyl esters of fatty acids in oils and fats, method 963.22. 15th edition. *Association of Official Analytical Chemists*.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., ... Matsuzawa, Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and biophysical Research Communications*, 257(1), 79–83.
- Aslan, O., Hamill, R., Davey, G., McBryan, J., Mullen, A., Gispert, M., & Sweeney, T. (2012). Variation in the IGF2 gene promoter region is associated with intramuscular fat content in porcine skeletal muscle. *Molecular Biology Reports*, 39(4), 4101–4110.
- Astle, W., & Balding, D. J. (2010). Population structure and cryptic relatedness in genetic association studies. *Statistical Science*, 24(4), 451–471.
- Astrup, A., Dyerberg, J., Elwood, P., Hermansen, K., Hu, F. B., Jakobsen, M. U., ... Willett, W. C. (2011). The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4), 684–688.

- Aulchenko, Y. S., De Koning, D. J., & Haley, C. (2007). Genomewide rapid association using mixed model and regression: a fast and simple method for genome-wide pedigree-based quantitative trait loci association analysis. *Genetics*, *177*(1), 577–585.
- Barrett, J. C., Hansoul, S., Nicolae, D. L., Cho, J. H., Duerr, R. H., Rioux, J. D., ... Barmada, M. M. (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics*, *40*(8), 955–962.
- Bendall, J. R., & Swatland, H. J. (1988). A review of the relationships of pH with physical aspects of pork quality. *Meat Science*, *24*(2), 85–126.
- Bidanel, J. P., Milan, D., Iannuccelli, N., Amigues, Y., Boscher, M. Y., Bourgeois, F., ... Chevalet, C. (2001). Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Genetics Selection Evolution*, *33*(3), 289–309.
- Blanchard, P. J., Willis, M. B., Warkup, C. C., & Ellis, M. (2000). The influence of carcass backfat and intramuscular fat level on pork eating quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(1), 145–151.
- Bloom, J. S., Ehrenreich, I. M., Loo, W. T., Lite, T. L., & Kruglyak, L. (2013). Finding the sources of missing heritability in a Yeast Cross. *Nature*, *494*(7436), 234–237.
- Boddicker, N., Waide, E. H., Rowland, R. R., Lunney, J. K., Garrick, D. J., Reecy, J. M., & Dekkers, J. C. (2012). Evidence for a major QTL associated with host response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus challenge. *Journal of Animal Science*, *90*(6), 1733–1746.
- Bonen, A., Chabowski, A., Luiken, J. J., & Glatz, J. F. (2007). Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence. *Physiology*, *22*(1), 15–28.

- Bonen, A., Luiken, J. J., Arumugam, Y., Glatz, J. F., & Tandon, N. N. (2000). Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(19), 14501–14508.
- Bouchard, M., Grote, D., Craven, S. E., Sun, Q., Steinlein, P., & Busslinger, M. (2005). Identification of Pax2-regulated genes by expression profiling of the mid-hindbrain organizer region. *Development*, *132*(11), 2633–2643.
- Brewer, M. S., Zhu, L. G., & McKeith, F. K. (2001). Marbling effects on quality characteristics of pork loin chops: consumer purchase intent, visual and sensory characteristics. *Meat Science*, *59*(2), 153–163.
- Bush, W. S., & Moore, J. H. (2012). Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS Computational Biology*, *8*(12), e1002822.
- Calder, P. C. (2005). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochemical Society transactions*, *33*(Pt 2), 423–427.
- Cameron, N. D. (1990). Genetic and phenotypic parameters for carcass traits, meat and eating quality traits in pigs. *Livestock Production Science*, *26*(2), 119–135.
- Cánovas, E., Quintanilla, R., Badaoui, B., Porredón, C., Gallardo, D., Pena, R. N., ... Amills, M. (2009). Pig HDL-binding protein (HDLBP) genotype is associated with intramuscular fat percentage. *Livestock Science*, *126*(1-3), 298–301.
- Casellas, J., Noguera, J. L., Reixach, J., Díaz, I., Amills, M., & Quintanilla, R. (2010). Bayes factor analyses of heritability for serum and muscle lipid traits in Duroc pigs. *Journal of Animal Science*, *88*(7), 2246–2254.
- Casellas, J., Vidal, O., Pena, R. N., Gallardo, D., Manunza, a, Quintanilla, R., & Amills, M. (2013). Genetics of serum and muscle lipids in pigs. *Animal Genetics*.

- Cayuela, J. M., Garrido, M. D., Bañón, S. J., and Ros, J. M. (2003). Simultaneous HPLC analysis of alpha-tocopherol and cholesterol in fresh pig meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1120-1124.
- Cepica, A., Stratil, M., Kopecny, P., Blazkova, J., Schröffel, R., Davoli, L., ... Moser. (2003). Linkage and QTL mapping for Sus scrofa chromosome 4. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(1), 28–37.
- Chambers, J. C., Elliott, P., Zabaneh, D., Zhang, W., Li, Y., Froguel, P., ... Kooner, J. S. (2008). Common genetic variation near MC4R is associated with waist circumference and insulin resistance. *Nature Genetics*, 40(6), 716–718.
- Chen, W. M., & Abecasis, G. R. (2007). Family-based association tests for genomewide association scans. *American Journal of Human Genetics*, 81(5), 913–926.
- Ciobanu, D. C., Bastiaansen, J., Malek, M., Helm, J., Woollard, J., Plastow, G., & Rothschild, M. (2001). Evidence for new alleles in the Protein Kinase Adenosine Monophosphate-Activated γ 3-Subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. *Genetics*, 159(3), 1151–1162.
- Ciobanu, D. C., Bastiaansen, J. W., Lonergan, S. M., Thomsen, H., Dekkers, J. C., Plastow, G. S., & Rothschild, M. F. (2004). New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *Journal of Animal Science*, 82(10), 2829–2839.
- Ciobanu, D. C., Lonergan, S. M. & Huff-Lonergan, E. J. (2011). Genetics of meat and carcass traits. In: The Genetics of the Pig. 2nd edition. Ed. by Rothschild, M.F. & Ruvinsky, A.
- Clop, A., Ovilo, C., Perez-Enciso, M., Cercos, A., Tomas, A., Fernandez, A., ... Noguera, J. L. (2003). Detection of QTL affecting fatty acid composition in the pig. *Mammalian Genome*, 14(9), 650–656.

- Cooper, G. M., Johnson, J. A., Langae, T. Y., Feng, H., Stanaway, I. B., Schwarz, U. I., ... Rieder, M. J. (2008). A genome-wide scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose. *Blood*, *112*(4), 1022–1027.
- Corcoran, M. P., Lamon-Fava, S., & Fielding, R. A. (2007). Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *85*(3), 662–677.
- Corominas, J., Ramayo-Caldas, Y., Puig-Oliveras, A., Pérez-Montarelo, D., Noguera, J. L., Folch, J. M., & Ballester, M. (2013). Polymorphism in the ELOVL6 gene is associated with a major QTL effect on fatty acid composition in pigs. *PLoS ONE*, *8*(1), e53687.
- Cossu, G., & Borello, U. (1999). Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *The EMBO Journal*, *18*(24), 6867–6872.
- Davoli, R., & Braglia, S. (2007). Molecular approaches in pig breeding to improve meat quality. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, *6*(4), 313–21.
- De Koning, D. J., Rattink, A. P., Harlizius, B., van Arendonk, J. A., Brascamp, E. W., & Groenen, M. A. (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*(14), 7947–7950.
- Demars, J., Fabre, S., Sarry, J., Rossetti, R., Gilbert, H., Persani, L., ... Bodin, L. (2013). Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS Genetics*, *9*(4), e1003482.
- Denic, V., & Weissman, J. S. (2007). A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell*, *130*(4), 663–677.

- Duijvesteijn, N., Knol, E., Merks, J., Crooijmans, R., Groenen, M., Bovenhuis, H., & Harlizius, B. (2010). A genome-wide association study on androstenone levels in pigs reveals a cluster of candidate genes on chromosome 6. *BMC Genetics*, *11*(1), 42.
- Enger, E. G., Aass, L., Ødegard, J., & Vangen, O. (2010). Genetic parameters of meat quality traits in two pig breeds measured by rapid methods. *Animal*, *4*(11), 1832–1843.
- Enoch, H. G., Catalá, A., & Strittmatter, P. (1976). Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *Journal of Biological Chemistry*, *251*(16), 5095–5103.
- Enser, M. (1984). The chemistry, biochemistry and nutritional importance of animal fats. In: *Fats in animal nutrition*. Ed. by Wiseman, J.
- Ernst, C. W. & Steibel, J. P. (2013). Molecular advances in QTL discovery and application in pig breeding. *Trends in Genetics*, *29*(4), 215-224.
- Estellé, J., Fernández, A. I., Pérez-Enciso, M., Fernández, A., Rodríguez, C., Sánchez, A., ... Folch, J. M. (2009). A non-synonymous mutation in a conserved site of the MTTP gene is strongly associated with protein activity and fatty acid profile in pigs. *Animal Genetics*, *40*(6), 813–820.
- Evans, G. J., Giuffra, E., Sanchez, A., Kerje, S., Davalos, G., Vidal, O., ... Andersson, L. (2003). Identification of quantitative trait loci for production traits in commercial pig populations. *Genetics*, *164*(2), 621–627.
- Falconer, D.S., & MacKay, T.F. (1996). Heritability. In : *Introduction to quantitative genetics*. 4th edition. Ed. by Longman, Group.

- Fan, B, Du, Z. Q., & Rothschild, M. F. (2009^a). The fat mass and obesity-associated (FTO) gene is associated with intramuscular fat content and growth rate in the pig. *Animal Biotechnology*, 20(2), 58–70.
- Fan, B, Onteru, S. K., Plastow, G. S., & Rothschild, M. F. (2009^b). Detailed characterization of the porcine MC4R gene in relation to fatness and growth. *Animal Genetics*, 40(4), 401–409.
- Fan, B., Onteru, S. K., Du, Z. Q., Garrick, D. J., Stalder, K. J., and Rothschild, M. F. (2011). Genome-Wide association study identifies loci for body composition and structural soundness traits in pigs. *PLoS ONE*, 6(2), e14726.
- Fernandez, X., Monin, G., Talmant, A., Mourot, J., & Lebret, B. (1999). Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat - 1. Composition of the lipid fraction and sensory characteristics of m. longissimus lumborum. *Meat Science*, 53(1), 59–65.
- Finlay, E. K., Berry, D. P., Wickham, B., Gormley, E. P., & Bradley, D. G. (2012). A genome wide association scan of Bovine Tuberculosis susceptibility in Holstein-Friesian dairy cattle. *PLoS ONE*, 7(2), e30545.
- Flint, J., & Mackay, T. F. (2009). Genetic architecture of quantitative traits in mice, flies, and humans. *Genome Research*, 19(5), 723–733.
- Fontanesi, L., Scotti, E., Buttazzoni, L., Dall'Olio, S., Bagnato, A., Lo Fiego, D. P., ... Russo, V. (2010). Confirmed association between a single nucleotide polymorphism in the FTO gene and obesity-related traits in heavy pigs. *Molecular Biology Reports*, 37(1), 461–466.
- Franco, M. M., Antunes, R. C., Silva, H. D., & Goulart, L. R. (2005). Association of PIT1, GH and GHRH polymorphisms with performance and carcass traits in Landrace pigs. *Journal of Applied Genetics*, 46(2), 195–200.

- Fu, W. X., Liu, Y., Lu, X., Niu, X. Y., Ding, X. D., Liu, J. F., & Zhang, Q. (2012). A genome-wide association study identifies two novel promising candidate genes affecting *Escherichia Coli* F4ab/F4ac susceptibility in swine. *PLoS ONE*, 7(3), e32127.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., de Leon, S., Khanna, V. K., Weiler, J. E., ... MacLennan, D. H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253(5018), 448–451.
- Gallardo, D., Pena, R. N., Quintanilla, R., Ramírez, O., Almuzara, D., Noguera, J. L., & Amills, M. (2012). Quantitative trait loci analysis of a Duroc commercial population highlights differences in the genetic determination of meat quality traits at two different muscles. *Animal Genetics*, 43(6), 800–804.
- Gallardo, D., Quintanilla, R., Varona, L., Díaz, I., Ramírez, O., Pena, R. N., & Amills, M. (2009). Polymorphism of the pig acetyl-coenzyme A carboxylase α gene is associated with fatty acid composition in a Duroc commercial line. *Animal Genetics*, 40(4), 410–417.
- Gao, S. Z. , & Zhao, S. M. (2009). Physiology, affecting factors and strategies for control of pig meat intramuscular fat. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 1(1), 59–74.
- Georges, M. (2007). Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait Loci in domestic animals. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 8(1), 131–162.
- Gerbens, F., van Erp, A. J., Harders, F. L., Verburg, F. J., Meuwissen, T. H., Veerkamp, J. H., & Te Pas, M. F. (1999). Effect of genetic variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs. *Journal of Animal Science*, 77(4), 846–852.

- Gerbens, F., Verburg, F. J., Van Moerkerk, H. T., Engel, B., Buist, W., Veerkamp, J. H., & Te Pas, M. F. (2001). Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs. *Journal of Animal Science*, *79*(2), 347–354.
- Glatz, J. F., Luiken, J., & Bonen, A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiological Reviews*, 367–417.
- Glatz, J. F., Schaap, F. G., Binas, B., Bonen, A., van der Vusse, G. J., & Luiken, J. J. (2003). Cytoplasmic fatty acid-binding protein facilitates fatty acid utilization by skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, *178*(4), 367–371.
- Goyal, S., Banerjee, S., & Mazumdar, S. (2012). Oxygenation of monoenoic fatty acids by CYP175A1, an orphan cytochrome P450 from thermus thermophilus HB27. *Biochemistry*, *51*(40), 7880–7890.
- Grindflek, E., Szyda, J., Liu, Z., & Lien, S. (2001). Detection of quantitative trait loci for meat quality in a commercial slaughter pig cross. *Mammalian Genome*, *12*(4), 299–304.
- Groenen, M. A., Archibald, A. L., Uenishi, H., Tuggle, C. K., Takeuchi, Y., Rothschild, M. F., ... Megens, H. J. (2012). Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*, *491*(7424), 393–398.
- Guo, T., Ren, J., Yang, K., Ma, J., Zhang, Z., & Huang, L. (2009). Quantitative trait loci for fatty acid composition in longissimus dorsi and abdominal fat: results from a White Duroc x Erhualian intercross F2 population. *Animal Genetics*, *40*(2), 185–191.
- Hamilton, J. A., Johnson, R. A., Corkey, B., & Kamp, F. (2001). Fatty acid transport: the diffusion mechanism in model and biological membranes. *Journal of Molecular Neuroscience*, *16*(2-3), 99-108.

- Han, X., Jiang, T., Yang, H., Zhang, Q., Wang, W., Fan, B., & Liu, B. (2012). Investigation of four porcine candidate genes (H-FABP, MYOD1, UCP3 and MASTR) for meat quality traits in Large White pigs. *Molecular Biology Reports*, *39*(6), 6599–6605.
- Hauswirth, R., Haase, B., Blatter, M., Brooks, S. A., Burger, D., Drögemüller, C., ... Leeb, T. (2012). Mutations in MITF and PAX3 cause “Splashed White” and other white spotting phenotypes in horses. *PLoS Genetics*, *8*(4), e1002653.
- Hawken, R. J., Zhang, Y. D., Fortes, M. R., Collis, E., Barris, W. C., Corbet, N. J., ... Lehnert, S. A. (2012). Genome-wide association studies of female reproduction in tropically adapted beef cattle. *Journal of Animal Science*, *90*(5), 1398–1410.
- Hayes, B. J., Bowman, P. J., Chamberlain, A. J., & Goddard, M. E. (2009). Invited review: Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. *Journal of Dairy Science*, *92*(2), 433–443.
- Hayes, B. J., Pryce, J., Chamberlain, A. J., Bowman, P. J., & Goddard, M. E. (2010). Genetic architecture of complex traits and accuracy of genomic prediction: coat colour, milk-fat percentage, and type in Holstein cattle as contrasting model traits. *PLoS Genetics*, *6*(9), e1001139.
- He, X. P., Xu, X. W., Zhao, S. H., Fan, B., Yu, M., Zhu, M. J., ... Liu, B. (2009). Investigation of Lpin1 as a candidate gene for fat deposition in pigs. *Molecular Biology Reports*, *36*(5), 1175–1180.
- Hernández-Sánchez, J., Amills, M., Pena, R. N., Mercadé, A., Manunza, A., & Quintanilla, R. (2012). Genomic architecture of heritability and genetic correlations for intramuscular and back fat contents in Duroc pigs. *Journal of Animal Science*, *91*(2), 623-32.

- Hoppler, S., Brown, J. D., & Moon, R. T. (1996). Expression of a dominant-negative Wnt blocks induction of MyoD in *Xenopus* embryos. *Genes & Development*, *10*(21), 2805–2817.
- Houston, R. D., Cameron, N. D., & Rance, K. A. (2004). A melanocortin-4 receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected Large White pig populations. *Animal Genetics*, *35*(5), 386–390.
- Houston, R. D., Rance, K. A., Sutcliffe, E., Archibald, A. L., & Haley, C. S. (2008). The cholecystokinin type A receptor g.179A>G polymorphism affects feeding rate. *Animal Genetics*, *39*(2), 187–188.
- Hu, Z. L., Park, C. A., Wu, X. L., & Reecy, J. M. (2013). Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era. *Nucleic acids research*, *41*(Database issue).
- Huang, W., Kirkpatrick, B. W., Rosa, G. J., & Khatib, H. (2010). A genome-wide association study using selective DNA pooling identifies candidate markers for fertility in Holstein cattle. *Animal Genetics*, *41*(6), 570–578.
- Ibañez-Escriche, N., & Gonzalez-Recio, O. (2011). Review. Promises, pitfalls and challenges of genomic selection in breeding programs. *Spanish Journal of Agricultural Research, North America*.
- International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN), Harley, J. B., Alarcón-Riquelme, M. E., Criswell, L. A., Jacob, C. O., Kimberly, R. P., ... Kelly, J. A. (2008). Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. *Nature Genetics*, *40*(2), 204–210.
- Joo, S. T., Kauffman, R. G., Kim, B. C., & Park, G. B. (1999). The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *Meat Science*, *52*(3), 291–297.

- Jung, S. Y., & Ko, Y. G. (2010). TRIM72, a novel negative feedback regulator of myogenesis, is transcriptionally activated by the synergism of MyoD (or myogenin) and MEF2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(2), 238–245.
- Kamili, A., Roslan, N., Frost, S., Jaffer, S., Cantrill, L., Chen, Y., & Byrne, J. (2013). Analyses of lipid storage and mitochondrial function in cancer cells. *Book of Abstracts: Lowy Cancer Symposium*.
- Kampf, J. P., & Kleinfeld, A. M. (2007). Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? *Physiology*, 22(1), 7–14.
- Kang, H. M., Sul, J. H., Service, S. K., Zaitlen, N. A., Kong, S. Y., Freimer, N. B., ... Eskin, E. (2010). Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. *Nature Genetics*, 42(4), 348–354.
- Karyadi, D. M., Karlins, E., Decker, B., vonHoldt, B. M., Carpintero-Ramirez, G., Parker, H. G., ... Ostrander, E. A. (2013). A Copy Number Variant at the KITLG locus likely confers risk for canine squamous cell carcinoma of the digit. *PLoS Genetics*, 9(3), e1003409.
- Kathiresan, S., Melander, O., Guiducci, C., Surti, A., Burt, N. P., Rieder, M. J., ... Orho-Melander, M. (2008). Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nature Genetics*, 40(2), 189–197.
- Keys, A., Menotti, A., Karvonen, M. J., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., ... Keys, M. H. (1986). The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *American Journal of Epidemiology*, 124(6), 903–915.
- Kiens, B. (2006). Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiological Reviews*, 86(1), 205–243.

- Kim, K. S., Larsen, N., Short, T., Plastow, G., & Rothschild, M. F. (2000). A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mammalian Genome*, *11*(2), 131–135.
- Kim, Y., Kong, M., Nam, Y. J., & Lee, C. (2006). A quantitative trait locus for oleic fatty acid content on *Sus scrofa* chromosome 7. *The Journal of Heredity*, *97*(5), 535–537.
- Kizilkaya, K., Tait, R. G., Garrick, D. J., Fernando, R. L., & Reecy, J. M. (2013). Genome-wide association study of infectious bovine keratoconjunctivitis in Angus cattle. *BMC Genetics*, *14*(1), 23.
- Kmit, A., van Kruchten, R., Ousingsawat, J., Mattheij, N. J., Senden-Gijsbers, B., Heemskerk, J. W., ... Kunzelmann, K. (2013). Calcium-activated and apoptotic phospholipid scrambling induced by *Ano6* can occur independently of *Ano6* ion currents. *Cell Death & Disease*, *4*(4), e611.
- Kobayashi, T., & Fujimori, K. (2012). Very long-chain-fatty acids enhance adipogenesis through coregulation of *Elovl3* and *PPAR γ* in 3T3-L1 cells. *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism*, *302*(12).
- Kovacs, W. J., Shackelford, J. E., Tape, K. N., Richards, M. J., Faust, P. L., Fliesler, S. J., & Krisans, S. K. (2004). Disturbed Cholesterol homeostasis in a Peroxisome-Deficient *PEX2* knockout mouse model. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(1), 1–13.
- Kurył, J., & Pierzchała, M. (2001). Association of *POU1F1/RsaI* genotypes with carcass traits in pigs. *Journal of Applied Genetics*, *42*(3), 309–316.
- Kyöstilä, K., Cizinauskas, S., Seppälä, E. H., Suhonen, E., Jeserevics, J., Sukura, A., ... Lohi, H. (2012). A *SEL1L* mutation links a canine progressive early-onset cerebellar ataxia to the endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) machinery. *PLoS Genetics*, *8*(6), e1002759.

- Larzul, C., Roy, P., Gogué, J., Talmant, A., Jacquet, B., Lefaucheur, L., ... Monin, G. (1999). Selection for reduced muscle glycolytic potential in Large White pigs. II. Correlated responses in meat quality and muscle compositional traits. *Genetics Selection Evolution*, 31(1), 1–16.
- Lawson, H. A., Cady, J. E., Partridge, C., Wolf, J. B., Semenkovich, C. F., & Cheverud, J. M. (2011). Genetic effects at pleiotropic loci are context-dependent with consequences for the maintenance of genetic variation in populations. *PLoS Genetics*, 7(9), e1002256.
- Ledur, M. C., Navarro, N., & Pérez-Enciso, M. (2010). Large-scale SNP genotyping in crosses between outbred lines: how useful is it? *Heredity*, 105(2), 173–182.
- Lee, S., Chen, Y., Moran, C., Stratil, A., Reiner, G., Bartenschlager, H., ... Geldermann, H. (2003). Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 5. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120, 38–44.
- Lee, S., Norman, J. M., Gunasekaran, S., van Laack, R. L. J. M., Kim, B. C., & Kauffman, R. G. (2000). Use of electrical conductivity to predict water-holding capacity in post-rigor pork. *Meat Science*, 55(4), 385-389.
- Lee^a, S. H., Choi, Y. M., Choe, J. H., Kim, J. M., Hong, K. C., Park, H. C., & Kim, B. C. (2010). Association between polymorphisms of the heart fatty acid binding protein gene and intramuscular fat content, fatty acid composition, and meat quality in Berkshire breed. *Meat Science*, 86(3), 794–800.
- Lee^b, C. S., Yi, J. S., Jung, S. Y., Kim, B. W., Lee, N. R., Choo, H. J., ... Ko, Y. G. (2010). TRIM72 negatively regulates myogenesis via targeting insulin receptor substrate-1. *Cell Death & Differentiation*, 17(8), 1254–1265.
- Li^a, H. D., Lund, M. S., Christensen, O. F., Gregersen, V. R., Henckel, P., & Bendixen, C. (2010). Quantitative trait loci analysis of swine meat quality traits. *Journal of Animal Science*, 88(9), 2904–2912.

- Li^b, Y., Xu, Z., Li, H., Xiong, Y., & Zuo, B. (2010). Differential transcriptional analysis between red and white skeletal muscle of Chinese Meishan pigs. *International Journal of Biological Sciences*, 6(4), 350–360.
- Liu, J., Liang, S., Liu, X., Brown, J. A., Newman, K. E., Sunkara, M., ... Graf, G. A. (2012). The absence of ABCD2 sensitizes mice to disruptions in lipid metabolism by dietary erucic acid. *Journal of Lipid Research*, 53(6), 1071–1079.
- Liu, M., Peng, J., Xu, D. Q., Zheng, R., Li, F. E., Li, J. L., ... Jiang, S. W. (2008). Association of MYF5 and MYOD1 gene polymorphisms and meat quality traits in Large White x Meishan F2 pig populations. *Biochemical Genetics*, 46(11-12), 720–732.
- Liu, Y., Li, M., Ma, J., Zhang, J., Zhou, C., Wang, T., ... Li, X. (2013). Identification of differences in microRNA transcriptomes between porcine oxidative and glycolytic skeletal muscles. *BMC Molecular Biology*, 14(1), 7.
- Loos, R. J., Lindgren, C. M., Li, S., Wheeler, E., Zhao, J. H., Prokopenko, I., ... Beckmann, J. S. (2008). Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nature Genetics*, 40(6), 768–775.
- Luo, W., Chen, S., Cheng, D., Wang, L., Li, Y., Ma, X., ... Zhang, L. (2012^b). Genome-wide association study of porcine hematological parameters in a Large White × Minzhu F2 resource population. *International Journal of Biological Sciences*, 8(6), 870–881.
- Luo, W., Cheng, D., Chen, S., Wang, L., Li, Y., Ma, X., ... Zhang, L. (2012^a). Genome-wide association analysis of meat quality traits in a porcine Large White × Minzhu intercross population. *International Journal of Biological Sciences*, 8(4), 580–595.

- Ma, J., Yang, J., Zhou, L., Zhang, Z., Ma, H., Xie, X., ... Huang, L. (2013). Genome-wide association study of meat quality traits in a white Duroc × Erhualian F2 intercross and chinese Sutai pigs. *PLoS ONE*, *8*(5), e64047.
- Mach, N., Devant, M., Díaz, I., Font-Furnols, M., Oliver, M. A., García, J. A., & Bach, A. (2006). Increasing the amount of n-3 fatty acid in meat from young Holstein bulls through nutrition. *Journal of Animal Science*, *84*(11), 3039–3048.
- Mackay, T. F., Stone, E. A., & Ayroles, J. F. (2009). The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nature Reviews Genetics*, *10*(8), 565–577.
- Mackowski, M., Szymoniak, K., Szydlowski, M., Kamyczek, M., Eckert, R., Rozycki, M., & Switonski, M. (2005). Missense mutations in exon 4 of the porcine LEPR gene encoding extracellular domain and their association with fatness traits. *Animal Genetics*, *36*(2), 135–137.
- Maller, J., George, S., Purcell, S., Fagerness, J., Altshuler, D., Daly, M. J., & Seddon, J. M. (2006). Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nature Genetics*, *38*(9), 1055–1059.
- Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R., & Delday, M. (2003). Determinants of meat quality: tenderness. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *62*(2), 337-347.
- Manolio, T. a, Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorff, L. a, Hunter, D. J., ... Visscher, P. M. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, *461*(7265), 747–53.
- Markljung, E., Braunschweig, M., Mortensen, P. K., Bruun, C., Sawera, M., Cho, I. C., ... Andersson, L. (2008). Genome-wide identification of quantitative trait loci in a cross between Hampshire and Landrace II: Meat quality traits. *BMC Genetics*, *9*(1), 22.

- Martínez, S. W. & Zering, K. (2004). Pork quality and the role of market organization. United States Department of Agriculture. *Agricultural Economic Report*, 835.
- Mercadé, A., Estellé, J., Pérez-Enciso, M., Varona, L., Silió, L., Noguera, J. L., ... Folch, J. M. (2006). Characterization of the porcine acyl-CoA synthetase long-chain 4 gene and its association with growth and meat quality traits. *Animal Genetics*, 37(3), 219–224.
- Milan, D., Jeon, J. T., Looft, C., Amarger, V., Robic, A., Thelander, M., ... Andersson, L. (2000). A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*, 288(5469), 1248–1251.
- Minozzi, G., Williams, J. L., Stella, A., Strozzi, F., Luini, M., Settles, M. L., ... Neiberghs, H. L. (2012). Meta-analysis of two genome-wide association studies of Bovine Paratuberculosis. *PLoS ONE*, 7(3), e32578.
- Mohrmann, M., Roehe, R., Knap, P. W., Looft, H., Plastow, G. S., & Kalm, E. (2006). Quantitative trait loci associated with AutoFOM grading characteristics, carcass cuts and chemical body composition during growth of *Sus Scrofa*. *Animal Genetics*, 37(5), 435–443.
- Muñoz, G., Alcázar, E., Fernández, A., Barragán, C., Carrasco, A., de Pedro, E., ... Rodríguez, M. C. (2011). Effects of porcine MC4R and LEPR polymorphisms, gender and Duroc sire line on economic traits in Duroc × Iberian crossbred pigs. *Meat Science*, 88(1), 169–173.
- Muñoz, G., Alves, E., Fernández, A., Ovilo, C., Barragán, C., Estellé, J., ... Fernández, A. I. (2007). QTL detection on porcine chromosome 12 for fatty acid composition and association analyses of the fatty acid synthase, gastric inhibitory polypeptide and acetyl-coenzyme A carboxylase alpha genes. *Animal Genetics*, 38(6), 639–646.

- Musunuru, K., Strong, A., Frank-Kamenetsky, M., Lee, N. E., Ahfeldt, T., Sachs, K. V., ... Rader, D. J. (2010). From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature*, *466*(7307), 714–719.
- Myocardial Infarction Genetics Consortium, Kathiresan, S., Voight, B. F., Purcell, S., Musunuru, K., Ardissino, D., ... Samani, N. J. (2009). Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nature Genetics*, *41*(3), 334–341.
- Nagamine, Y., Haley, C. S., Sewalem, A., & Visscher, P. M. (2003). Quantitative trait loci variation for growth and obesity between and within lines of pigs (*Sus scrofa*). *Genetics*, *164*(2), 629–635.
- Nii, M., Hayashi, T., Tani, F., Niki, A., Mori, N., Fujishima-Kanaya, N., ... Mikawa, S. (2006). Quantitative trait loci mapping for fatty acid composition traits in perirenal and back fat using a Japanese wild boar × Large White intercross. *Animal Genetics*, *37*(4), 342–347.
- Nonneman, D., Lindholm-Perry, A. K., Shackelford, S. D., King, D. A., Wheeler, T. L., Rohrer, G. A., ... Moeller, S. J. (2011). Predictive markers in calpastatin for tenderness in commercial pig populations. *Journal of Animal Science*, *89*(9), 2663–2672.
- Onteru, S. K., Fan, B., Du, Z. Q., Garrick, D. J., Stalder, K. J., & Rothschild, M. F. (2012). A whole-genome association study for pig reproductive traits. *Animal Genetics*, *43*(1), 18–26.
- Onteru, S. K., Fan, B., Nikkilä, M. T., Garrick, D. J., Stalder, K. J., & Rothschild, M. F. (2011). Whole-genome association analyses for lifetime reproductive traits in the pig. *Journal of Animal Science*, *89*(4), 988–995.
- Ovilo, C., Clop, A., Noguera, J. L., Oliver, M. A., Barragán, C., Rodríguez, C., ... Pérez-Enciso, M. (2002^a). Quantitative trait locus mapping for meat quality

- traits in an Iberian x Landrace F2 pig population. *Journal of Animal Science*, 80(11), 2801–2808.
- Ovilo, C., Fernández, A., Noguera, J. L., Barragán, C., Letón, R., Rodríguez, C., ... Toro, M. (2005). Fine mapping of porcine chromosome 6 QTL and LEPR effects on body composition in multiple generations of an Iberian by Landrace intercross. *Genetical Research*, 85(1), 57–67.
- Ovilo, C., Oliver, A., Noguera, J. L., Clop, A., Barragán, C., Varona, L., ... Silió, L. (2002^b). Test for positional candidate genes for body composition on pig chromosome 6. *Genetics, Selection, Evolution*, 34(4), 465–479.
- Ovilo, C., Pérez-Enciso, M., Barragán, C., Clop, A., Rodríguez, C., Oliver, M. A., ... Noguera, J. L. (2000). A QTL for intramuscular fat and backfat thickness is located on porcine Chromosome 6. *Mammalian Genome*, 11(4), 344–346.
- Palomer, X., Pérez, A., & Blanco-vaca, F. (2005). Adiponectina : un nuevo nexo entre obesidad , resistencia a la insulina y enfermedad. *Diabetes*, 124(10), 388–395.
- Paszek, A. A., Wilkie, P. J., Flickinger, G. H., Miller, L. M., Louis, C. F., Rohrer, G. A., ... Schook, L. B. (2001). Interval mapping of carcass and meat quality traits in a divergent swine cross. *Animal Biotechnology*, 12(2), 155–165.
- Paton, C. M., & Ntambi, J. M. (2009). Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 297(1), E28-37.
- Peixoto, J., Guimarães, S. E., Lopes, P., Soares, M. A., Pires, A., Barbosa, M. V., ... Almeida, D. (2006). Associations of leptin gene polymorphisms with production traits in pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 123(6), 378–383.

- Pérez-Enciso, M., Clop, A., Noguera, J. L., Ovilo, C., Coll, A., Folch, J. M., ... Sánchez, A. (2000). A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: evidence from an Iberian by Landrace intercross. *Journal of Animal Science*, 78(10), 2525–2531.
- Person, R. C. (2003). Benchmarking value in the pork supply chain: quantitative strategies and opportunities to improve quality in ham and belly processing. *Texas A & M University. Master of Science Thesis*.
- Price, A. L., Patterson, N. J., Plenge, R. M., Weinblatt, M. E., Shadick, N. A., & Reich, D. (2006). Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics*, 38(8), 904–909.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., ... Sham, P. C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559–575.
- Quintanilla, R., Pena, R. N., Gallardo, D., Cánovas, A., Ramírez, O., Díaz, I., ... Amills, M. (2011). Porcine intramuscular fat content and composition are regulated by quantitative trait loci with muscle-specific effects. *Journal of Animal Science*, 89(10), 2963–2971.
- Quintanilla, R., Pena, R. N., Cánovas, A., and Amills, M. (2010). Differential gene expression profile between two porcine skeletal muscles: longissimus dorsi and gluteus medius. In: Book of abstracts of the 32th International Conference on Animal Genetics. *Edinburgh, UK*.
- Ramayo-Caldas, Y., Mercadé, A., Castelló, A., Yang, B., Rodríguez, C., Alves, E., ... Folch, J. M. (2012). Genome-wide association study for intramuscular fatty acid composition in an Iberian × Landrace cross. *Journal of Animal Science*, 90(9), 2883–2893.

- Ramos, A. M., Crooijmans, R. P., Affara, N. A., Amaral, A. J., Archibald, A. L., Beever, J. E., ... Groenen, M. A. (2009). Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. *PLoS ONE*, 4(8), e6524.
- Raudsepp, T., McCue, M. E., Das, P. J., Dobson, L., Vishnoi, M., Fritz, K. L., ... Chowdhary, B. P. (2012). Genome-wide association study implicates testis-sperm specific FKBP6 as a susceptibility locus for Impaired Acrosome Reaction in stallions. *PLoS Genetics*, 8(12), e1003139.
- Rincker, P. J., Killefer, J., Ellis, M., Brewer, M. S., & McKeith, F. K. (2008). Intramuscular fat content has little influence on the eating quality of fresh pork loin chops. *Journal of Animal Science*, 86(3), 730–737.
- Ros-Freixedes, R., Reixach, J., Tor, M., & Estany, J. (2012). Expected genetic response for oleic acid content in pork. *Journal of Animal Science*, 90(12), 4230–4238.
- Rothschild, M., Jacobson, C., Vaske, D., Tuggle, C., Wang, L., Short, T., ... Plastow, G. (1996). The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(1), 201–205.
- Sahana, G., Guldbandsen, B., Bendixen, C., & Lund, M. S. (2010). Genome-wide association mapping for female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. *Animal Genetics*, 41(6), 579–588.
- Sahana, G., Guldbandsen, B., Thomsen, B., & Lund, M. S. (2013). Confirmation and fine-mapping of clinical mastitis and somatic cell score QTL in Nordic Holstein cattle. *Animal Genetics*.
- Sanchez, M. P., Lannuccelli, N., Basso, B., Bidanel, J. P., Billon, Y., Gandemer, G., ... Le Roy, P. (2007). Identification of QTL with effects on intramuscular fat

- content and fatty acid composition in a Duroc x Large White cross. *BMC Genetics*, 8(1), 55.
- Scheffler, T. L., & Gerrard, D. E. (2007). Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Science*, 77(1), 7–16.
- Schneider, J. F., Rempel, L. A., Snelling, W. M., Wiedmann, R. T., Nonneman, D. J., & Rohrer, G. A. (2012). Genome-wide association study of swine farrowing traits. Part II: Bayesian analysis of marker data. *Journal of Animal Science*, 90(10), 3360–3367.
- Schoenebeck, J. J., Hutchinson, S. A., Byers, A., Beale, H. C., Carrington, B., Faden, D. L., ... Ostrander, E. A. (2012). Variation of BMP3 Contributes to Dog Breed Skull Diversity. *PLoS Genetics*, 8(8), e1002849.
- Schopen, G. C. B., Visker, M. H. P. W., Koks, P. D., Mullaart, E., van Arendonk, J. A. M., & Bovenhuis, H. (2011). Whole-genome association study for milk protein composition in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 3148–3158.
- Schwab, C. R., Mote, B. E., Du, Z. Q., Amoako, R., Baas, T. J., & Rothschild, M. F. (2009). An evaluation of four candidate genes for use in selection programmes aimed at increased intramuscular fat in Duroc swine. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126(3), 228–236.
- Sellier, P. (1998). Genetics of meat and carcass traits. In: *The Genetics of the Pig*. Ed. by Rothschild, M.F. & Ruvinsky, A.
- Solanes, F. X., Reixach, J., Tor, M., Tibau, J., & Estany, J. (2009). Genetic correlations and expected response for intramuscular fat content in a Duroc pig line. *Livestock Science*, 123(1), 63–69.

- Solovieff, N., Cotsapas, C., Lee, P. H., Purcell, S. M., & Smoller, J. W. (2013). Pleiotropy in complex traits: challenges and strategies. *Nature Reviews Genetics*, *14*(7), 483–495.
- Song, C. Y., Gao, B., Teng, S. H., Wang, X. Y., Xie, F., Chen, G. H., ... Mao, J. D. (2007). Polymorphisms in intron 1 of the porcine POU1F1 gene. *Journal of Applied Genetics*, *48*(4), 371–374.
- Stranger, B. E., Stahl, E. A., & Raj, T. (2011). Progress and promise of genome-wide association studies for human complex trait genetics. *Genetics*, *187*(2), 367–383.
- Suzuki, K., Ishida, M., Kadowaki, H., Shibata, T., Uchida, H., & Nishida, A. (2006). Genetic correlations among fatty acid compositions in different sites of fat tissues, meat production, and meat quality traits in Duroc pigs. *Journal of Animal Science*, *84*(8), 2026–2034.
- Svishcheva, G. R., Axenovich, T. I., Belonogova, N. M., van Duijn, C. M., & Aulchenko, Y. S. (2012). Rapid variance components-based method for whole-genome association analysis. *Nature Genetics*, *44*(10), 1166–1170.
- Swatland, H. J. (1982). Meat color of pork chops in relation to pH and adductor capacitance of intact carcasses. *Journal of Animal Science*, *54*(2), 264–267.
- Szyda, J., Grindflek, E., Liu, Z., & Lien, S. (2003). Multivariate mixed inheritance models for QTL detection on porcine chromosome 6. *Genetical Research*, *81*(1), 65–73.
- Szyda, J., Liu, Z., Grindflek, E., & Lien, S. (2002). Application of a mixed inheritance model to the detection of quantitative trait loci in swine. *Journal of Applied Genetics*, *43*(1), 69–83.
- Uemoto, Y., Nakano, H., Kikuchi, T., Sato, S., Ishida, M., Shibata, T., ... Suzuki, K. (2012^b). Fine mapping of porcine SSC14 QTL and SCD gene effects on fatty

- acid composition and melting point of fat in a Duroc purebred population. *Animal Genetics*, 43(2), 225–228.
- Uemoto, Y., Sato, S., Ohnishi, C., Terai, S., Komatsuda, A., & Kobayashi, E. (2009). The effects of single and epistatic quantitative trait loci for fatty acid composition in a Meishan x Duroc crossbred population. *Journal of Animal Science*, 87(11), 3470–3476.
- Uemoto, Y., Soma, Y., Sato, S., Ishida, M., Shibata, T., Kadowaki, H., ... Suzuki, K. (2012^a). Genome-wide mapping for fatty acid composition and melting point of fat in a purebred Duroc pig population. *Animal Genetics*, 43(1), 27–34.
- Uleberg, E., Widerøe, I. S., Grindflek, E., Szyda, J., Lien, S., & Meuwissen, T. H. (2005). Fine mapping of a QTL for intramuscular fat on porcine chromosome 6 using combined linkage and linkage disequilibrium mapping. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 122(1), 1–6.
- Van Laack, R. L., Stevens, S. G., & Stalder, K. J. (2001). The influence of ultimate pH and intramuscular fat content on pork tenderness and tenderization. *Journal of Animal Science*, 79(2), 392–397.
- Van Laere, A. S., Nguyen, M., Braunschweig, M., Nezer, C., Collette, C., Moreau, L., ... Andersson, L. (2003). A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*, 425(6960), 832–836.
- Van Wijk, H. J., Arts, D. J., Matthews, J. O., Webster, M., Ducro, B. J., & Knol, E. F. (2005). Genetic parameters for carcass composition and pork quality estimated in a commercial production chain. *Journal of Animal Science*, 83(2), 324–333.
- Varona, L., Ovilo, C., Clop, A., Noguera, J. L., Pérez-Enciso, M., Coll, A., ... Sánchez, A. (2002). QTL mapping for growth and carcass traits in an Iberian by Landrace pig intercross: additive, dominant and epistatic effects. *Genetical Research*, 80(2), 145–154.

- Verner, J., Humpolíček, P., & Knoll, A. (2007). Impact of MYOD family genes on pork traits in Large White and Landrace pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 124(2), 81–85.
- Vertino, A. M., Taylor-Jones, J. M., Longo, K. A., Bearden, E. D., Lane, T. F., McGehee, R. E., ... Peterson, C. A. (2005). Wnt10b deficiency promotes coexpression of myogenic and adipogenic programs in myoblasts. *Molecular Biology of the Cell*, 16(4), 2039–2048.
- Vidal, O., Noguera, J. L., Amills, M., Varona, L., Gil, M., Jiménez, N., ... Sánchez, A. (2005). Identification of carcass and meat quality quantitative trait loci in a Landrace pig population selected for growth and leanness. *Journal of Animal Science*, 83(2), 293–300.
- Visscher, P. M. (2008). Sizing up human height variation. *Nature Genetics*, 40(5), 489–490.
- Visscher, P. M., Brown, M. A., McCarthy, M. I., & Yang, J. (2012). Five years of GWAS discovery. *American Journal of Human Genetics*, 90(1), 7–24.
- Wang, J. Y., Luo, Y. R., Fu, W. X., Lu, X., Zhou, J. P., Ding, X. D., ... Zhang, Q. (2013). Genome-wide association studies for hematological traits in swine. *Animal Genetics*, 44(1), 34–43.
- Warriss, P. D. (2000). Measuring the composition and physical characteristics of meat and Post-mortem handling of carcasses and meat quality. In : *Meat Science: An introductory text*. Ed. by CAB-International: Wallingford.
- Warriss, P. D., & Brown, S. N. (1987). The relationships between initial pH, reflectance and exudation in pig muscle. *Meat Science*, 20(1), 65–74.
- Whittington, F. M., Prescott, N. J., Wood, J. D., & Enser, M. (1986). The effect of dietary linoleic acid on the firmness of backfat in pigs of 85 kg live weight. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(8), 753–761.

- Wimmers, K., Murani, E., Te Pas, M. F., Chang, K. C., Davoli, R., Merks, J. W., ... Ponsuksili, S. (2007). Associations of functional candidate genes derived from gene-expression profiles of prenatal porcine muscle tissue with meat quality and muscle deposition. *Animal Genetics*, 38(5), 474–484.
- Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., ... Whittington, F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78(4), 343–358.
- Wood, J., & Whittemore, C. (2007). Pig meat and carcass quality. In: *Whittemore's Science and Practice of Pig Production*. 3rd edition. Ed. by Kariazakis, I., & Whittemore, C.
- Wu, J., Zhou, D., Deng, C., Wu, X., Long, L., & Xiong, Y. (2008). Characterization of porcine ENO3: genomic and cDNA structure, polymorphism and expression. *Genetics, Selection, Evolution*, 40(5), 563–579.
- Wynder, E. L., Cohen, L. A., & Winters, B. L. (1997). The challenges of assessing fat intake in cancer research investigations. *Journal of the American Dietetic Association*, 97(7 Suppl).
- Xu, X., Xu, X., Yin, Q., Sun, L., Liu, B., & Wang, Y. (2011). The molecular characterization and associations of porcine cardiomyopathy associated 5 (CMYA5) gene with carcass trait and meat quality. *Molecular Biology Reports*, 38(3), 2085–2090.
- Yang, B., Zhang, W., Zhang, Z., Fan, Y., Xie, X., Ai, H., ... Ren, J. (2013). Genome-wide association analyses for fatty acid composition in porcine muscle and abdominal fat tissues. *PLoS ONE*, 8(6), e65554.
- Yang, J., Benyamin, B., McEvoy, B. P., Gordon, S., Henders, A. K., Nyholt, D. R., ... Visscher, P. M. (2010). Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nature Genetics*, 42(7), 565–569.

- Yu, L., Tang, H., Wang, J., Wu, Y., Zou, L., Jiang, Y., ... Li, N. (2007). Polymorphisms in the 5' regulatory region of myostatin gene are associated with early growth traits in Yorkshire pigs. *Science in China Series C: Life Sciences*, 50(5), 642–647.
- Zdravec, D., Brolinson, A., Fisher, R. M., Carneheim, C., Csikasz, R. I., Bertrand-Michel, J., ... Jacobsson, A. (2010). Ablation of the very-long-chain fatty acid elongase ELOVL3 in mice leads to constrained lipid storage and resistance to diet-induced obesity. *The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(11), 4366–4377.
- Zeggini, E., Scott, L. J., Saxena, R., Voight, B. F., Marchini, J. L., Hu, T., ... Andersen, G. (2008). Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nature Genetics*, 40(5), 638–645.
- Zhang, L., Liu, J., Zhao, F., Ren, H., Xu, L., Lu, J., ... Du, L. (2013). Genome-wide association studies for growth and meat production traits in sheep. *PLoS ONE*, 8(6), e66569.
- Zheng, Q., & Wang, X. J. (2008). GOEAST: a web-based software toolkit for Gene Ontology enrichment analysis. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue).
- Zhou, X., & Stephens, M. (2012). Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. *Nature Genetics*, 44(7), 821–824.
- Zhou, X., Carbonetto, P., & Stephens, M. (2013). Polygenic modeling with Bayesian Sparse Linear Mixed Models. *PLoS Genetics*, 9(2), e1003264.
- Zuk, O., Hechter, E., Sunyaev, S. R., & Lander, E. S. (2012). The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), 1193–1198.

