



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



MASTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA
ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**“Genes candidatos para el metabolismo
lipídico: análisis genético y funcional
del cromosoma 8 porcino”**

Tesis de Máster
Barcelona, Julio 2013

Manuel Revilla Sánchez

Directores:

Dr. Josep M. Folch Albareda

Dra. Maria Ballester Devis



El Dr. **Josep M. Folch Albareda**, profesor titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona e investigador del CRAG (Centre for Research in Agricultural Genomics)

y

la Dra. **Maria Ballester Devis**, investigadora adscrita al CRAG (Centre for Research in Agricultural Genomics)

CERTIFICAN:

Que **Manuel Revilla Sánchez** ha realizado bajo su supervisión el trabajo de investigación titulado “Genes candidatos para el metabolismo lipídico: análisis genético y funcional del cromosoma 8 porcino” para la obtención de la Tesis de Máster del Máster en Mejora Genética y Biotecnología de la Reproducción (Universitat Politècnica de València; Universitat Autònoma de Barcelona).

Que este trabajo se ha realizado en el CRAG (Centre for Research in Agricultural Genomics)

Bellaterra, 1 de Julio de 2013

Dr. Josep M. Folch Albareda

Dra. Maria Ballester Devis

“Familia que camina unida,
jamás será vencida” Anónimo

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de Máster, si bien ha requerido de esfuerzo y dedicación, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia.

En primer lugar agradecer a la Universidad Autónoma de Barcelona y en especial al personal investigador del “*Centre de Recerca en Agrigènómica*”, por abrirme las puertas y permitir iniciarme con mi formación investigadora.

Debo a su vez un especial agradecimiento a mi Director de Tesis, el Dr. Josep María Folch Albareda por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo.

Del mismo modo merece un agradecimiento especial mi Directora de Tesis, la Dra. María Ballester Devis quien me guió por la ruta de la genética molecular y el mejoramiento genético, quien siempre estuvo allí, a la hora de cualquier duda y asesoramiento en aspectos moleculares. Por su generosidad en la explicación y valiosos comentarios realizados en todo el proceso de elaboración del trabajo y sus atinadas correcciones. Sin la cual la elaboración de este proyecto no hubiera sido viable.

A mi grupo de investigación, Jordi Corominas, Anna Puig, Sandra Contreras y Jorge Augusto Petroli, por brindarme su apoyo, ánimo y colaboración en todo momento y sobre todo cuando más necesitaba de ellos, sin poner nunca peros o darme negativas, sino todo lo contrario. En especial a Yulixaxis Ramayo, por su presencia incondicional, sus apreciados y relevantes aportes, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo. A todos ellos considero más que compañeros de trabajo, amigos.

A las Dras. Anna Castelló y Anna Mercadé por siempre haber sido un ejemplo a la ética, profesionalismo y por su continuo asesoramiento.

A Betlem Cabrera, por su permanente disposición y desinteresada ayuda.

A todas y cada una de las personas que forman parte de la Unidad de Genética, Dr. Armand Sánchez, Dr. Alex Clop, Dr. Marcel Amills, Dr. Miguel Pérez-Enciso, Dr.

Sebastián Ramos, Dra. Natalia Sastre, Dra. Arianna Manunza, Tania Guil, Oriol Timoneda, Verónica Martínez, Erica Bianco, Antonia Noce y William Burgos), que me han hecho sentir como en casa y de los que me llevo verdaderos amigos. Especial agradecimiento merece Sarai Córdoba, por su constante espíritu servicial y desinteresada colaboración en el diseño de la portada del presente manuscrito (mi espalda te lo agradece aún más).

A todos mis profesores del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Extremadura, de los cuales he aprendido mi profesión y a los que les debo bastante de mi recorrido académico y profesional.

A mis profesores del Máster por su dedicación, entrega y transmisión de conocimientos.

A mis compañeros del Máster, de los cuales me llevo gratas experiencias, en especial a vosotros Marcia, Ximena, Rayner y Marina.

A mi familia en Barcelona quienes han compartido conmigo los “ires y venires” en el plano personal durante esta estancia en la ciudad Condal: Javi, Luis y Marta.

A mis padres, Manuel y Asunción, porque todo lo que soy se lo debo a ellos. Gracias por vuestras enseñanzas, por ser un ejemplo, por creer en mí, por apoyarme, por estar siempre a mí lado, por comprenderme, y sobretodo, gracias por brindarme todo vuestro amor. A mi hermana, Cristina, por ser un ejemplo de valentía, capacidad y superación; y un ejemplo a seguir. ¡Os quiero!

A las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo y han hecho posible que hoy vea la luz.

A todos mi eterno agradecimiento.

ABREVIATURAS

ACL	Longitud promedio de la cadena de los ácidos grasos (<i>Average Chain Length</i>)
AG	Ácidos grasos
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
BACs	Cromosoma artificial bacteriano (<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>)
cM	Centimorgan
Gb	Gigabases
GD	Grasa dorsal
GIM	Grasa intramuscular
GWAS	Análisis de asociación del genoma completo (<i>Genome-Wide Association Study</i>)
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (<i>High Density Lipoprotein</i>)
IBMAP	Cruce experimental Ibérico x Landrace
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
M	Millones
MAS	Selección asistida por marcadores
Mb	Megabases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
QTL	Loci de caracteres cuantitativos (<i>Quantitative Trait Loci</i>)
SGSC	Consorcio de secuenciación del genoma porcino (<i>Swine Genome Sequencing Consortium</i>)
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SSC	Cromosoma especie porcina (<i>Sus scrofa chromosome</i>)
SSR	Repeticiones de Secuencia Simple
STR	Repeticiones Simples en Tándem
TAS	Regiones cromosómicas con SNPs asociados (<i>Trait-Associated SNP</i>)
UE	Unión-Europea
WGS	Secuenciación paralela masiva (<i>Whole Genome Sequencing</i>)

ÍNDICE

RESUMEN / SUMMARY.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Estructura del sector porcino.....	15
1.2. Razas porcinas europeas.....	17
1.3. Mejora genética aplicada al sector porcino.....	18
1.4. Calidad de la carne.....	19
1.5. Marcadores moleculares.....	22
1.5.1. Microsatélites.....	23
1.5.2. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP).....	23
1.6. Secuenciación del genoma porcino.....	24
1.7. Identificación de QTL.....	25
1.8. El proyecto IBCMAP.....	28
1.8.1. Genes candidatos analizados en el cruce IBCMAP.....	32
1.8.2. Evaluación de nuevos genes candidatos porcinos relacionados con el QTL del SSC8.....	35
2. OBJETIVOS.....	37
3. ARTÍCULO.....	38
“Association study for backfat fatty acid composition in an iberian x landrace cross with a 144 SNP <i>CHIP</i> of SSC8”.....	38
3.1. Introduction.....	41
3.2. Materials and Methods.....	42
3.2.1. Animal samples.....	42
3.2.2. Analyzed traits.....	43
3.2.3. Genotyping and quality control.....	43
3.2.4. Association analysis.....	44
3.2.5. Amplification and sequencing of the pig <i>MAML3</i> and <i>SETD7</i> genes.....	45
3.2.6. Detection of microsatellite polymorphisms.....	45
3.2.7. RNA isolation and cDNA synthesis.....	46
3.2.8. Gene expression quantification.....	46
3.3. Results and Discussion.....	47
3.3.1. Association studies, linkage disequilibrium and linkage analyses (LDLA) and family-based studies.....	47

3.3.2. Identification of polymorphisms in the porcine <i>MAML3</i> and <i>SETD7</i> genes.....	50
3.3.3. Association study for BF FA composition in family 1 of the F2 generation.....	51
3.3.4. Effect of the <i>SETD7:c.-1034T>G</i> and <i>SETD7:c.700G>T</i> SNPs and <i>MAML3</i> microsatellites on gene expression.....	52
3.4. Conclusions.....	52
3.5. Acknowledgments.....	53
3.6. References	53
3.7. Figure legends.....	64
3.8. Supplementary material.....	68
4. CONCLUSIONES.....	72
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
6. ANEXO.....	84
6.1. Revilla M., Ramayo-Caldas Y., Castelló A., Corominas J., Puig-Oliveras A., Ibáñez-Escriche N., Muñoz M., Ballester M. y Folch J.M. (2013) Estudio de asociación para la composición de ácidos grasos en grasa dorsal en un cruce Ibérico x Landrace con un CHIP de 144 SNPs del SSC8. <i>XV Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza</i>	84

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1.1. Producción de carne en el ámbito mundial de los diferentes tipos de ganado durante el año 2010, expresado en porcentajes (Fuente: FAOSTAT. Abril 2012).....	15
Figura 1.2. Distribución por países de la producción de carne de cerdo (miles de toneladas) en la UE-27 durante el año 2011, expresado en porcentajes (Fuente: EUROSTAT. Abril 2012).....	16
Figura 1.3. Distribución regional del censo porcino (intensivo + extensivo) en España durante el año 2011, expresado en porcentajes (Fuente: MAGRAMA. Marzo 2012).....	17
Figura 1.4. Electroferograma de un microsatélite obtenido con el <i>software Peak Scanner™ 2.0</i> (AppliedBiosystems). El genotipo del microsatélite es heterocigoto 243-259.....	23
Figura 1.5. Esquema del material animal correspondiente al proyecto IBMAP utilizado en el presente trabajo.....	29
Figura 1.6. Perfiles de $-\log_{10}$ (P -valor nominal) del QTL identificado en el SSC4 de la población F2 IBMAP (Mercadé <i>et al.</i> 2005a).....	31
Figura 1.7. Perfiles del $-\log_{10}$ (P -valor nominal) del QTL identificado en el SSC8 de la población F2 IBMAP. La línea horizontal en el valor 2 corresponde a un valor de significación de 0,01 (Estellé <i>et al.</i> 2009b).....	31
Figura 1.8. Gen <i>MTTP</i> con la mutación en el dominio de transferencia lipídica.....	34
Tabla 1.1. Atributos relacionados con la calidad de la carne porcina (adaptado de Coma y Piquer, 1999).....	19
Tabla 1.2. Composición de la grasa del cerdo (adaptado de Suzuki <i>et al.</i> 2006).....	21
Tabla 1.3. Estadísticos descriptivos incluyendo media, desviación estándar (SD), heredabilidad (h^2) de la composición de los AG y de índices metabólicos (adaptado de Ramayo-Caldas <i>et al.</i> 2012).....	21
Tabla 1.4. Número de QTLs identificados en la especie porcina según la base de datos PigQTLdb (http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/browse ; mayo 2013).....	26

Tabla 1.5. QTLs detectados en el SSC8 para la composición de AG y engrasamiento (PigQTLdb: http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/browse ; Junio 2013).....	27
Tabla 1.6. QTLs detectados previamente en el proyecto IBMAP resumidos por el tipo de carácter y el cromosoma donde tiene efecto el QTL detectado.....	30
Tabla 1.7. Principales genes candidatos analizados en el cruce IBMAP.....	32

RESUMEN

El contenido y la composición de ácidos grasos en cerdo es un parámetro de creciente interés debido a su efecto sobre el rendimiento de la canal y la calidad de la carne. En trabajos anteriores, se identificó la presencia de un QTL para la composición de ácidos grasos (AG) en grasa dorsal (GD) en el cromosoma 8 porcino (SSC8) en un cruce Ibérico x Landrace. Recientemente, un análisis de asociación genómico con el chip de 60 K SNP detectó esta misma región genómica afectando a la composición de AG en músculo en un retrocruce (25% Ibérico, 75% Landrace). El gen *ELOVL6* fue estudiado como gen candidato posicional y funcional. Este gen, relacionado con la lipogénesis *de novo*, actúa en la elongación de los AG saturados y monoinsaturados. Se identificó un polimorfismo en la región promotora de este gen asociado con el porcentaje de AG palmítico (C16:0) y palmitoleico (C16:1(n-7)) en músculo y tejido adiposo. Además, este polimorfismo estaba asociado con diferencias de expresión del gen en tejido adiposo, lo cual concuerda con la función del gen y con las diferencias observadas en la composición de AG.

El objetivo principal del presente trabajo fue estudiar el QTL del SSC8 para la composición de los AG en GD en una generación F2 de un cruce Ibérico x Landrace con un panel de 144 SNPs informativos distribuidos a lo largo del cromosoma. La combinación de un análisis de asociación marcador por marcador y un enfoque basado en haplotipos permitió la identificación de dos regiones cromosómicas con SNPs asociados (*TAS*, *Trait-Associated SNP*) a la composición de AG en tejido adiposo (GD). En la primera región TAS, localizada a 93 Mb, se identificaron y seleccionaron dos genes como candidatos posicionales: *mastermind-like 3 (MAML3)* y *SET domain containing lysine methyltransferase 7 (SETD7)*. La segunda región TAS, localizada a 119 Mb, corresponde a la región cromosómica del gen *ELOVL6* previamente descrito. La búsqueda de polimorfismos en el gen *MAML3* reveló dos nuevos microsatélites que fueron genotipados en 132 animales del retrocruce y 168 animales de la F2. No obstante, los polimorfismos identificados no fueron estadísticamente significativos para los caracteres estudiados. Además, la búsqueda de polimorfismos en el gen *SETD7* reveló 9 SNPs. Dos SNPs fueron seleccionados para genotipar 144 animales del retrocruce: *SETD7:c.-1034T>G* localizado en la región promotora y *SETD7:c.700G>T* localizado en el exón 6 y el cual produce un cambio de Valina por Leucina en la

proteína. Del mismo modo, *SETD7:c.700G>T* fue genotipado en 168 animales de la generación F2. Los estudios de asociación mostraron que estos SNPs no eran los más fuertemente asociados con la composición de AG.

Además, se realizó un análisis de expresión génica para los genes *MAML3* y *SETD7* mediante PCR a tiempo real en hígado y GD en 56 hembras del retrocruce. Sin embargo, no se evidenció ninguna asociación entre los genotipos del *SETD7* y la expresión. Lo mismo ocurrió con los genotipos del *MAML3*. Son necesarios más estudios para investigar el efecto de los polimorfismos identificados en la actividad de la proteína.

Del mismo modo, el polimorfismo del *ELOVL6:c.-533C>T* fue genotipado en 168 animales de la generación F2, mostrando una fuerte asociación con los porcentajes en GD de los AGs esteárico (C18:0) y palmitoleico (C16:1(n-7), y los índices C18:1(n-9)/C18:0, C16:0/C14:0, C16:1(n-7)/C16:0 y C18:0/C16:0. Por lo tanto, se confirma el efecto pleiotrópico tanto en GD como en grasa intramuscular del QTL del SSC8 y se refuerza la importancia del polimorfismo *ELOVL6:c.-533C>T*.

Palabras clave: *cerdo, tejido adiposo, QTL, Trait-associated SNP, MAML3, SETD7, ELOVL6.*

ABSTRACT

Content and fatty acid (FA) composition in swine is a parameter of increasing interest because of their effect on carcass performance and meat quality. A QTL for FA composition in backfat (BF) was identified in porcine chromosome 8 (SSC8) in an Iberian by Landrace swine cross. More recently, a genome association analysis (GWAS) with the 60 K SNP chip detected the same genomic region affecting muscle FA composition in a backcrossed population. The *ELOVL fatty acid elongase 6 (ELOVL6)* was a strong positional candidate gene involved in *de novo* lipogenesis, acting on the elongation of saturated and monounsaturated FAs. A polymorphism in the promoter region of this gene was associated with the percentage of palmitic (C16:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) FAs in muscle and adipose tissues. This variant was also associated with differences in *ELOVL6* gene expression in adipose tissue which were consistent with gene function and FA composition.

The aim of this work was to study the SSC8 QTL for FA composition in BF in a F2 generation of an Iberian x Landrace cross with a panel of 144 informative SNPs distributed along the chromosome. The combination of a single-marker analysis and a haplotype-based approach allowed the identification of two trait-associated SNP (TAS) regions for FA composition in BF adipose tissue. In the first TAS region, located at 93 Mb, two genes were identified and selected as positional candidate genes: *mastermind-like 3 (MAML3)* and *SET domain containing lysine methyltransferase 7 (SETD7)*. The second TAS position, located 119 Mb, corresponds to the previously described *ELOVL6* chromosomal region. A search for polymorphisms in the *MAML3* gene revealed two new microsatellites that were genotyped in 132 backcross animals and 168 F2 animals, showing no significant associations for any of the characters studied. Otherwise, a search for polymorphisms in the *SETD7* gene revealed nine SNPs. Two SNPs were selected for genotyping 144 backcross animals: *SETD7:c.-1034T>G* located in the promoter region and *SETD7:c.700G>T* placed in exon six and producing a Valine for Leucine change in the protein. In the same way, *SETD7:c.700G>T* was genotyped in 168 F2 animals. The identified polymorphisms were not the most statistically significant for the studied characters.

Furthermore, we performed a *MAML3* gene and a *SETD7* gene expression analysis by real-time PCR in the liver and BF of 56 backcross females. However, no association was detected between *SETD7* genotypes and expression. The same happened with *MAML3* genotypes. Future research is required to study the effect of the identified polymorphisms in the protein activity.

In the same way, *ELOVL6:c.-533C>T* polymorphism was genotyped in 168 F2 animals, showing a strong association with BF percentages of stearic (C18:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) FAs, and C18:1(n-9)/C18:0, C16:0/C14:0, C16:1(n-7)/C16:0 and C18:0/C16:0 related indices. Hence, confirming the pleiotropic effect in BF and IMF of the SSC8 QTL and reinforcing the relevance of *ELOVL6:c.-533C>T* polymorphism.

Keywords: *pig, adipose tissue, QTL, Trait-associated SNP, MAML3, SETD7, ELOVL6.*

I ● Introducción

1.1. Estructura del sector porcino

La carne de cerdo continúa siendo la más producida en el ámbito mundial, representando el 39,4% y un total de 109 millones (M) de toneladas. Le sigue la producción de carne de ave (31%), así como la producción de bovino (23%) (Figura 1.1).

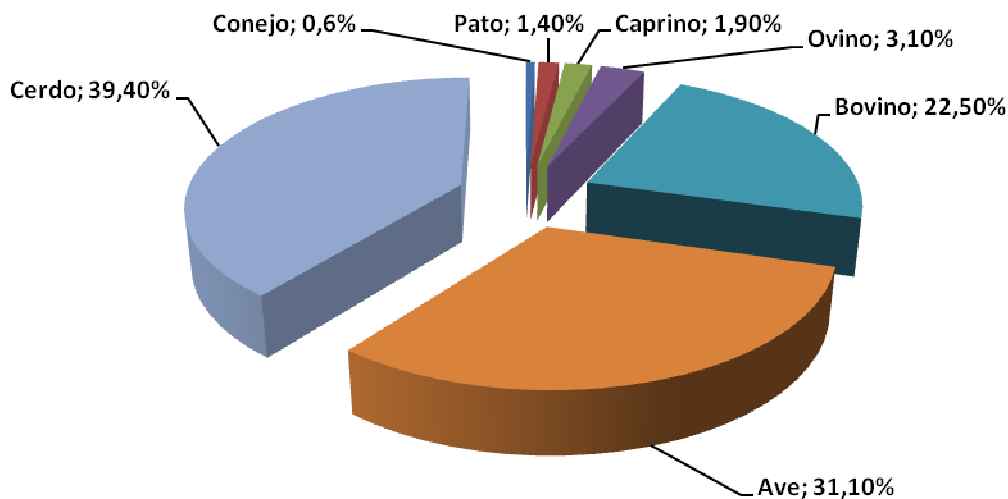


Figura 1.1. Producción de carne en el ámbito mundial de los diferentes tipos de ganado durante el año 2010, expresado en porcentajes (Fuente: FAOSTAT. Abril 2012).

Por países, China se mantiene en primera posición con el 47% de la producción mundial de carne de cerdo y mostrando un aumento a lo largo del tiempo, habiendo incrementado su producción aproximadamente un 10% entre 2008 y 2010. Estados Unidos y los dos líderes europeos (Alemania y España) ocupan las siguientes posiciones en el ranking (GLiPHA; <http://kids.fao.org/glipha/>). En la Unión Europea-27 (UE-27), durante el año 2011, se ha alcanzado una cifra de 22,3 M de toneladas, con una producción de carne porcina del 24,9% y 15,6% en Alemania y España, respectivamente (Figura 1.2). La diferencia de peso entre ambos países en relación a la producción de carne es debida a la elevada importación de animales vivos que tiene Alemania, procedentes principalmente de Holanda y Dinamarca.

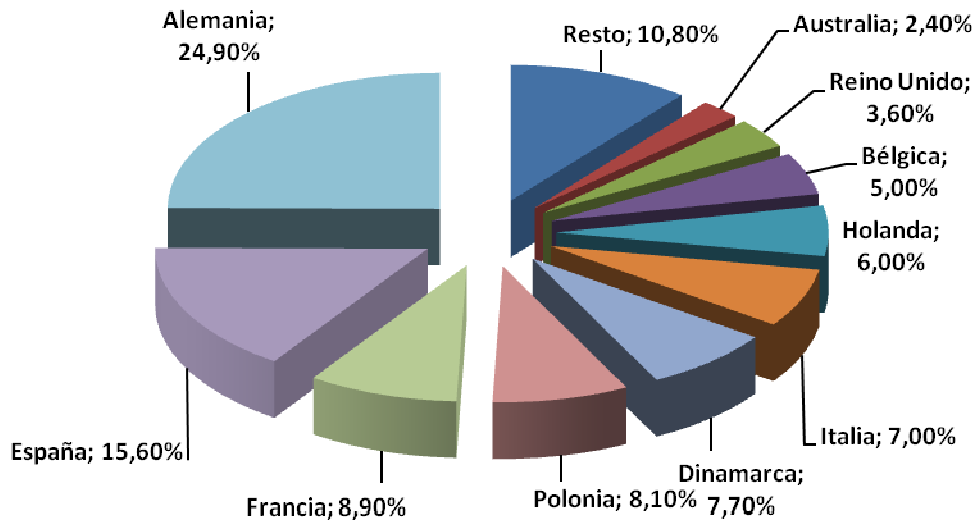


Figura 1.2. Distribución por países de la producción de carne de cerdo (miles de toneladas) en la UE-27 durante el año 2011, expresado en porcentajes (Fuente: EUROSTAT. Abril 2012).

En España, durante el año 2011, se ha alcanzado una cifra de 25,6 M de cabezas de porcino, de las cuales 23,2 M son de producción intensiva y 2,4 M corresponden al cerdo ibérico, con producción extensiva. Del censo total, el 50% se concentra en dos comunidades autónomas: Cataluña (27,5%) y Aragón (21,8%) (Figura 1.3). Castilla y León y Andalucía, las siguientes comunidades en importancia de censo total de ganado porcino (12,6% y 8,5%, respectivamente) destacan al concentrar entre ambas el 57% de la producción extensiva de porcino de España. La Región de Murcia, Castilla La Mancha, Extremadura, Comunidad Valenciana y Galicia son las comunidades autónomas que siguen, con un 4-6% del censo de porcino de España.

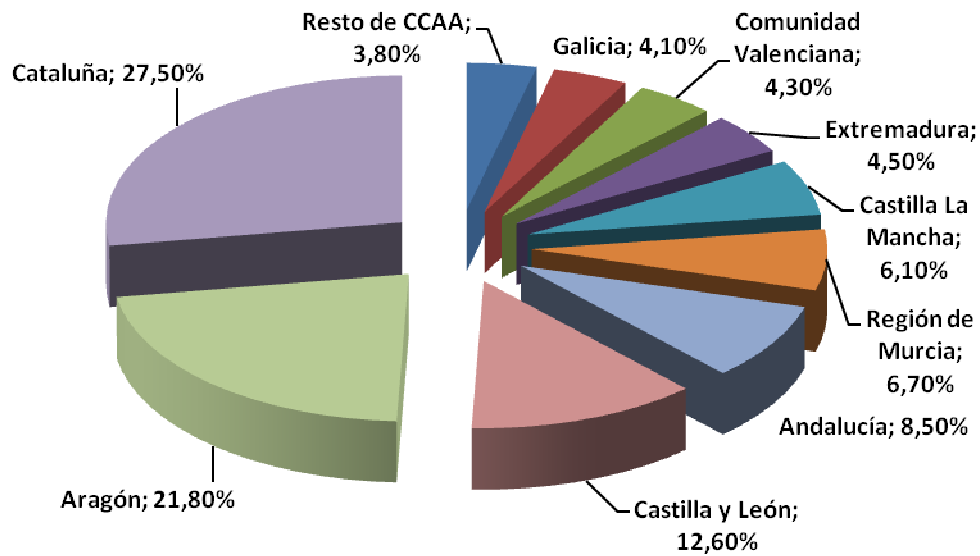


Figura 1.3. Distribución regional del censo porcino (intensivo + extensivo) en España durante el año 2011, expresado en porcentajes (Fuente: MAGRAMA. Marzo 2012).

1.2. Razas porcinas europeas

Las razas más utilizadas por la industria productora porcina europea se pueden dividir en tres grupos principales de acuerdo a sus aptitudes productivas (Tibau, 1992). El primer grupo, caracterizado por su prolificidad y conversión alimenticia, está compuesto por las razas Large White, Landrace y Yorkshire. Estas razas se utilizan para producir hembras híbridas y machos finalizadores para incrementar la calidad de la carne. El segundo grupo lo forman las razas Landrace Belga y Pietrain. Son menos prolíficas que las anteriores pero poseen una eficiente conversión alimenticia y un porcentaje mayor de carne magra. El tercer grupo lo forman las razas Duroc y Hampshire, que se caracterizan por su rusticidad, buena conformación, bajo consumo alimenticio y una calidad de canal con un elevado porcentaje de grasa intramuscular (GIM), pero presentan un desarrollo más lento a partir de los 45 kg con tendencia al engrasamiento, motivo por el cual estas razas son utilizadas mediante cruzamientos con Large White y con Landrace.

Particularmente en España se produce el cerdo Ibérico. Se trata de un animal rústico de capa oscura o rojiza, posee una canal corta y pequeña con una conformación inferior a las razas comerciales. Es un animal precoz y con gran capacidad para depositar grasa

en sus tejidos, lo cual resulta muy beneficioso para la producción de jamón. Su elevado índice de infiltración de grasa, con un porcentaje mayor de ácido oleico (C18:1(n-9)) y menor proporción de grasas poliinsaturadas, le confiere una excelente calidad organoléptica (Serra *et al.* 1998).

1.3. Mejora genética aplicada al sector porcino

La mejora genética del ganado porcino se ha desarrollado de forma paralela a la importancia de este sector productivo. Cada país ha desarrollado la mejora genética bajo estructuras con características diferenciales. En algunos países, como por ejemplo Dinamarca (Christensen *et al.* 1986) o Francia (Ollivier, 1989), existen programas nacionales de mejora genética porcina que coexisten con empresas privadas de selección. A diferencia de estos países, en España son compañías privadas las responsables de la mejora genética porcina. En 1965, las empresas españolas de selección crean la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Porcino Selecto con el fin de coordinar las actividades en mejora genética porcina.

Los principales objetivos de una óptima producción son obtener tasas de crecimiento eficientes, buenos índices de conversión y una buena conformación de la canal y la calidad de la carne. Los criterios de selección considerados dependen de los objetivos propuestos, de las variables controladas y de las relaciones entre ambos. En la especie porcina, la baja correlación entre los caracteres productivos y reproductivos (Haley *et al.* 1988; Short *et al.* 1994) ha permitido el tratamiento de forma independiente de los mismos, siendo ésta la forma de proceder más generalizada.

Con el objetivo de aprovechar la variabilidad existente entre las diferentes razas, los pilares en los que se basa la mejora genética son la selección y los cruzamientos. Todo objetivo de selección debe ser establecido de forma limitada, fijado a medio-largo plazo, fácilmente medible y garantizando correlaciones favorables entre los objetivos de selección fijados (Tibau, 1992). Sin embargo, el mercado es el que ha ido marcando los objetivos de selección, los cuales han ido variando en función de la demanda. En primer lugar, en la década de los 80, la selección se centraba en caracteres relacionados con la conformación de la canal, destacando el porcentaje de magro sobre cualquier otro carácter. Posteriormente, en la década de los 90, los objetivos variaron para centrarse en

los relacionados con la calidad de la carne y el crecimiento. Ya en el año 2000, se fijaron como objetivos fundamentales los caracteres relacionados con la calidad de la carne y de la grasa. Sin embargo, los cambios producidos en el rumbo de los objetivos de selección han tenido su impacto en varios caracteres. Por ejemplo, la selección durante tantos años para reducir el contenido en grasa de la canal ha causado también una disminución del porcentaje de GIM. Esta consecuencia no presenta un efecto deseado ya que la GIM se encuentra relacionada con carnes más tiernas y jugosas (Cameron, 1990). Del mismo modo la calidad de la carne se encuentra influenciada por otros factores como el pH post-mortem, la composición de ácidos grasos (AG), la capacidad de retención de agua o la estructura histoquímica de las fibras musculares (Cameron *et al.* 2000; van Laack *et al.* 2001; Paszek *et al.* 2001).

1.4. Calidad de la carne

La calidad de la carne engloba diferentes propiedades y atributos de gran importancia para el sector productivo, la industria y el consumidor (Davoli y Braglia, 2007). La calidad de la carne se puede definir como la suma de todos los aspectos y propiedades sensoriales, nutricionales y tecnológicas (Hofman, 1994; López-Bote *et al.* 1998).

Tabla 1.1. Atributos relacionados con la calidad de la carne porcina (adaptado de Coma y Piquer, 1999).

Categoría	Atributos
Calidad sensorial	Color Terneza Jugosidad Sabor Olor Cantidad de grasa visible Veteado
Calidad nutritiva	Cantidad de grasa Composición de ácidos grasos Valor proteico
Calidad tecnológica	pH Capacidad de retención de agua Consistencia de la grasa Separación de tejidos Estabilidad oxidativa

Tal y como muestra la Tabla 1.1, son varios los atributos relacionados con la calidad de la carne, destacando entre ellos la jugosidad, la terneza, la textura, la capacidad de retención de agua y el sabor por su especial interés sobre la aceptación del consumidor. Estos atributos dependen del porcentaje y ratio músculo/grasa que este posee en el momento del sacrificio y de los cambios que se derivan del proceso de maduración de músculo a carne. A su vez, la composición del músculo viene determinada por factores dietéticos, de manejo, bienestar animal y genéticos, siendo la GIM y la composición de AG dos de los parámetros con más efecto sobre la calidad sensorial, nutricional y tecnológica de la carne, afectando la textura, la jugosidad, la capacidad de retención de agua y el sabor de la carne (Candek-Potokar *et al.* 2002; Olsson y Pickova, 2005).

Sin embargo, y como se ha comentado anteriormente, la industria del porcino ha mejorado el contenido de magro de la canal mediante selección contra el espesor de grasa dorsal (GD) (Toro y Silió, 1992), provocando una reducción de la GIM debido a la correlación genética positiva que existe entre GD y GIM (Solanes *et al.* 2009), hasta valores que mayoritariamente se sitúan por debajo de los recomendados en la producción de curados de calidad. En la última década, el mercado se ha desplazado hacia un incremento de la demanda de carne de cerdo de alta calidad debido a un interés creciente del consumidor en los aspectos relacionados con la calidad sensorial, nutricional y la salud humana. Por tanto, el objetivo del sector es disponer de metodologías de selección que permitan manipular GD y GIM de forma independiente, así como el contenido y composición intramuscular de AG.

En la composición de la grasa del cerdo se observa un gradiente de insaturación desde el centro de la canal hacia el exterior. Así, los ácidos grasos saturados (AGS) abundan en el tejido graso perirenal o GIM, mientras que en la grasa subcutánea predominan los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (Tabla 1.2). Los AGS más comunes y con mayor efecto sobre la calidad tecnológica de la carne son el ácido palmítico (C16:0), el ácido esteárico (C18:0) y el ácido mirístico (C14:0), estando relacionados con la firmeza, el gusto y el aroma de la carne; mientras que el ácido oleico (C18:1(n-9)) y el ácido palmitoleico (C16:1(n-7)) son los AGMI más importantes influyendo en la correcta maduración y en el gusto y aroma de los productos curados. Entre los AGPI, el ácido linoleico (C18:2(n-6)) es el que tiene una mayor repercusión sobre la calidad de la carne, jugando un papel

muy importante en la estabilidad oxidativa y el gusto de la carne (Wood *et al.* 2008). Algunos de los AG con mayor impacto sobre la calidad de la carne se muestran en la Tabla 1.3.

Tabla 1.2. Composición de la grasa del cerdo (adaptado de Suzuki *et al.* 2006).

%	Grasa subcutánea exterior	Grasa subcutánea interior	Grasa intermuscular	Grasa intramuscular
C14:0	1,58	1,55	1,72	1,53
C16:0	25,05	26,82	27,01	26,46
C16:1(n-7)	2,78	2,07	2,81	4,45
C18:0	13,81	16,79	15,35	13,43
C18:1(n-9)	45,87	42,88	43,4	48,38
C18:2(n-6)	10,86	9,89	9,71	5,62
Ratio insaturación AG	59,52	54,86	55,94	58,44

Tabla 1.3. Estadísticos descriptivos incluyendo media, desviación estándar (SD), heredabilidad (h^2) de la composición de los AG y de índices metabólicos (adaptado de Ramayo-Caldas *et al.* 2012).

Ítem	Carácter	Nomenclatura	Media	SD	h^2
AGS	C14:0	Ácido mirístico	1,18	0,15	0,54
	C16:0	Ácido palmítico	22,60	1,20	0,57
	C18:0	Ácido esteárico	14,18	1,03	0,24
AGMI	C16:1(n-7)	Ácido palmitoleico	2,50	0,39	0,55
	C18:1(n-9)	Ácido oleico	40,08	2,76	0,40
	C18:1(n-7)	Ácido vaccénico	3,88	0,36	0,42
	C20:1(n-9)	Ácido eicosenoico	0,85	0,11	0,47
AGPI	C18:2(n-6)	Ácido linoleico	10,35	2,37	0,22
	C18:3(n-3)	Ácido α -linolénico	0,65	0,29	0,18
	C20:2(n-6)	Ácido eicosadienoico	0,54	0,12	0,26
	ACL	Longitud promedio de la cadena	17,47	0,05	0,41
	Σ SFA	SFA	38,47	1,63	0,53
	Σ MUFA	MUFA	47,96	3,06	0,19
	Σ PUFA	PUFA	13,36	3,29	0,18
Índices metabólicos					
Actividad	C16:1(n-7)/C16:0		0,11	0,01	0,51
$\Delta 9$-desaturasa	C18:1(n-9)/C18:0		2,84	0,29	0,35
Actividad	C18:1(n-7)/C16:1(n-7)		1,58	0,19	0,57
elongasa	C20:2(n-6)/C18:2(n-6)		0,05	0,01	0,39

Al efecto que presentan los AG en la calidad de la carne hay que sumarle el impacto que tienen sobre la salud humana, ya que un aumento de la cantidad de AGMI y AGPI en la dieta disminuye la susceptibilidad a padecer enfermedades cardiovasculares. Estos AG están asociados con una disminución de los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low Density Lipoprotein*) y colesterol plasmático sin reducir los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High Density Lipoprotein*) (Ventanas *et al.* 2007), mientras que los AGS tienen el efecto contrario (Ordovas, 2006).

La carne de cerdo es rica en grasa y particularmente en colesterol y constituye una de las fuentes principales de lípidos de las dietas occidentales siendo de especial interés ampliar el conocimiento de la base genética del metabolismo lipídico en esta especie. Con el fin de determinar la base genética de los caracteres de importancia económica como son la grasa, la composición y la calidad de la carne, durante los últimos años se han utilizado diferentes herramientas genéticas que han ido evolucionando a lo largo del tiempo.

1.5. Marcadores moleculares

Un marcador genético o marcador molecular es un segmento de ADN con una ubicación física identificable (*locus*) en un cromosoma y cuya herencia genética se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del ADN sin función conocida. Dado que los segmentos del ADN que se encuentran contiguos en un cromosoma tienden a heredarse juntos, los marcadores se utilizan a menudo como formas indirectas de rastrear el patrón hereditario de un gen que todavía no ha sido identificado, pero cuya ubicación aproximada se conoce. Permiten evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN entre dos individuos, modifiquen éstas o no su fenotipo.

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

1.5.1. Microsatélites

Los microsatélites o SSR (Repeticiones de Secuencia Simple) o STR (Repeticiones Simples en Tándem) consisten en una secuencia de ADN de unos cuantos nucleótidos de longitud (de 2 a 6 pares de bases) que se repite varias veces en tándem (p. ej., CACACACACACACA), y se encuentran diseminados por todo el genoma de los eucariotas. Los microsatélites son de un tamaño relativamente pequeño y, por consiguiente, pueden ser fácilmente amplificados con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) usando ADN extraído de diversas fuentes como la sangre, el pelo, la piel, e incluso las heces. Los polimorfismos se pueden visualizar por electroforesis de poliacrilamida o capilar (Figura 1.4) y la disponibilidad de secuenciadores automáticos de ADN permite un análisis rápido de un gran número de muestras (Goldstein y Schlötterer, 1999; Jarne y Lagoda, 1996).

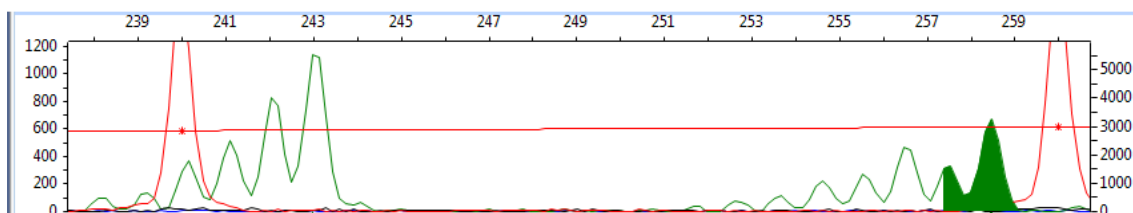


Figura 1.4. Electroferograma de un microsatélite obtenido con el *software Peak Scanner™ 2.0* (Applied Biosystems). El genotipo del microsatélite es heterocigoto 243-259.

Los microsatélites son hipervariables; muestran a menudo decenas de alelos en un *locus* que difieren entre sí en el número de repeticiones. Siguen siendo los marcadores de elección para estudios de diversidad, para análisis de parentesco y para el cartografiado de QTLs.

1.5.2. Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Los SNPs son variaciones de un único nucleótido. Se encuentran en todo el genoma y generalmente son dialélicos. Son muy abundantes en el genoma humano, a razón de un SNP por cada 300 nucleótidos (Sachidanandam *et al.* 2001). En la base de datos *SNP Database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) se puede encontrar información sobre los

SNPs descritos en diferentes especies. La mayoría de SNPs se localizan en las regiones no codificantes y no tienen un impacto directo en el fenotipo de un individuo. No obstante, algunos introducen mutaciones en secuencias codificadoras o en regiones que influyen en la expresión génica (promotores, 3'UTR...).

Uno de los avances más importantes relacionados con los SNPs ha sido la creación de los chips de SNPs de alto rendimiento (chip de 60K SNPs porcino; Ramos *et al.* 2009), los cuales ofrecen la posibilidad de realizar genotipado de alta densidad en cerdos. Dicho avance ha permitido en muchos casos acotar los intervalos de QTLs previamente identificados.

1.6. Secuenciación del genoma porcino

Tras la publicación del proyecto genoma humano (Lander *et al.* 2001) se propusieron otros proyectos de secuenciación de genomas de especies de interés como modelo de enfermedades. Aunque en 2001 se inició un primer proyecto conjunto entre China y Dinamarca para llevar a cabo la secuenciación del genoma porcino, se obtuvo sólo una secuencia parcial del mismo (Wernersson *et al.* 2005). En 2003, se inició un segundo proyecto, el *Swine Genome Sequencing Consortium* (SGSC) (Rohrer *et al.* 2003; Schook *et al.* 2005) y, recientemente, se ha publicado la secuencia del genoma porcino (http://www.ensembl.org/Sus_scrofa/Info/Index; Groenen *et al.* 2012). Esta secuencia (Assembly Sscrofa 10.2) ha sido obtenida por secuenciación de Sanger a partir de BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*) y, más recientemente, por secuenciación paralela masiva (WGS, *Whole Genome Sequencing*). Comprende un total de 2,6 Gb de secuencia asignada a los cromosomas más 212 Mb de posición desconocida. La anotación de la secuencia del genoma del cerdo ha permitido identificar 21.640 genes codificantes de proteínas, 380 pseudogenes y 2.965 ncRNAs (RNAs no codificantes). Además, se han encontrado 95 nuevas familias de elementos repetitivos. Los elementos repetitivos constituyen un 40% del genoma porcino, siendo los LINE1 y los PRE (un SINE específico de cerdos) los más abundantes (Groenen *et al.* 2012).

El conocimiento de la secuencia del genoma porcino ayudará a descifrar, en parte, la base genética de diferentes caracteres de interés. Del mismo modo, la secuencia del

genoma también proporciona un valioso recurso tanto en la producción agrícola como en la investigación biomédica.

1.7. Identificación de QTL

Los caracteres de mayor importancia económica en la producción animal son de naturaleza cuantitativa, y se ven afectados por un gran número de genes (*loci*), en general con un efecto pequeño sobre el carácter, aunque algunos tienen efectos mayores (Le Roy *et al.* 1990; Andersson *et al.* 1994). Un *locus* cuyo polimorfismo explica una parte significativa de la variación de un carácter cuantitativo se conoce como un QTL (Lynch y Walsh, 1998). La presencia de un QTL se deduce por cartografía genética, donde la variación total está dividida en componentes ligados a varias regiones cromosómicas discretas. Desde el punto de vista genético resulta interesante dilucidar la arquitectura de los caracteres complejos siendo un primer paso la detección de las regiones cromosómicas (QTL) que controlan las diferencias fenotípicas observadas. Así, los estudios de QTL se basan en determinar si existe una asociación significativa entre la variación fenotípica de los caracteres estudiados y la variación genética analizada (Lynch y Walsh, 1998).

El primer estudio de QTL en porcino fue el descrito por Andersson *et al.* (1994). Para este estudio se generó un cruce entre dos machos jabalíes y ocho hembras Large White de los que se obtuvo una generación F2 de 200 animales. Con el método estadístico descrito por Haley *et al.* (1994) detectaron un QTL en el cromosoma 4 porcino (SSC4, *Sus scrofa chromosome*) con efecto sobre crecimiento, tamaño del intestino y deposición de grasa dorsal y abdominal. El efecto de este QTL ha sido confirmado en la mayoría de los sucesivos experimentos realizados en diferentes razas (Walling *et al.* 2000), siendo uno de los QTLs más consistentes en porcino, conocido como *FAT1* (Marklund *et al.* 1999). Para llevar a cabo estos estudios se generaron cruces con diferentes razas divergentes. La mayoría de ellos consisten en cruces de razas comerciales europeas con razas chinas, principalmente Meishan, o jabalí. También se han utilizado cruces entre razas comerciales o poblaciones comerciales (Rothschild *et al.* 2007). La heterogeneidad en el material animal utilizado dificulta la comparación de los QTLs. Dos QTLs que difieran 20-30 cM pueden corresponder al mismo *locus* y al

contrario, resultados coincidentes pueden no corresponder al mismo QTL (Bidanel y Rothschild, 2002).

Existen numerosos trabajos de revisión de los QTLs identificados con énfasis en uno o más caracteres (Bidanel y Rothschild, 2002; Buske *et al.* 2006). Del mismo modo la base de datos PigQTLdb (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index>) recopila la información de los QTLs identificados en la especie porcina (Tabla 1.4) (Hu *et al.* 2005).

Tabla 1.4. Número de QTLs identificados en la especie porcina según la base de datos PigQTLdb (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/browse>; mayo 2013).

Cromosoma	QTLs Identificados	Cromosoma	QTLs Identificados
Y	1	9	315
X	313	10	195
1	1582	11	180
2	896	12	249
3	283	13	346
4	677	14	303
5	301	15	269
6	829	16	170
7	840	17	174
8	364	18	142

Existen QTLs para una gran variedad de caracteres, desde caracteres como el crecimiento o calidad de la carne hasta caracteres relacionados con la resistencia a enfermedades o el comportamiento. No obstante, debido a que los análisis tradicionales de QTLs se han focalizado en caracteres productivos que afectan al crecimiento, composición y calidad de la canal o reproducción, hay un mayor número de QTLs identificados para estos caracteres.

En la Tabla 1.5 se presenta una revisión de QTLs del SSC8 depositados en la base de datos PigQTLdb para caracteres de engrasamiento y composición de AG con efecto sobre la calidad de la canal y de la carne. Una parte muy importante de estos QTLs han sido detectados en un cruce Ibérico x Landrace (IBMAP).

Tabla 1.5. QTLs detectados en el SSC8 para la composición de AG y engrasamiento (PigQTLdb: <http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/browse>; Junio 2013).

Categoría	Carácter	Referencia
Composición de los AG	Porcentaje de ácido esteárico	Guo <i>et al.</i> 2009; Estellé <i>et al.</i> 2009a; Uemoto <i>et al.</i> 2012.
	Porcentaje de ácido palmitoleico	Clop <i>et al.</i> 2003; Estellé <i>et al.</i> 2009a; Ramayo-Caldas <i>et al.</i> 2012.
	Porcentaje de ácido linoleico	Guo <i>et al.</i> 2009; Estellé <i>et al.</i> 2009a.
	Porcentaje de ácido oleico	Clop <i>et al.</i> 2003; Sánchez <i>et al.</i> 2007; Estellé <i>et al.</i> 2009a; Uemoto <i>et al.</i> 2012; Ramayo-Caldas <i>et al.</i> 2012.
	Porcentaje de ácido eicosenoico	Guo <i>et al.</i> 2009.
	Porcentaje de ácido gadoleico	Estellé <i>et al.</i> 2009a.
	Porcentaje de ácido vaccenico	Estellé <i>et al.</i> 2009a.
	Total de AGS	Guo <i>et al.</i> 2009; Ramayo-Caldas <i>et al.</i> 2012.
	Contenido de AG insaturados	Guo <i>et al.</i> 2009; Ramayo-Caldas <i>et al.</i> 2012.
	Relación de los AGPI con los AGS	Guo <i>et al.</i> 2009.
	Ratio entre ácido vaccenico y ácido palmitoleico	Ramayo-Caldas <i>et al.</i> 2012.
	Índice de dobles enlaces	Guo <i>et al.</i> 2009.
	Longitud promedio de la cadena	Clop <i>et al.</i> 2003.
Grasa	Peso de la grasa	Knott <i>et al.</i> 1998.; Paszek <i>et al.</i> 2001
	Total de grasa corporal	Edwards <i>et al.</i> 2008.
	Espesor de grasa dorsal	Rohrer <i>et al.</i> 2000; De Koning <i>et al.</i> 2003; Vidal <i>et al.</i> 2005; Sánchez <i>et al.</i> 2006; Liu <i>et al.</i> 2007; Muñoz <i>et al.</i> 2009; Chen <i>et al.</i> 2009; Pan <i>et al.</i> 2010; Tomás <i>et al.</i> 2011; Edwards <i>et al.</i> 2008; Cherel <i>et al.</i> 2011.
	Espesor de la grasa subcutánea en el hombro	Liu <i>et al.</i> 2007.
	Porcentaje de grasa en la canal	Uemoto <i>et al.</i> 2012.
	Contenido de GIM	Duthie <i>et al.</i> 2008.
	Diámetro de los adipocitos	Geldermann <i>et al.</i> 2010; Rückert <i>et al.</i> 2012.

El siguiente paso después de la detección de QTLs es la identificación de los genes y polimorfismos causales. Existen varias estrategias para la identificación de dichos genes como la búsqueda de genes candidatos por posición, y el análisis de genes candidatos funcionales por posición. En las especies domésticas, la estrategia comúnmente utilizada ha sido la elección del gen en base a su fisiología y a su posición, descrita en la misma especie o por mapeo comparativo con especies de las que se dispone de mapas de alta resolución, como el humano o el ratón. No obstante, la identificación de la mutación causal de los QTL detectados es complicada debido al gran número de genes presentes en cada región cromosómica y al desequilibrio de ligamiento generado en las poblaciones experimentales (Varona *et al.* 2005).

Si se identifica un *locus* con un efecto mayor, y se puede diseñar una prueba molecular, el genotipo de los animales en dicho *locus* puede utilizarse para la selección. En otros casos, puede identificarse una región cromosómica cercana al gen de interés y utilizarse como marcador. A este tipo de selección se la conoce bajo el nombre de selección asistida por marcadores (MAS). Esta estrategia permite seleccionar los alelos de los marcadores que están asociados con alelos favorables del QTL. La principal ventaja de la MAS es que el genotipo del marcador se puede determinar justo al nacimiento del animal sin tener que esperar a tener los registros fenotípicos (Haley y Visscher, 1998-1999).

1.8. El proyecto IBMAP

El material animal utilizado para realizar el presente estudio corresponde al proyecto IBMAP, llevado a cabo en colaboración entre el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA), la Universidad de Lleida-Instituto de Investigación de Tecnologías Agroalimentarias de la Generalitat de Catalunya (UdL-IRTA) y la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). En el proyecto IBMAP se generó un cruce experimental entre cerdos Ibéricos de la estirpe Guadyerbás (Dehesón del Encinar, Toledo) y hembras Landrace (Nova Genètica S.A.). El cerdo Ibérico se caracteriza por una excelente calidad de la carne y una composición de AG saludable para la dieta humana, mientras que la raza Landrace es una de las razas comerciales donde la selección artificial ha modificado notablemente estos caracteres. Para identificar los

QTLs y genes responsables de estos caracteres se cruzaron 3 machos Ibéricos con 31 hembras Landrace. De este cruce se obtuvo una F1, que permitió obtener una F2 (cruzando animales de la F1). Además, se seleccionaron 5 machos (F1) que fueron cruzados con 26 hembras Landrace para obtener un retrocruce de 166 animales (BC1_LD) (Figura 1.5).

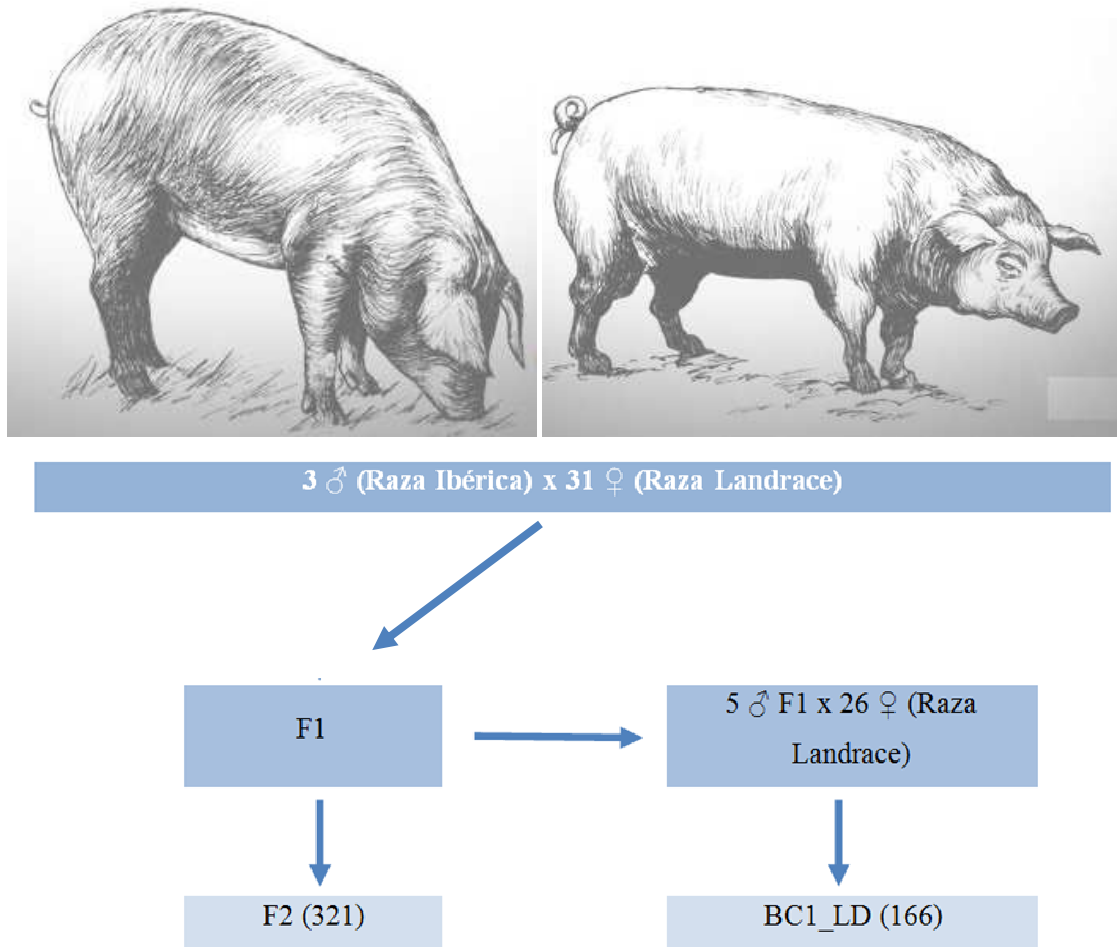


Figura 1.5. Esquema del material animal correspondiente al proyecto IbmAP utilizado en el presente trabajo.

El objetivo inicial del proyecto IbmAP era detectar QTLs relacionados con caracteres de crecimiento, engrasamiento y calidad de la canal y de la carne en la población experimental F2. Posteriormente, se planteó el refinamiento de la posición de los QTLs de mayor interés y el análisis de genes candidatos. En la Tabla 1.6 se resumen algunos de los principales QTLs identificados en el cruce IbmAP.

Tabla 1.6. QTLs detectados previamente en el proyecto IBMAP resumidos por el tipo de carácter y el cromosoma donde tiene efecto el QTL detectado.

Carácter	Cromosoma	Referencia
Crecimiento, canal y engrasamiento	SSC2, SSC4, SSC6 y SSCX	Óvilo <i>et al.</i> 2000; Pérez-Enciso <i>et al.</i> 2000; Varona <i>et al.</i> 2002; Mercadé <i>et al.</i> 2005a; Óvilo <i>et al.</i> 2005; Pérez-Enciso <i>et al.</i> 2005.
Calidad de la carne	SSC3, SSC4, SSC6, SSC7, SSC8 y SSCX	Óvilo <i>et al.</i> 2000; Óvilo <i>et al.</i> 2002a; Pérez-Enciso <i>et al.</i> 2002; Mercadé <i>et al.</i> 2005a.
Composición de los AG	SSC4; SSC6; SSC8; SSC10; SSC12; SSCX	Pérez-Enciso <i>et al.</i> 2000; Clop <i>et al.</i> 2003; Mercadé <i>et al.</i> 2006a; Muñoz <i>et al.</i> 2007.

En el año 2000, Pérez-Enciso y colaboradores confirmaron la presencia del QTL *FATI* en el cruce IBMAP concluyendo que además de afectar al espesor de la grasa también tiene efecto sobre la composición de los AG. Estos resultados fueron confirmados en estudios posteriores (Clop *et al.* 2003). Gracias al refinamiento realizado de este QTL en el SSC4 con una población F3 y BC, se observó la existencia de dos QTLs. El primero de ellos, cerca del gen *FABP4* (o *A-FABP*), con un efecto importante sobre la grasa y el crecimiento, mientras que el segundo afectaba al crecimiento y la forma del animal. Este último QTL corresponde con la región del *FATI* (Mercadé *et al.* 2005a; Mercadé *et al.* 2006b; Figura 1.6). Se ha demostrado que polimorfismos en el gen *FABP4* están altamente relacionados con la grasa y la forma del QTL. Sin embargo, no parecen ser la mutación causal (Mercadé *et al.* 2006b).

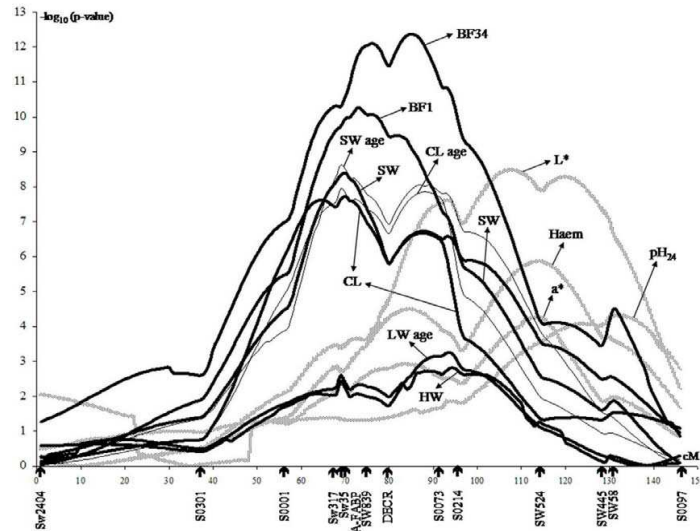


Figura 1.6. Perfiles de $-\log_{10}$ (P -valor nominal) del QTL identificado en el SSC4 de la población F2 IIBM (Mercadé *et al.* 2005a).

En 2003, Clop y colaboradores realizaron el primer análisis del genoma en búsqueda de QTLs que afectaran a la composición de AG en porcino. Utilizando la generación F2 del cruce IIBM, se identificaron importantes QTLs para la composición de AG en GD en los cromosomas porcinos 4, 6, 8, 10 y 12. El QTL del SSC8 fue significativo para el porcentaje de ácido palmítico (C16:0) y palmitoleico (C16:1(n-9)). Del mismo modo, también presentó un efecto significativo la longitud promedio de la cadena de los ácidos grasos (ACL, *Average Chain Length*) (Clop *et al.* 2003; Estellé *et al.*, 2009b) (Figura 1.7).

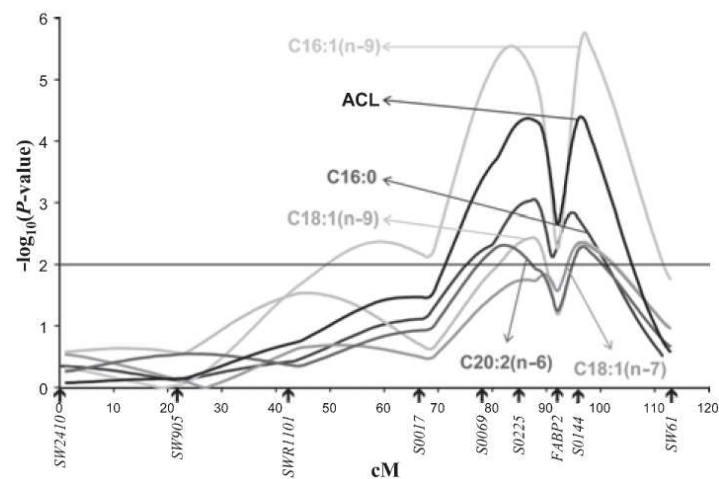


Figura 1.7. Perfiles de $-\log_{10}$ (P -valor nominal) del QTL identificado en el SSC8 de la población F2 IIBM. La línea horizontal en el valor 2 corresponde a un valor de significación de 0,01 (Estellé *et al.* 2009b).

Recientemente, se ha realizado un análisis de asociación del genoma completo (GWAS, *Genome-Wide Association Study*) (Ramayo-Caldas *et al.* 2012) con los datos genotípicos del chip de 60K SNPs (Illumina) y la composición de AG en músculo (*Longissimus dorsi*) en 144 animales del retrocruce BC1_LD (25% Ibérico, Landrace 75%). Este estudio ha permitido refinar la posición del QTL del SSC8 e identificar el gen *ELOVL6* como potente candidato posicional y funcional.

1.8.1. Genes candidatos analizados en el cruce IBMAP

En el proyecto IBMAP se han analizado numerosos genes candidatos (Tabla 1.7). Estos análisis se han centrado principalmente en los QTLs que afectan al metabolismo y la calidad de la carne debido a la relevancia de estos caracteres en la calidad de los productos curados en la raza ibérica. La mayoría de los estudios se han realizado en el SSC4 y SSC6 debido a la relevancia que presentaban los QTLs allí detectados con el engrasamiento y la GIM. Además, se han analizado otros genes candidatos para los QTLs detectados en el SSC2, SSC8, SSC12 y SSCX.

Tabla 1.7. Principales genes candidatos analizados en el cruce IBMAP.

SSC	Carácter asociado al QTL	Gen candidato testado
SSC2	Crecimiento y engrasamiento	<i>IGF2</i> (Estellé <i>et al.</i> 2005).
SSC4	Crecimiento, engrasamiento y forma	<i>DECR</i> (Cloup <i>et al.</i> 2002), <i>DGAT1</i> (Mercadé <i>et al.</i> 2005b), <i>FABP4</i> (Mercadé <i>et al.</i> 2006b), <i>FABP5</i> (Estellé <i>et al.</i> 2006).
SSC6	Engrasamiento y GIM	<i>LEPR</i> (Óvilo <i>et al.</i> 2005), <i>FABP3</i> (Óvilo <i>et al.</i> 2002b), <i>ACADM</i> (Kim <i>et al.</i> 2006).
SSC8	Composición de los AG	<i>CDS1</i> (Mercadé <i>et al.</i> 2007), <i>FABP2</i> (Estellé <i>et al.</i> 2009b), <i>MTTP</i> (Estellé <i>et al.</i> 2009a), <i>ELOVL6</i> (Corominas <i>et al.</i> 2013).
SSC12	Composición de los AG	<i>FASN</i> , <i>GIP</i> y <i>ACACA</i> (Muñoz <i>et al.</i> 2007).
SSCX	Composición de los AG, crecimiento, engrasamiento y GIM	<i>ACSL4</i> (Mercadé <i>et al.</i> 2006a; Corominas <i>et al.</i> 2012).

Algunos de los genes candidatos posicionales para determinados QTLs detectados previamente son:

- **Gen 2,4-dienoyil-CoA reductase (DECR)** por su efecto en la oxidación de los AG insaturados. El mapeo RH y el análisis de ligamiento lo posicionaron dentro del intervalo de confianza del QTL del SSC4 pero, a pesar de detectar un polimorfismo que causaba cambio aminoacídico, éste segregaba a frecuencias muy bajas en el pedigrí y no se realizó un estudio de asociación (Clop *et al.* 2002).
- **Leptin receptor (LEPR) y Heart fatty acid binding protein (FABP3)**: Ambos genes estudiados para el QTL del SSC6.

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

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

- **Porcine insulin-like growth factor 2 (IGF2)** situado en el SSC2. Aunque no se había detectado previamente ningún QTL en la región de este gen (Varona *et al.* 2002), la mutación está segregando en una pequeña familia de la F2, detectándose una asociación con grasa, área del lomo y peso de los jamones (Estellé *et al.* 2005).

- Microsomal triglyceride transfer protein (MTTP).** En 2009, Estellé y colaboradores analizaron el gen *MTTP* como gen candidato para el QTL del SSC8. Se identificó un SNP (*c.2573T>C*) que provoca un cambio aminoacídico (Phe840Leu) dentro del dominio de transferencia lipídica (Figura 1.8). Aunque este cambio aminoacídico se considera una mutación conservativa, el análisis *in silico* de la proteína predijo que la mutación era potencialmente perjudicial. Además, en un ensayo de actividad *in vitro* se determinó una diferencia de actividad entre los dos alelos. Estos resultados reforzaban el interés del gen *MTTP* como candidato posicional de este QTL para la composición de AG en GD.

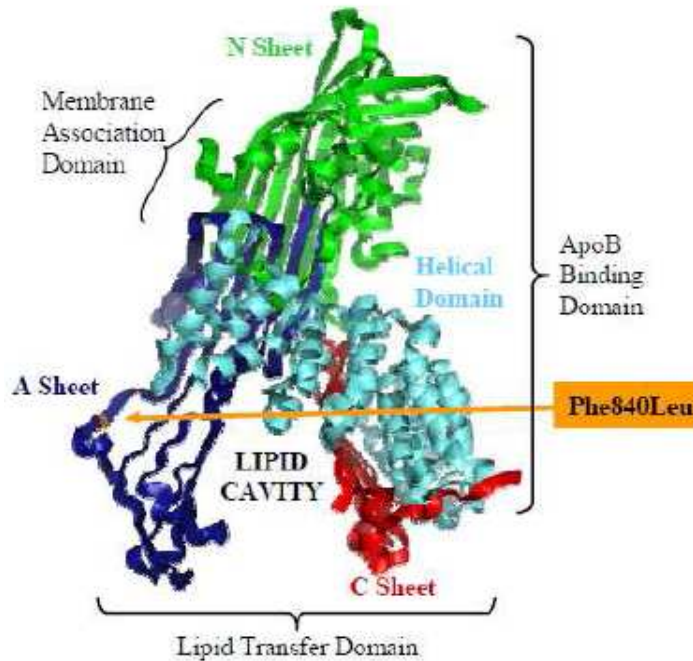


Figura 1.8. Gen *MTTP* con la mutación en el dominio de transferencia lipídica.

- ELOVL fatty acid elongase 6 (ELOVL6)** está involucrado en la lipogénesis *de novo*, actuando sobre la elongación de los AGS y AGMI. El gen *ELOVL6* ha sido analizado como un potente candidato posicional y funcional del QTL del SSC8. Un polimorfismo en la región promotora de este gen (*ELOVL6:c.-533C>T*) ha sido recientemente asociado con el porcentaje de ácido palmítico (C16:0) y palmitoleico (C16:1(n-7)) en músculo y tejido adiposo (Corominas *et al.* 2013). El genotipo del polimorfismo *ELOVL6:c.-533C>T* está asociado con la expresión del gen *ELOVL6* en tejido adiposo. En concordancia con la función del gen, una menor expresión correlaciona con un mayor porcentaje de ácido palmítico (C16:0) y palmitoleico (C16:1(n-7)) en músculo y tejido adiposo (Corominas *et al.* 2013).

1.8.2. Evaluación de nuevos genes candidatos porcinos relacionados con el QTL del SSC8

El presente trabajo se centró en la búsqueda de genes candidatos posicionales para los QTLs detectados en SSC8 (Clöp *et al.* 2003; Ramayo-Caldas *et al.* 2012).

- **Gen *SET Domain Containing (Lysine Methyltransferase) 7 (SETD7)***. El dominio *SET* contiene una lisina metiltransferasa. El gen *SETD7* codifica para una histona metiltransferasa que metila específicamente la Lys-4 de la histona H3. Esta metilación representa una etiqueta epigenética específica para la activación transcripcional. Parece que este gen juega un papel fundamental en la respuesta inflamatoria mediada por la glucosa y por lo tanto es un gen candidato para complicaciones vasculares diabéticas (Estève *et al.* 2011). Además, desempeña un papel central en la activación transcripcional de genes tales como la colagenasa y la insulina. *SETD7* es también un regulador de ADN (citosina-5-)-metiltransferasa1 (*DNMT1*), que es responsable del mantenimiento de los patrones de metilación del ADN en las divisiones celulares (Estève *et al.* 2009). El gen *SETD7* porcino (ENSSSCG00000030396) consta de 38.136 pb y 7 exones. Este gen se transcribe a un ARNm de 5.915 pb (ENSSSCT00000023019). Asimismo, el gen codifica una proteína de 353 amino ácidos.
- **Gen *Mastermind-Like 3 (MAML3)***. *Mastermind (Mam)* fue identificado por primera vez en *Drosophila* como un importante regulador de la señalización *Notch* (Helms *et al.* 1999), actuando como coactivador transcripcional. La señalización *Notch* es un mecanismo conservado evolutivamente que regula la comunicación célula-célula necesaria para el destino celular en metazoos (Artavanis-Tsakonas *et al.* 1999; Mumm y Kopan 2000). En vertebrados, la señalización *Notch* se ha demostrado que media la diferenciación celular en múltiples tejidos (Lanford *et al.* 1999; Milner *et al.* 1999). Además, las anomalías en la señalización *Notch* están vinculadas a enfermedades humanas como la neoplasia, derrame cerebral, el síndrome de la colestasis intrahepática y la enfermedad cardíaca congénita (Ellisen *et al.* 1991; Bulman *et al.* 2000). En vertebrados se han identificado cuatro genes *Notch* (*Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, y *Notch4*) (Weinmaster, 1997). Cada uno de ellos desempeña funciones

independientes y superpuestas (Swiatek *et al.* 1994; Weinmaster, 1997). Los productos de los genes *Notch* son moléculas de tipo receptor que se sintetizan primero como grandes proteínas transmembrana de tipo I. El gen porcino consta de 194.432 pb (ENSSSCG00000009060) e incluye 4 exones. Se transcribe a un ARNm de 3.991 pb (ENSSSCT00000009924) que codifica una proteína de 453 amino ácidos.

Ambos genes (*SETD7* y *MAML3*) han sido identificados en un estudio de co-asociación genómica y redes génicas aplicado a la disección genética del contenido intramuscular de AG (Ramayo-Caldas *et al.* 2013).

II ● **Objetivos**

El presente trabajo se engloba dentro del proyecto MINECO AGL2011-29821-C02 desarrollado en colaboración entre el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) y la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Este proyecto ha sido posible gracias a los resultados obtenidos previamente por el proyecto ILMAP en el cual, mediante barrido genómico, se detectaron QTLs de interés económico en un cruce F2 entre Ibérico (línea Guadyerbas) y Landrace. El presente trabajo trata de profundizar en la caracterización genética de los QTLs del cromosoma 8 relacionados con la composición de ácidos grasos.

Los objetivos específicos del presente trabajo fueron:

- 1.) Estudiar los QTLs del SSC8 para la composición de ácidos grasos en grasa dorsal en la generación F2 del cruce ILMAP con un panel de 144 SNPs informativos distribuidos a lo largo del SSC8.
- 2.) Analizar los genes candidatos posicionales *ELOVL6*, *SETD7* y *MAML3* de los QTLs del SSC8: identificación de polimorfismos, análisis de expresión génica y realización de estudios de asociación con caracteres relacionados con el metabolismo lipídico.

III. ● Artículo

**ASSOCIATION STUDY FOR BACKFAT FATTY ACID COMPOSITION IN AN
IBERIAN X LANDRACE CROSS WITH A 144 SNP CHIP OF SSC8**

Revilla M.¹, Ramayo-Caldas Y.^{1,2}, Castelló A.¹, Corominas J.^{1,2}, Puig-Oliveras A.^{1,2},
Ibáñez-Escriche N.³, Muñoz M.⁴, Ballester M.^{1,2} and Folch J.M.^{1,2}

¹Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB,
Campus UAB, Bellaterra, 08193. ²Departament de Ciència Animal i dels Aliments,
Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra.

³Genètica i Millora Animal, IRTA, Av Rovira Roure 191, 25198 Lleida. ⁴Departamento
Mejora Genética Animal, SGIT-INIA, Ctra. Coruña Km 7.5, 28040 Madrid.

Corresponding author: Manuel Revilla Sánchez

E-mail: manuel.revilla@cragenomica.es

ABSTRACT

Content and fatty acid (FA) composition in swine is a parameter of increasing interest because of their effect on carcass performance and meat quality. A QTL for FA composition in backfat (BF) was identified in porcine chromosome 8 in an Iberian by Landrace swine cross. More recently, a genome association analysis (GWAS) with the 60 K SNP chip detected the same genomic region affecting muscle FA composition in a backcrossed population. The *ELOVL fatty acid elongase 6 (ELOVL6)* was a strong positional candidate gene involved in *de novo* lipogenesis, acting on the elongation of saturated and monounsaturated FAs. A polymorphism in the promoter region of this gene was associated with the percentage of palmitic (C16:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) FAs in muscle and adipose tissues. This variant was also associated with differences in *ELOVL6* gene expression in adipose tissue which were consistent with gene function and FA composition.

The aim of this work was to study the SSC8 QTL for FA composition in BF in a F2 generation of an Iberian x Landrace cross with a panel of 144 informative SNPs distributed along the chromosome. The combination of a single-marker analysis and a haplotype-based approach allowed the identification of two trait-associated SNP (TAS) regions for FA composition in BF adipose tissue. In the first TAS region, located at 93 Mb, two genes were identified and selected as positional candidate genes: *mastermind-like 3 (MAML3)* and *SET domain containing lysine methyltransferase 7 (SETD7)*. The second TAS position, located 119 Mb, corresponds to the previously described *ELOVL6* chromosomal region. A search for polymorphisms in the *MAML3* gene revealed two new microsatellites that were genotyped in 132 backcross animals and 168 F2 animals, showing no significant associations for any of the characters studied. Otherwise, a search for polymorphisms in the *SETD7* gene revealed nine SNPs. Two SNPs were selected for genotyping 144 backcross animals: *SETD7:c.-1034T>G* located in the promoter region and *SETD7:c.700G>T* placed in exon six and producing a Valine for Leucine change in the protein. In the same way, *SETD7:c.700G>T* was genotyped in 168 F2 animals. The identified polymorphisms were not the most statistically significant for the studied characters.

Furthermore, we performed a *MAML3* gene and a *SETD7* gene expression analysis by real-time PCR in the liver and BF of 56 backcross females. However, no association

was detected between *SETD7* genotypes and expression. The same happened with *MAML3* genotypes. Future research is required to study the effect of the identified polymorphisms in the protein activity.

In the same way, *ELOVL6:c.-533C>T* polymorphism was genotyped in 168 F2 animals, showing a strong association with BF percentages of stearic (C18:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) FAs, and C18:1(n-9)/C18:0, C16:0/C14:0, C16:1(n-7)/C16:0 and C18:0/C16:0 related indices. Hence, confirming the pleiotropic effect in BF and IMF of the SSC8 QTL and reinforcing the relevance of *ELOVL6:c.-533C>T* polymorphism.

Keywords: *pig, adipose tissue, QTL, Trait-associated SNP, MAML3, SETD7, ELOVL6.*

3.1. INTRODUCTION

One of the main sources of human food is swine meat, which represents more than 40% of the meat produced worldwide (Rothschild & Ruvinsky, 2011). Success of pig meat production was strongly related to improvements in growth and carcass yield. Meat quality traits are essential for the processing industry and end consumer acceptance (Park *et al.*, 2002); and, as a result, these qualitative traits have been widely studied in breeding programs. Content and fatty acid (FA) composition in swine is a parameter of increasing interest because of their effect on carcass performance and meat quality. It determines important sensorial and technological aspects of meat due to the variability in the melting point of FA. In addition, the amount and type of fat in the diet have a major impact on human health. High consumption of saturated fatty acids (SFA) raises plasma LDL-cholesterol, which is a major risk factor for atherosclerosis and coronary heart disease (CHD) (Clarke *et al.*, 1997; Mensink & Katan, 1992; Wolfram, 2003). Although, recent studies suggest that individual SFAs have different physiological effects. Indeed, SFAs (lauric acid (12:0), myristic acid (14:0) and palmitic acid (16:0)) raise LDL and HDL cholesterol whereas stearic acid (C18:0) is neutral (Hunter *et al.*, 2010; Astrup *et al.*, 2011), but still some epidemiologic evidence suggests that stearic acid (C18:0) is associated with CHD (Hu *et al.*, 1999). In contrast, cis-monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) are beneficial for human health. PUFA have been shown to protect against CHD (Harris *et al.*, 2007), whereas MUFA are also considered to have a hypocholesterolemic effect (López-Huertas, 2010) and, in addition, to have a beneficial effect on insulin sensitivity (Ros, 2003).

Using an Iberian by Landrace swine F2 intercross (IBMAP) (Clop *et al.*, 2003) a QTL was identified in porcine chromosome 8 (SSC8) for the percentage of palmitic (16:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) FAs and the average length of FAs in backfat (BF). In addition, a suggestive effect on the percentage of oleic acid (C18:1(n-9)) was observed. More recently, a GWAS (Ramayo-Caldas *et al.*, 2012) with genotypes from the 60 K SNPs chip (Illumina) and intramuscular fat (IMF) (*Longissimus dorsi*) FA composition was conducted in a backcross population (BC1_LD; 25% Iberian and 75% Landrace). This study allowed the identification of five genomic regions in SSC8 associated with IMF FA composition. A combined linkage QTL scan and GWAS done in the same backcross revealed significant pleiotropic regions with effects on palmitic acid (C16:0) and palmitoleic acid (C16:1(n-7)) in both IMF and BF tissues (Muñoz *et al.*, 2013,

manuscript submitted). The strongest association signal was detected in a chromosomal region where the *ELOVL fatty acid elongase 6 (ELOVL6)* gene is located. *ELOVL6* gene is involved in *de novo* lipogenesis, acting on the elongation of SFA and MUFA. A polymorphism in the promoter region of this gene (*ELOVL6:c.-533C>T*) was associated with the percentage of palmitic (C16:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) FAs in IMF and BF adipose tissues (Corominas *et al.*, 2013). This SNP was also associated with *ELOVL6* gene expression in BF, being gene expression in accordance with FA composition: a lower expression of *ELOVL6* gene was observed in animals with higher percentages of palmitic (C16:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) FA in both IMF and BF tissues (Corominas *et al.*, 2013).

The main goals of this work were: 1) to study the SSC8 QTL architecture for FA composition in the F2 generation of the IBCMAP cross using a panel of 144 informative SNPs, 2) to analyze additional positional candidate genes.

3.2. MATERIALS AND METHODS

3.2.1. Animal samples

Animals used in this study belong to the IBCMAP cross, a population generated by crossing 3 Iberian (Guadyerbas line) boars with 31 Landrace sows (Pérez-Enciso *et al.*, 2000), and containing several generations and backcrosses. The 144 SNP chip genotyping was done in the F2 animals. The *SETD7* and *MAML3* sequencing and gene expression analyses were carried out in animals from a backcross (BC1_LD) generated by crossing five F1 (Iberian x Landrace) boars with 26 Landrace sows and producing 144 backcrossed animals. All animals were maintained under intensive conditions and feeding was *ad libitum* with a cereal-based commercial diet. The experiments were performed in Europe following national and institutional guidelines for the ethical use and treatment of animals in experiments. In addition it was approved by the Ethical Committee of the Institution (IRTA Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries). Backcross animals were slaughtered at an average age of 179.8 ± 62.3 days, and samples of liver and adipose tissue were collected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyzed. DNA was extracted from blood samples of all animals by the phenol-chloroform method, and used for promoter amplification and polymorphism genotyping.

3.2.2. Analyzed Traits

The composition of 10 FA in IMF (*Longissimus dorsi* muscle) and BF (taken between the third and the fourth ribs) tissues was determined as described before (Clop *et al.*, 2003; Ramayo-Caldas *et al.*, 2012). Subsequently, the percentage of each FA was calculated along with the global percentages of SFA, MUFA, PUFA and related indices.

3.2.3. Genotyping and Quality Control

A total of 470 animals were genotyped for 144 SNPs by *VeraCode* (*Illumina*) chip, a selection of 142 informative SNPs derived from the *Porcine SNP60K BeadChip* (Ramos *et al.*, 2009) and two additional SNPs corresponding to the previously detected polymorphisms in the *MTTP* (Estellé *et al.*, 2009a) and *FABP2* (Estellé *et al.*, 2009b) genes, using the *GoldenGate* methodology. Position of the SNPs was based on the whole genome sequence assembly 10.2 build of *Sus scrofa* (<http://www.animalgenome.org/repository/pig/>). *PLINK* (Purcell *et al.*, 2007) software was used to remove markers that showed minor allele frequency (MAF) < 5% and missing genotypes > 5%. In total, 133 SNPs (92%) passed this quality threshold filtering and were employed in subsequent analysis. Genotyped animals were classified into 6 families, two of which were removed for having a limited number of animals, leaving a total of 426 animals for the association analysis.

The SNPs *SETD7:c.-1034T>G*, *SETD7:c.700G>T* and *ELOVL6:c.-533C>T* were genotyped using the KASP SNP genotyping system platform (<http://www.lgcgenomics.com/genotyping/>). The SNPs *SETD7:c.-1034T>G* and *SETD7:c.700G>T* were genotyped for a total of 181 animals, 144 of those belonging to BC1_LD and the rest being parental animals of the IBCMAP cross (F0 and F1). In addition, *SETD7:c.700G>T* and *ELOVL6:c.-533C>T* SNPs were genotyped for 215 animals, 168 belonging to F2, 28 F1 and 19 for parental generation. Besides this, two new microsatellites of the *MAML3* gene were genotyped by PCR amplification and capillary electrophoresis and fluorescent detection using an ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). A total of 352 animals, 20 of them belonging to the parental generation, 32 to F1, 168 to F2 and 132 to BC1_LD were genotyped for the two microsatellites.

3.2.4. Association analysis

The association was performed for FA composition and indices of FA metabolism in 426 F2 animals. In the same way, association studies were performed by paternal half-sib families. A mixed model accounting for additive effects was performed using Qxpack 5.0 (Pérez-Enciso & Misztal, 2011):

$$y_{ijklm} = \text{Sex}_i + \text{Batch}_j + \beta c_l + \lambda_l a_k + u_l + e_{ijklm},$$

in which y_{ijklm} is the l -th individual record, sex (two levels) and batch (five levels) are fixed effects, β is a covariate coefficient with c being carcass weight, λ_l is a -1, 0, +1 indicator variable depending on the l -th individual genotype for the k -th SNP, a_k represents the additive effect associated with SNP, u_l represents the infinitesimal genetic effect treated as random and distributed as $N(0, \mathbf{A}\sigma_u)$ where \mathbf{A} is a numerator of the kinship matrix and e_{ijklm} is the residual. To calculate the false-discovery rate (FDR) the R package q-value (Storey & Tibshirani, 2003) was used, and the cut-off of the significant association was set at $q\text{-value} \leq 0.05$. The Bonferroni correction was used to account for the false positive error rate associated with multiple statistical tests. Version 2.15.2 of R (Ihaka & Gentleman, 1996; <http://cran.r-project.org>) was used to calculate the descriptive statistics for the 10 analyzed traits and its related indices. Haplotypes were reconstructed using DualPHASE software (Druet & Georges 2010), which exploits population (linkage disequilibrium) and family information (Mendelian segregation and linkage) in a Hidden Markov Model setting. Then, QTL fine-mapping was performed for the most significant characters: C16:1(n-7); C18:0/C16:0; C16:1(n-7)/C18:1(n-7) and ACL by simultaneously exploiting linkage and linkage disequilibrium (LDLA) following the mixed model:

$$y = \mathbf{Xb} + \mathbf{Z}_h \mathbf{h} + \mathbf{Z}_u \mathbf{u} + \mathbf{e},$$

in which \mathbf{b} is a vector of fixed effects (sex and batch), \mathbf{h} is the vector of random QTL effects corresponding to the K cluster defined by the Hidden State, \mathbf{u} is the vector of random individual polygenic effects and \mathbf{e} is the vector of individual error.

3.2.5. Amplification and sequencing of the pig *MAML3* and *SETD7* genes

The proximal promoter and the exon 1 of the *MAML3* gene was amplified and sequenced in samples from the BC1_LD (n=10) and Iberian boars (n=2). A total of 931 bp were sequenced in two overlapping fragments of 517 bp and 663 bp. Primers (Table S1) were designed from the *Sus scrofa* breed mixed chromosome 8 sequence (ENSSSCG00000009060) available at the *Sscrofa10.2* database assuming conservation with the human *MAML3* gene (ENSG00000196782).

A total of 839 bp of the *SETD7* promoter and exon 1 were amplified and sequenced in two overlapping fragments of 473 bp and 478 bp. Thirty samples from animals belonging to different generations of the IBMAP cross were analysed. Primers (Table S1) were designed from *Sus scrofa* breed mixed chromosome 8 sequence (ENSSSCG00000030396) available at the *Sscrofa10.2* database assuming gene structure conservation with the human *SETD7* gene (ENSG00000145391).

All primers were designed using the PRIMER3 software (Rozen & Skaletsky 2000) and were validated using the PrimerExpress 2.0 software (Applied Biosystems).

PCRs were carried out in a total volume of 25 µl containing 0.6 units of AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 1.5–2.5 mM MgCl₂ (depending on the primers; Table S1), 0.2 mM of each dNTP, 0.5 µM of each primer and 20 ng of genomic DNA. The thermal profile was 94 °C for 10 min and 35 cycles at 94 °C for 1 min, 58–62 °C (depending on the primers; Table S1) for 1 min and 72 °C for 1:30 min, including a final step of 7 min at 72 °C. Gradient parameters were determined based on size and G–C content of the amplicon. The samples were then tested in 1.5% agarose gel. Purification was performed using the ExoSAP-IT® method. For the sequencing reaction we used the Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit and we employed an ABI Prism 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems). Polymorphisms were checked through Seqscape v2.1.1 program (Applied Biosystems).

3.2.6. Detection of microsatellite polymorphisms

Based on the sequencing results of the promoter region and exon 1 of the *MAML3* gene, two potential new microsatellites were identified. The first microsatellite marker included a tandem repeat of (CA)_n and was found in the promoter region. The second

microsatellite consisted of a tandem repeat of (CGG)_n and was located in exon 1. Both microsatellites were independently amplified using fluorescent primers (Table S1). PCR was performed in a 25 µl reaction mix containing the following: 20 ng of genomic DNA, 0.2 mM of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 µM of each PCR primer and 0.6 units of AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). PCR was run as follows: 94 °C for 10 min, 35 cycles of 94 °C for 1 min, 58 °C for 1 min, 72 °C for 1:30 min and a final extension step at 72 °C for 7 min. The two amplicons were mixed at a ratio of 1: 3 (HEX: FAM) and analysed using capillary electrophoresis on an ABI Prism 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems) and the ROX-500 GeneScan Size Standard. The peak height of each product was determined using Peak Scanner 2 software (Applied Biosystems).

3.2.7. RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from liver and BF tissues using the RiboPure kit (Ambion), following the manufacturer's recommendations. RNA was then quantified using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop products) and the RNA integrity was assessed by Agilent Bioanalyzer-2100 (Agilent Technologies). One microgram of total RNA of individual samples was reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) in 20µl of reactions.

3.2.8. Gene expression quantification

A total of 56 females of the BC1_LD were used to perform gene expression quantification. *MAML3* and *SETD7* gene expression was analyzed using the 48.48 microfluidic dynamic array IFC chip (Fluidigm) as previously described (Ramayo-Caldas *et al.*, 2013, manuscript submitted). Briefly, two µl of 1:5 diluted cDNA was pre-amplified using 2X Taqman PreAmp Master Mix (Applied Biosystems) and 50nM of each primer pair in 5µl reaction volume, according to the manufacturer's directions. The cycling program was 10 min at 95°C followed by 16 cycles of 15s at 95°C and 4 min at 60°C. At the end of this pre-amplification step the reactions were diluted 1:5. RT-qPCR on the dynamic array chips was conducted on the BioMark™ system (Fluidigm). Five µl sample pre-mix containing 2.5µl of SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX (Bio-Rad), 0.25µl of DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm) and 2.25µl of diluted pre-amplification samples (1:16 from liver and 1:64 for BF samples), as well as 5µl assay mix containing 2.5µl of Assay Loading Reagent (Fluidigm), 2.25µl of DNA Suspension Buffer (Teknova) and 0.25µl of 100µM primer

pairs (500nM in the final reaction) were mixed inside the chip using the IFC controller MX (Fluidigm). The thermal cycle was 60s at 95°C followed by 30 cycles of 5s at 96°C and 20s at 60°C. A dissociation curve was also drawn for each primer pair.

Data was collected using the Fluidigm Real-Time PCR analysis software 3.0.2 (Fluidigm) and analyzed using the DAG expression software 1.0.4.11 (Ballester *et al.*, 2013, manuscript submitted) using standard curves for relative quantification. Standard curves with a four-fold dilutions series (1/4, 1/16, 1/64, 1/256, 1/1024) of a pool of 10 cDNA samples were constructed for each gene to extrapolate the quantity values of the studied samples. Of the four endogenous genes tested (*ACTB*, *B2M*, *HPRT1*, *TBP*), *ACTB* and *TBP* were the genes with the most stable expression (Vandesompele *et al.*, 2002) in both tissues. The normalized quantity values of each sample and assay were used to compare our data.

PCR primer sequences have been previously described (Ramayo-Caldas *et al.*, 2013, manuscript submitted).

3.3. RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1. Association studies, linkage disequilibrium and linkage analyses (LDLA) and family based studies

A total of 470 animals were genotyped for a selection of 144 informative SNPs using a *VeraCode* (*Illumina*) chip. After quality control a subset of 133 SNPs were retained with high genotyping quality (call rate > 0.99) to be used for the association studies.

An association analysis for the BF FA composition in the C14:0 to C22:0 range was performed. Statistical significant associations were found (Table 1) for the SFA myristic (C14:0), palmitic (C16:0) and stearic (C18:0). Among MUFA, palmitoleic acid (C16:1(n-7)) and oleic acid (C18:1(n-9)) were associated, whereas for PUFA only eicosadienoic acid (C20:2(n-6)) was significant. Similarly, metabolic ratio of average chain length (ACL) showed a significant association. A strong association signal was found for the C16:1(n-7)/C16:0 desaturation ratio and two elongation ratios: C18:0/C16:0 and C18:1(n-7)/C16:1(n-7). These results are in accordance with a previous QTL scan (Clöp *et al.*, 2003) done in F2 animals with microsatellites. In this study, the SSC8 QTL showed a clear effect on the percentages of palmitic (C16:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) FA as well as on ACL.

In our study, two regions containing trait-associated SNP (TAS) were clearly visualized in the association plots at around 93 and 119 Mb for all the above mentioned FA and indices with the exception of the C20:2(n-6)/C18:2(n-6) elongation ratio that showed only one significant TAS region (120.99 Mb) (Table 1). The 119 Mb TAS region showed, for all the significant characters, a strongest signal than the 93 Mb region. The strongest effects of both TAS regions were found for palmitoleic acid (C16:1(n-7)) content and the C18:0/C16:0 and C18:1(n-7)/C16:1(n-7) elongation ratios.

The observed effects on FA composition and indices are concordant with a lower expression of the *ELOVL6* gene in animals with the Iberian allele (Corominas *et al.*, 2013) for both TAS regions (Figure 1). *ELOVL6* elongates palmitic (C16:0) to stearic (C18:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) to vaccenic (C18:1(n-7)) FA, thus a lower *ELOVL6* activity of the Iberian allele will decrease directly these elongation ratios. Moreover, as observed, lower *ELOVL6* activity will be associated with an accumulation of palmitic (C16:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) FA, while reducing the stearic FA (C18:0) content.

For oleic FA (C18:1(n-9)), the main dietary FA, a reduction of its content in BF was observed for animals with the Iberian allele for the TAS regions in SSC8. It must be noted that the opposite effect was observed in the major SSC4 and SSC6 TAS regions for oleic IMF content (Ramayo-Caldas *et al.*, 2012).

A combination of linkage disequilibrium and linkage analysis (LDLA) was performed using 470 animals and a subset of 133 SNPs for the most significantly associated characters (Table 2). The LDLA study pointed to the two TAS regions identified by association analysis. The 119 Mb region showed the strongest statistical signal for the analysed traits. For instance, for the C18:0/C16:0 elongation ratio, the LDLA approach identified two genomic regions at 93.21-93.87 Mb and 117.67-119.89 Mb (Figure 2). Plots of the other three characters analysed are shown in Supplementary Figure 1.

To know if one or two QTLs are segregating on SSC8 for the BF FA and indices, models fitting one QTL against a model considering two different QTLs were tested. Results of the LR test indicated that models with two QTLs were more likely for the 10 analysed traits (Table 3).

In order to deepen the study of the two reported genomic regions, association studies were performed by paternal half-sib families. A total of 470 animals were classified into 6 families, two of which were removed because they had a low number of animals, leaving a total of 426 animals for the analysis. For all studied FA, the most significant associations were found in family 1, which had the highest number of animals (n=173) (Figure 3). In this family, as expected, the 119 Mb TAS region showed a higher statistical significance level than the 93 Mb region for the palmitoleic acid content (C16:1(n-7)) of BF. Conversely, in family 2, the 93 Mb was more strongly associated to BF palmitoleic content (C16:1(n-7)) than the 119 Mb region.

All these results point towards the presence of two QTLs for FA composition traits segregating on SSC8. A GWAS for IMF (*Longissimus dorsi*) FA composition (Ramayo-Caldas *et al.*, 2012) in BC1_LD (25% Iberian 75% Landrace backcrossed population) identified five chromosomal intervals on SSC8. The strongest signals for palmitoleic acid (C16:1(n-7)) and C18:1(n-7)/C16:1(n-7) ratio were centered at SNPs ALGA0048684 and SIRI0000509 which are located in *Sscrofa10.2* assembly at 99.2 Mb and 119.7 Mb, respectively. Furthermore, a combined linkage QTL scan and GWAS done in the same backcross (Muñoz *et al.*, 2013, manuscript submitted) revealed two significant pleiotropic regions (at 93.3-99.5 Mb and 110.9-126.9 Mb) with effects on palmitoleic FA (C16:1(n-7)) in both IMF and BF tissues. For palmitic FA (C16:0), a large (83.8-130.6 Mb) chromosomal interval was significant in both BF and IMF. Taken together, two QTLs on SSC8 were shown to be segregating in different crosses of the IBMAP population. Both QTLs had a pleiotropic effect on both BF and IMF FA depots and affected palmitoleic FA (C16:1(n-7)) content and related elongation ratios.

Gene annotation of the two TAS genomic regions identified genes related to FA metabolism. In the first region, *MAML3* (at position 92.67 Mb) and *SETD7* (at position 93.13 Mb) genes were found. *MAML3* acts as a transcriptional coactivator for NOTCH proteins. It has been shown to amplify NOTCH-induced transcription of HES1 (Oyama *et al.*, 2011). The product of *SETD7* gene is a histone methyltransferase that specifically monomethylates Lys-4 of histone H3 (Syreeni *et al.*, 2011) and, thus, it is implicated in the epigenetic transcriptional regulation of genes. *SETD7* gene plays a central role in the transcriptional activation of genes such as *collagenase* or *insulin* (Chakrabarti *et al.*, 2003). In addition, both *SETD7* and *MAML3* have been reported in a predicted co-association gene network for intramuscular FA composition in pigs.

In the second region, the *ELOVL6* gene was located (at position 120.12 Mb), as previously described for IMF FA composition (Corominas *et al.*, 2013). *ELOVL6* is a strong positional and functional candidate gene, involved in *de novo* lipogenesis and acting on the elongation of saturated and monounsaturated FA. A polymorphism in the promoter region of this gene (*ELOVL6:c.-533C>T*) was associated with the percentage of palmitic (C16:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) FA in muscle and adipose tissue (Corominas *et al.*, 2013). The genotype of polymorphism *ELOVL6:c.-533C>T* was associated with differences in *ELOVL6* gene expression in adipose tissue. As expected by the elongation function of the gene, a lower *ELOVL6* expression was associated with a higher percentage of palmitic (C16:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) FAs in muscle and adipose tissue (Corominas *et al.*, 2013).

3.3.2. Identification of polymorphisms in the porcine *MAML3* and *SETD7* genes

A 931 bp fragment of the pig *MAML3* gene, covering part of the promoter region and part of exon 1, was amplified and sequenced in 12 animals. Two novel microsatellites were found; a (CA)_n tandem repeat was located in the promoter region and a (CGG)_n tandem repeat was identified in exon 1. The variability of both microsatellites is represented in Table 4. These microsatellites were genotyped by PCR and capillary electrophoresis and fluorescent detection in a total of 352 animals: 20 founders, 32 F1, 168 F2 (family 1), and 132 BC1_LD.

To find polymorphisms in the porcine *SETD7* gene, a 839 bp fragment of the *SETD7* promoter and exon 1 was amplified and sequenced from genomic DNA of 30 animals. In addition, the identification of polymorphisms in the entire coding region of the *SETD7* gene was performed using *RNA-Seq* data with the Integrative Genomics Viewer (IGV) software (<http://www.broadinstitute.org/igv/>). The alignment and analysis of these sequences allowed the identification of nine polymorphisms (Table 5). Two of them were selected to be genotyped, one in the promoter region (*SETD7:c.-1034T>G*) and one non-synonymous polymorphism in exon six (*SETD7:c.700G>T*), which produces an amino acid change of valine to leucine. Regarding the IBCMAP founders, the *SETD7:c.-1034T* and *SETD7:c.700T* alleles were fixed in Iberian boars. Both polymorphisms segregated in the BC1_LD animals.

The SNPs *SETD7:c.-1034T>G* and *SETD7:c.700G>T* were genotyped using the KASP SNP genotyping system platform for a total of 181 animals, 144 of those belonging to

BC1_LD and the rest being parental animals of the IBCMAP cross (F0 and F1). In addition, *SETD7:c.700G>T* were genotyped in the family 1 of the F2 generation, including 168 F2 animals, 28 F1 and 19 founders.

3.3.3. Association study for BF FA composition in family 1 of the F2 generation

An association analysis with the SSC8 genotypes from 133 SNPs of the Porcine SNP *VeraCode (Illumina)*, two selected SNPs (*SETD7:c.700G>T* and *ELOVL6:c.-533C>T*) and two new microsatellites of *MAML3* gene (*MAML3_MS1* and *MAML3_MS2*) in 168 animals of the F2 generation belonging to family 1 was performed.

For the first region (93 Mb) the *SETD7* and *MAML3* genes were studied. For the *SETD7* gene, the polymorphism *SETD7:c.700G>T* analyzed was not the most significantly associated in this region (Table 6). In addition, *MAML3* gene microsatellites showed no significant associations for any of the characters studied.

For the second region (119 Mb) the *ELOVL6* gene was studied, a polymorphism in the promoter region of this gene (*ELOVL6:c.-533C>T*) was previously associated with the percentage of palmitic (C16:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) FAs in IMF and BF adipose tissues of BC1_LD animals (Corominas *et al.*, 2013). Here, we have found that the *ELOVL6:c.-533C>T* polymorphism showed the highest association with the percentage of palmitic (C16:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) FAs, ACL, and the C18:0/C16:0 and C18:1(n-7)/C16:1(n-7) ratios (Table 6). Hence, these results are consistent with those found in the IMF FA composition of the BC1_LD generation (Corominas *et al.*, 2013). The clear association of the *ELOVL6:c.-533C>T* polymorphism with the percentage of FA in IMF and BF indicates a pleiotropic effect of this gene.

A study of the additive value of the *SETD7:c.700G>T* and *ELOVL6:c.-533C>T* SNPs showed a higher contribution of *ELOVL6:c.-533C>T* SNP on all the studied FA and indices. Furthermore, the additive value of the Iberian alleles was always going in the same direction for the two SNPs (Table 7).

3.3.4. Effect of the *SETD7:c. 1034T>G* and *SETD7:c.700G>T* SNPs and *MAML3* microsatellites on gene expression

The expression profile of the pig *MAML3* gene and *SETD7* gene were studied in liver and BF tissues of 56 BC1_LD females by real-time qPCR. When animals were classified according to the *SETD7* genotypes, either *SETD7:c.-1034T>G* or *SETD7:c.700G>T*, no significant differences were found in liver and adipose tissues. The same result was observed when animals were classified according to the *MAML3_MS1* and *MS2* microsatellites. When the correlation of *MAML3* or *SETD7* expression levels between both tissues were analyzed, not clear associations were observed between tissues, suggesting different mechanisms controlling *MAML3* and *SETD7* genes expression in BF and liver tissues.

3.4. CONCLUSIONS

Association and LDLA studies were performed between BF FA composition and the genotypes of 133 SNPs of SSC8 in 470 F2 animals. Two TAS regions were identified around 93 and 119 Mb of SSC8, being the strongest observed effects of both regions for palmitoleic acid (C16:1(n-7)) content and the C18:0/C16:0 and C18:1(n-7)/C16:1(n-7) elongation ratios. The 119 Mb TAS region showed, for all the significant characters, a strongest signal than the 93 Mb region. The *MAML3* and *SETD7* genes were analysed as positional candidate genes of the 93 Mb TAS region. Two novel microsatellites were found in the promoter region and exon 1 of the *MAML3* gene. Nine SNPs were identified in the *SETD7* gene: 4 in the promoter region and 5 in coding exons, including a non-synonymous substitution. The association analysis with these new polymorphisms showed no significant associations for the genotypes of *MAML3* gene microsatellites. Although statistically significant, the *SETD7:c.700G>T* SNP was not the strongest signal in the 93 Mb region. These results suggest that the studied polymorphisms in the *MAML3* and *SETD7* are not the causal variants of the 93 Mb QTL. The expression of *MAML3* and *SETD7* genes was studied in the liver and adipose tissues of 56 animals, showing no association with the genotypes of the *SETD7:c.700G>T* SNP and *MAML3* microsatellites. Conversely, the *ELOVL6:c.-533C>T* was genotyped in a half-sib family of the F2 generation and showed the highest association with the percentage of palmitic (C16:0) and palmitoleic (C16:1(n-7)) FAs, ACL, and the C18:0/C16:0 and C18:1(n-7)/C16:1(n-7) elongation ratios.

Hence, the *ELOVL6:c.-533C>T* is pleiotropic, affecting the BF and IMF FA composition. These results reinforce the role of the *ELOVL6* gene polymorphism in the determination of the SSC8 QTL.

3.5. ACKNOWLEDGMENTS

This work has been funded by the MICINN AGL2008-04818-C03/GAN and MINECO AGL2011-29821-C02 and the Innovation Programme Consolider-Ingenio 2010 (CSD2007-00036). M. Revilla is a Masters student of Animal Breeding and Biotechnology of Reproduction (Polytechnic University of Valencia and Autonomous University of Barcelona). Y. Ramayo-Caldas has been funded by a FPU grant (AP2008-01450), J. Corominas with FPI scholarship from the Ministry of Education (BES-2009-018223) and A. Puig-Oliveras on scholarship PIF (458-01-1/2011).

3.6. REFERENCES

- Astrup A., Dyerber J., Elwood P., Hermansen K., Hu F.B., Jakobsen M.U. *et al.* (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, 684–688.
- Ballester M., Cerdón R. & Folch J.M. (2013) DAG Expression: high-throughput gene expression analysis of Real Time PCR data using standard curves for relative quantification. Submitted.
- Chakrabarti S.K., Francis J., Ziesmann S.M., Garney J.C. & Mirmira R.G. (2003) Covalent histone modifications underlie the developmental regulation of insulin gene transcription in pancreatic beta cells. *Journal of Biological Chemistry* 278(26), 23617-23.
- Clarke R., Frost C., Collins R., Appleby P. & Peto R. (1997) Dietary lipids and blood cholesterol: Quantitative meta-analysis of metabolic ward studies. *BMJ* 314, 112.
- Clop A., Óvilo C., Pérez-Enciso M., Cercos A. & Tomas A. (2003) Detection of QTL affecting fatty acid composition in the pig. *Mammalian Genome* 14, 650-656.

- Corominas J., Ramayo-Caldas Y., Puig-Oliveras A., Pérez-Montarelo D., Noguera J.L. *et al.* (2013) Polymorphism in the *ELOVL6* Gene Is Associated with a Major QTL Effect on Fatty Acid Composition in Pigs. *PLoS ONE* 8(1), e53687.
- Druet T. & Georges M. (2010) A hidden markov model combining linkage and linkage disequilibrium information for haplotype reconstruction and quantitative trait locus fine mapping. *Genetics* 184(3), 789-98.
- Estellé J., Fernández A.I., Pérez-Enciso M., Fernández A., Rodríguez C. *et al.* (2009a) 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.
- Estellé J., Mercadé A., Pérez-Enciso M., Pena R.N., Silió L. *et al.* (2009b) Evaluation of *FABP2* as candidate gene for a fatty acid composition QTL in porcine chromosome 8. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 126(1), 52–58.
- Harris W.S., Poston W.C. & Haddock C.K. (2007) Tissue n–3 and n–6 fatty acids and risk for coronary heart disease events. *Atherosclerosis* 193, 1–10.
- Hu F.B., Stampfer M.J., Manson J.E., Ascherio A., Colditz G.A., Speizer F.E. *et al.* (1999) Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 70, 1001–1008.
- Hunter J.E., Zhang J. & Kris-Etherton P.M. (2010) Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition* 91, 46–63.
- Ihaka R. & Gentleman R. (1996) R: A language for data analysis and graphics. *J. Comput. Graph. Stat.* 5, 299–314.
- López-Huertas E. (2010) Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacological Research* 61, 200–207.

- Mensink R.P. & Katan M.B. (1992) Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 12, 911–919.
- Muñoz M., Rodríguez M.C., Alves E., Folch J.M., Ibáñez-Escriche N., Silió L. & Fernández A.I. (2013) Genome-wide analysis of porcine backfat and intramuscular fat fatty acid composition using high-density genotyping and expression data. Submitted.
- Oyama T., Harigaya K., Sasaki N., Okamura Y., Kokubo H., Saga Y., Hozumi K., Suganami A., Tamura Y., Nagase T., Koga H., Nishimura M., Sakamoto R., Sato M., Yoshida N. & Kitagawa M. (2011) Mastermind-like 1 (MamL1) and mastermind-like 3 (MamL3) are essential for Notch signaling in vivo. *Development* 138(23), 5235-46.
- Park G.B., Moon S.S., Ko Y.D., Ha J.K. *et al.* (2002) Influence of slaughter weight and sex on yield and quality grades of Hanwoo (Korean native cattle) carcasses. *Journal of Animal Science* 80, 129-136.
- Pérez-Enciso M. & Misztal I. (2011) Qxpk.5: Old mixed model solutions for new genomics problems. *BMC Bioinformatics* 12(1), 202.
- Pérez-Enciso M., Clop A., Noguera J.L., Óvilo C., Coll A. *et al.* (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.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M. A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I., Daly M.J. & Sham P.C. (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet* *The American Journal of Human Genetics* 81, 559–575.
- Ramayo-Caldas Y., Ballester M., Fortes M.R.S., Esteve-Codina A., Castelló A., Noguera J.L., Fernández A.I., Pérez-Enciso M., Reverter A. & Folch J.M. (2013) From SNP co-association to gene co-expression: Evidence of pleiotropic expression-QTL in lipid metabolism in pigs. Submitted.

- Ramayo-Caldas Y., Mercadé A., Castelló A., Yang B., Rodríguez C. *et al.* (2012) Genome-Wide Association Study for Intramuscular Fatty Acid Composition in an Iberian x Landrace Cross. *Journal of Animal Science* 90(9), 2883-93.
- Ramos A.M., Crooijmans R.P.M.A., Affara N.A., Amaral A.J., Archibald A.L. *et al.* (2009) Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by Next Generation Sequencing Technology. *PLoSOne* 4(8), e6524.
- Ros E. (2003) Dietary cis-monounsaturated fatty acids and metabolic control in type 2 diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition* 78, 617S–625S.
- Rothschild M.F. & Ruvinsky A. (2011) *The Genetics of the Pig*, 2nd ed. CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Rozen S. & Skaletsky H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132, 365-86.
- Storey J.D. & Tibshirani R. (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(16), 9440–9445.
- Syreeni A., El-Osta A., Forsblom C., Sandholm N., Parkkonen M., Tarnow L., Parving H.H., McKnight A.J., Maxwell A.P., Cooper M.E., Groop P.H.; Finn Diane Study Group (2011) Genetic examination of *SETD7* and *SUV39H1/H2* methyltransferases and the risk of diabetes complications in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 60(11), 3073-80.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. & Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 18, 3(7), RESEARCH0034.
- Wolfram G. (2003) Dietary fatty acids and coronary heart disease. *European Journal of Medical Research* 8, 321–324.

Table 1. Significant SNPs affecting BF FA composition (FDR=0.05) in an association study in the F2 generation.

Trait	Chromosomal región (Mb)	SNP	LR	P-value	a (SE)
C14:0	93.79	ALGA0048597	17.2127	3.34E-05	0.042 (0.019)
	117.55	ALGA0049135	18.7843	1.46E-05	0.055 (0.016)
C16:0	93.72	ALGA0048594	32.4610	1.22E-08	0.573 (0.881)
	117.66	ALGA0049139	48.1404	3.97E-12	0.599 (0.871)
C18:0	91.56	H3GA0025111	11.7215	6.18E-04	-0.254 (0.630)
	119.85 ¹	INRA0030422	20.6040	5.65E-06	-0.366 (0.616)
C16:1(n-7)	91.56	H3GA0025111	42.9598	5.59E-11	0.163 (0.082)
	119.85 ¹	INRA0030422	71.7870	1.11E-18	0.223 (0.082)
C18:1(n-9)	93.66	ALGA0048589	22.4009	2.21E-06	-0.651 (1.589)
	117.66	ALGA0049139	33.1059	8.73E-09	-0.672 (1.571)
C20:2(n-6)	94.73	MARC0097057	23.1170	1.52E-06	-0.032 (0.017)
	117.55	ALGA0049135	23.9259	1.00E-06	-0.039 (0.017)
ACL	93.72	ALGA0048594	46.5350	9.00E-12	-0.020 (0.001)
	117.66	ALGA0049139	71.4236	1.11E-16	-0.021 (0.001)
C16:1(n-7)/C16:0	91.56	H3GA0025111	22.7521	1.84E-06	0.006 (0.000)
	119.85 ¹	INRA0030422	37.4524	9.37E-10	0.008 (0.000)
C18:0/C16:0	91.56	H3GA0025111	47.8703	4.55E-12	-0.023 (0.002)
	119.85 ¹	INRA0030422	76.1635	1.11E-16	-0.032 (0.002)
C18:1(n-7)/C16:1(n-7)	93.72	ALGA0048594	32.8062	1.02E-08	-0.076 (0.016)
	119.85 ¹	INRA0030422	61.0692	5.55E-15	-0.089 (0.015)
C20:2(n-6)/C18:2(n-6)	120.99	ALGA0049254	13.8456	1.98E-04	-0.003 (0.000)

LR. Likelihood ratio test values; a (SE): additive effect (standard error).

¹ SNPs SIRI0000509 (119.73 Mb) and H3GA0025321 (119.89 Mb) showed the same P-value.

Table 2. Significant SNPs affecting BF FA composition (FDR=0.05) in a LDLA analyses in the F2 generation.

Trait	Chromosomal region (Mb)	SNP	LR	P-value	a (SE)
C16:1(n-7)	93.87	H3GA0025162	35.9228	2.05E-09	0.164 (0.085)
	119.85 ¹	INRA0030422	45.4291	1.58E-11	0.223 (0.082)
ACL	93.72	ALGA0048594	40.5341	1.93E-10	-0.020 (0.001)
	117.66	ALGA0049139	45.2997	1.69E-11	-0.021 (0.001)
C18:0/C16:0	93.87	H3GA0025162	39.8781	2.70E-10	-0.022 (0.002)
	119.73	SIRI0000509	55.9362	7.48E-14	-0.032 (0.002)
C18:1(n-7)/C16:1(n-7)	93.87	H3GA0025162	35.4047	2.68E-09	-0.058 (0.016)
	117.66	ALGA0049139	46.6404	8.53E-12	-0.088 (0.015)

LR. Likelihood ratio test values; a (SE): additive effect (standard error).

¹ SNP H3GA0025321 (119.89 Mb) showed the same P-value.

Table 3. Analysis of a two QTLs model in SSC8 for the most significant regions affecting BF FA composition.

Trait	Chromosomal region (Mb)	SNP	LR	P-value
C14:0	91.57	ALGA0048513	21.0699	4.43E-06
	117.66	ALGA0049139		
C16:0	91.57	ALGA0048513	47.4716	5.58E-12
	117.66	ALGA0049139		
C18:0	91.56	H3GA0025111	19.1441	1.21E-05
	119.73	SIRI0000509		
C16:1(n-7)	91.56	H3GA0025111	68.9761	1.11E-16
	119.73	SIRI0000509		
C18:1(n-9)	91.57	ALGA0048513	35.9079	2.07E-09
	117.66	ALGA0049139		
C20:2(n-6)	91.56	H3GA0025111	23.3687	1.34E-06
	117.55	ALGA0049135		
ACL	91.57	ALGA0048513	69.2893	1.11E-16
	117.66	ALGA0049139		
C16:1(n-7)/C16:0	91.57	H3GA0025111	37.5734	8.80E-10
	119.73	SIRI0000509		
C18:0/C16:0	91.56	H3GA0025111	66.7598	3.33E-16
	119.73	SIRI0000509		
C18:1(n-7)/C16:1(n-7)	91.57	ALGA0048513	66.3888	3.33E-16
	119.73	SIRI0000509		

LR. Likelihood ratio test values.

Table 4. Microsatellites identified in the *MAML3* gene.

SSR locus	5' fluorescent label	No. of alleles	Size of alleles
<i>MAML3_MS1</i>	HEX	2	135,137
<i>MAML3_MS2</i>	FAM	8	233,239,243,245,247,251,257,259

Table 5. Polymorphisms identified in the proximal promoter and coding regions of the *SETD7* gene.

Gene localization	Position (bp)	Ref⁴	Pol⁵	Aminoacidic change
Promoter¹	-1300	A	G	
	-1034 ³	T	G	
	-980	C	A	
	-632	T	C	
Exon 4²	462	C	T	
Exon 6²	700 ³	G	T	VAL/LEU
	708	G	A	
Exon 7²	807	C	T	
Exon 8²	960	C	T	

¹Positions relative to the transcription start site using, as reference, the GenBank ENSSSCG00000030396 sequence.

²Referring to the coding region, using RNA-Seq data.

³SNPs genotyped.

⁴Ref = nucleotide in the reference sequence.

⁵Pol = polymorphisms found.

Table 6. Significant SNPs affecting BF FA composition (FDR=0.05) in family 1 (n=168) of the F2 generation.

Trait	Chromosomal region (Mb)	SNP	LR	P-value	a (SE)
C16:0	120.01	<i>ELOVL6:c.533C>T</i>	16.9446	3.85E-05	0.652 (0.818)
C16:1(n-7)	120.01	<i>ELOVL6:c.533C>T</i>	33.1038	8.74E-09	0.221 (0.045)
C18:1(n-9)	117.44	ASGA0039595	24.0369	9.45E-07	-0.827 (0.809)
C18:1(n-7)	142.23	ALGA0106925	13.3222	2.62E-04	0.174 (0.049)
ACL	120.01	<i>ELOVL6:c.533C>T</i>	24.7173	6.64E-07	-0.022 (0.001)
MUFA	117.44	ASGA0039595	13.8134	2.02E-04	-0.724 (1.108)
C16:1(n-7)/C16:0	127.78	MARC0087394	20.5866	5.70E-06	0.007 (0.000)
C18:0/C16:0	120.01	<i>ELOVL6:c.533C>T</i>	28.3700	1.00E-07	-0.032 (0.001)
C18:1(n-7)/C16:1(n-7)	120.01	<i>ELOVL6:c.533C>T</i>	36.7487	1.34E-09	-0.101 (0.008)
C20:2(n-6)/C18:2(n-6)	91.93	ALGA0048544	17.4256	2.99E-05	0.009 (0.000)

LR. Likelihood ratio test values; a (SE): additive effect (standard error).

Table 7. Additive value affecting BF FA composition in family 1 (n=168) of the F2 generation for the *SETD7:c.700G>T* and *ELOVL6:c.533C>T* SNPs.

Trait	<i>SETD7:c.700G>T</i>	<i>ELOVL6:c.533C>T</i>
C16:0	0.421	0.652
C16:1(n-7)	0.169	0.221
C18:1(n-9)	-0.465	-0.714
C18:1(n-7)	0.068	0.081
ACL	-0.015	-0.022
MUFA	-0.266	-0.457
C16:1(n-7)/C16:0	0.006	0.007
C18:0/C16:0	-0.022	-0.032
C18:1(n-7)/C16:1(n-7)	-0.062	-0.101
C20:2(n-6)/C18:2(n-6)	-0.003	-0.005

3.7. FIGURES LEGENDS

Figure 1. Schematic representation of the elongation pathway of 16 and 18 carbon FAs. Statistically significant FAs (red square) and ratios of elongation and desaturation (colored arrows) are shown for BF FA composition in the F2 generation.

Figure 2. Association study and LDLA of the C18:0/C16:0 elongation ratio in BF. Plot of association study (red points) and LDLA patterns (blue line) for the stearic/palmitic ratio. The X-axis represents chromosome 8 positions in Mb and Y-axis shows the $-\log_{10}$ (p-value). The vertical, pink line represents the position of the *MAML3* gene, the blue line represents the position of the *SETD7* gene and the green line represents the position of the *ELOVL6* gene on SSC8. Horizontal dashed lines mark the association study significance level (FDR-based $q\text{-value} \leq 0.05$). Positions in Mb are relative to *Sscrofa10.2* assembly of the pig genome.

Figure 3. Family-based association study for the palmitoleic acid content of BF in the F2 generation. Plot of association study (red points) for palmitoleic acid (C16:1(n-7)). The X-axis represents chromosome 8 positions in Mb and Y-axis shows the $-\log_{10}$ (p-value). The vertical pink line represents the position of the *MAML3* gene, the blue line represents the position of the *SETD7* gene, and the green line represents the position of the *ELOVL6* gene on SSC8. Horizontal dashed lines mark the association study significance level (FDR-based $q\text{-value} \leq 0.05$). Positions in Mb are relative to *Sscrofa10.2* assembly of the pig genome.

Figure 1.

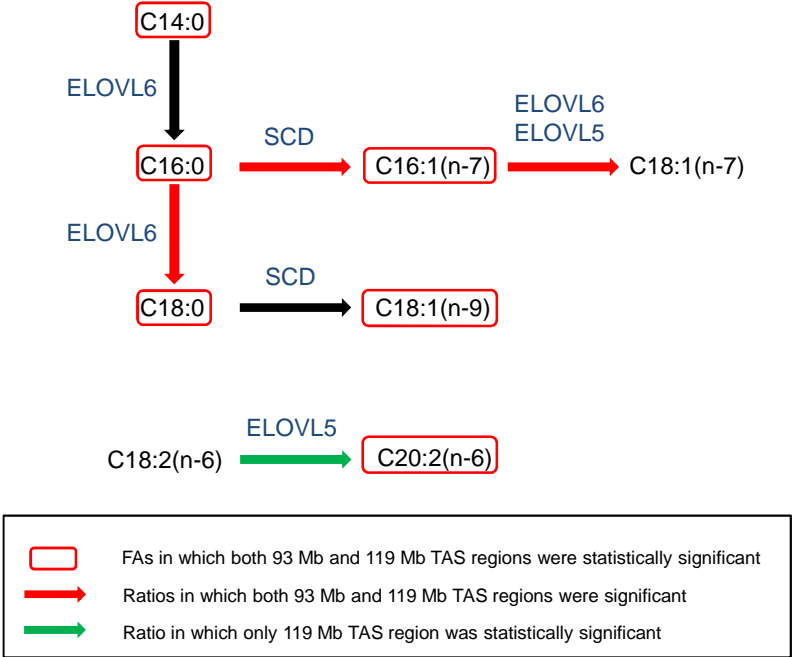


Figure 2.

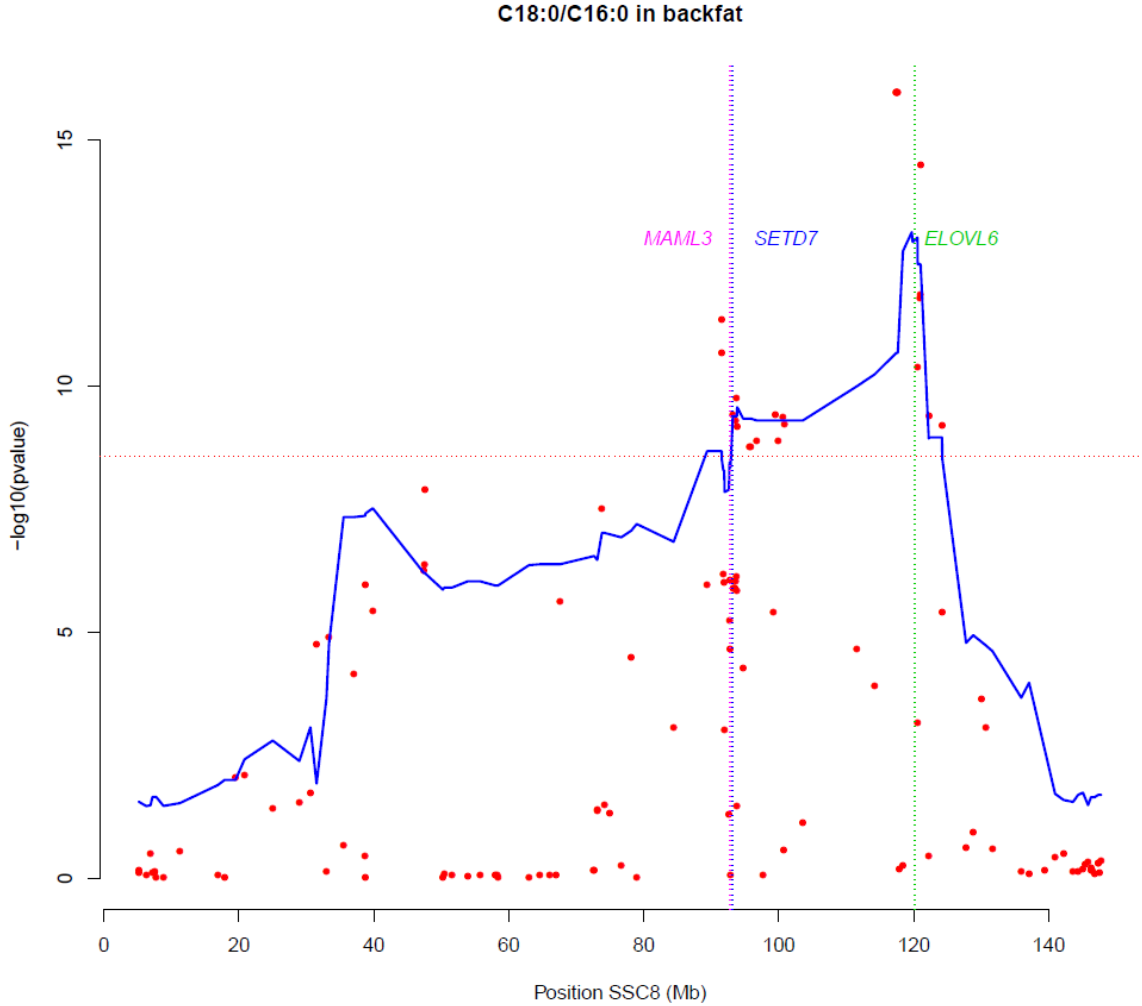
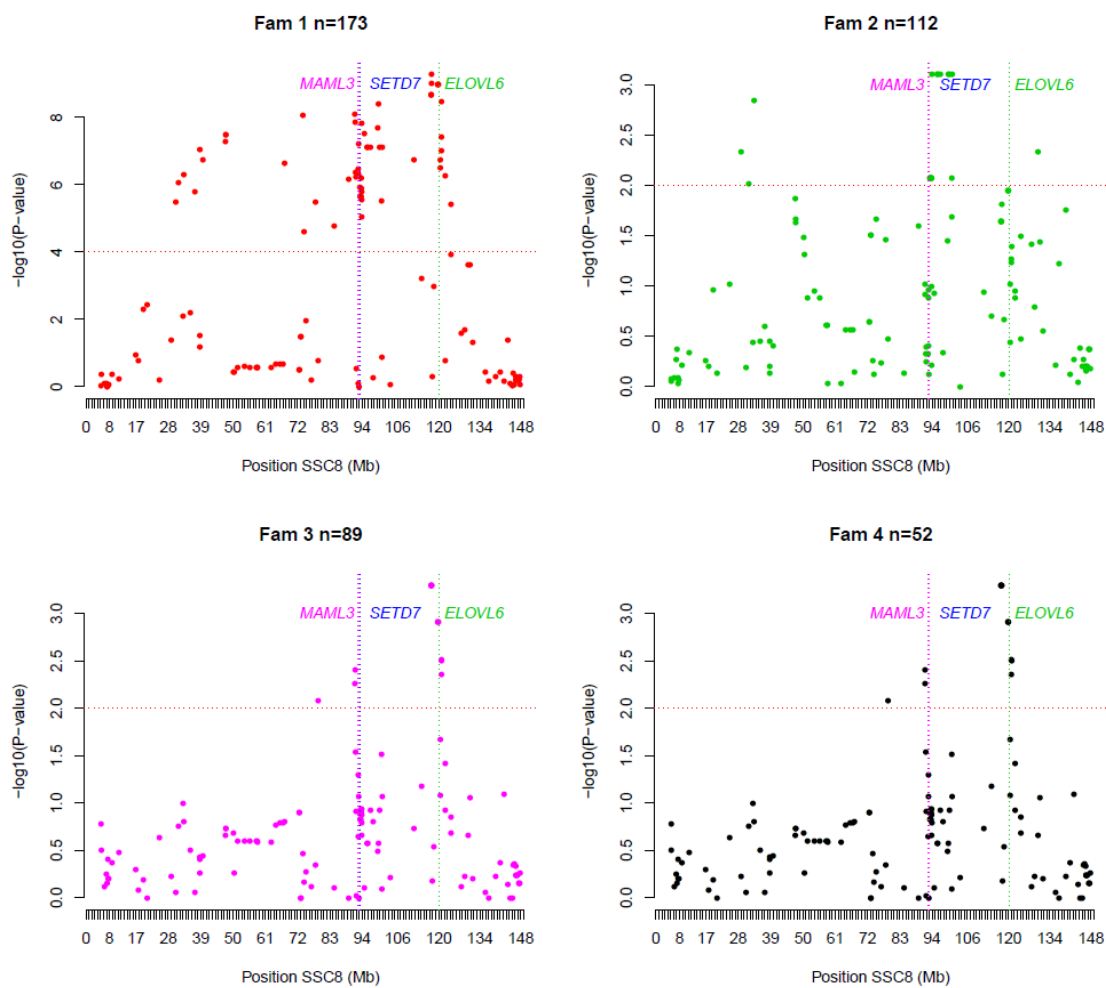


Figure 3.



3.8. SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Primers for *SETD7* and *MAML3* promoter sequencing (P), promoter and exon 1 sequencing (PE) and microsatellite genotyping (MS).

Table S2. Descriptive statistics including mean, SD and estimated heritability (h^2) of FA composition and FA indices.

Supplementary Figure 1. Association study and LDLA of the C16:1(n-7), ACL and C18:1(n-7)/C16:1(n-7) elongation ratio in BF. Plot of association study (red points) and LDLA patterns (blue line) for the palmitoleic acid, ACL and vaccenic/palmitoleic ratio. The X-axis represents chromosome 8 positions in Mb and Y-axis shows the $-\log_{10}$ (p-value). The vertical, pink line represents the position of the *MAML3* gene, the blue line represents the position of the *SETD7* gene and the green line represents the position of the *ELOVL6* gene on SSC8. Horizontal dashed lines mark the association study significance level (FDR-based $q\text{-value} \leq 0.05$). Positions in Mb are relative to *Scrofa10.2* assembly of the pig genome.

Table S1.

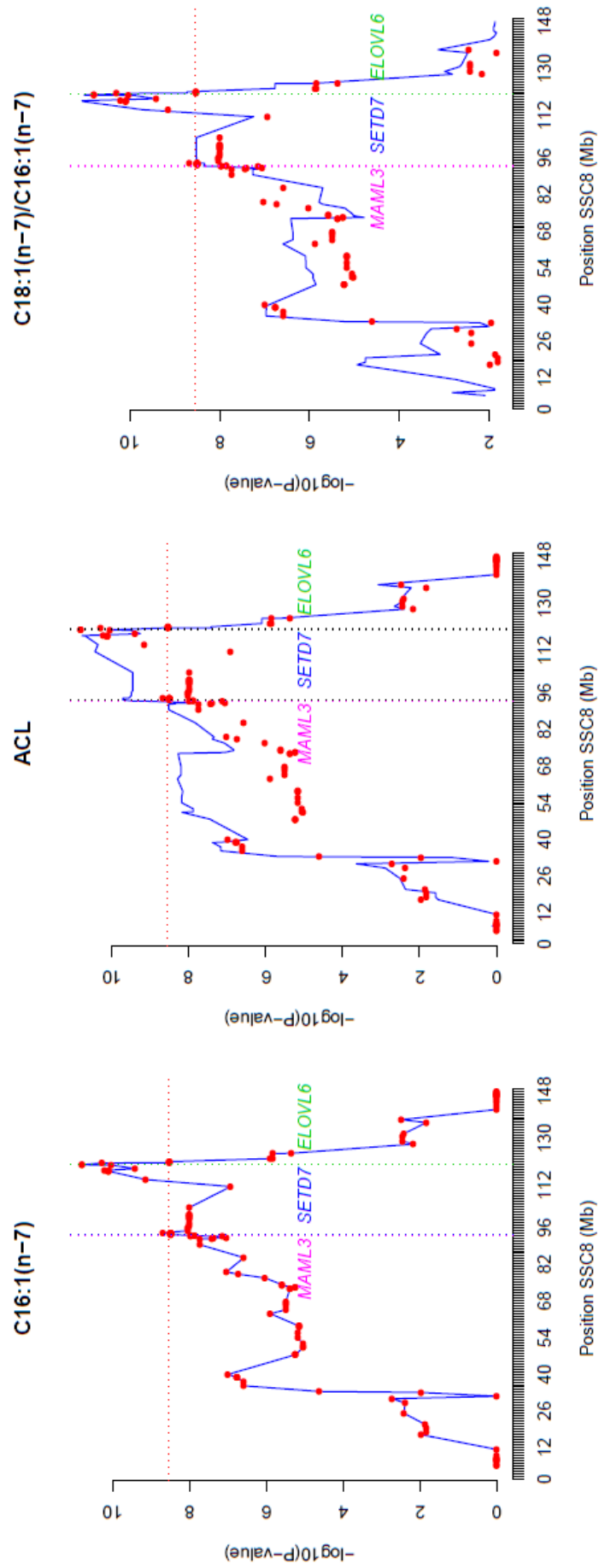
Gene ¹	Primer	Sequence	Amplicon length (bp)	T _m	[MgCl ₂]
<i>SETD7</i>	SETD7-Fw1 (P)	5'-ACAACTTCTCTTGCTCCCTTCTA-3'	473	62°C	1.5mM
<i>SETD7</i>	SETD7-Rv1 (P)	5'-TTTGGATCTGGTGAATTTCTGAAT-3'			
<i>SETD7</i>	SETD7-Fw2 (PE)	5'-GTTCCCTTTCCGTTACCACAAC-3'			
<i>SETD7</i>	SETD7-Rv2 (PE)	5'-GAGTCGGGAGTTCTGAGC-3'			
<i>MAML3</i>	MAML3-Fw1 (P)	5'-GTACCCGGCATTAAATAATATTCC-3'	517	56°C	2.5mM
<i>MAML3</i>	MAML3-Rv1 (P)	5'-ATCTTTTCTCTGTTTTCTGGC-3'			
<i>MAML3</i>	MAML3-Fw2 (PE)	5'-TGTATAACAACAACCTTGGGCTCTC-3'	663	58°C	*GC-Rich PCR System
<i>MAML3</i>	MAML3-Rv2 (PE)	5'-TCACCGAICTACTTTTGCAGTC-3'			
<i>MAML3</i>	MAML3_HEX-Fw (MS)	5'-TGTATAACAACAACCTTGGGCTCTC-3'	249	58°C	2.5mM
<i>MAML3</i>	MAML3-Rv1 (MS)	5'-ATCTTTTCTCTGTTTTCTGGC-3'			
<i>MAML3</i>	MAML3_FAM-Fw (MS)	5'-GCTGCCGGTGTACTGAGCT-3'	135	58°C	2.5mM
<i>MAML3</i>	MAML3-Rv3 (MS)	5'-AGCAGTTGATCATGTGATGGT-3'			

¹ The genes analyzed were: *SET* domain containing lysine methyltransferase 7 (*SETD7*) and *mastermind-like 3* (*MAML3*)

Table S2.

Item	Trait	Label	Mean	SD	h ²
SFA	C14:0	Myristic acid	1.51	0.17	0.19
	C16:0	Palmitic acid	21.10	1.41	0.28
	C18:0	Stearic acid	10.90	1.04	0.40
MUFA	C16:1(n-7)	Palmitoleic acid	2.50	0.39	0.24
	C18:1(n-9)	Oleic acid	44.38	1.77	0.29
	C18:1(n-7)	Vaccenic acid	3.02	0.36	0.26
	C20:1(n-9)	Eicosenoic acid	0.85	0.18	0.41
	C18:2(n-6)	Linoleic acid	14.00	1.65	0.28
PUFA	C18:3(n-3)	α -Linolenic acid	1.08	0.18	0.25
	C20:2(n-6)	Eicosadienoic acid	0.62	0.16	0.42
	ACL	Average Chain Length	17.50	0.04	0.26
Metabolic ratios	Σ SFA	SFA	33.46	1.97	0.24
	Σ MUFA	MUFA	50.85	2.12	0.25
	Σ PUFA	PUFA	15.72	1.80	0.27
FA ratios					
	$\Delta 9$ -desaturase activity	C16:1(n-7)/C16:0 C18:1(n-9)/C18:0	0.12 4.12	0.02 0.49	0.21 0.15
Elongase activity					
		C16:0/C14:0 C18:0/C16:0	14.10 0.52	1.51 0.05	0.16 0.41
		C18:1(n-7)/C16:1(n-7) C20:2(n-6)/C18:2(n-6)	1.22 0.04	0.16 0.01	0.21 0.39

Supplementary Figure 1.



IV ● Conclusiones

1. Se identificaron dos regiones del SSC8 (93 y 119 Mb) con SNPs fuertemente asociados al contenido de ácido palmitoleico (C16:1(n-7)) y a los índices de elongación C18:0/C16:0 y C18:1(n-7)/C16:1(n-7) en la GD de los animales de la generación F2 de un cruce entre el cerdo Ibérico y Landrace. La comparación de modelos estadísticos con uno o dos QTLs segregando en el SSC8 sugiere la presencia de dos QTLs para la composición de AGs en GD.
2. Los genes *MAML3* y *SETD7* fueron analizados como genes candidatos posicionales de la región localizada a 93 Mb del SSC8. Se identificaron dos microsatélites en el promotor y exón 1 del gen *MAML3* y 9 SNPs en el gen *SETD7*: 4 en el promotor y 5 en los exones, incluyendo una sustitución que determina un cambio aminoacídico de Valina por Leucina.
3. El estudio de asociación realizado con estos nuevos polimorfismos mostró asociaciones no significativas con los genotipos de los microsatélites del gen *MAML3*. Para el gen *SETD7*, el SNP *SETD7:c.700G>T* estaba asociado significativamente con la composición de AGs pero no era la señal más fuerte para esta región del SSC8. Estos resultados sugieren que los polimorfismos estudiados no son probablemente la variante causal del QTL de la región de 93 Mb.
4. No se encontró asociación entre la expresión de los genes *MAML3* y *SETD7* en hígado y tejido adiposo y los genotipos de los microsatélites de *MAML3* y el SNP *SETD7:c.700G>T*, en 56 animales del backcross Ibérico x Landrace. La baja correlación entre los valores de expresión en hígado y tejido adiposo en ambos genes sugiere la existencia de mecanismos diferentes de regulación de la expresión génica en ambos tejidos para los dos genes.
5. Para la región localizada a 119 Mb del SSC8, el SNP *ELOVL6:c.-533C>T*, localizado en el promotor del gen *ELOVL6*, fue el marcador que mejor explicaba las diferencias observadas en ácido palmítico (C16:0) y palmitoleico (C16:1(n-7)), ACL, y los índices de elongación C18:0/C16:0 y C18:1(n-7)/C16:1(n-7). Este resultado confirma que dicho polimorfismo presenta un efecto pleiotrópico, en GD y GIM, sobre la composición de AGs y refuerza el papel del polimorfismo del gen *ELOVL6* en la determinación de este QTL.

V

Referencias

● **Bibliográficas**

- Andersson L., Haley C.S., Ellegren H., Knott S.A., Johansson M., Andersson K., Andersson-Eklund L., Edfors-Lilja I., Fredholm M., Hansson I., Hakansson J. y Lundstrom K. (1994) Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* 263, 1771–1774.
- Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D. y Lake R.J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770–776.
- Bidanel J.P. y Rothschild M.F. (2002) Current status of quantitative trait locus mapping in pigs. *Pig News and Information* 23, 39-54.
- Bulman M.P., Kusumi K., Frayling T.M., McKeown C., Garrett C., Lander E.S., Krumlauf R., Hattersley A.T., Ellard S. y Turnpenny P.D. (2000) Mutations in the human delta homologue, *DLL3*, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nature Genetics* 24(4), 438-41.
- Buske B., Sternstein I. y Brockmann G. (2006) Qtl and candidate genes for fecundity in sows. *Animal Reproduction Science* 95, 167-183.
- Cameron N.D. (1990) Genetic and phenotypic parameters for carcass traits, meat and eating quality traits in pigs. *Livestock Production Science* 26, 119-135.
- Cameron N.D., Ensen M., Nute G.R., Whittington F.M., Penman J.C., Fisker A.C., Perry A.M. y Wood J.D. (2000) Genotype with nutrition interaction on fatty acid composition of intramuscular fat and the relationship with flavour of pig meat. *Meat Science* 55, 187-195.
- Candek-Potokar M., Monin G. y Zlender B. (2002) Pork quality, processing, and sensory characteristics of dry-cured hams as influenced by Duroc crossing and sex. *Journal of Animal Science* 80, 988-96.
- Chen Z.G., Ma Z.X., Zuo B., Lei M.G. y Xiong Y.Z. (2009) Molecular characterization and association with carcass traits of the porcine *SLC39A7* gene. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 126(4), 288-95.
- Cherel P., Pires J., Glénisson J., Milan D., Iannuccelli N., Hérault F., Damon M. y Le Roy P. (2011) Joint analysis of quantitative trait loci and major-effect causative

mutations affecting meat quality and carcass composition traits in pigs. *BMC Genetics* 29, 12:76.

Christensen A., Sorensen D., Vestergaard T. y Van Kemenade P. (1986) The Danish pig breeding program: current system and future developments. *Proc. of 3th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Nebraska*. X, 141-149.

Clop A., Cercos A., Tomas A., Pérez-Enciso M., Varona L., Noguera J.L., Sánchez A. y Amills M. (2002) Assignment of the *2,4-dienoyl-coa reductase (DECR)* gene to porcine chromosome 4. *Animal Genetics* 33, 164-165.

Clop A., Óvilo C., Pérez-Enciso M., Cercós A., Tomàs A., Fernández A., Coll A., Folch J.M., Barragán C., Díaz I., Oliver M., Varona L., Silió L., Sánchez A. y Noguera J.L. (2003) Detection of QTL affecting fatty acid composition in the pig. *Mammalian Genome* 14, 650-656.

Coma J. y Piquer J. (1999) Calidad de carne en porcino: efecto de la nutrición. *XV Curso de Especialización. Avances en Nutrición y Alimentación Animal* 1-22.

Corominas J., Ramayo-Caldas Y., Castelló A., Muñoz M., Ibáñez-Escriche N., Folch J.M. y Ballester M. (2012) Evaluation of the porcine *ACSL4* gene as a candidate gene for meat quality traits in pigs. *Animal Genetics* 43(6), 714-20.

Corominas J., Ramayo-Caldas Y., Puig-Oliveras A., Pérez-Montarelo D., Noguera J.L., Folch J.M. y 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.

Davoli R. y Braglia S. (2007) Molecular approaches in pig breeding to improve meat quality. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6, 313-21.

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

Duthie C., Simm G., Doeschl-Wilson A., Kalm E., Knap P.W. y Roehe R. (2008) Quantitative trait loci for chemical body composition traits in pigs and their

- positional associations with body tissues, growth and feed intake. *Animal Genetics* 39(2), 130-40.
- Edwards D.B., Ernst C.W., Tempelman R.J., Rosa G.J., Raney N.E., Hoge M.D. y Bates R.O. (2008) Quantitative trait loci mapping in an F2 Duroc x Pietrain resource population: I. Growth traits. *Journal of Animal Science* 86(2), 241-53.
- Ellisen L.W., Bird J., West D.C., Soreng A.L., Reynolds T.C., Smith S.D. y Sklar J. (1991) *TAN-1*, the human homolog of the *Drosophila notch* gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell Press* 66(4), 649-61.
- Estellé J, Pérez-Enciso M., Mercadé A., Varona L., Alves E., Sánchez A. y Folch J.M. (2006) Characterization of the porcine *FABP5* gene and its association with the *FAT1* QTL in an Iberian by Landrace cross. *Animal Genetics* 37(6), 589-91.
- Estellé J., Fernández A.I., Pérez-Enciso M., Fernández A., Rodríguez C., Sánchez A., Noguera J.L. y Folch J.M. (2009a) 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, 813-20.
- Estellé J., Mercadé A., Noguera J. L., Pérez-Enciso M., Óvilo C., Sánchez A. y Folch J.M. (2005) Effect of the porcine *IGF2-intron3-G3072A* substitution in an outbred Large White population and in an Iberian × Landrace cross. *Journal of Animal Science* 12, 2723-2728.
- Estellé J., Mercadé A., Pérez-Enciso M., Pena R.N., Silió L., Sánchez A. y Folch J.M. (2009b) Evaluation of *FABP2* as candidate gene for a fatty acid composition QTL in porcine chromosome 8. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 126(1), 52-8.
- Estève P.O., Chang Y., Samaranyake M., Upadhyay A.K., Horton J.R., Feehery G.R., Cheng X. y Pradhan S. (2011) A methylation and phosphorylation switch between an adjacent lysine and serine determines human *DNMT1* stability. *Nature Structural y Molecular Biology* 18(1), 42-8.

- Estève P.O., Chin H.G., Benner J. *et al.* (2009) Regulation of *DNMT1* stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 5076–5081.
- Geldermann H., Cepica S., Stratil A., Bartenschlager H. y Preuss S. (2010) Genome-wide mapping of quantitative trait loci for fatness, fat cell characteristics and fat metabolism in three porcine F2 crosses. *Genetics Selection Evolution* 28, 42:31.
- Goldstein D.B. y Schlotterer C. (1999) Microsatellites: evolution and applications. Nueva York, EE.UU. *Oxford University Press*.
- Groenen M.A., Archibald A.L., Uenishi H., Tuggle C.K., Takeuchi Y. *et al.* (2012) Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature* 491(7424), 393-8.
- Guo T., Ren J., Yang K., Ma J., Zhang Z. y 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, 185-91.
- Haley C. y Visscher P. (1998-1999) DNA markers and genetic testing in farm animal improvement: current applications and future prospects. *Roslin Institute Annual Report* 28-39.
- Haley C.S., Avalos E. y Smith C. (1988) Selection for litter size in the pig. *Animal Breeding Abstracts* 56, 317-332.
- Haley C.S., Knott S.A., y Elsen J.M. (1994) Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* 136, 1195-1207.
- Helms W., Lee H., Ammerman M., Parks A.L., Muskavitch M.A. y Yedvobnick B. (1999) Engineered truncations in the *Drosophila mastermind* protein disrupt *Notch* pathway function. *Development Biology* 215(2), 358-74.
- Hofmann K. (1994) What is quality. *Meat Focus* 73-82.
- Hu Z.L., Dracheva S., Jang W., Maglott D., Bastiaansen J., Rothschild M.F., y Reecy J.M. (2005) A qtl resource and comparison tool for pigs: Pig qtl db. *Mammalian Genome* 16, 792-800.

- Jarne P. y Lagoda P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree* 11, 424-429.
- Kim J.H., Lim H.T., Park E.W., Rodriguez C., Silió L., Varona L., Mercadé A., Jeon J.T. y Óvilo C. (2006) Polymorphisms in the promoter region of the porcine *acyl-coa dehydrogenase, medium-chain (ACADM)* gene have no effect on fat deposition traits in a pig iberian x landrace cross. *Animal Genetics* 37, 430-431.
- Knott S.A., Marklund L., Haley C.S., Andersson K., Davies W., Ellegren H., Fredholm M., Hansson I., Hoyheim B., Lundström K., Moller M. y Andersson L. (1998) Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and large white pigs. *Genetics* 149(2), 1069-80.
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K. *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822), 860-921.
- Lanford P.J., Lan Y., Jiang R., Lindsell C., Weinmaster G., Gridley T. y Kelley M.W. (1999) Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nature Genetics* 21(3), 289-92.
- Le Roy P., Naveau J., Elsen J.M., y Sellier P. (1990) Evidence for a new major gene influencing meat quality in pigs. *Genetical Research* 55, 33-40.
- Liu G., Jennen D.G., Tholen E., Juengst H., Kleinwächter T., Hölker M., Tesfaye D., Un G., Schreinemachers H.J., Murani E., Ponsuksili S., Kim J.J., Schellander K. y Wimmers K. (2007) A genome scan reveals QTL for growth, fatness, leanness and meat quality in a Duroc-Pietrain resource population. *Animal Genetics* 38(3), 241-52.
- López-Bote C. (1998) Sustained utilization of the Iberian pig breed. *Meat Science* 49 Suppl.1, 17-27.
- Lynch M. y Walsh B. (1998) Genetics and analysis of Quantitative Traits. *Sinauer Associates Inc. Publishers*. MA, USA.

- Marklund L., Nystrom P.E., Stern S., Andersson-Eklund L. y Andersson L. (1999) Confirmed quantitative trait loci for fatness and growth on pig chromosome 4. *Heredity* 82, 134-141.
- Mercadé A., Estellé J., Noguera J.L., Folch J.M., Varona L., Silió L., Sánchez A., y Pérez-Enciso M. (2005a) On growth, fatness, and form: A further look at porcine chromosome 4 in an iberian x landrace cross. *Mammalian Genome* 16, 374-382.
- Mercadé A., Estellé J., Pérez-Enciso M., Varona L., Silió L., Noguera J.L., Sánchez A., y Folch J.M. (2006a) Characterization of the porcine acyl-co-synthetase long-chain 4 gene and its association with growth and meat quality traits. *Animal Genetics* 37, 219-224.
- Mercadé A., Pérez-Enciso M., Varona L., Alves E., Noguera J.L., Sánchez A. y Folch J.M. (2006b) Adipocyte fatty-acid binding protein is closely associated to the porcine fat1 locus on chromosome 4. *Journal of Animal Science* 84, 2907-2913
- Mercadé A., Sánchez A. y Folch J.M. (2005b) Exclusion of the acyl coa:Diacylglycerol acyltransferase 1 gene (*DGATI*) as a candidate for a fatty acid composition qtl on porcine chromosome 4. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 122, 161-164.
- Mercadé A., Sánchez A. y Folch J.M. (2007) Characterization and physical mapping of the porcine *CDS1* and *CDS2* genes. *Animal Biotechnology* 18, 23-35.
- Milner L.A. y Bigas A. (1999) *Notch* as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood* 93(8), 2431-48.
- Mumm J.S. y Kopan R. (2000) *Notch* signaling: from the outside in. *Development Biology* 228(2), 151-65.
- Muñoz G., Alves E., Fernández A., Óvilo C., Barragan C., Estellé J., Quintanilla R., Folch J.M., Silió L., Rodríguez M.C. y 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, 639-646.
- Muñoz G., Óvilo C., Silió L., Tomás A., Noguera J.L. y Rodríguez M.C. (2009) Single- and joint-population analyses of two experimental pig crosses to confirm

- quantitative trait loci on Sus scrofa chromosome 6 and leptin receptor effects on fatness and growth traits. *Journal of Animal Science* 87(2), 459-68.
- Ollivier L. (1989) Le programme national d'amélioration génétique porcine en France. *Actas II Congreso monográfico nacional de mejora genética del ganado porcino*.
- Olsson V. y Pickova J. (2005) The influence of production systems on meat quality, with emphasis on pork. *Ambio* 34, 338-343.
- Ordovas J.M. (2006) Genetic interactions with diet influence the risk of cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 83, 443S-446S.
- Óvilo C., Clop A., Noguera J.L., Oliver M.A., Barragan C., Rodríguez C., Silió L., Toro M.A., Coll A., Folch J.M., Sánchez A., Babot D., Varona L. y Pérez-Enciso M. (2002a) Quantitative trait locus mapping for meat quality traits in an Iberian x Landrace F2 pig population. *Journal of Animal Science* 80, 2801-8.
- Óvilo C., Fernández A., Noguera J.L., Barragán C., Leton R., Rodríguez C., Mercadé A., Alves E., Folch J.M., Varona L. y Toro M.A. (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.
- Óvilo C., Oliver A., Noguera J.L., Clop A., Barragán C., Varona L., Rodríguez C., Toro M., Sánchez A., Pérez-Enciso M. y Silió L. (2002b) Test for positional candidate genes for body composition on pig chromosome 6. *Genetic Selection Evolution* 34, 465-479.
- Óvilo C., Pérez-Enciso M., Barragán C., Clop A., Rodríguez C., Oliver M., Toro M. y Noguera J.L. (2000) A QTL for intramuscular fat and backfat thickness is located on porcine chromosome 6. *Mammalian Genome* 11, 344-346.
- Pan G., Fu Y., Zuo B., Ren Z., Xu D., Lei M., Zheng R. y Xiong Y.Z. (2010) Molecular characterization, expression profile and association analysis with fat deposition traits of the porcine APOM gene. *Molecular Biology Reports* 37(3), 1363-71.
- Paszek A., Wilkie P., Flickenger G., Miller L.M., Louis C.F., Rohrer G., Alexander L., Beattie C. y Schook L. (2001) Interval mapping of carcass and meat quality traits in a divergent swine cross. *Animal Biotechnology* 12(2), 155-165.

- Pérez-Enciso M., Clop A., Noguera J.L., Óvilo C., Coll A., Folch J.M., Babot D., Estany J., Oliver M.A., Diaz I. y Sánchez A. (2000) A QTL on pig chromosome4 affects fatty acid metabolism: evidence from an Iberian by Landrace intercross. *Journal of Animal Science* 78, 2525-31.
- Pérez-Enciso, M., Clop A., Folch J.M., Sánchez A., Oliver M.A., Óvilo C., Barragan C., Varona L. y Noguera J.L. (2002) Exploring alternative models for sex-linked quantitative trait loci in outbred populations: Application to an iberian x landrace pig intercross. *Genetics* 161, 1625-1632.
- Pérez-Enciso, M., Mercadé A., Bidanel J.P., Geldermann H., Cepica S., Bartenschlager H., Varona L., Milan D. y Folch J.M. (2005) Large-scale, multibreed, multitrait analyses of quantitative trait loci experiments: The case of porcine x chromosome. *Journal of Animal Science* 83, 2289-2296.
- Ramayo-Caldas Y., Mercadé A., Castelló A., Yang B., Rodríguez C. *et al.* (2012) Genome-wide association study for intramuscular fatty acid composition in an Iberian x Landrace cross. *Journal of Animal Science* 90(9), 2883–2893.
- Ramayo-Caldas Y., Reverter A., Ballester M., Fortes M.R.S., Esteve-Codina A., Noguera J.L., Fernández A.I. y Folch J.M. (2013) Estudios de co-asociación genómica y redes génicas aplicados a la disección genética del contenido intramuscular de ácidos grasos. *XV Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza*.
- Ramos A.M., Crooijmans R.P.M.A., Affara N.A., Amaral A.J., Archibald A.L., Beever J.E., Bendixen C., Churcher C., Clark R., Dehais P., Hansen M.S., Hedegaard J., Hu Z.-L., Kerstens H.H., Law A.S., Megens H.-J., Milan D., Nonneman D.J., Rohrer G.A., Rothschild M.F., Smith T.P.L., Schnabel R.D., Van Tassell C.P., Taylor J.F., Wiedmann R.T., Schook L.B. y Groenen M.A.M. (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.
- Rohrer G., Beever J.E., Rothschild M.F., Schook L., Gibbs R. y Weinstock G. (2003) *Porcine Genomic Sequencing Initiative*.

- Rohrer G.A. (2000) Identification of quantitative trait loci affecting birth characters and accumulation of backfat and weight in a Meishan-White Composite population. *Journal of Animal Science* 78, 2547-2553.
- Rothschild M.F., Hu Z.L., y Jiang Z. (2007) Advances in QTL mapping in pigs. *International Journal of Biological Sciences* 3, 192-197.
- Rückert C., Stratz P., Preuss S. y Bennewitz J. (2012) Mapping quantitative trait loci for metabolic and cytological fatness traits of connected F2 crosses in pigs. *Journal of Animal Science* 90(2), 399-409.
- Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S.C., Kakol J.M., Stein L.D., Marth G., Sherry S., Mullikin J.C., Mortimore B.J., Willey D.L., Hunt S.E. *et al.* (2001) Amap of human genome sequence variation containing 1.42 million singlenucleotide polymorphisms. *Nature* 409(6822), 928-933.
- Sánchez M.P., Iannuccelli N., Basso B., Bidanel J.P., Billon Y., Gandemer G., Gilbert H., Larzul C., Legault C., Riquet J., Milan D. y 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, 55.
- Sánchez M.P., Riquet J., Iannuccelli N., Gogué J., Billon Y., Demeure O., Caritez J.C., Burgaud G., Fève K., Bonnet M., Péry C., Lagant H., Le Roy P., Bidanel J.P. y Milan D. (2006) Effects of quantitative trait loci on chromosomes 1, 2, 4, and 7 on growth, carcass, and meat quality traits in backcross Meishan x Large White pigs. *Journal of Animal Science* 84(3), 526-37.
- Schook L.B, Beever J.E., Rogers J., Humphray S., Archibald A., Chardon P., Milan D., Rohrer G. y Eversole K. (2005) Swine Genome Sequencing Consortium(SGSC): a strategic roadmap for sequencing the pig genome. *Comparative and Functional Genomics* 6, 251-255.
- Serra X., Gil F., Pérez-Enciso M., Oliver M., Vázquez J., Gispert M., Díaz I., Moreno F., Latorre R. y Noguerra J.L. (1998) A comparison of carcass, meat quality and histochemical characteristics of Iberian (Guadyerbas line) and Landrace pigs. *Livestock Production Science* 56, 215-223.

- Short T.H., Wilson E.R. y McLaren D.G. (1994) Relationship between growth and litter traits in pig dam lines. *Proc. of 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph XVII*, 413-416.
- Solanes F. X., Reixach J., Tor M., Tibau J. y Estany J. (2009) Genetic correlations and expected response for intramuscular fat content in Duroc pig line. *Livestock Science* 123, 63-69.
- Suzuki K., Ishida M., Kadowaki H., Shibata T., Uchida H. y Nishida A. (2006) Genetic correlations among fatty acid compositions in different sites of fattissues, meat production, and meat quality traits in Duroc pigs. *Journal of Animal Science* 84, 2026-34.
- Swiatek P.J., Lindsell C.E., del Amo F.F., Weinmaster G. y Gridley T. (1994) *Notch1* is essential for postimplantation development in mice. *Genes y Development* 8(6), 707-19.
- Tibau J. (1992) Mejora genética de los caracteres productivos en el ganado porcino. *Torcí* 7, 11-21.
- Tomás A., Ramírez O., Casellas J., Muñoz G., Sánchez A., Barragán C., Arqué M., Riart I., Óvilo C., Noguera J.L., Amills M. y Rodríguez C. (2011) Quantitative trait loci for fatness at growing and reproductive stages in Iberian × Meishan F(2) sows. *Animal Genetics* 42(5), 548-51.
- Toro M.A. y Silió L. (1992) La mejora de la selección porcina. *Porci* 7, 69-78.
- Uemoto Y., Soma Y., Sato S., Ishida M., Shibata T., Kadowaki H., Kobayashi E. y Suzuki K. (2012) Genome-wide mapping for fatty acid composition and melting point of fat in a purebred Duroc pig population. *Animal Genetics* 43(1), 27-34.
- Van Laack R.L.J.M., Stevensi S.G. y Stalder K.J. (2001) The influence of ultimate pH and intramuscular fat content on pork tenderness and tenderization. *Journal of Animal Science* 79, 392-397.
- Varona L., Gómez-Raya L., Rauw W.M. y Noguera J.L. (2005) A simulation study on the detection of causal mutations from F2 experiments. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 122, 30-6.

- Varona L., Óvilo C., Clop A., Noguera J.L., Pérez-Enciso M., Coll A., Folch J.M., Barragan C., Toro M.A., Babot D. y Sánchez A. (2002) Qtl mapping for growth and carcass traits in an iberian by landrace pig intercross: Additive, dominant and epistatic effects. *Genetic Research* 80, 145-154.
- Ventanas S., Ruiz J., Garcia C. y Ventanas J. (2007) Preference and juiciness of Iberiandry-cured loin as effected by intramuscular fat content, crossbreeding andrearing system. *Meat Science* 77, 324-330.
- Vidal O., Noguera J.L., Amills M., Varona L., Gil M., Jiménez N., Dávalos G., Folch J.M. y 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.
- Walling, G.A., Visscher P.M., Andersson L., Rothschild M.F., Wang L., Moser G., Groenen M.A., Bidanel J.P., Cepica S., Archibald A.L., Geldermann H., de Koning D.J., Milan D. y Haley C.S. (2000) Combined analyses of data from quantitative trait loci mapping studies. Chromosome 4 effects on porcine growth and fatness. *Genetics* 155, 1369-1378.
- Weinmaster G. (1997) The ins and outs of notch signaling. *Molecular and Cellular Neuroscience*9(2), 91-102.
- Wernersson R., Schierup M.H., Jorgensen F.G., Gorodkin J., Panitz F., Staerfeldt H.H., Christensen O.F., Mailund T., Hornshoj H., Klein A., Wang J., Liu B., Hu S., Dong W., Li W., Wong G.K., Yu J. *et al.* (2005) Pigs in sequence space: a 0.66Xcoverage pig genome survey based on shotgun sequencing. *BMC Genomics* 6(1), 70.
- Wood J.D., Enser M., Fisher A.V., Nute G.R., Sheard P.R., Richardson R.I., Hughes S.I. y Whittington F.M. (2008) Fat deposition, fatty acid composition and meatquality: A review. *Meat Science* 78, 343-358.

VI. Anexo

ESTUDIO DE ASOCIACIÓN PARA LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN GRASA DORSAL EN UN CRUCE IBÉRICO X LANDRACE CON UN *CHIP* DE 144 SNPs DEL SSC8

Revilla, M.¹, Ramayo-Caldas, Y.^{1,2}, Castelló, A.¹, Corominas, J.^{1,2}, Puig-Oliveras, A.^{1,2}, Ibáñez-Escriche, N.³, Muñoz, M.⁴, Ballester, M.¹, Folch, J.M.^{1,2}

¹Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, Bellaterra, 08193. ²Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra. ³Genètica i Millora Animal, IRTA, Av Rovira Roure 191, 25198 Lleida. ⁴Departamento Mejora Genética Animal, SGIT-INIA, Ctra. Coruña Km 7.5, 28040 Madrid.

E-mail: manuel.revilla@cragenomica.es

INTRODUCCIÓN

El contenido y composición de ácidos grasos en porcino resulta un parámetro de creciente interés por su efecto sobre el rendimiento de la canal y la calidad de la carne. En un cruce F2 Ibérico x Landrace se identificó (Clöp *et al.*, 2003) un QTL en el cromosoma 8 porcino (SSC8) para el porcentaje de los ácidos grasos palmítico y palmitoleico y para la longitud media de los ácidos grasos en grasa dorsal. Recientemente, se ha realizado un análisis de asociación genómico (GWAS) (Ramayo-Caldas *et al.*, 2012) con los datos genotípicos del chip de 60 K SNPs de *Illumina* y la composición de ácidos grasos en músculo (*Longissimus dorsi*) en 144 animales del retrocruce BC1_LD (25% Ibérico, 75% Landrace). Este estudio ha permitido refinar la posición del QTL del SSC8 e identificar el gen *ELOVL6* como potente candidato posicional y funcional. *ELOVL6* está implicado en la lipogénesis *de novo*, actuando en la elongación de ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Un polimorfismo en la región promotora de este gen (ELOVL6:c.-533C>T) está asociado con el porcentaje de palmítico y palmitoleico en músculo y tejido adiposo (Corominas *et al.*, 2013). Animales con un genotipo diferente para el polimorfismo ELOVL6:c.-533C>T, mostraron diferencias de expresión del gen *ELOVL6* en tejido adiposo, donde una menor expresión del gen resultó en un mayor porcentaje de palmítico y palmitoleico en músculo y tejido adiposo, en concordancia con la función del gen (Corominas *et al.*, 2013). El objetivo del presente trabajo es estudiar el QTL del SSC8 para la composición de ácidos grasos en grasa dorsal en la generación F2 del cruce IBMAP con un panel refinado de 144 SNPs informativos distribuidos a lo largo del SSC8.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal y fenotipos: El material animal utilizado procede del cruce IBMAP, generado por el cruce inicial de verracos Ibéricos Guadyerbos y cerdas Landrace (Pérez-Enciso *et al.* 2000). Se analizaron un total de 470 animales F2 procedentes del cruce de 6 machos y 67 hembras F1. En el estudio de asociación se incluyeron los datos de composición de 20 ácidos grasos en grasa dorsal, en el rango del C12:0 al C22:0 (Clöp *et al.*, 2003). También se realizaron estudios de asociación por familias de medios hermanos paternos. Para el análisis se utilizaron 426 animales pertenecientes a las 4 familias con mayor número de descendientes.

Genotipado y control de calidad. Se determinó el genotipo de un total de 144 SNPs del SSC8 en 470 animales mediante la metodología de *GoldenGate* en un chip *VeraCode* (*Illumina*) donde se incluyeron 142 SNPs del *Porcine SNP60K BeadChip* (*Illumina*) y 2 SNPs de genes candidatos: *MTTP* (Estellé *et al.*, 2009) y *FABP2* (Estellé *et al.*, 2009). Utilizando el programa *Plink* (Purcell *et al.*, 2007), se actualizaron las coordenadas genómicas de los SNPs (*Sscrofa10.2*). Posteriormente, se eliminaron los SNPs con problemas de asignación de genotipos (*cluster analysis* de *GenomeStudio*, *Illumina*) y con una frecuencia del alelo minoritario (MAF) inferior al 5 %. Finalmente, se obtuvieron un total de 133 SNPs informativos.

Modelo estadístico: El análisis de asociación fue realizado con la nueva versión del programa *Qxpak5* (Pérez-Enciso y Misztal, 2011). Todos los fenotipos fueron analizados bajo el siguiente modelo:

$$y_{ijklm} = \text{Sexo}_i + \text{Lote}_j + \beta c_i + \lambda_{lk} a_k + \mu_l + e_{ijklm}$$

Donde y_{ijklm} es el valor fenotípico de cada individuo

Sexo_i : sexo del individuo con 2 niveles $i=1,2$ (definido como efecto fijo)

Lote_j : Lote del individuo con 5 niveles $j=1, 2, 3, 4, 5$ (definido como efecto fijo)

β : Coeficiente de covariable

c_i : Peso de la canal de cada individuo

λ_{lk} corresponde al genotipo del SNP k para el individuo l , siendo $\lambda = -1$ (aa), 0 (Aa), $+1$ (AA)

a_k : es el efecto aditivo de sustitución alélica del SNP k

μ_l : Efecto infinitesimal que se distribuye como $N(0, \mathbf{A} \sigma_u^2)$

\mathbf{A} : Matriz de parentesco

σ_u^2 : varianza genética aditiva

e_{ijklm} : residuo

Los *p*-valores obtenidos fueron corregidos utilizando la librería de R *q-value* (Storey *et al.*, 2004) considerando significativos aquellos SNPs que mostraron un *q*-value < 0,05. La versión 2.15.2 de R (*R Development Core Team*, 2008) fue utilizada para calcular los estadísticos descriptivos para los 20 caracteres analizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer objetivo fue diseñar un chip con aquellos SNPs que presentaban una máxima informatividad, distribuidos uniformemente a lo largo del SSC8. Posteriormente, se realizó un estudio de asociación con 133 SNPs informativos y 470 animales F2. Se observaron asociaciones significativas en el 50% de los ácidos grasos estudiados (10/20) incluyendo los descritos previamente en grasa dorsal (Clop *et al.*, 2003): C16:0, C16:1 (n-7) y ACL. El genotipado de nuevos marcadores distribuidos a lo largo del SSC8 ha permitido identificar nuevos QTLs (C16:1 y C18:0) en regiones genómicas poco cubiertas en los análisis anteriores con microsatélites (C14:0, C18:1 (n-9), C18:0). Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos recientemente en grasa intramuscular en un retrocruce de la población experimental IBMAP (BC1_LD) (Ramayo-Caldas *et al.*, 2012), siendo la región 117,4-121,0 Mb del SSC8 la más asociada a los ácidos grasos C16:1 (n-7) y C16:0. En esta región se localiza el gen *ELOVL6*. Estos resultados refuerzan la hipótesis de un QTL con efecto pleiotrópico sobre el perfil de estos ácidos grasos en grasa dorsal y en músculo.

En el análisis por familias se obtuvieron asociaciones significativas en el 80% de los ácidos grasos estudiados, observándose una fuerte asociación en el SSC8 con el ácido palmítico en las cuatro familias estudiadas (*Figura 1*). Cabe destacar la detección en algunas de las familias de una región localizada en la posición 92,7-93,2 Mb y asociada con C16:0, C16:1, C18:0, C18:1(n-9), ACL, C18:1/C16:1, C16:1/C16:0 y C18:0/C16:0. En esta región se encuentran los genes *SETD7* y *MAML3*. El gen *SETD7* desempeña un papel central en la activación transcripcional de genes como la colagenasa o la insulina. El gen *MAML3* actúa como un coactivador transcripcional de las proteínas NOTCH. Los resultados sugieren la presencia de dos QTLs del SSC8 para la composición de ácidos grasos en grasa dorsal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Clop *et al.* 2003. *Mamm. Genome* 14(9): 650-6.
- Y. Ramayo-Caldas *et al.* 2011. XIV Jornadas sobre Producción animal, Zaragoza 17-18 Mayo.
- Y. Ramayo-Caldas *et al.* 2012. *Journal of Animal Science*.
- Jordi Corominas *et al.* 2013. *Plos One* 8(1).
- Pérez-Enciso, M. & Misztal, I. 2011. *Bioinformatics*.
- J. Estellé *et al.* 2009 *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126: 52–58.
- J. Estellé *et al.* 2009 *Animal Genetics*, 40: 813–820.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos MICINN AGL2008-04818-C03/GAN y MINECO AGL2011-29821-C02 y por el Programa de Innovación Consolider-

Ingenio 2010 (CSD2007-00036). M. Revilla es estudiante del Máster Interuniversitario *Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción* (Universidad Politécnica de Valencia y Universidad Autónoma de Barcelona). Y. Ramayo-Caldas ha sido financiado con una beca *FPU* (AP2008-01450), J. Corominas con la beca *FPI* del *Ministerio de Educación* (BES-2009-018223) y A. Puig-Oliveras con una beca *PIF* (458-01-1/2011).

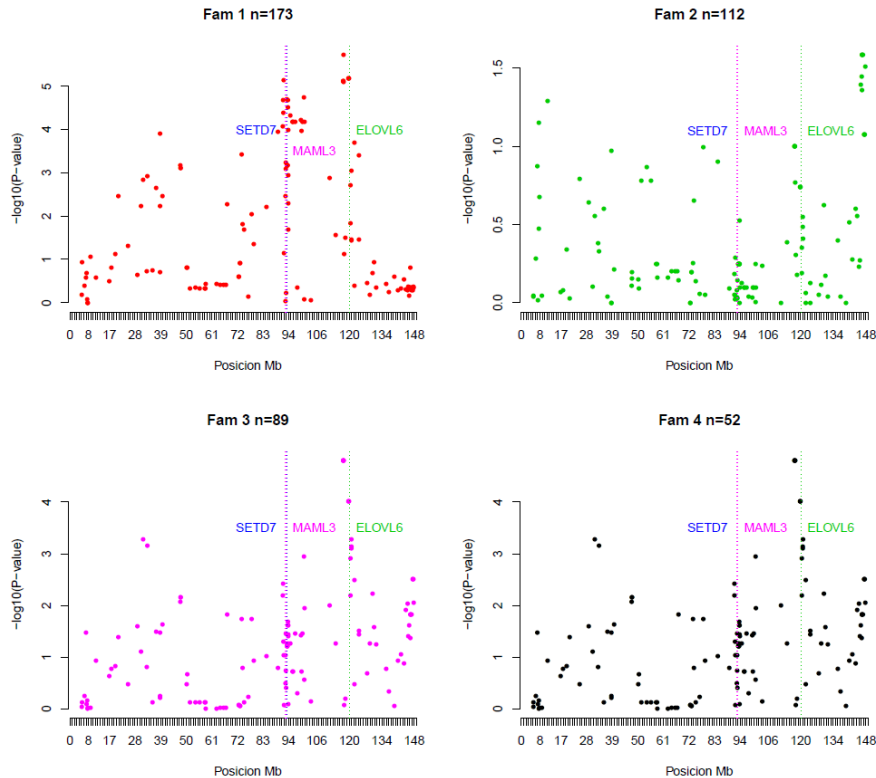


Figura 1: Análisis de asociación por familias para el contenido de C16:0 en grasa dorsal. Las posiciones en Mb son relativas a *Sscrofa10.2*. Las líneas verticales discontinuas indican la ubicación de genes candidatos posicionales.

ASSOCIATION STUDY FOR BACKFAT FATTY ACID COMPOSITION IN AN IBERIAN X LANDRACE CROSS WITH A 144 SNP CHIP OF SSC8

ABSTRACT: An association study for backfat fatty acid composition with the genotypes of 144 SNP of SSC8 was performed. Twenty traits, related with fatty acid composition and index of fatty acid metabolism in backfat, were analyzed. A total of 470 F2 animals from an Iberian x Landrace cross (IBMAP) were genotyped. After quality control, a total of 133 informative SNPs were retained. Two QTLs were found in the association analysis. The QTL in the 117.4-121.0 Mb region was in concordance with a previously identified QTL for intramuscular fatty acid composition, where *ELOVL6* is a strong candidate gene. An additional QTL, confirmed in an analysis of families, was found in 92.7 to 93.2 Mb position, where *SETD7* and *MAML3* genes are located.

Keywords: pig, adipose tissue, QTL.