

Aquesta Tesi s'ha realitzat amb l'objectiu de detectar QTLs amb efecte sobre caràcters d'interès econòmic i productiu en porcí. Per aconseguir-ho, inicialment es va realitzar l'anàlisi genotípica de 60 microsatèl·lits posicionats en els cromosomes 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 13, 16 i 17. Aquesta anàlisi es va dur a terme en una població de tipus F_2 obtinguda mitjançant l'encreuament de 3 porcs Ibèrics de l'estirp Guadyervas amb 31 femelles Landrace, les diferències entre els quals són molt notables. Mitjançant aquest encreuament, es varen obtenir 73 femelles i 6 mascles F_1 , que, alhora, varen produir 577 animals F_2 (295 mascles i 282 femelles).

El primer treball experimental realitzat fou l'extracció de l'ADN genòmic dels animals i l'establiment d'un banc de mostres. Posteriorment es varen seleccionar 60 microsatèl·lits en funció de l'eficiència d'amplificació, la posició cromosòmica i la informativitat que varen mostrar. Finalment es va realitzar l'amplificació d'aquests microsatèl·lits en els 34 animals fundadors, els 79 individus de la F_1 i 321 animals F_2 agrupats en 58 famílies diferents, per la qual cosa el nombre total d'animals analitzats fou de 434.

La informativitat dels microsatèl·lits es va valorar mitjançant el càlcul modificat (Clop *et al.*, 1998) de l'índex d'informativitat de Ron (Ron *et al.*, 1995) en els tres mascles Ibèrics i en 15 femelles Landrace (Ie_{15}), el mateix càlcul en els 3 mascles i en 29 femelles tenint en compte la informació genealògica (Ie_{29}), l'heterozigositat a la F_1 (H) i el contingut informatiu a la F_2 (IC). Totes aquestes mesures resultaren altes en la majoria dels microsatèl·lits. Segons el paràmetre, entre 2 i 4 microsatèl·lits varen presentar un valor inferior a 0,5 i entre 6 i 14 microsatèl·lits assoliren el valor màxim (1). Els quatre paràmetres varen mostrar una altíssima correlació genètica positiva, per la qual cosa va quedar demostrada la utilitat de l'índex de Ron per a valorar la informativitat dels marcadors a la F_0 . El nombre d'alel·les dels marcadors es va situar entre 2 i 12, essent els marcadors més freqüents aquells que presentaven 5 o 6 alel·les.

Amb la informació genotípica obtinguda i mitjançant l'opció *build* del programa CRI-MAP, version 2.4 (Green *et al.*, 1990), es varen calcular les distàncies de recombinació entre els marcadors i es va construir el mapa de lligament per als deu cromosomes. L'ordre dels microsatèl·lits al mapa de lligament obtingut, va coincidir plenament amb el descrit per Rohrer *et al.* (1996). Existeixen algunes diferències en les distàncies entre els microsatèl·lits

que podrien ésser degudes a la diferent base genètica de les poblacions analitzades en ambdós treballs o al diferent nombre de meiosis informatives detectades en les mateixes.

L'anàlisi de detecció de QTLs es va realitzar mitjançant el mètode de regressió desenvolupat per Haley *et al.* (1994). Es varen detectar QTLs significatius en els cromosomes 2, 4, 7 i 8. En el cromosoma 2 es va detectar un efecte significatiu per a l'espessor ($F = 10,36$) i l'àrea del llom ($F = 12,9$), a les posicions 54 i 68 cM, respectivament. En ambdós casos l'efecte additiu ($a = -2,51$ i $-1,84$, respectivament) va indicar una disminució del desenvolupament del llom quan l'al·lel Ibèric estava present.

Els QTLs més significatius varen ser detectats al cromosoma 4, a la regió compresa entre els microsatèl·lits SW839 i S0214. El major de tots ells afectava a l'espessor del greix dorsal mesurat amb regleta a l'escorxador ($F = 25,97$), que, alhora, anava acompanyat d'altres efectes significatius sobre el mateix caràcter però mesurat amb un *Fat-O-meter* i sobre el pes del greix dorsal. L'al·lel Ibèric en homozigosi augmentava clarament aquests paràmetres ($a = 3,707$). El segon efecte de major significació descrit a la present Tesi ($F = 17,13$), es va detectar a la mateixa regió cromosòmica i estava associat amb el percentatge d'àcid linoleic al teixit adipós subcutani dorsal. L'al·lel Ibèric estava associat a una disminució d'aquest percentatge ($a = -0,65$). Aquesta regió també va mostrar un efecte sobre l'índex de dobles enllaços dels àcids grassos (DBI) i llur índex de peroxidabilitat (PI). La mateixa regió cromosòmica posseeix efectes sobre la longitud de la canal ($F = 11,8$), de manera que l'al·lel Ibèric redueix el tamany de les canals. En una regió propera al microsatèl·lit SW445 (109 cM) i allunyada de la descrita per aquests QTLs, es va detectar una associació amb la concentració d'hematina al múscul *Longissimus* ($F = 8,68$) i sobre el paràmetre colorimètric L^* ($F = 16,4$). L'al·lel Ibèric augmentava el valor del primer i disminuïa el del segon. També s'observà un efecte sobre el paràmetre colorimètric a^* en una regió que presentava un interval de confiança ensoportat amb els segments que s'associaren amb la concentració d'hematina i L^* .

En el cromosoma 7 es va trobar un efecte ($F = 9$) per a la concentració d'hematina a la mateixa posició que el microsatèl·lit (S0066), en el que l'al·lel Ibèric augmentava el paràmetre. En el cromosoma 8, a la mateixa posició que el microsatèl·lit S0225, es varen trobar efectes sobre els percentatges dels àcids grassos palmític i palmitoleic en el greix dorsal, així com sobre la longitud mitjana de les cadenes de carboni dels àcids grassos en

aquest teixit (ACL). La presència de l'al·lel Ibèric implicava un augment del percentatge d'ambdós àcids greixosos i, per tant, una disminució del valor de ACL. També es varen detectar per a diversos caràcters efectes suggestius a tots els cromosomes estudiats en aquesta Tesi. Aquests QTLs afectaren al percentatge de fibres musculars de tipus IIA (cromosoma 1) i IIB (cromosomes 1 i 8), el diàmetre de fibres IIB (cromosoma 7), a la longitud (cromosoma 17) i el pes de la canal (cromosomes 2 i 17), al pH del llom a les 24 hores post-mortem (cromosomes 1 i 3), a l'àrea del llom (cromosoma 4), als valors minolta a* (cromosomes 4, 7 i 8), b* (cromosoma 8) i L* (cromosoma 7), a l'espessor del greix dorsal (cromosomes 2, 7 i 8), al percentatge de greix intramuscular (cromosoma 16), al pes del pernil (cromosoma 13) i al percentatge dels àcids grassos palmític (cromosomes 6 y 12), palmitoleic (cromosoma 2), esteàric (cromosomes 6 i 7) oleic (cromosomes 4, 8 i 9), linoleic (cromosoma 6), vaccenic (cromosoma 12) i el seus índex metabòlics ACL (cromosomes 6 i 12) i PI (cromosomes 6 i 12).

Amb la intenció de valorar el possible efecte del DNA mitocondrial sobre els diferents caràcters de creixement i engreixament en la nostra població, es va caracteritzar un haplotip en el citocrom B porcí (*CytB*), constituït per quatre SNPs, que determina l'origen europeu o asiàtic de la línia materna dels animals. El baix nivell de segregació de l'haplotip AI en la població Landrace F₀ del nostre treball, no va fer possible avaluar la incidència d'aquests haplotips en els caràcters productius analitzats. La caracterització dels haplotips es va dur a terme mitjançant la tècnica de piroseqüenciació, en cinc poblacions porcines diferents per determinar l'origen europeu o asiàtic de la línia materna dels animals que les composaven. Dels quatre haplotips observats fins aleshores (Andersson, comunicació personal), dos d'ells són característics d'origen europeu (EI i EII) i els altres dos ho són de l'asiàtic (AI i AII). Es van genotipar cinc porcs de l'estirp Guadyerbas del porc Ibèric (IB), cinc animals de la raça Porc Negre de Mallorca (PN), 112 truges Landrace (LD), 43 Large White (LW) i 69 Pietrain (PT). Mentre que en les races comercials es va observar una clara segregació de l'haplotip europeu EI i asiàtic AI, en nou dels deu animals autòctons (IB i PN) s'observà el tipus EI i un animal PN presentà un nou haplotip aparentment híbrid del EI i el AI.

Per a la detecció dels possibles gens candidats que expliquessin l'efecte sobre caràcters d'engreixament i de composició en àcids grassos del greix dorsal en el cromosoma 4, es va revisar la funció dels gens que es trobaven localitzats a la regió homòloga a la del

QTL, en humà (Hsap 1p2.2-q2.5 i Hsap 8q11.1-q24.3). Finalment, es va escollir al gen de la 2,4-Dienoil Coenzim A Reductasa (*DECR*), (Hsap8q21.3) i que intervé en la beta-oxidació dels àcids grassos, com a possible candidat. Es dissenyaren uns *primers* a partir de les seqüències conservades entre humà i rata i es va amplificar un grup d'animals parentals. Es va detectar un polimorfisme nucleotídic (G → C) a la posició 114 de l'exó 2 que implicava un canvi aminoacídic (Val → Leu) i que podia ser detectat per PCR-RFLP mitjançant la digestió amb l'enzim de restricció *MaeI* o el seu isoesquizòmer *BfaI*. Es varen analitzar tots els animals del pedigree i es va incorporar al mapa de lligament. L'allel que presentava la diana de restricció estava representat en molt pocs individus del pedigree. Degut al baix nivell de polimorfisme existent, el resultat de l'anàlisi postulava dues posicions (entre els microsatèl·lits SW839 i S0214, o entre S0001 i SW839), el *LOD score* de les quals era molt similar. L'anàlisi en un pannel de cèl·lules híbrides irradiades va confirmar la posició del gen entre els microsatèl·lits S0001 i SW839. Aquesta posició (68,3 cM) indica la proximitat del gen al QTL per al percentatge d'àcid linoleic (67-87 cM). Degut a aquest baix nivell de polimorfisme existent tampoc es va poder realitzar una anàlisi d'associació del gen amb els caràcters afectats per el QTL de greix i àcids grassos del cromosoma 4. Actualment s'estan cercant noves mutacions que poguessin presentar un nivell de segregació superior i que permetessin per tant, realitzar una anàlisi d'associació amb aquests caràcters fenotípics.

Els resultats obtinguts en aquesta Tesi es complementen amb els detectats en la resta de cromosomes porcins en el laboratori del *Area de Genética y Mejora Animal* del CIT-INIA i constitueixen una bona base i punt de partida per a la identificació i caracterització de gens candidats d'interès econòmic-productiu en l'espècie porcina.

The main purpose of this Thesis was to detect QTLs affecting economically important traits in pigs. First of all, the genotypic analysis located along the chromosomes 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9,13, 16 and 17 was performed. The analysis was executed in a F₂ intercross obtained by mating 3 Iberian boars from the Guadyerbas lineage to 31 Landrace sows. The phenotypes of the two breeds are markedly different. As a result of this cross, 73 females and 6 males in the F₁ and 577 F₂ (295 males and 282 females) were produced.

Our first goal was to obtain genomic DNA from each pig. Afterwards, 60 microsatellites were selected according to their amplification efficiency, chromosomal location and informativeness. Finally, we analysed these markers by PCR, in the 34 founder animals, the 79 individuals from the F₁ and 321 F₂ from 58 full-sib families, which means a total of 434 animals.

The informativeness of these markers was measured by means of a modified statistics (Clop et al., 1998) derived from the predictor developed by Ron et al. (1995). The statistics was calculated in the 3 Iberian boars and 15 Landrace sows (Ie₁₅), or by employing the 3 boars and 29 Landrace sows according to the pedigree information (Ie₂₉). The heterozygosity in the F₁ (H) and the information content of the F₂ (IC) was also calculated. Most of the markers showed high informativeness, although, between 2 and 4 microsatellites showed values below the 0.5 threshold. Approximately, between 6 and 14 markers presented the highest informative index (I). All the 4 informativeness predictors were highly correlated. This allows us to conclude that the Ie is a very useful index in predicting the marker informativeness of microsatellites in the F₀. The number of alleles varied between 2 and 12, being the most frequent markers with 5 or 6 alleles.

By using the option build of the CRI-MAP program, version 2.4 (Green et al., 1990), we calculated the recombination fractions between the markers and constructed the linkage map of the 10 chromosomes. The order of the markers was in total agreement with the map described by Rohrer et al. (1996). There exists several minor differences between both maps related with the distances between markers. This could be due to the different biological material used in both pedigrees or even to the different number of informative meioses that could be detected in each pedigree.

With the objective of detecting QTLs, we performed the regression analysis developed by Haley et al. (1994). We detected significant QTLs in chromosomes 2, 4, 7 and 8. A significant QTL affecting loin thickness ($F = 10.36$) and loin eye area ($F = 12.9$) was detected in chromosome 2 at 54 cM and 68 cM, respectively. In both cases, the additive effect ($\alpha = -2.51$ and -1.84 , respectively) showed that the Iberian allele decreased the values of both parameters.

The most significant QTLs were found in chromosome 4, between the markers SW839 and S0214. The most significant QTL affected backfat thickness measured directly in the slaughterhouse ($F = 25.97$). This QTL was also affecting backfat thickness measured with a Fat-O-meter and backfat weight. The homozygous animals with the Iberian allele showed higher backfat deposition ($\alpha = 3.707$). The second most important QTL found in this work was detected in the same position and was affecting the linoleic fatty acid percentage in the subcutaneous backfat ($F = 17.13$). The Iberian allele decreased this percentage ($\alpha = -0.65$). An effect on the double bond index of fatty acids (DBI) and their peroxidizability index (PI) was also detected. In the same region, we detected an effect on the carcass length ($F = 11.8$), showing that the Iberian allele reduced the value of this trait. In the position 109 cM, close to the marker SW445, we detected an effect on the haematine concentration on Longissimus muscle ($F = 8.68$) and on the colorimetric parameter L^* ($F = 16.4$). The Iberian allele increased the haematine concentration and decreased L^* . An effect on the colorimetric parameter a^* was also denoted in a position which confidence interval overlapped with the segments associated with the concentration of haematin and L^* .

In chromosome 7, in the same position defined by the microsatellite S0066, we detected a QTL ($F = 9$) for the haematine concentration. When the Iberian allele was present, the haematine concentration was increased. In chromosome 8, in the same position where the marker S0225 is located, we detected an association with the percentage of palmitic and palmitoleic fatty acids in backfat, as well as with the average chain length of fatty acids (ACL). The presence of the Iberian allele increased these percentages and consequently, decreased ACL. Suggestive associations were detected on all the chromosomes analysed in this Thesis. These QTLs showed effects on the percentage of type IIA (chromosome 1) and IIB (chromosomes 1 and 8), and the diameter of type IIB (chromosome 7) muscle fibres, the carcass length (chromosome 17) and weight (chromosomes 2 and 17), the pH at the

Longissimus muscle 24 hours post-mortem (chromosomes 1 and 3), the loin eye area (chromosome 4), the minolta parameters a (chromosomes 4, 7 and 8), b* (chromosome 8) and L* (chromosome 7), the backfat thickness (chromosomes 2, 7 and 8), the percentage of intramuscular fat (chromosome 16) the ham weight (chromosome 13) and the percentage of palmitic (chromosomes 6 and 12), palmitoleic (chromosome 2), stearic (chromosomes 6 and 7), oleic (chromosomes 4, 8 and 9), linoleic (chromosome 6), and vaccenic (chromosome 12) fatty acids and their metabolic ratios ACL (chromosomes 6 and 12) and PI (chromosomes 6 and 12).*

To evaluate the putative effect of mitochondrial DNA on fatness and growth traits in our population, we characterized an haplotype in Cytochrome B (CytB), composed by four SNPs, which determinates the european or asiatic origin of the maternal line of the animals. Because the segregation of the AI allele in the F₀ Landrace sows was low, we could not study the influence of this haplotype on the analysed traits. The characterization of the haplotypes was performed by Pyrosequencing, in five different pig breeds in order to determine the european or asiatic origin of their maternal lines. Two out of the four haplotypes that had been detected to time (Andersson, Personal Communication) have an european origin (EI and EII), and the other two types indicates an asiatic origin (AI and AII). Five Guadyerbas pigs from the Iberian breed (IB), five pigs from the Porc Negre de Mallorca breed (PN), 112 Landrace sows (LD), 43 Large White sows (LW) and 69 Pietrain sows (PT), were analysed. The commercial breeds (LD, LW and PT) showed a clear segregation of both european EI and asiatic AI types. Nine out of the ten pigs from the autochthonous breeds (IB and PN) were EI type and one PN showed a new haplotype, which sequence was apparently a mixture between EI and AI haplotypes.

To detect the possible candidate genes for the chromosome 4 effect on the linoleic percentage, we investigated the physiology of the genes that were located in the human genomic regions that share homology with the chromosomal position of the QTL (Hsap 1p2.2-q2.5 and Hsap 8q11.1-q24.3). This study suggested that the 2,4-Dienoyl CoA Reductase gene (DECR) (Hsap8q21.3) was a good candidate since it participates in the beta-oxidation of fatty acids. We designed two primers complementary to the conserved regions of the exon 2, between human and rat and we amplified this target in several F₀ individuals. The analysis of the sequences, showed a nucleotide polymorphism (G → C) that was associated to

an amino acidic substitution (Val → Leu). This polymorphism could be detected by PCR-RFLP by using the BfaI or MaeI endonucleases. After analysing all the individuals of the pedigree, we mapped the DECR in our linkage map. Due to the low polymorphism of the mutation in our population, the results showed two possible positions (between the microsatellites SW839 and S0214, or between S0001 and SW839), which LOD score was highly similar. The analysis in a RH panel confirmed the position between the markers S0001 and SW839. This position (68.3 cM) indicates that the fatty acids QTL lies in a close region (67-87 cM). Due to this low polymorphism the association analysis with the traits affected by this chromosome 4 fatness and fatty acids QTL could not be performed. At present, we are searching for other mutations than could segregate at a higher level in our population, and thus, allows us to perform an association analysis with these phenotypic traits.

The results showed in this Thesis are complementary to those detected in the rest of pig chromosomes, that were analysed by the Laboratory of the “Area de Genética y Mejora Animal” from CIT-INIA. These results pinpoint the identification and characterization of candidate genes in pigs, affecting important genes with effect on economic traits.