

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDIO DE LA BASE GENÉTICA DEL COLOR DE LA
CAPA Y APLICACIONES PRÁCTICAS EN PORCINO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

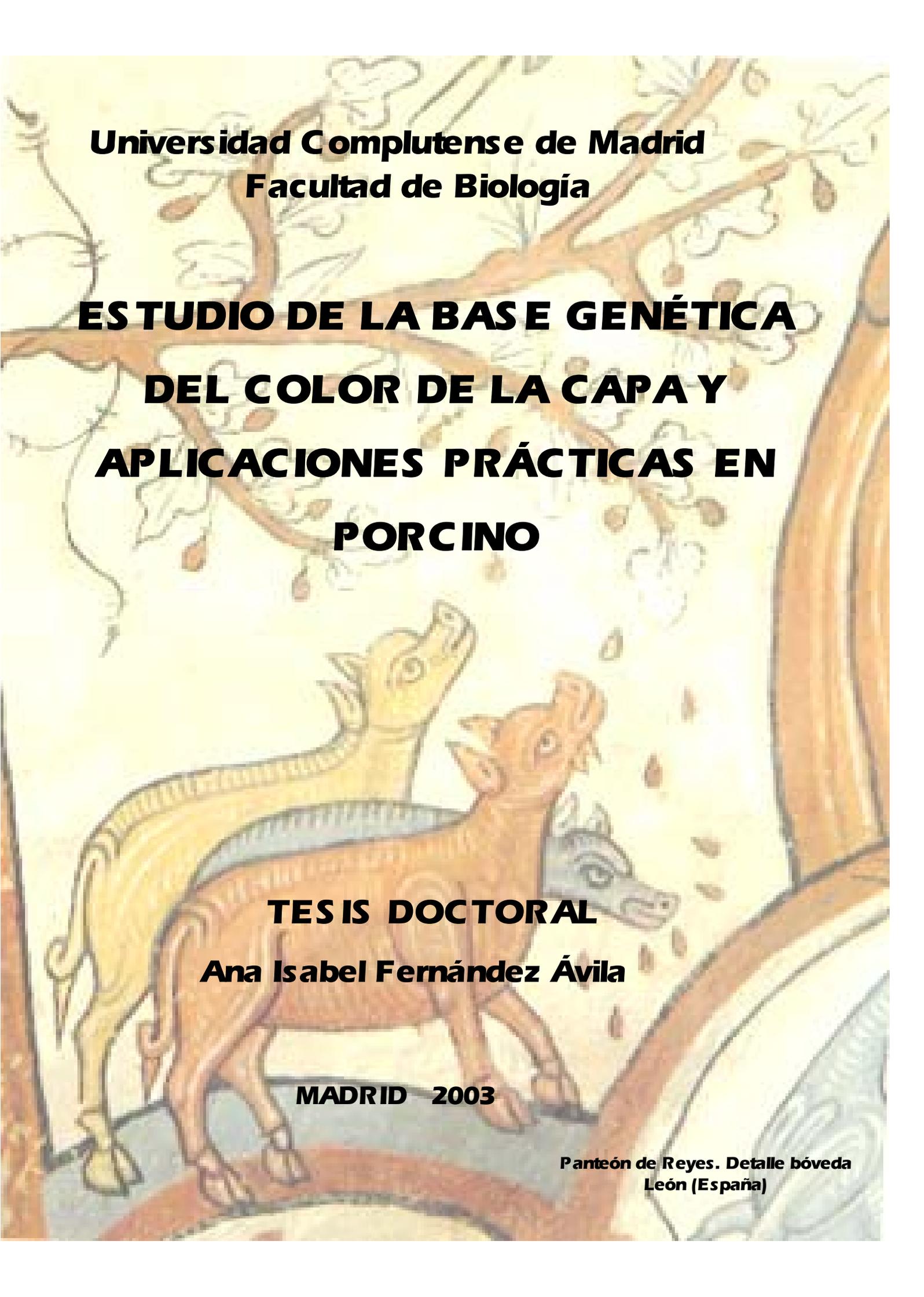
Ana Isabel Fernández Ávila

Bajo la dirección de la Doctora:

Cristina Óvilo Martín

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-1687-3



**Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Biología**

**ESTUDIO DE LA BASE GENÉTICA
DEL COLOR DE LA CAPA Y
APLICACIONES PRÁCTICAS EN
PORCINO**

**TESIS DOCTORAL
Ana Isabel Fernández Ávila**

MADRID 2003

**Panteón de Reyes. Detalle bóveda
León (España)**

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer muy sinceramente a la Dra. Cristina Óvilo, directora de esta tesis, su amistad, y toda su dedicación, esfuerzo y confianza depositada en mí para la realización de este trabajo.

Al Dr. Luís Silió y a la Dra. M^a Carmen Rodríguez, agradezco todo el apoyo, interés y ayuda prestada, principalmente en la obtención del material biológico, muy dificultoso en algunas ocasiones y en el análisis, interpretación de los datos y redacción de esta memoria.

Al Dr. Miguel Ángel Toro y a la Dra. Almudena Fernández agradecer su interés, apoyo y ayuda en la realización de este trabajo.

Al Dr. Armand Sánchez le agradezco la oportunidad de haber trabajado en su laboratorio, lo que ha permitido la realización de ciertas partes del trabajo que se presenta y por haberme permitido conocer a las personas que integran éste: Alex, Marcel, Anna, Josep María, Oriol, María, Neus, Óscar, Guillermo, Olga y Betlem.

Al Dr. Luis Varona, agradezco su ayuda en el análisis estadístico de parte de los datos que se presentan en esta memoria.

A Carmen Barragán, Carmina, Estefânia y Estela, agradezco toda la ayuda prestada en el trabajo realizado y presente en esta tesis, sus consejos y su amistad.

A Jorge y Nines les agradezco su disposición para ayudar en la base del trabajo de laboratorio, su simpatía y amistad.

A Gloria, última persona en integrarse en el laboratorio, agradezco principalmente su amistad y consejos, dentro y fuera del laboratorio y gracias por aguantarme.

Agradecimientos

A todo el personal de CIA Dehesón del Encinar agradezco la ayuda prestada en la obtención de las muestras de tejidos de animales ibéricos de las líneas Guadyervas y Torbiscal.

A Juan Altarriba, Joan Tibau, Selección Batallé, Mariano Señorón, Regino Díaz, AECERIBER y Sánchez Romero Carvajal Jabugo S.A., agradezco la colaboración recibida para la obtención de una gran parte de las muestras empleadas en este trabajo.

Al IRTA de Lérida, agradezco el suministro de las muestras del cruce ibérico x Landrace empleadas en este trabajo.

Por supuesto, agradezco a mis padres, hermanos y demás... todo su apoyo y comprensión, sobretodo cuando las cosas no han salido bien.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Mejora Genética Animal del INIA, gracias a una beca de la Comunidad de Madrid.

ÍNDICE

MC - DZ - I

	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
El color de la capa.....	1
Patrones de color de la capa en cerdo.....	2
Fisiología de la pigmentación de la capa.....	6
Genética del color de la capa.....	9
Estrategias de análisis.....	9
1. Análisis de la segregación fenotípica en cruces experimentales.....	9
2. Detección de loci para caracteres cuantitativos (QTL).....	10
3. Análisis del gen candidato.....	11
Genes mayores implicados en la regulación de síntesis de pigmentos.....	13
<i>Extensión- MC1R</i>	13
<i>Agouti</i>	19
<i>Pink</i>	21
<i>KIT</i>	22
Otros.....	25
Variedades de patrones del color en cerdo ibérico.....	26
Líneas Torbiscal y Guadyerbas.....	28
Marcadores moleculares.....	33
Aplicaciones.....	34
Trazabilidad del origen genético.....	34
Detección de QTL.....	36
Antecedentes en el experimento de detección de QTL en el cruce IB x LR.....	38
OBJETIVOS.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41

Animales	41
Métodos	43
	Página
I) Extracción de ácidos nucleicos	43
1. Extracción de ADN.....	43
2. Extracción de ARN.....	44
3. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	46
II) Métodos y técnicas comunes empleadas para el análisis	46
1. Diseño de oligonucleótidos.....	46
2. Confirmación del éxito de las reacciones de amplificación.....	47
3. Secuenciación.....	47
4. Edición, ensamblaje y alineamiento de secuencias.....	49
5. Búsqueda de significado y de dianas de restricción.....	50
6. Genotipado por análisis del tamaño de los fragmentos amplificados.....	50
7. PCR-RFLP.....	51
8. PCR-SSCP.....	52
9. PCR alelo-específica.....	52
10. Localización de un gen candidato.....	53
Localización física.....	53
Localización genética.....	54
I. ANÁLISIS DEL GEN <i>MC1R</i>	56
la. Búsqueda de polimorfismos mediante secuenciación	56
1. Secuenciación del ADN.....	56
2. Descripción de los haplotipos.....	59
Discusión de los resultados.....	62
lb. Análisis de la diversidad genética en poblaciones de cerdo ibérico	63
1. Genotipado de los haplotipos <i>MC1R</i> *1- <i>MC1R</i> *7.....	64
2. Genotipado del polimorfismo localizado en la posición 668 del gen.....	71

Discusión de los resultados.....	73
Página	
II. ANÁLISIS DEL GEN <i>AGOUTI</i>.....	79
Ila. Búsqueda de polimorfismos mediante secuenciación.....	79
Discusión de los resultados.....	81
Ilb. Análisis de la diversidad genética en poblaciones de cerdo ibérico.....	81
Discusión de los resultados.....	87
III. ANÁLISIS DEL GEN <i>PINK</i>.....	89
IIIa. Caracterización y búsqueda de polimorfismos mediante secuenciación.....	89
1. Secuenciación ADNc.....	89
1.1. RT- PCR.....	89
1.2. RACE.....	91
2. Secuenciación y búsqueda de polimorfismos en el intrón 9.....	94
Discusión de los resultados.....	97
IIIb. Diversidad genética en poblaciones de cerdo ibérico.....	99
Genotipado de polimorfismos.....	99
1. Polimorfismos en el ADNc.....	104
2. Polimorfismos en el intrón 9.....	118
Discusión de los resultados.....	122
IIIc. Localización del gen.....	126
1. Localización física.....	126
2. Localización genética.....	128
Discusión de los resultados.....	130
IV. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DEL EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES <i>MC1R</i> Y <i>PINK</i> Y DE SU INTERACCIÓN SOBRE EL COLOR DE LA CAPA.....	132
Antecedentes.....	132

1. Recogida de datos.....	132
	Página
2. Análisis estadístico.....	136
2.1. Asociación de los polimorfismos considerados individualmente.....	136
2.2. Asociación de la interacción de los polimorfismos <i>MC1R- Pink</i>	137
Discusión de los resultados.....	139
VI. APLICACIÓN DE LOS GENES <i>MC1R</i> Y <i>PINK</i> A LA VERIFICACIÓN DEL ORIGEN RACIAL DE ANIMALES IBÉRICOS Y SUS PRODUCTOS.....	143
Antecedentes.....	143
1. Genotipado de los marcadores en productos curados.....	144
2. Cálculo de la utilidad de un marcador racial.....	146
Discusión de los resultados.....	148
V. APLICACIÓN DEL GEN <i>MC1R</i> COMO MARCADOR GENÉTICO PARA EL MAPEO FINO DE QTL EN EL CROMOSOMA 6 PORCINO.....	152
Antecedentes.....	152
1. Localización genética del gen <i>MC1R</i>	153
2. Análisis de detección de QTL incorporando el gen <i>MC1R</i>	157
2.1. Análisis de detección de QTL univariante.....	157
2.2. Análisis de detección bivariante.....	160
Discusión de los resultados.....	164
DISCUSIÓN GENERAL.....	168
Material biológico.....	168
Interpretación de los polimorfismos detectados.....	169
Análisis de los genes <i>MC1R</i> , <i>Agouti</i> y <i>Pink</i>	170
Trazabilidad.....	172
Genes de color y QTL.....	173

Perspectivas.....	174
	Página
CONCLUSIONES.....	179
RESUMEN.....	182
BIBLIOGRAFÍA.....	187
ANEJO1. FOTOS DE CERDOS ANALIZADOS EN ESTE TRABAJO.....	207
ANEJO2. <i>MC1R</i>	209
Secuencia nucleotídica del gen <i>MC1R</i> porcino, parejas de oligonucleótidos.....	209
Secuencia aminoacídica de la proteína <i>MC1R</i> porcina, cambios aminoacídicos.....	211
Predicción de estructuras secundarias de las variantes de la proteína <i>MC1R</i>	212
Secuencias de oligonucleótidos.....	218
ANEJO3. <i>AGOUTI</i>	219
Secuencia nucleotídica del gen <i>Agouti</i> porcino, parejas de oligonucleótidos.....	219
Secuencia aminoacídica de la proteína <i>Agouti</i> porcina, cambios aminoacídicos.....	221
Predicción de estructuras secundarias de las variantes de la proteína <i>Agouti</i>	222
Secuencias de oligonucleótidos	223
ANEJO4. <i>PINK</i>	224
Secuencias nucleotídicas del gen <i>Pink</i> humano y ratón, parejas de oligonucleótidos empleados en la secuenciación del ADNc.....	224
Secuencia nucleotídica del ADNc del gen <i>Pink</i> porcino, polimorfismos y parejas de oligonucleótidos empleados en el genotipado.....	227
Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las variantes de la proteína <i>P</i> detectadas.....	228

Predicción de estructuras secundarias de las variantes de la proteína P.....231

Página

Secuencia nucleotídica del intrón 9 del gen *Pink* porcino, polimorfismos y parejas de oligonucleótidos empleados para la secuenciación y genotipado.....243

PCR alelo- específica para el polimorfismo del intrón 9, parejas de oligonucleótidos.....244

Secuencias de oligonucleótidos.....245

ÍNDICE FIGURAS247

ÍNDICE TABLAS251

INTRODUCCIÓN

—ZT—KQASJ—0Z

EL COLOR DE LA CAPA

El color de la capa es un carácter sencillo en cuanto a su apreciación en los animales, cuyas diferencias se han utilizado tradicionalmente para la diferenciación entre individuos, razas o especies. A su vez, ha servido como sistema modelo para entender aspectos básicos relevantes en la biología del desarrollo de otros caracteres.

La supervivencia, incluyendo la adaptación al medio (temperatura, exposición al sol, capacidad de atracción hacia una presa, defensa ante un predador) y reproducción (capacidad para atraer a una pareja reproductora), han favorecido las diferencias de color de capa en las especies de animales silvestres. Pero, en los animales domésticos un hecho fundamental en la variación de los patrones de color, han sido y son los criterios de selección según las preferencias de los mejoradores. Así, uno de los criterios que tradicionalmente se valora en el establecimiento de las razas animales es el color de la capa.

A pesar de su sencilla apreciación, la base genética del color de la capa es compleja, presentando aspectos cuantitativos y cualitativos. Se han descrito múltiples genes que lo influyen, tanto en la especie humana como en diversas especies animales.

El ratón y la rata son las principales especies objeto de estudio de la genética del color de la capa. Recientemente se ha incluido el estudio en la especie humana debido a su interés patológico; y por otra parte el número de estudios moleculares sobre la variación del color en animales domésticos también se ha desarrollado rápidamente.

Los primeros estudios sobre la genética del color de la capa en mamíferos se realizaron durante la primera mitad del siglo XX por Wright (1918). A éste siguieron otros trabajos, principalmente en porcino (Wentworth y Lush, 1923; Kosswing y Ossent 1932, 1934 y Smith et al., 1939). En esta especie el mayor número de datos experimentales ha sido aportado por Hetzer desde 1945 hasta 1954. Posteriormente, se han realizado pocos estudios sobre la genética del color de la capa excepto los trabajos de Searle en 1968 donde se discute la posible homología entre los genes que determinan el color de la capa en cerdo y otras especies de mamíferos; y de Ollivier y Sellier en 1982 que publican una revisión sobre la genética del cerdo donde se incluye

un capítulo sobre el color de la capa. En este periodo de tiempo muchas de las observaciones referentes al color de la capa han sido observaciones secundarias derivadas de experimentos donde se estudiaba caracteres de interés económico en cerdo, tales como crecimiento, composición de la canal y caracteres reproductivos. Además, en estos trabajos el tamaño de las muestras es reducido lo que no permite establecer conclusiones precisas.

Recientemente se ha renovado el interés en este tema y se han producido importantes avances en el conocimiento de la base molecular de este carácter principalmente porque se considera que los genes que determinan el color de la capa son posibles marcadores que pueden sumarse a otros existentes en problemas de identificación (Legault, 1998).

PATRONES DE COLOR EN EL CERDO

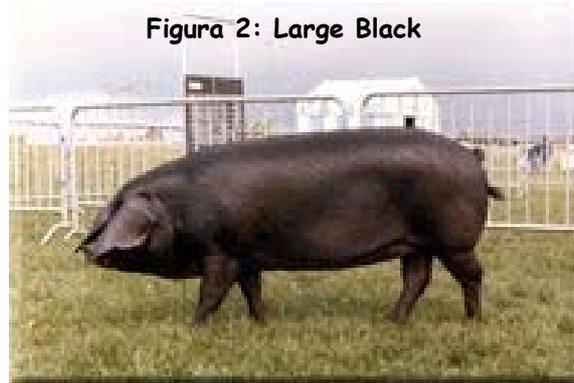
El color de la capa y pelo en cerdo han sido utilizados tradicionalmente como criterio para el establecimiento de razas más homogéneas en cuanto a su apariencia.

De acuerdo con Legault (1998), los patrones de color de la capa establecidos en cerdo son:

Color silvestre, presente en jabalí (Figura 1), se caracteriza por una banda subterminal amarilla con pelo oscuro que va variando su intensidad dependiendo de la región corporal. En el nacimiento muestran unas tiras longitudinales que gradualmente van desapareciendo a lo largo de su vida. Esto también ocurre en algunas razas domésticas, como en Mangalitza y Duroc. Este patrón está presente a muy baja frecuencia en cerdo doméstico.



Negro uniforme, es el patrón de color más común en numerosas razas nativas de China , como la raza Jiaxing y Vietnam. Segrega a alta frecuencia en poblaciones ibérica, africana y criolla caribeña. El tipo modelo lo presentan las razas Large Black (Figura 2), French Gascon, German Cornwall y variedades negras de cerdo Ibérico.



Colorado uniforme, es común en poblaciones nativas mediterráneas, y en poblaciones nativas americanas y africanas de origen Ibérico, sin embargo está ausente en razas asiáticas. Está presente en las razas Duroc, Tamworth (Figura 3), Minnesota e Ibérico (retinto, rubio y colorado).



A continuación se describen los patrones de color en los que se da una mezcla de pigmentación:

Domino, manchas negras, se le dio el término "domino" (Lauvergne y Canope, 1979) por aparecer un gran número de manchas negras con un tamaño irregular y repartidas por todo el cuerpo, excepto en las extremidades, cuello y extremo del rabo. Generalmente ocurre cuando existe un fondo genético blanco, pero también puede aparecer en un fondo genético colorado mezclado con blanco. Aparece en las razas Spotted Poland China, Gloucester Old Spot, Pietrain (Figura 4), Polish Zlotnika y en razas nativas de Europa central.

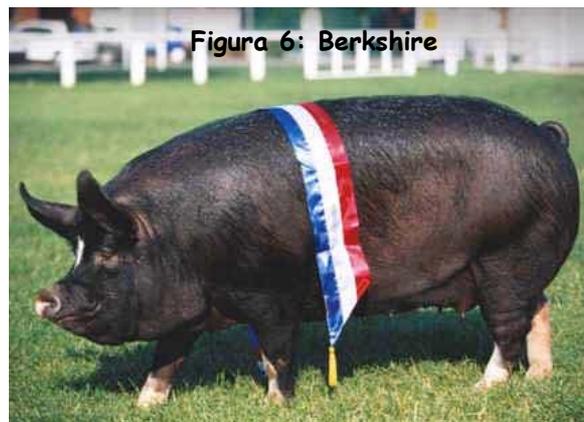


Moteado Dálmata, término que se emplea cuando aparece un gran número de manchas negras pequeñas en un fondo genético colorado, surge como consecuencia de los cruces Piétrain x Duroc y Piétrain x Minnesota.

Piebaldismo negro y colorado, es un patrón opuesto al "domino", presentando unas pocas manchas negras o coloradas pero grandes, localizadas en principio en la cabeza y en el lomo y manchas intermedias al final de la espalda. Puede aparecer como una mancha negra con cabeza negra (como en las razas nativas francesas Limousine y Vasca, y en sus cruces con las razas chinas Meishan y Jinhua), mancha negra con marcas blancas en la cabeza, (como en razas chinas o Hereford), cincha blanca, (como en Hampshire (Figura 5), Essex y Wessex British con fondo genético negro o como en Bavarian Landschwein con fondo genético colorado). Éste último patrón puede confundirse con otros patrones cuando el área blanca es grande como en el caso de la raza china Jinhua.



Negro con puntos blancos, es un patrón de capa negro uniforme a excepción de seis puntos blancos (morro, rabo y patas). Este patrón aparece en las razas Berkshire (Figura 6) y Poland-China, una excepción es el caso de la raza Meishan que sólo tiene cuatro de estas manchas localizadas en las extremidades.



El último patrón corresponde a la inhibición del pigmento:

Blanco, existen dos tipos, uno donde la piel es blanca, como es el caso de las razas Large White, Landrace (Figura 7) y otras europeas; y blanco "sucio" con la piel pigmentada como ocurre en la raza Mangalitza (Figura 8).



Figura 7: Landrace



Figura 8: Mangalitzka

Ocasionalmente han aparecido colores no habituales en la capa de algunos cerdos: pelo sepia, capa color sepia con mezcla de bandas de pelo de color blanco y oscuro, canoso (mezcla de pelo blancos y negros), color azul (pelo blanco sobre piel negra) (Legault, 1998).

FISIOLOGÍA DE LA PIGMENTACIÓN DE LA CAPA

Existen dos aspectos fundamentales en la fisiología de la pigmentación de la capa, por un lado la regulación de la síntesis de los pigmentos y por otro el desarrollo y distribución de las células productoras de dichos pigmentos, los melanocitos.

El fenotipo albino existe tanto en aves como en reptiles y mamíferos, incluyendo especies domésticas, y se caracteriza por la ausencia de pigmento en la piel, pelo y ojos, pudiendo tener consecuencias negativas para su supervivencia, llegando en algunos casos a ser letal. Este fenotipo puede ser consecuencia de dos hechos diferentes, bien que no exista síntesis de pigmentos en los melanocitos, por bloqueo en la ruta de síntesis del pigmento o bien que no existan melanocitos, por bloqueo en el desarrollo/migración de los mismos.

Regulación de la síntesis de pigmentos:

Las células de la cresta neural en el embrión son el origen de los melanocitos, células responsables de la síntesis de los pigmentos que dan el color de la capa y el pelo.

El pigmento responsable de la coloración de la capa y pelo en mamíferos es la melanina. La melanina (de mélas, negro) es un pigmento intracelular, que al

microscopio de luz se presenta en forma de pequeños gránulos. El color varía del amarillo al negro.

Las principales funciones de la melanina son dos, por un lado la protección frente a radiaciones, particularmente radiación ultravioleta y por otro lado el poder de captación de radicales citotóxicos. Además, los melanoblastos (células precursoras de los melanocitos), participan en la inducción de la diferenciación de ciertos tipos celulares (neuronas sensoriales y simpáticas, células cromafines de la médula adrenal, glía y células de Schwann).

Los melanocitos se originan en la cresta neural, de la cual, en forma de melanoblastos migran a tres sitios: a la piel (epidermis y bulbos pilosos), al ojo (coroides, iris y retina) y a la membrana aracnoides (membrana que envuelve el encéfalo y médula espinal).

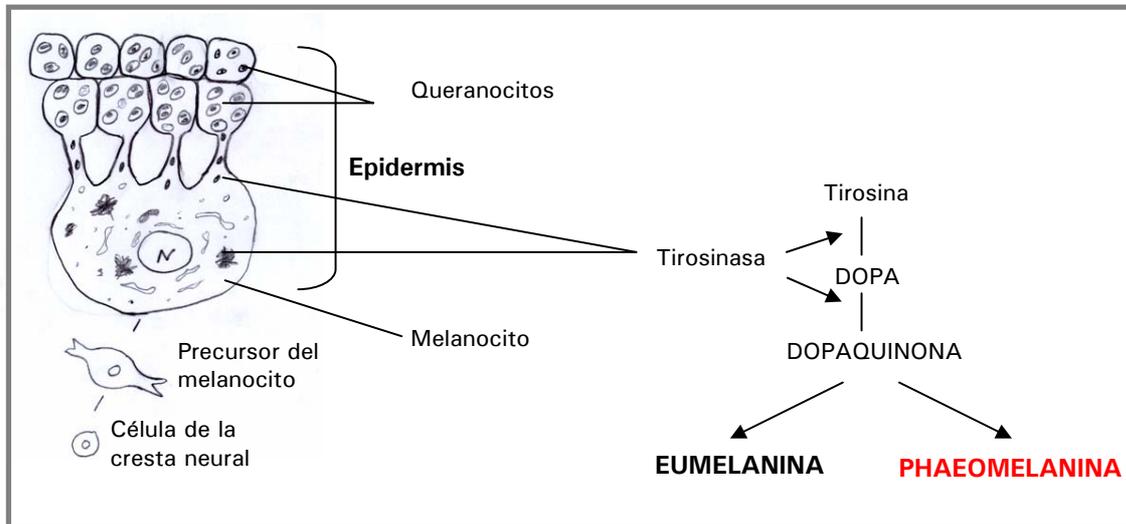
La melanina se produce en los melanosomas (orgánulos celulares especializados), a partir de la tirosina. En el proceso de biosíntesis (Figura 9), la reacción crítica es la conversión de la tirosina en DOPA (3,4-hidroxifenilalanina) por hidroxilación, paso que es catalizado por la enzima tirosinasa. Esta reacción es muy lenta en ausencia de esta enzima.

El melanosoma pasa por diversos estadios a lo largo de la cadena de reacciones que terminan generando la melanina (melanosoma IV). Los melanocitos secretan los gránulos de melanina, que son fagocitados por los queranocitos, que los degradan y redistribuyen. La melanina también es transferida a la dermis, donde es captada por macrófagos (melanofágos).

Químicamente hay dos tipos básicos de melanina: la eumelanina, (marrón - negra), y la phaeomelanina, (amarilla - rojiza). La síntesis de esta última depende principalmente de la presencia de grupos sulfidrilos después de la producción de dopaquinona.

Por tanto el color de la capa depende fundamentalmente del tipo de melanina y de la cantidad y distribución de los corpúsculos de melanina en las capas superficiales de la epidermis.

Figura 9: Esquema del proceso de biosíntesis de los principales pigmentos en mamíferos



El principal sistema regulador conocido de síntesis de pigmentos es la interacción molecular entre el receptor de la melanocortina o receptor de la hormona estimulante de los melanocitos (MC1R o MSH-R), la proteína G acoplada y la proteína Agouti. La unión de la hormona estimulante de melanocitos (MSH) al MC1R estimula al enzima tirosinasa que a su vez eleva los niveles de AMPc y lleva a la activación de una cascada de protein-quinosas dependientes de AMPc, favoreciendo la ruta metabólica de síntesis de eumelanina (pigmento negro-marrón), mientras que la unión del péptido antagonista Agouti, secretado por células adyacentes a los melanocitos, inhibe la señal de transducción, por bloqueo de la acción melanocortina del MC1R, y se ve favorecida la ruta alternativa de síntesis de phaeomelanina (pigmento rojo-amarillo).

Distribución de los melanocitos

La migración y diferenciación de los melanoblastos en melanocitos son los factores responsables de los fenotipos moteado y cinchado que aparecen en muchas especies de mamíferos.

Las células de la cresta neural en el embrión sufren una migración dorsolateral y tras formarse la epidermis se diferencian los melanocitos, proliferan y son estimulados para la melanización.

La función del receptor tirosinasa es la transducción de las señales extracelulares asociadas a la proliferación celular, supervivencia y diferenciación de los melanocitos y sus precursores, de forma que alteraciones en esta proteína o en enzimas reguladoras pueden generar deficiencias en la migración y/o maduración de los melanocitos. Este receptor, denominado c-kit, juega por tanto un papel muy importante junto con su ligando en patrones de color anormales, afectando a la supervivencia de los melanocitos.

Los patrones de color de capa en los que aparece una o varias manchas también pueden surgir como consecuencia de un proceso de reversión somática. Este fenómeno consiste en la recuperación de genotipo silvestre para determinado gen en una célula somática precursora (Kijas et al., 2001).

En la ruta metabólica de biosíntesis y distribución de pigmentos hay implicados múltiples factores de transcripción (factor de transcripción SP1, MITF), proteínas relacionadas con la tirosinasa (TRP-1 y TRP-2), protein-quinasas activadas por el aumento de AMPc intracelular (proteína P, producto del gen *Pink*), o proteínas que facilitan las interacciones proteicas (atractinas).

GENÉTICA DEL COLOR DE LA CAPA

ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS

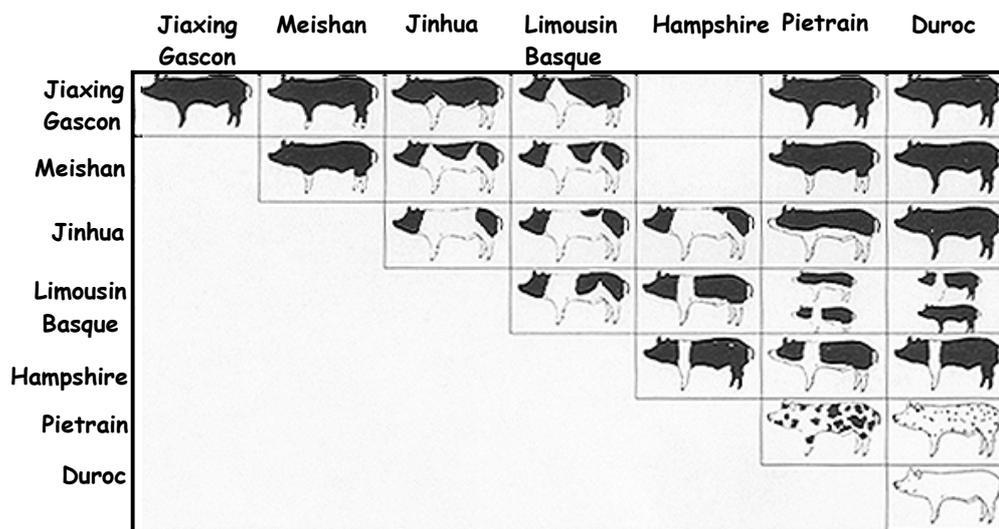
1. Análisis de la segregación fenotípica en cruces experimentales

Los estudios clásicos del color de la capa se basan en el análisis de la segregación de cruces experimentales como se muestra en la Figura 10. Para ello se analiza la segregación fenotípica obtenida en el cruzamiento de líneas que presentan fenotipos extremos para este carácter de forma que se establecen los posibles loci que regularían este carácter y sus alelos.

Un ejemplo son los trabajos de Bidanel et al. (1989) y Legault (1998) donde establecen el alelismo existente entre *E* y *E^P* (locus *Extension*), al observar el fenotipo

de la descendencia obtenida en cruces entre las razas Meishan, Large White y Pietrain.

Figura 10: Patrones de color de capa en algunas razas puras y sus cruces.



2. Detección de loci con efectos sobre caracteres cuantitativos

En el estudio de caracteres de importancia económica en animales se asume un modelo en el que estos caracteres están controlados por un número infinito de genes cada uno con un efecto infinitesimal. Esta asunción permite explicar la variación continua de este carácter como consecuencia del efecto acumulativo de muchos genes mendelianos cada uno con un efecto pequeño sobre el carácter y del efecto ambiental. Estos genes son los denominados QTL (Quantitative Trait Loci).

El color de la capa puede ser tratado como un carácter cuantitativo, es decir, con variación continua, al ser medido como cantidad y distribución de pigmento y pueden, por tanto, realizarse estudios de detección de QTL para determinar la posición de los loci relacionados con estos caracteres.

La estrategia seguida consiste en provocar la segregación de los genes que influyen en los caracteres de interés y de una serie de marcadores moleculares (secuencias de ADN polimórficas que indican posiciones específicas del genoma), en

cruces en los que existe un desequilibrio de ligamiento entre los marcadores y los QTL, para detectar asociaciones estadísticas entre el valor del carácter y el genotipo del marcador. La existencia de asociaciones significativas entre la herencia de una región cromosómica y la variación del carácter, indicaría por tanto que en esa región deberá existir un gen o varios genes que afecten a la variación de dicho carácter.

Así, en una publicación reciente (Hirooka et al. 2002), en el análisis de un cruce entre la raza Meishan y líneas porcinas comerciales holandesas, se determina la existencia de dos QTL para el carácter color de capa en los cromosomas 6 y 8. También se detecta un QTL adicional en el cromosoma 5 que afectaría exclusivamente al color blanco y dos nuevos QTL que afectarían al color negro en el cromosoma 2.

Esta estrategia conduce a la localización de regiones cromosómicas donde se supone la existencia de un gen o genes que afectan a la variación de un carácter, pero no a la identificación del gen en particular.

3. Estrategia del gen candidato

Gen candidato biológico para el carácter color de la capa es aquel cuya función biológica puede relacionarse con la fisiología de este carácter.

Gen candidato posicional para el carácter color de la capa es aquel que por su supuesta localización puede ser responsable de la variación fenotípica observada en este carácter, en base a resultados de estudios previos de detección de QTL.

La estrategia del gen candidato consiste en centrar el trabajo en aquellos genes conocidos y cuya función biológica esta relacionada con el carácter color de la capa y por tanto hace sospechar que su variación genética puede ser la causa de los distintos patrones de color o de alguno de sus aspectos (distribución o tipo de pigmento). Esta estrategia puede hacer uso de la información derivada del mapa genético de la especie en estudio (porcino) o bien de los análisis genómicos de especies modelo (humano y ratón), mediante el mapeo comparativo.

El mapeo comparativo se basa en la observación de que los genes y su organización dentro de los cromosomas en grupos de genes estrechamente ligados en

unas especies tienden a estarlo en otras y la probabilidad de que el ligamiento o sintenia se conserve o se rompa depende de las reordenaciones cromosómicas que se produjesen durante la divergencia de las especies, es decir, durante la evolución (Nadeau, 1998).

Las especies más relacionadas generalmente presentan un mayor grado de conservación genómica, de forma que se puede establecer la localización cromosómica de genes homólogos en distintas especies, pudiendo identificar y alinear los segmentos cromosómicos correspondientes.

Los mapas cromosómicos permiten encontrar posibles genes candidatos a partir de genes ya descritos en otras especies, principalmente humano, por lo que el progreso llevado a cabo en el análisis del genoma humano proporciona una importante fuente de información para el estudio genético en especies domésticas.

Análisis de la secuencia nucleotídica/aminoacídica del gen candidato

Al analizar un gen candidato para determinado carácter se busca qué posibles mutaciones en la secuencia de éste podrían ser las responsables de la aparición de determinado fenotipo, por la implicación que esta mutación pueda tener en la fisiología de la proteína que codifica.

Tanto las mutaciones puntuales como las grandes mutaciones tipo sustituciones, deleciones, inserciones o duplicaciones en un determinado gen (incluyendo regiones promotoras y reguladoras), pueden generar un cambio en la composición aminoacídica de la proteína, provocar fenómenos de splicing alternativo, o bien originar la aparición de codon stop, provocando cambios en la estructura y funcionalidad de la proteína, lo cual puede tener un papel importante o fundamental en el proceso fisiológico en el que participa.

Este tipo de estrategia consiste por lo tanto en la búsqueda de polimorfismos en la secuencia nucleotídica de un gen candidato. Puede tratarse de un gen ya localizado y caracterizado total o parcialmente, o bien de un gen no descrito anteriormente en la especie objeto de estudio pero descrita en especies próximas.

Cuando se analiza un gen ya descrito anteriormente el procedimiento habitual consiste en buscar mediante secuenciación de ADN nuevas mutaciones que puedan

estar asociadas al fenotipo que presenten las muestras disponibles, o bien analizar las mutaciones ya descritas y determinar la asociación, si es que existe, con el carácter estudiado.

Cuando se analiza un gen no descrito en la especie a estudiar, el primer paso consiste en recurrir al mapeo comparativo, de forma que partiendo de la secuencia nucleotídica del gen en otra especie se puede llegar a secuenciar este gen, por la generación de oligonucleótidos degenerados o por la búsqueda de regiones conservadas, y realizar un análisis comparativo posterior y determinar su localización. De esta forma Kim et al. (2000) realizan la caracterización de un fragmento del gen *Agouti* en cerdo, mediante el diseño de oligonucleótidos en las regiones más conservadas entre las secuencias del gen disponibles en ratón y vaca. Everts et al. (2000) siguen la misma estrategia para la caracterización completa del gen *MC1R* canino, usando oligonucleótidos basados en la secuencia del gen disponible en zorro.

Un aspecto fundamental en la caracterización de un nuevo gen en determinada especie es su localización física y genética, basada en técnicas moleculares, citogenéticas o de análisis de ligamiento.

GENES MAYORES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PIGMENTOS

Extension y *Agouti* son los principales loci que regulan el proceso de biosíntesis de estos pigmentos. Estos loci, descritos en los años 70, codifican para el receptor de la melanocortina y para su antagonista, la proteína Agouti, respectivamente.

Extension- MC1R

En todas las especies de animales domésticos la síntesis del pigmento negro dominante está asociado con el locus *Extension*. Se han propuesto diferentes alelos para este locus, por análisis de segregación de patrones de color de la capa, y en los últimos años se ha tratado de identificar las mutaciones responsables no sólo del color negro dominante, sino también responsables de los patrones de color de capa marrón, colorado, negro y blanco.

En el locus *Extension* hay un gran número de alelos descritos molecularmente tanto en humano como en ratón (Robbins et al. 1993) y en especies domésticas,

principalmente en vacuno (Klungland et al. 1995), caballo (Marklund et al. 1996), perro (Newton et al. 2000) y gallina (Takeuchi et al. 1996). Estos alelos se caracterizan por diferentes polimorfismos, incluyendo sustituciones de un solo nucleótido, deleciones e inserciones de uno o más nucleótidos. Este gen se localiza en el cromosoma 16q24.3 humano, en el cromosoma 8 de ratón y en ganado vacuno se ha localizado en el cromosoma 16.

Los estudios clásicos del color de la capa en porcino se basan en el análisis de la segregación de cruces experimentales, es decir, el análisis de la segregación obtenida en cruzamientos entre razas que presentan fenotipos diferentes tanto para el color de la capa como para la distribución de los pigmentos. De esta forma se estableció la nomenclatura de Hetzer (1945) para el locus *Extension*, sugiriéndose la presencia de cuatro alelos, el alelo E^+ que corresponde al alelo silvestre, el alelo E designado para el fenotipo negro dominante, el alelo E^p para el fenotipo en el que aparecían manchas negras y el alelo e para el fenotipo colorado uniforme. El alelismo existente se confirmó por el análisis de segregación de cruces experimentales (razas implicadas en los cruzamientos en la tabla 1) y se determinó el orden de dominancia $E/E^p/e$. Por otro lado Kosswig y Ossent (1931) distinguen entre el negro correspondiente al alelo E presente en Large Black y negro dominante (Tabla 2), correspondiente a un nuevo alelo denominado E^d presente en Hampshire, estableciendo el orden de dominancia $E^d/E/E^p/e$.

Tabla 1: Alelos descritos por análisis de segregación para el locus *Extension* (Hetzer)

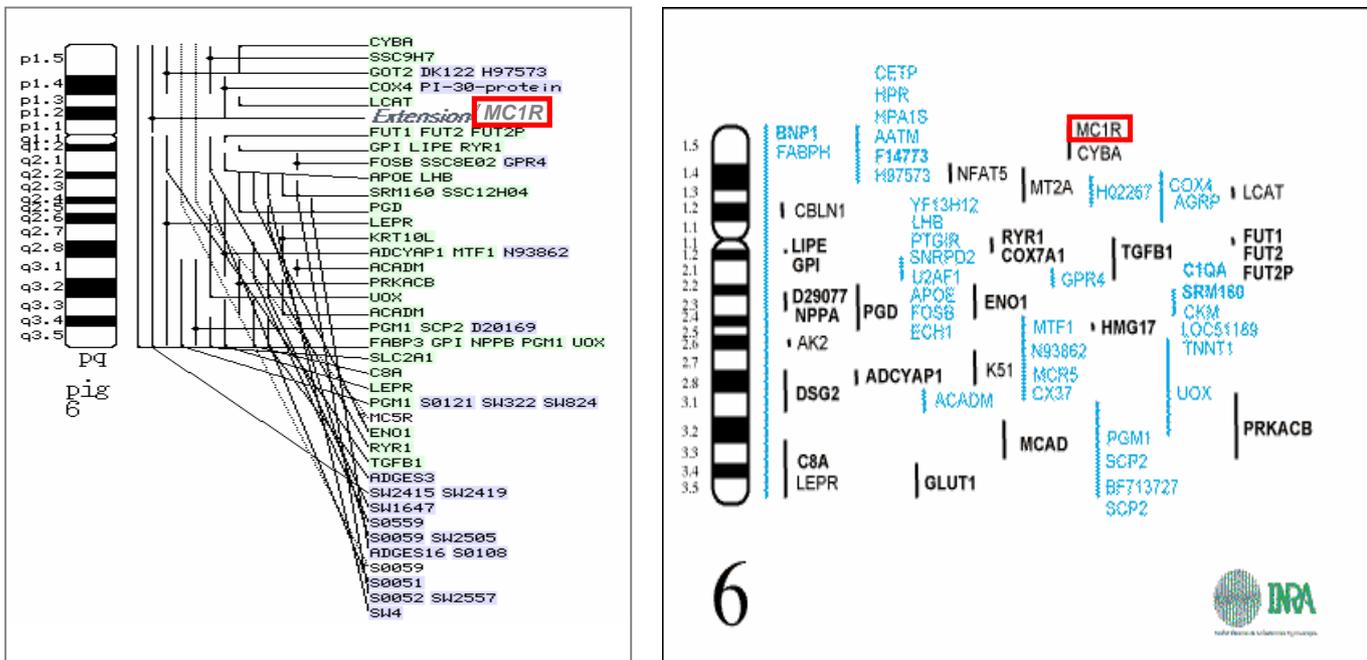
Hetzer (1945)	Fenotipo	Razas implicadas en los cruces	Autores del análisis de los cruces
E	negro uniforme	Hampshire Bavarian Duroc Cornwall Minnesota	Kronacher, 1942 Bushnell, 1943 Rempel y Marshall, 1946
E^p	manchas negras	Berkshire Large Black Cornwall	Carr-Saunders, 1922 Kosswig y Ossent, 1931
E	uniforme colorado	Meishan Piétrain Large White Poland-China Berkshire	Hetzer, 1945

Tabla 2: Diferenciación de los alelos determinantes del color para el locus *Extension*

Kosswig y Ossent (1931)	Fenotipo	Razas
E	negro	Cornwall Large Black
E ^d	negro dominante	Hannover-Breunschweig Hampshire

El gen *MC1R* fue analizado molecularmente como gen candidato para el locus *Extension* en cerdo, confirmándose su equivalencia (Kijas et al. 1998). Esto fue previamente sugerido en el trabajo de Mariani et al. (1996) donde se localizaba al locus *MC1R* en el brazo corto del cromosoma 6 de cerdo (Figura 11) y compartía homología con el locus *Extension* en ratón y vacuno. Esta información permitió establecer que éste era el gen para el receptor de la hormona estimulante de melanocito (*MSHR*).

Figura 11: Mapas de ligamiento y citogenéticos del SSC6



El gen *MC1R* porcino está constituido por un único exón de 950 pb y codifica una proteína de 320 aminoácidos que contiene 7 dominios transmembrana imprescindibles en su función melanocortina.

En un primer estudio molecular en porcino (Kijas et al. 1998) se analizó un fragmento de 758 pb del exón, a través de amplificación por PCR y secuenciación, en animales representativos de patrones de color silvestre (Jabalí europeo), negro (Large Black y Meishan), blanco (Large White), colorado (Duroc), blanco con manchas negras (Pietrain) y negro con manchas blancas (Hampshire); encontrando cuatro alelos distintos (Tabla 3) correspondientes a los cuatro descritos para el locus *Extension*.

Alelo *MC1R**1, corresponde a la secuencia del jabalí europeo, necesaria para la expresión del color silvestre, tomada como referencia.

Alelo *MC1R**2, presenta cuatro mutaciones respecto a la secuencia silvestre, dos de ellas no producen ninguna alteración en la secuencia aminoacídica, localizadas en los tripletes 118 y 240 del gen. La mutación localizada en posición 92, V92M, produce un cambio de Valina a Metionina, aunque no se relaciona con ningún cambio en la funcionalidad de la proteína. Sin embargo, la mutación localizada en posición 99 de la secuencia (L99P) provoca una sustitución de una Leucina por Prolina, cambio que sucede en otras especies de mamíferos, provocando una activación constitutiva del receptor lo que lleva a la síntesis de eumelanina, que resulta en el color negro de la capa.

Alelo *MC1R**3 contiene una mutación respecto a la secuencia silvestre, en el triplete 121 del gen, D121N, produciendo un cambio aminoacídico de ácido Aspártico a Asparagina. Esta ruptura en la unión por puentes de hidrógeno entre los residuos de aspártico hace que sólo este presente la forma activa del receptor.

Alelo *MC1R**4 presenta dos mutaciones respecto a la secuencia silvestre, A161V y A240T. Ambas conllevan cambio aminoacídico y aunque no se han realizado estudios funcionales, Kijas et al. (1998) proponen esta segunda mutación como candidata para provocar la inactivación del receptor, basándose en el hecho de que ésta se localiza en el dominio transmembrana 6, altamente conservado en muchas especies de mamíferos.

Por otro lado, respecto a la asociación de los alelos encontrados en el gen *MC1R* y los descritos para el locus *Extension* (Tabla 4), los autores propusieron que el alelo *MC1R*1* sería el asignado para el alelo E^+ del locus *Extension*, el alelo *MC1R*4* para el alelo *e* y dentro del fenotipo negro dominante se proponen dos alelos, el alelo E^{D1} y E^{D2} , que se corresponden con los alelos *MC1R*2* y *MC1R*3*, respectivamente. Este último sería compartido con E^P , concluyendo que debería de existir otra mutación causante de este fenotipo manchado localizada en otra posición del exón.

Tabla 3 : Mutaciones detectadas en el análisis de la secuencia de 758 pb del exón del gen *MC1R* (Kijas et al., 1998)

codon	92	99	118	119	120	121	161	239	240
MC1R*1	GTG	CTG	AAT	GTC	ATG	GAC	GCG	GGC	GCG
MC1R*2	ATG	CCG	AAC	GTC	ATG	GAC	GCG	GGC	GCA
MC1R*3	GTG	CTG	AAT	GTC	ATG	AAC	GCG	GGC	GCG
MC1R*4	GTG	CTG	AAT	GTC	ATG	GAC	GTG	GGC	ACG

Tabla 4 : Alelos descritos para el Locus *Extension* y sus correspondientes en el gen *MC1R* en las distintas razas porcinas analizadas (Kijas et al., 1998)

Alelo MC1R	Alelo Extension	Fenotipo	Animales
MC1R*1	E^+	Silvestre	Jabalí europeo
MC1R*2	E^{D1}	Negro	Meishan
MC1R*3	{ E^{D2} E^P	Negro manchas blancas Blanco manchas negras /Blanco	Hampshire Pietrain/Large White
MC1R*4	<i>e</i>	Colorado	Duroc

Un trabajo posterior (Giuffra et al. 2000), con el objetivo de establecer relaciones filogenéticas entre diversas razas porcinas, describió en jabalí japonés la presencia de un nuevo alelo para el gen *MC1R*, que contiene una mutación

compartida con el alelo *MC1R*2* y no produce ningún cambio en la secuencia aminoacídica, denominado *MC1R*5* (Tabla 5).

Tabla 5 : Nueva mutación descrita para el alelo *MC1R*5*, comparada con los alelos *MC1R*1* y *MC1R*2* (Giuffra et al., 2000)

	codon	92	99	118	119	120	121	161	239	240
Jabalí europeo	<i>MC1R*1</i>	GTG	CTG	AAT	GTC	ATG	GAC	GCG	GGC	GCG
Meishan/Large Black	<i>MC1R*2</i>	ATG	CCG	AAC	GTC	ATG	GAC	GCG	GGC	GCA
Jabalí japonés	<i>MC1R*5</i>	GTG	CTG	AAC	GTC	ATG	GAC	GCG	GGC	GCG

Posteriormente Kijas et al. (2001) realizaron un trabajo en el que analizaron por PCR y posterior secuenciación toda la secuencia del exón del gen *MC1R*, en distintas razas porcinas, incluyendo fenotipo silvestre (jabalí japonés, jabalí europeo), negro (Meishan y Berkshire), blanco (Yorkshire y Landrace), colorado (Duroc, Tamworth), negro con cincha blanca (Hampshire), blanco con manchas negras (Pietrain y Gloucester Old Spot), colorado con manchas negras (Linderöd) y colorado con cincha blanca (Hereford).

En este trabajo se describe la existencia de un nuevo alelo, *MC1R*6*, en animales de las razas coloradas Tamworth y Hereford, blancas Landrace y Yorkshire y moteadas Pietrain y Gloucester Old Spot, que resulta de la inserción de 2 citosinas en el nucleótido 67, nt67insCC, lo que provoca la aparición de un codon stop que impide la síntesis del receptor, por lo que sólo existe síntesis del pigmento phaeomelanina, dando el color colorado o blanco a estas razas, sin embargo este fenómeno no determina el fenotipo manchado.

En este mismo trabajo describen cómo en animales con manchas negras, que presentan esta inserción en homocigosis, al analizar el ARN extraído de piel de estas regiones manchadas, se observa que se ha producido una reversión somática, de forma que se ha eliminado esta inserción y se ha restablecido el fenotipo con color. Por otro lado, el análisis de ARN de piel de Berkshire (capa negra uniforme) que también presenta un genotipo con la inserción en homocigosis, muestra reversión

somática, y es debido a fenómenos de selección el hecho de que el fenotipo con manchas se haya extendido hasta llegar a ser negro uniforme.

Estos trabajos han aportado una información relevante sobre el papel de las mutaciones detectadas en el gen *MC1R* en el determinismo del color de la capa en cerdo.

Agouti

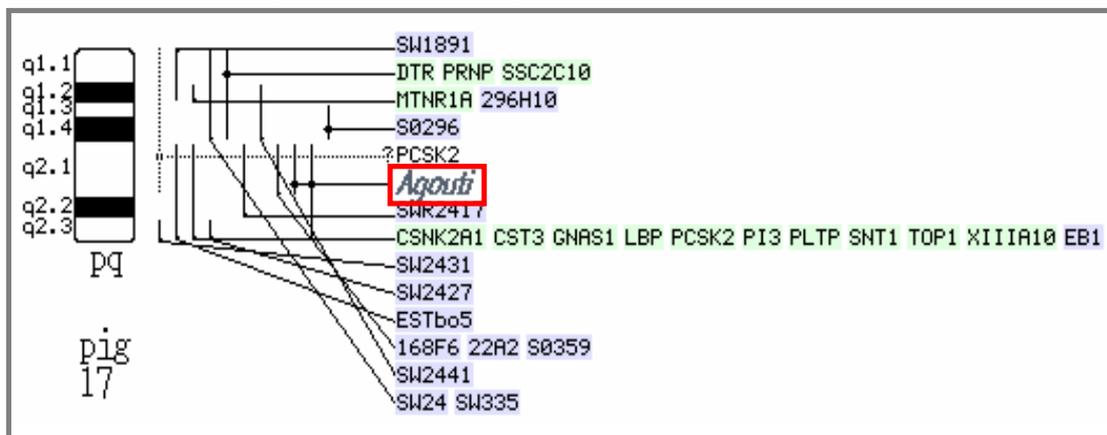
El locus *Agouti* tiene una organización genómica más compleja, estando constituido por cuatro exones de los cuales solo tres de ellos son codificantes. Hay descritos múltiples alelos dominantes, codominantes y recesivos para este locus en ratón (Bultman et al., 1992; 1994; Siracusa, 1991; 1994; Michaud et al., 1994; Hustad et al., 1995) y humano (Kwon et al., 1994), incluyéndose grandes inserciones, deleciones y aparición de exones adicionales que conllevan a la formación de transcritos alternativos. Para otras especies domésticas no hay descrito previamente ningún polimorfismo.

Aparte de su relación con la pigmentación, otros efectos asociados a este locus en ratón son la obesidad, diabetes e incremento en la susceptibilidad tumoral, como consecuencia de la expresión ectópica de la proteína Agouti que puede actuar como antagonista del receptor de la melanocortina hipotalámica (MC3R y MC4R), (Fan et al.; 1997).

Este gen ha sido localizado en el cromosoma 20 en la especie humana, en ratón se ha localizado en el cromosoma 2 y su homólogo ovino en el cromosoma 13.

El gen *Agouti* porcino ha sido recientemente localizado y caracterizado en porcino, (Leeb et al. 2000). Se ha localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (q21-q23) (Figura 12) y se han descrito cuatro exones, el primero con un tamaño de 92 pb y no codificante, los otros tres codificantes con tamaños de 170 pb, 59 pb y 177 pb, respectivamente.

Figura 12: Mapa citogenético del SSC17



El análisis de la secuencia del gen en las razas German Landrace, German Large White, Pietrain, Angler Saddleback, Duroc, Bunte Bentheimer y jabalí a través de PCR y secuenciación ha permitido detectar tres polimorfismos localizados en regiones no codificantes del gen (Tabla 6). Una de ellas produce un cambio en el tamaño de la cola de poli-C, en el intrón uno, y las otras dos constituyen polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs). Los autores no establecen ningún significado funcional ni relación con patrones de color (Leeb et al., 2000).

Tabla 6: Posiciones polimórficas detectadas para el gen *Agouti*

Localización	Posición	Polimorfismo
intrón 1	399	$C_6 \longrightarrow C_7$
intrón 1	1107	$A \longrightarrow G$
exon 4(3'-UTR)	6128	$T \longrightarrow C$

Hasta el momento no se ha detectado ninguna mutación en este gen responsable de ningún cambio en los patrones del color en porcino.

Locus *Pink* (OCA2/P)

Un tipo de albinismo que se presenta en ratón y humano es el denominado albinismo tirosinasa positivo o albinismo oculocutáneo tipo II (OCA2), de herencia recesiva. Éste se debe a determinadas mutaciones en el gen *Pink* (*P*) (Kerr et al., 2000).

El gen *P* ha sido localizado y caracterizado en la especie humana, (Lee et al., 1995) y en ratón (Rinchik et al., 1993). Este gen ha sido localizado en el cromosoma 15 humano y su homólogo en ratón está localizado en el cromosoma 7.

En la especie humana este gen está constituido por 25 exones, el primero de los cuales no es codificante. El producto de este gen es una proteína transportadora íntegra de membrana del melanocito que contiene 12 dominios transmembrana y se le atribuye la función de estabilizar el complejo multiproteico necesario para la biosíntesis de la eumelanina.

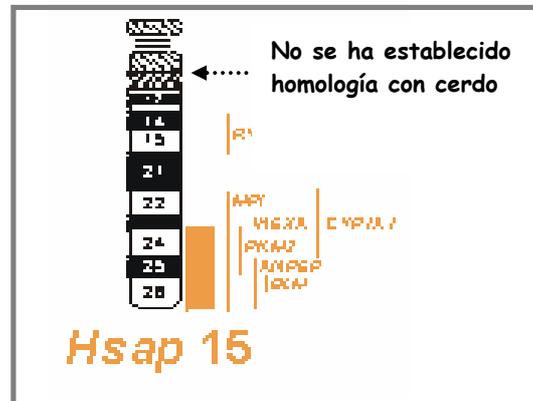
Determinadas mutaciones en este locus provocan una reducción en la deposición de eumelanina (Lamoreux et al., 1995), pues este locus codifica para una de las enzimas que se activarían cuando se produce el aumento de AMPc provocado por la acción de MC1R.

Se han descrito múltiples mutaciones en la secuencia de este gen, desde mutaciones puntuales hasta fenómenos de splicing alternativo del exón 19 que podrían relacionarse con el albinismo oculocutáneo tipo II (OCA2) (Oetting et al., 1998), forma más común de albinismo oculocutáneo, correspondiente a aproximadamente a un 50% de los casos existentes (Newton et al., 2001)

Recientemente se ha establecido la existencia de asociación entre la interacción de los genes *MC1R* y *P* para determinar la variación interindividual en los patrones de color de la piel en poblaciones humanas estudiadas de China (Akey et al., 2001).

En porcino este gen no está localizado ni caracterizado molecularmente. Por otro lado, aún no se ha establecido homología entre la región del cromosoma 15 humano donde está localizado este gen con ninguna región cromosómica porcina (Figura 13).

Figura 13: Mapa citogenético para HSAP 15



Gen del receptor del factor de crecimiento celular "mast/stem" (*KIT*)

Este gen codifica para el receptor del factor de crecimiento celular "mast/stem" (MGF), imprescindible en el proceso de distribución y supervivencia de los melanocitos.

Los primeros estudios genéticos relativos a la distribución del color en la capa se realizaron en la especie bovina. Así, el fenotipo moteado fue localizado en esta especie en el cromosoma 6 y se estableció una acción dominante incompleta del locus *Spotted* (Grosz et al., 1999). Por otro lado, se localizó un QTL para este carácter en el cromosoma 6 (Reinsch et al., 1999) donde se localiza el gen *KIT*, sugiriéndose la relación de este aspecto cuantitativo del color con posibles variantes del gen *KIT*.

Este gen tiene una estructura compleja, está constituido por 21 exones. Ha sido localizado en la especie humana en el cromosoma 4, su homólogo en ratón en el cromosoma 5 y en cerdo en el cromosoma 8.

Como se menciona anteriormente el patrón de color de capa es un carácter en el que se basa la formación de múltiples razas y poblaciones porcinas, así la preferencia por el color de capa blanco en cerdos comerciales puede datarse desde la época medieval en Europa (Wiseman et al., 1986).

La dominancia del color blanco en cerdo fue determinada por Spillman en 1907 y en estudios moleculares más recientes se ha determinado que este fenotipo viene

determinado por un gen autosómico dominante denominado *I*, por inhibir el color de la capa (Ollivier y Sellier, 1982). De esta forma se estableció la existencia de dos alelos, el alelo *I* que estaría presente en homocigosis en las razas de color de capa blanca y el alelo *i* presente en homocigosis en razas coloreadas (negras y coloradas). Posteriormente Hetzer en 1948 propone la existencia de un nuevo alelo, *I^d*, presente en individuos con fenotipo ruano, canoso, con mezcla de pelo blanco y negro, observado en cruces de Landrace y Hampshire. Mas tarde, Johansson Moller et al. (1992) postula un cuarto alelo *I^P* (Patch), de fenotipo manchado, parcialmente dominante.

Johansson Moller et al. (1996) determinan mediante análisis moleculares en un cruce de jabalí con Large White que el color de capa en cerdo esta regulado por el protooncogen *KIT* y proponen este gen como candidato para determinar el fenotipo blanco. Este fenotipo estaría asociado a una duplicación del gen *KIT*, es decir, aquellos individuos que presentan color de capa blanco presentan una duplicación del gen *KIT*, correspondiendo al alelo *I* mientras que el gen sin la duplicación correspondería al alelo *i*, presente en los individuos coloreados. Por otro lado, determinan que el alelo *I^P* también esta asociado a una duplicación del gen.

En un trabajo posterior Marklund et al. (1998) analizaron la secuencia del gen *KIT* en animales con capa blanca, negra, colorada y manchada. Estos autores describieron la presencia de una mutación en el duplicado del gen (una sustitución de Guanina por Adenina en el primer nucleótido del intrón 17) que provocaría splicing alternativo y produciría una disminución en la actividad tirosinquinasa generando el fenotipo manchado.

Giuffra et al. (1999) analizan el fenotipo denominado "Belt", cinchado, en las razas Hampshire (cinchado) y Pietrain (no cinchado), demostrando que el alelo responsable de este fenotipo mapea en la región centromérica del cromosoma 8 de cerdo, coincidiendo en posición con el gen *KIT* y determinan la existencia de un nuevo alelo, *I^B*. Por otro lado, encuentran una cosegregación completa entre el fenotipo Belt y una mutación de un sólo nucleótido detectado en el gen *KIT* (una sustitución de una Timina por Citosina en posición 2678 del exón 19). Estos autores concluyen que no

se trata de la mutación causal y determinan que este alelo no se corresponde con duplicación del gen.

Posteriormente Pielberg et al. (2002) describen la existencia de dos nuevos alelos I^2 e I^3 . Ambos alelos del locus *KIT* generan el fenotipo predominantemente blanco y están constituidos por una triplicación del gen. Concretamente describen el alelo I^2 como una triplicación del gen, donde una de las copias muestra la mutación en el primer nucleótido del intrón 17. Este alelo fue detectado en animales pertenecientes a la raza Large White. Por otra parte, el alelo I^3 es descrito como una triplicación del gen pero en este caso dos copias del mismo portan la mutación en el intrón 17, este alelo también es detectado en animales de la raza Large White. Por tanto, concluyen que existe una elevada diversidad alélica en el locus *KIT* (Tabla 7) que causa el color predominantemente blanco en cerdo doméstico y que probablemente la interacción de los loci *Extensión* y *KIT* sea la responsable de los distintos patrones de color.

En un trabajo reciente (Giuffra et al., 2002) se describe que la causa de estas duplicaciones es la recombinación entre los elementos LINE que flanquean el gen *KIT*.

Tabla 7: Descripción de los alelos del locus *KIT*, según el nº de copias del gen y mutaciones

Alelos	Correspondencia con gen <i>KIT</i>
I	KIT*1/KIT*1
I^2	KIT*1/KIT*1/KIT*2
I^3	KIT*1/KIT*2/KIT*2
i	KIT*1
I^P	KIT*1/KIT*2
I^B	KIT*3
I^d	¿?

*KIT*1*: copia del gen *KIT*

*KIT*2*: copia del gen *KIT* portadora de la sustitución G→A intrón 17

*KIT*3*: copia del gen *KIT* portadora de la sustitución T→C exón 19

Otros

Se han propuesto más de 100 genes diferentes que pueden participar como loci modificadores en el proceso de regulación de síntesis de pigmentos. Entre ellos pueden resultar especialmente importantes los loci:

Locus *Brown (b)*

Equivalente al gen *TYRP1* (proteína relacionada con la tirosinasa 1), forma parte de la familia de genes de las proteínas relacionadas con la tirosinasa (TYR). La proteína que codifica cataliza la polimerización de la melanina. Este gen ha sido relacionado con fenómenos de hipopigmentación, y determinadas mutaciones producen albinismo en la especie humana, denominado albinismo oculocutáneo tipo III (OCA3) (Boissy et al. 1996).

Este gen ha sido analizado molecularmente en la especie humana (Murty et al., 1992; Box et al., 1998; Kobayashi et al., 1998), en ratón (Bell et al., 1995) y en caballo (Rieder et al. 2001), en este último sin encontrar ninguna asociación con los patrones de color. El locus *TYRP1* ha sido localizado en la especie humana en el cromosoma 9 (p23), su homólogo en ratón en el cromosoma 4 y en caballo en el cromosoma 23.

En porcino no está localizado ni caracterizado molecularmente. Por homología se deduce su localización en el brazo largo del cromosoma 1.

Locus *Tirosinasa (TYR)*

Este locus codifica para la proteína tirosinasa, imprescindible en el proceso de melanogénesis.

En ratón y humano se conocen numerosas mutaciones para el locus *tirosinasa* responsables de cierto tipo de albinismo, albinismo oculocutáneo tipo I (OCA1) (Tripathi et al., 1992; Rinchik et al., 1993; Beermann et al., 1990), también denominado albinismo tirosinasa negativo. Algunos ensayos sugieren que este tipo de albinismo se da por bloqueo en la conversión de la tirosina en DOPA, paso que es catalizado por la tirosinasa (Rowett and Fleet, 1993).

Las mutaciones detectadas en este locus comprenden desde mutaciones puntuales hasta grandes deleciones, como ocurre en ratón, en el que causan en

homocigosis la muerte, ya que llevan consigo la inactivación de genes ligados (Juriloff et al., 1994; Rinchik et al., 1993). El locus *Tirosinasa* ha sido localizado en el cromosoma 11 humano, su homólogo en ratón está localizado en el cromosoma 7 y en vacuno en el cromosoma 29.

El locus *Tirosinasa* ha sido localizado genética (Marklund et al., 1992) y físicamente (Chowdhary et al., 1994) en porcino en el cromosoma 9 (p1.2p1.4). Ninguno de los polimorfismos detectados en este gen presentan asociación con los patrones de color en las razas y poblaciones en que se ha estudiado.

También cabe mencionar loci modificadores negativos de *Agouti*, como *Mahogany* (Edeal et al., 2000), *Mahognoid* (Miller et al., 1997) y *EDNRB* (receptor B endotelial) (Santschi et al., 2001).

VARIETADES DE PATRONES DE COLOR EN CERDO IBÉRICO

La población de cerdo ibérico es la más numerosa de los tipos de cerdo del área mediterránea y se mantuvo durante siglos con un elevado censo en amplias zonas del Suroeste de la Península Ibérica (Extremadura, Alentejo y Andalucía Occidental) de clima continental semiárido. Se acepta que la mayoría de las razas europeas cuentan, en diferente medida, con ascendientes asiáticos a partir de la introducción masiva de cerdos procedentes de China y del Sudeste Asiático registrada a finales del siglo XVIII (Clutton-Brock, 1981). Sin embargo, el cerdo ibérico, que ha contribuido a la formación de la mayoría de razas criollas centro y sudamericanas así como a la de la raza Duroc (Briggs y Briggs, 1980), es probablemente uno de los escasos tipos europeos libres de sangre oriental como han confirmado recientes estudios realizados en ADN mitocondrial (Clop et al., Enviado; Alves et al., Enviado).

En ausencia de un grupo preponderante de ganaderos seleccionadores, las características del cerdo ibérico son el resultado de un proceso de adaptación a un sistema de producción muy condicionado por el medio natural (Rodrigáñez et al., 1993). El hábitat característico del cerdo ibérico es la dehesa, bosque dominado por especies arbóreas del género *Quercus* (encinas, alcornoques, quejigos etc) sobre pastizales herbáceos anuales que da lugar a una fuerte estacionalidad de los recursos

nutritivos. La morfología del cerdo Ibérico (piel y pelo oscuros, hocico largo y patas fuertes y largas) facilitan su resistencia a la insolación y a las altas temperaturas y le capacitan para el pastoreo en terrenos quebrados. Asimismo su temprana madurez fisiológica y reducido metabolismo basal le permiten soportar largos periodos de subnutrición, mientras que su alta capacidad de ingesta le capacita para engordar rápidamente entre Noviembre y Febrero mediante el consumo de bellotas, hierba y pequeñas raíces y bulbos (López-Bote, 1998).

Aunque todos los cerdos ibéricos comparten las características citadas, dentro de la población tradicional se diferenciaron diversas variedades comarcales, con escaso flujo genético entre ellas y algunas diferencias fenotípicas singulares. Algunas de estas variedades se exportaron a países americanos en la época colonial, siendo ascendientes directos de algunas razas de cerdos Criollos (Lemus-Flores et al., 2001). Posteriormente, cerdos ibéricos colorados exportados a los Estados Unidos desde Portugal y España en el siglo XIX contribuyeron al origen de la raza Duroc-Jersey (Vaughan, 1950).

El color de piel y pelo es uno de los caracteres morfológicos en los que se ha basado la diferenciación de variedades y/o estirpes dentro de la agrupación racial del cerdo Ibérico. Se distinguen dos colores de capa principales: negro y colorado. En ellos se basan las diversas clasificaciones de variedades de cerdo Ibérico, que han sido revisadas recientemente (Laguna, 1998; Diéguez, 2001).

Variedades Negras: Su piel es fina y completamente negra, con matices que oscilan entre el negro intenso y una tonalidad más pálida, similar a la pizarra. El Negro Lampiño se caracteriza por la práctica ausencia de pelos y los principales tipos, que se han conservado hasta nuestros días, son los de la Vega del Guadiana (pelón guadianés) y el más rústico y huesudo de la Serena. La variedad Negro Entrepelado presenta mayor densidad de pelos en el dorso, patas y cabeza. Así como una menor tendencia al engarzamiento. Esta variedad procedía originariamente, al menos en parte, del cruce de cerdos Negro Lampiños con animales de la raza Large Black inglesa, importados hacia 1920 por el Duque de Peñaranda. Los actuales Negro Entrepelados proceden de cruces entre ambos tipos de Negro Lampiños y Retintos Portugueses. Aunque su color al nacimiento es caoba, su pigmentación se acentúa

con la edad y resulta en una tonalidad negra intensa en los adultos. La importancia relativa de esta variedad en la población es creciente, por su adecuación al cruce comercial con la raza Duroc.

Las cerdos ibéricos de capa colorada presentan cerdas de la misma coloración de la piel, con tonalidades diversas que oscilan desde el rubio al retinto o colorado oscuro. Aunque en los concursos locales y nacionales se utilizaba tradicionalmente como única denominación la de Colorada Extremeña, algunos estudiosos han diferenciado entre variedades Rubias y Retintas.

Variedades Rubias: Localizadas casi exclusivamente en Andalucía y en el Alentejo. Se ha distinguido una variedad Cana Campiñesa, con una capa de coloración blanquecina y presencia en las campiñas de Córdoba y Sevilla y un tipo Dorado Gaditano o Dourado Alentejano, con una intensa pigmentación colorada encendida en la piel y pelo. Estas variedades pueden considerarse actualmente desaparecidas al menos en España, aunque existe presencia de animales rubios en algunas ganaderías de cerdo Ibérico.

Variedades Retintas: Su color oscila entre el canela y el propiamente retinto o colorado oscuro. El Retinto Oliventino o Extremeño es la variedad más extendida actualmente en España. Desde hace años, sus cruces frecuentes con su equivalente Retinto Portugués han contribuido notablemente a su mejora.

Un singular tipo de cerdo es el denominado Manchado de Jabugo, que presenta capa rubia con manchas negras dispuestas de forma irregular y pezuñas claras y muy grandes. Aunque ha participado desde 1913 en los concursos nacionales como una variedad más de cerdo Ibérico, los responsables actuales de su recuperación y conservación han acreditado la importante contribución a su origen de cerdos Large White y especialmente Berkshire importados de Gran Bretaña (Forero, 1999). La secuenciación de su ADN mitocondrial ha permitido verificar esta hipótesis en cuanto a los linajes maternos (Alves et al., Enviado).

Líneas Torbiscal y Guadyerbas:

En 1943, con el objetivo de crear un centro de selección de cerdos ibéricos se encomendó a D. Miguel Odriozola una exploración de las mejores ganaderías de cerdo

ibérico de España y Portugal a partir de las cuales fue elegido el contingente de animales fundadores. Se escogieron cuatro antiguas ganaderías o soleras que llevaban mucho tiempo aisladas. Las cuatro piaras elegidas pretendían representar la gran dispersión de tipos de cerdo ibérico entonces disponible, estas fueron:

- Ervideira, procedente de la ganadería del Conde de Ervideira, en Evora. Con tipo grande y tardío, de pelo colorado encendido, representante del dorado alentejano y del rubio andaluz.

- Campanario, procedente de la ganadería de los hermanos Donoso en Campanario. De tipo negro lampiño de la Serena, huesudo y rústico.

- Caldeira, procedente de la ganadería del señor Picao Caldeira, en Elvas. De tipo alargado retinto.

- Puebla, procedente de la piara de D. Fabián Lozano en Puebla de la Calzada. De tipo negro lampiño de las Vegas del Guadiana.

Éstas fueron mantenidas en riguroso aislamiento reproductivo (1945-1963) hasta que, debido al aumento de la consanguinidad, se procedió a la fusión de las mismas generando la línea Torbiscal (Figuras 17 y 18) en 1964, mantenida hasta la actualidad y de la que se dispone de información genealógica completa (Tabla 8).

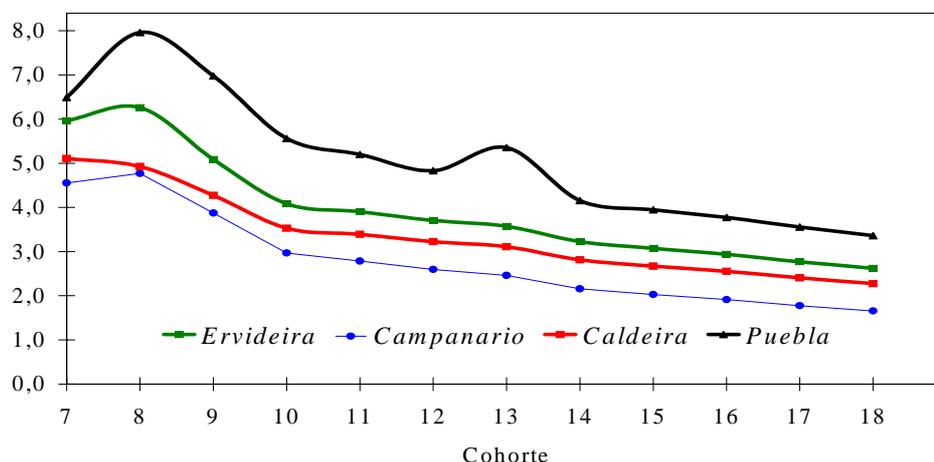
Tabla 8: Información genealógica: fundadores, cohortes y reproductores que contribuyeron la formación de la línea Torbiscal (Rodríguez et al., 2000)

Número de animales en la genealogía	3,489
Número de fundadores (representados en Torbiscal)	116 (71)
# Ervideira	31 (24)
# Campanario	28 (16)
# Caldeira	25 (17)
# Puebla	32 (14)
Cohortes (1945-1962)	1 a 6
Reproductores (1945-1962)	1393
Cohortes (1963-1997)	7 a 18
Reproductores Torbiscal (1963-1997)	1980

La contribución relativa de las cuatro antiguas ganaderías a la actual población Torbiscal aparece representado en la Figura 14, donde se muestra como los valores

de contribución en el número de alelos ha disminuido a lo largo de la existencia de la línea.

Figura 14: N° de alelos esperado de las estirpes fundadoras en Torbiscal (Rodríguez et al., 2000)



En esta línea de cerdos ibéricos procedente del cruce de cuatro estirpes, dos de ellas con capa negra y dos con capa colorada, se procuró eliminar el “alelo” determinante del fenotipo negro, procedentes de las estirpes de cerdo negro lampiño, para que el color de la misma fuera colorado, y a su vez se fomentó la diversidad de tonalidades: rubio, colorado, retinto y entrepelado.

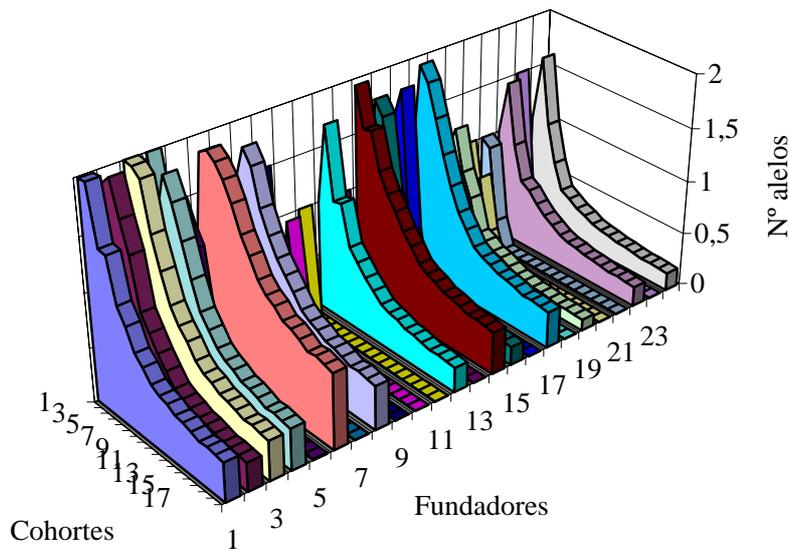
Junto con la línea Torbiscal se conservaron dos estirpes procedentes de la solera Puebla, estas fueron Gamito, desaparecida en la década de los 80, colorada y procedente de una hembra “heterocigótica” para el color negro/ colorado y Guadyervas (Figura 16) , negra lampiña, mantenida en la actualidad y de la que se dispone de información genealógica (Tabla 9).

Tabla 9: Información genealógica: fundadores, cohortes y reproductores que contribuyeron a la formación de la línea Guadyervas (Toro et al., 2000)

Número de animales en la genealogía	1024
Número de fundadores	24
Cohortes (1945-1962)	1 a 6
Reproductores (1945-1962)	306
Cohortes (1963-1997)	7 a 18
Reproductores Torbiscal (1963-1997)	694

La contribución esperada de cada uno de los fundadores en cada cohorte establecido para la línea Guadyerbas aparece representado en la Figura 15, donde se muestra una estima de la disminución en la contribución con alelos fundadores e incluso la extinción de la misma en un número reducido de cohortes.

Figura 15: N° esperado de alelos con los que contribuye cada fundador en cada uno de los cohortes establecidos para la línea Guadyerbas (Toro et al., 2000)



Estas líneas mantenidas completamente aisladas en El Dehesón del Encinar han constituido y constituyen un material útil no sólo para la conservación del origen ibérico si no también para estudios de mejora genética animal ya que se trata de líneas ibéricas cerradas y altamente controladas.



Figura 16: Cerdo ibérico con color de capa negra (Guadyerbas)



Figura 17: Cerdo ibérico con color de capa colorada (Torbiscal)



Figura 18: Cerdo ibérico con color de capa retinta (Torbiscal)



Figura 19: Cerdo con color de capa manchada (Manchado de Jabugo)

MARCADORES MOLECULARES

Desde el punto de vista de los mecanismos moleculares existen tres tipos de variación en el ADN, estos son cambios en un solo nucleótido (SNPs), inserciones o deleciones (Indels, de 1 a cientos de bases de tamaño), y variaciones en el número de repeticiones de secuencia en tandem (VNTR) (Vignal et al., 2002).

Desde el punto de vista de la genética molecular se considera que existen tres categorías de información procedente de las variaciones que presente un locus, según su interés. Éstas son: polimorfismos bialélicos dominantes, como es el caso de los RAPDs y AFLPs; polimorfismos bialélicos codominantes como es el caso de los RFLPs y SSCPs y polimorfismos multialélicos codominantes, como es el caso de los microsatélites.

Los polimorfismos detectados en genes candidatos son generalmente de tipo SNP. Un marcador de tipo SNP es un cambio producido en una base nucleotídica de la secuencia de ADN, donde normalmente hay dos posibles nucleótidos en esa posición.

Se ha establecido que para considerarse alelo esta mutación ha de estar a una frecuencia igual o superior al 1% y se ha estimado que la frecuencia de sustitución de un sólo nucleótido (SNP) esta entre 1×10^{-9} y 5×10^{-9} por nucleótido y por año en posiciones neutrales en mamíferos.

Los mecanismos de mutación de una base son las transiciones: purina-purina (A-G) o pirimidina-pirimidina (C-T), o las transversiones: purina-pirimidina o pirimidina-purina (A-C, A-T, G-C, G-T) y cabe esperar que este cambio se produzca al azar, es decir que la frecuencia de que se produzca una transición o una transversión sea de 0,5. Pero los datos experimentales (ratón y humano) indican que es 1,4 veces más probable una transición que una transversión (Collins et al., 1994) e incluso en estudios mas recientes llegan a estimar un cociente superior a 3 (Kim et al., 2002).

El concepto más reciente de SNP procede principalmente de la necesidad de aumentar la densidad de los marcadores genéticos en estudios de enfermedades multifactoriales y del reciente progreso en la metodología para la detección de polimorfismos y técnicas de genotipado.

En la actualidad existe numerosas metodologías para la detección y genotipado de polimorfismos de tipo SNP. Entre ellos cabe destacar las metodologías basadas en

hibridaciones directas, desde ASO (oligonucleótidos específicos de alelo) a chips; técnicas basadas en el empleo de enzimas de restricción (PCR-RFLP); en diferencias en la movilidad de las cadenas de ADN (PCR-SSCP); en *Primer extension* (SBE, MALDI-TOF); ensayos de unión de oligonucleótidos (OLA); Pirosecuenciación; detección por actividad exonucleasa (Sonda TaqMan); empleo de sondas de oligonucleótidos invasivas (*invader assay*).

Las técnicas más novedosas para el genotipado a gran escala de polimorfismos de tipo SNP son el empleo de arrays y microchips, desplazando el uso de técnicas basadas en la electroforesis, pero su costo aún no es asequible para la mayoría de los laboratorios.

APLICACIONES

Los posibles polimorfismos de los genes que influyen en el color de la capa en cerdo, por el hecho de ser un carácter utilizado tradicionalmente para la formación de razas y poblaciones porcinas, pueden utilizarse como marcadores para estudios de trazabilidad del origen genético de un animal cruzado o de la materia prima de un producto cárnico, así como para ser utilizados como marcadores genéticos para la construcción de mapas genéticos que permitan realizar un análisis de detección de loci para caracteres cuantitativos (QTL).

Trazabilidad del origen racial

La exigencia de una información precisa sobre los diversos elementos de la cadena de producción, transformación, distribución y presentación de los alimentos de origen animal ha llevado a acuñar el término de trazabilidad, para determinar al seguimiento de la materia prima utilizada en la elaboración de un producto desde su transformación hasta su consumo.

La diferenciación del origen genético de la materia prima es un elemento de creciente importancia en el necesario control de calidad en algunos productos, en los que es preciso identificar la sustitución deliberada o accidental de la materia prima idónea por otra de menor coste e inferior calidad.

Dadas las especiales características fisiológicas del cerdo ibérico, con un alto contenido graso, bajo índice de transformación, baja prolificidad, largo ciclo productivo y difícil manejo en régimen extensivo, se ha visto propiciado el cruzamiento con otras razas, principalmente Duroc y Large Black, consiguiendo una mejor aptitud cárnica en los cerdos cruzados en detrimento de la calidad de sus productos derivados, especialmente de sus piezas nobles, jamones, paletas y lomos.

Por otro lado existe una fuerte relación entre el empleo de animales puros en sistema extensivo con el aprovechamiento de los recursos de la dehesa, en especial la ceba en montanera. En los sistemas más intensivos predomina el empleo de animales cruzados. A esta diversidad de sistemas en la producción nacional hay que sumar el problema que supone, desde hace una decena de años, la elaboración de productos a partir de materia prima importada de países del Este de Europa y que en parte aparecen en el mercado como Ibéricos, aunque proceden de razas grasas de capa oscura de estos países.

Estas circunstancias han hecho necesaria una clara normativa de clasificación de producciones y productos que incluya su origen genético. Además el permitir la discriminación de genotipos puros y cruzados en animales vivos posibilita la defensa del acervo genético de la raza frente a los riesgos de introgresión de genes de razas foráneas.

Distintos métodos basados en el análisis químico han sido y están siendo utilizados para confirmar la autenticidad de los productos alimentarios. Estos métodos consisten en el análisis de lípidos y métodos electroforéticos de separación de proteínas y tinción a través de técnicas enzimológicas e inmunológicas. Pero el hecho de que el procesamiento pueda causar la desnaturalización de las proteínas y que la expresión de determinadas proteínas sea dependiente del tejido, ha favorecido el interés por el empleo de técnicas basadas en el análisis del ADN. Actualmente estas técnicas están desplazando a las anteriores debido principalmente a que el ADN es más termoestable que las proteínas, esta presente en todas las células nucleadas independientemente del tejido, puede aportar mayor información por la existencia de regiones presentes en el ADN no codificantes y por el rápido desarrollo de técnicas de análisis de ácidos nucleicos.

Recientemente se han desarrollado diversas técnicas moleculares aplicables a la verificación de la autenticidad de alimentos de origen animal (carnes, pescados, y sus productos elaborados). Estas se basan en el empleo de marcadores genéticos.

Marcadores genéticos son secuencias de ADN que indican posiciones específicas en el genoma. Para que un marcador sea útil debe de ser polimórfico, es decir, que presente más de un alelo. Éste ha de ser preferiblemente codominante, de manera que se puedan distinguir los genotipos homocigotos de los heterocigotos (no en el caso de marcadores genéticos en ADN mitocondrial) y debe de ser de fácil genotipado.

Los primeros análisis del ADN aplicados a la verificación de la autenticidad de alimentos se basaban en métodos de hibridación, con sondas de ADN genómico, principalmente secuencias de ADN satélite (Buckland, 1985; Buntjer et al., 1995).

Actualmente están siendo utilizadas técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de especies y razas porcinas en productos elaborados (productos frescos, curados y patés). A continuación se indican algunos de los trabajos realizados para la identificación del origen ibérico principalmente frente a Duroc empleando marcadores de tipo microsátélites: Óvilo et al. (2000); Toro et al. (2000), Fabuel et al. (Enviado); de tipo AFLPs: Alves et al. (2001) y ADN mitocondrial: Alves et al.(Enviado).

DetECCIÓN DE QTL

Como se menciona anteriormente, en el estudio de caracteres de importancia económica en animales domésticos se asume un modelo en el que estos están controlados por un gran número de genes con efecto infinitesimal de forma que permite explicar la variación continua presente en caracteres cuantitativos como consecuencia del efecto acumulativo de muchos genes mendelianos, cada uno con un efecto pequeño sobre el carácter (Yule, 1906) y del efecto ambiental. Estos genes son denominados QTL(Quantitative Trait Loci).

La estrategia más común para la detección de QTL consiste en realizar cruces entre líneas divergentes de animales domésticos adaptados a diferentes condiciones ambientales y productivas provocando la segregación de los genes que influyen en los

caracteres de interés y de marcadores genéticos, cruces donde existe desequilibrio de ligamiento entre marcadores y QTL, lo que permite detectar asociaciones estadísticas entre el valor del carácter y el genotipo del marcador. Si existen asociaciones significativas entre la herencia de una región cromosómica y la variación del carácter, en esa región deberá existir algún gen o genes que afecten a dicho carácter (Haley et al., 1994; Knott et al., 1998).

La incorporación de un nuevo marcador en regiones no cubiertas, es decir, donde no se dispone de ningún marcador, permite afinar el análisis de detección de QTL.

En el análisis de detección de QTL interesa que los marcadores disponibles sean informativos, de forma que la situación óptima es que los alelos para estos marcadores estén fijados de forma alternativa en las poblaciones parentales de manera que la informatividad de éstos en el cruce sea máxima y a su vez interesa para realizar un análisis más preciso una cobertura homogénea a lo largo de todo el cromosoma de forma que todas las regiones cromosómicas contengan una elevada informatividad.

Hasta ahora los estudios de detección de QTL se han basado en el uso de marcadores de tipo microsatélite por su elevado nivel de polimorfismo, su abundancia en los mapas de animales domésticos y por la sencillez de su genotipado. Sin embargo, actualmente el desarrollo de técnicas altamente automatizadas para el genotipado de marcadores de tipo SNPs, así como la abundancia de este tipo de marcadores y su distribución homogénea en el genoma anticipa su próxima inclusión en este tipo de estudios, a pesar de su bajo nivel de polimorfismo, ya que generalmente son bialélicos (Fan y Xiong, 2002; Xiong et al., 2002).

Antecedentes en el experimento de detección de QTL en el cruce Ibérico x Landrace

Este experimento, aún vigente, está basado en el cruce experimental de dos líneas divergentes Ibérico y Landrace que presentan diversos rasgos distintivos idóneos para estudiar la base genética de caracteres de calidad de carne. Un aspecto singular de las poblaciones parentales es que corresponden a tipos extremos de los cerdos del Sur y del Norte de Europa, la magnitud de las diferencias entre estas líneas, especialmente para caracteres de composición corporal y calidad de carne, y la disponibilidad de animales de varias generaciones (F_2 , F_3 y retrocruce $F_2 \times LR$) con registros para estos caracteres. En este experimento se realizó un barrido genómico con un panel de 90 microsatélites de 350 animales F_2 , entre cuyos resultados destacan la detección de un QTL en el cromosoma 6 porcino (SSC6) con un fuerte efecto del alelo Ibérico sobre espesor de grasa dorsal y porcentaje de grasa intramuscular (Óvilo et al., 2000); la detección de un QTL en el cromosoma 4 porcino (SSC4) que afecta al metabolismo de ácidos grasos (Pérez-Enciso et al., 2000); la detección de un QTL para el porcentaje de grasa intramuscular que ha sido localizado en el cromosoma X; la detección de diversos QTL con efecto sobre la composición de ácidos grasos de la grasa de cerdos (Clop et al. Enviado); la detección de no asociación entre dos polimorfismos en los genes *HFABP* y *LEPR*, genes candidatos posicionales para el QTL localizado en el cromosoma 6 para porcentaje de grasa intramuscular (Óvilo et al., 2002); la detección de pleiotropía para QTL localizados en el cromosoma 6 porcino (Óvilo et al. 2002); la localización del gen *DECR* (Clop et al., 2002); y diversas contribuciones metodológicas al análisis estadístico aportando nuevas perspectivas a los experimentos de análisis de QTL (epistasia, modelos de pleiotropía o ligamiento, mapeo por intervalos y métodos bayesianos) (Pérez-Enciso et al., 2000; Pérez-Enciso et al., 2002).

OBJETIVOS

NOV-17-20

El principal objetivo científico de este trabajo es el análisis en la especie porcina de tres de los genes que codifican proteínas implicadas en el proceso de regulación de la melanogénesis en mamíferos: *MC1R*, *Agouti* y *Pink*. Sobre los dos primeros genes existen trabajos previos realizados en la especie porcina que se pretende profundizar y extender a la agrupación racial de cerdos Ibéricos, que no ha sido objeto de ningún estudio previo relacionado con el color de la capa. Asimismo se pretende caracterizar y localizar el gen *Pink*, (de compleja estructura ya que presenta 25 exones en la especie humana y ratón) que no ha sido localizado ni caracterizado anteriormente en la especie porcina.

En la realización del trabajo se pueden distinguir los siguientes objetivos parciales:

I. Análisis del gen *MC1R*: Estudio molecular de polimorfismos en el gen. Análisis de diversidad genética en poblaciones de cerdo Ibérico

II. Análisis del gen *Agouti*: Estudio molecular de polimorfismos en el gen. Análisis de diversidad genética en poblaciones de cerdo Ibérico

III. Caracterización, localización y análisis del gen *Pink*: Estudio molecular de polimorfismos en el gen. Localización física y de ligamiento en el genoma porcino. Análisis de diversidad genética en poblaciones de cerdo Ibérico.

IV. Análisis del efecto de los polimorfismos de estos genes y sus interacciones sobre el color de la piel en la línea Torbiscal de cerdos Ibéricos.

El logro de estos objetivos científicos permite plantear otros objetivos adicionales, basados en el empleo como marcadores genéticos altamente informativos de los polimorfismos de los genes de color *MC1R* y *Pink* en dos aplicaciones de interés práctico: trazabilidad del origen genético de animales y productos cárnicos y el análisis de detección de QTL.

La justificación de la aplicación a la detección de QTL es que el genotipado de algunos de los polimorfismos de los genes que determinan el color de la capa puede aumentar la información molecular en regiones cromosómicas de interés con escasa densidad e informatividad de marcadores genéticos. Ello contribuye a incrementar la potencia de los experimentos de detección de QTL.

Análogamente, el análisis de genes relacionados con el color de la capa puede proporcionar marcadores útiles para estudios de trazabilidad del origen racial, dado que este carácter ha sido un importante criterio en la definición de los prototipos raciales.

Actualmente, en el Departamento de Mejora Genética Animal del INIA y en colaboración con equipos del IRTA y la Universidad Autónoma de Barcelona se trabaja en la detección de QTL para diversos caracteres productivos y reproductivos en dos cruces experimentales en porcino (Ibérico Guadyerbas x Landrace e Ibérico Guadyerbas x Meishan). Asimismo se están llevando a cabo estudios de trazabilidad del origen racial orientados a la discriminación de genotipos ibéricos puros y cruzados con Duroc. El desarrollo de técnicas objetivas para la verificación del origen genético de animales y productos tiene un elevado interés en el caso del cerdo Ibérico, dado que las características de su producción y mercado hace necesario mejorar los elementos de control sobre los elementos de la cadena de producción, transformación y etiquetado de sus productos. En este contexto se han planteado los dos objetivos siguientes de carácter aplicado:

VI. Desarrollo de un panel de marcadores genéticos para la verificación del origen racial Ibérico tanto en animales vivos como en carne y productos curados.

V. Mapeo fino de QTL para caracteres de calidad de carne y grasa previamente localizados en el cromosoma 6 porcino en un cruce experimental Ibérico Guadyerbas x Landrace.

MATERIALES Y MÉTODOS

ΣΧΗΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΥΠΑ - ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

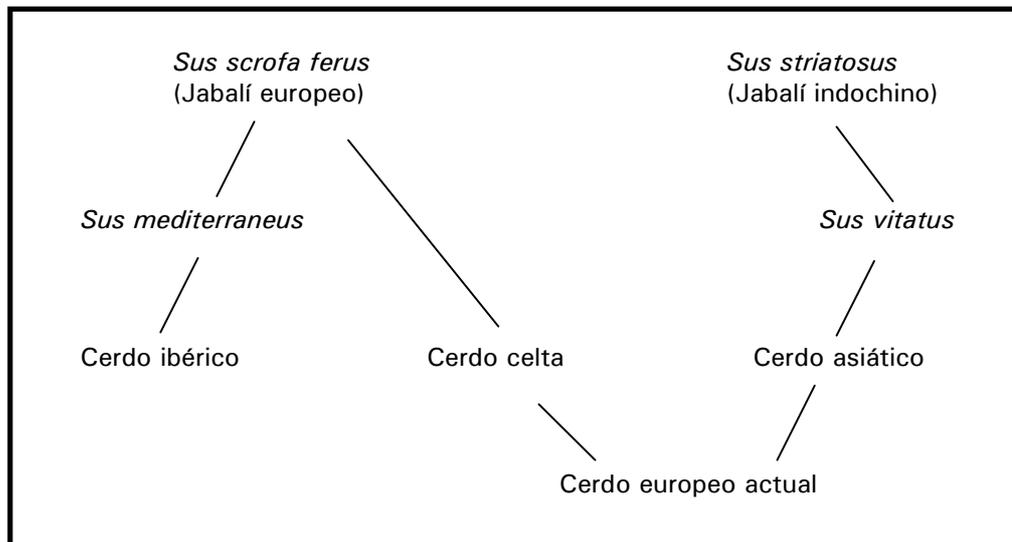
ANIMALES

El material biológico analizado en este trabajo corresponde principalmente a muestras de cerdos de la raza Ibérica.

En este trabajo se han analizado un total de 492 muestras de sangre de animales de la raza Ibérica procedentes de diferentes ganaderías (39 animales con color de capa negra pertenecientes a las poblaciones Guadyervas y Coronado, 358 animales con color de capa colorada, de los cuales 300 pertenecen a la línea Torbiscal , 81 animales con capa entreladada y 14 muestras de sangre de animales de la población Manchado de Jabugo). Además se han empleado 2 muestras de piel de animales Guadyervas y 6 muestras de piel de animales Torbiscales (con diversa intensidad de pigmento colorado).

Se ha tomado como referencia el jabalí europeo (*Sus scrofa ferus*) (2 muestras de piel y 38 muestras de sangre), antecesor del cerdo ibérico (Figura 20), que presenta el color de capa considerado silvestre.

Figura 20: Esquema de formación de razas porcinas actuales



Además, se ha dispuesto de muestras de diversos tejidos de cerdos de otras razas:

- Duroc-Jersey (Foto Anejo 1)(105 muestras de sangre y 2 muestras de piel), origen céltico y con color de capa colorada. Raza con la que se ha visto favorecido el cruzamiento del cerdo ibérico con el fin de conseguir una mejor aptitud cárnica en los cerdos cruzados en detrimento de la calidad de los derivados del cerdo ibérico.
- Meishan (Foto Anejo 1)(10 muestras de sangre y 2 muestras de piel), origen chino y color de capa negro excepto cuatro manchas blancas localizadas en las cuatro extremidades.
- Pampa (Foto Anejo 1) (2 muestras de pelo), procedentes de la pampa uruguaya y con color de capa negra.
- Landrace (Foto Anejo 1)(10 muestras de sangre y 2 muestras de piel), origen europeo y con color de capa blanca.
- Mangalitzá (Foto Anejo 1), origen húngaro, variedades golondrino (mancha negra) (2 muestras de sangre) y colorado (2 muestras de sangre).
- Cerdos de origen vietnamita (Foto Anejo 1) (3 muestras de hígado y 2 muestras de piel), con color de capa negra.
- Cerdos Vascos (Foto Anejo 1) (2 muestras de sangre), con color de capa negra con manchas blancas de tamaño y distribución variables.
- Large White (Foto Anejo 1)(2 muestras de sangre y 2 muestras de piel), de origen inglés y con color de capa blanca.
- Pietrain (Foto Anejo 1) (2 muestras de sangre), de origen belga y con color de capa blanca con numerosas manchas negras y de gran tamaño.
- Muestras de sangre de animales procedentes de un cruce experimental Ibérico x Landrace (Foto Anejo 1) (33 F₀, 70 F₁, 369 F₂ y 87 F₃) diseñado para un estudio de detección de QTL (Óvilo et al, 1999).

MÉTODOS

I) Extracción de ácidos nucleicos:

1. Extracción de ADN

1.1 Extracción de ADN de sangre

Se partió de 3 ml de sangre (recogida en tubos de 10 ml con EDTA para evitar la coagulación), donde se añadieron 6 ml de tampón de lisis de tejidos (TKM1 (10 mM TRIS HCl pH=7.6 1M + 10 mM KCl 1M + 10 mM MgCl₂ 1M + 2 mM EDTA 0.5 M pH=8) + Tritón 2%) y la mezcla se centrifugó a 4°C y 1.200 r.p.m. durante 7 min.

Tras la decantación del sobrenadante se añadieron 6 ml de tampón de lisis de células (400 mM NaCl + 10 mM TRIS-HCl pH=8.5 + 5 mM EDTA + 0.2% SDS), 300 µg de proteinasa K y 12 µg de RNasa y se dejó incubar toda la noche a 37°C con el fin de liberar el ADN del interior de las células.

El sobrenadante se precipitó con etanol absoluto (2,5 volúmenes) y se realizó un lavado con etanol al 80%, se dejó 10 min a -20°C y se centrifugó a 4°C y 1.200 r.p.m. durante 10 min. Tras eliminar el sobrenadante se rehidrató el precipitado con 300 µl de TE pH= 8 (TRIS 10 mM pH=8; EDTA 1 mM pH=8).

1.2 Extracción de ADN de pelo (cerdos de la raza Pampa)

Las muestras de pelo se utilizaron ya que no se disponía de otro tipo de tejido y se utilizó el kit comercial de aislamiento de ADN "Gen Elute Mammalian Genomic DNA kit" (Sigma- Aldrich)

1.3 Extracción de ADN de hígado (cerdos de origen Vietnamita)

Las 3 muestras de hígado se utilizaron ya que no se disponía de sangre para estos animales y se utilizó el kit comercial de aislamiento de ADN "PUREGENE: Genomic DNA isolation kit" (GENTRA).

1.4 Extracción de ADN de sangre impregnada en "FTA CARDS"

Las muestras de 200 animales ibéricos (Torbiscales) se tomaron utilizando el sistema de impregnación sobre "FTA CARDS" (Whatman BioScience), este sistema facilita la recogida y conservación de las muestras de sangre.

El protocolo para la purificación y fijación del ADN sobre la tarjeta se realizó utilizando el reactivo FTA Purification Reagent (Whatman BioScience), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

2. Extracción de ARN de piel

Las muestras de piel fueron mantenidas durante la recogida en N₂ líquido y posteriormente conservadas a -80°C.

La extracción del ARN de piel se realizó utilizando el reactivo TRI REAGENT (Sigma Aldrich), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, salvo pequeñas modificaciones, a partir de 150 mg de tejido.

El reactivo TRI REAGENT es una solución monofásica de guanidin tiocinato y fenol que disuelve de manera efectiva el ADN, ARN y proteínas en una mezcla homogeneizada de tejido.

Las muestras mantenidas a -80°C se homogeneizaron en mortero manteniendo siempre el tejido congelado con N₂ líquido, a continuación se añadió el reactivo TRI REAGENT (Sigma) en la proporción 1ml por 50-100 mg de tejido y se finalizó la homogenización, dejando la muestra 5 min a T^a ambiente. Posteriormente, se añadió cloroformo en una proporción de 200 µl por ml de reactivo, se mezcló con vortex y se dejó reposar durante 10 min a T^a ambiente. A continuación la mezcla se sometió a centrifugación a 4°C y 12000 r.p.m. durante 15 min para conseguir la separación de las tres fases, fase orgánica que contiene las proteínas, interfase donde está contenido el ADN y fase acuosa donde permanece el ARN.

La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo de 2 ml donde se añadió isopropanol, para la precipitación del ARN, en la proporción de 500 µl por ml de reactivo y se mantuvo toda la noche a -20°C.

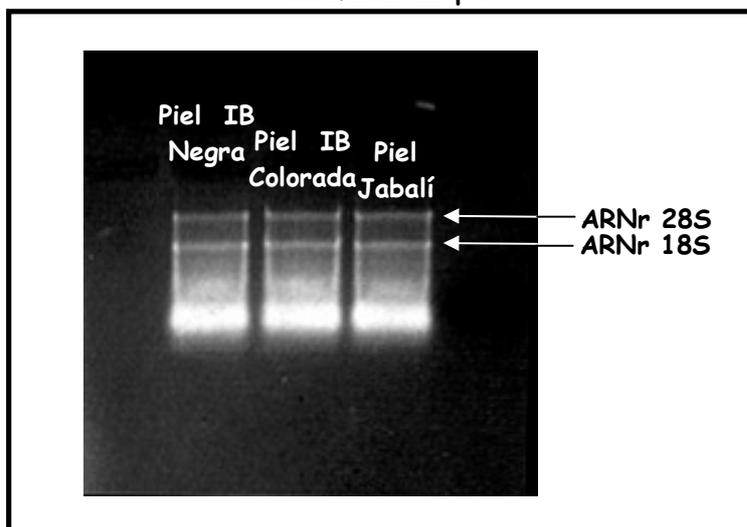
Transcurrido ese periodo de tiempo, la mezcla se centrifugó a 4°C y 12000 r.p.m. durante 10 min, formándose un precipitado blanco de ARN en el fondo del

tubo. Se eliminó el sobrenadante y el ARN se lavó con etanol frío al 75%, en la proporción de 1ml por ml de reactivo utilizado, se mezcló y se mantuvo 4 h a -20°C . A continuación se sometió a una centrifugación a 4°C y $12000g$ durante 5 min, se eliminó el etanol y se dejó secar el pellet durante 5 min.

El pellet se rehidrató con $50\ \mu\text{l}$ de agua libre de RNasa, (agua DEPC).

El resultado de la extracción del ARN fue visualizado en un gel de agarosa al 1.5% (Figura 21), para ello $1\ \mu\text{l}$ de la muestra se desnaturalizó con formamida e incubó a 65°C durante 5 min y se sometió a una electroforesis durante 20 min a 90V.

Figura 21: Patrón electroforético resultado de las extracciones de ARN de muestras piel



Como se observa en la figura 21 en la extracción de ARN total se pueden visualizar las bandas de ARN ribosómico correspondientes al ARNr 28S y 18S. La intensidad de estas bandas es indicativa del estado del ARN extraído, de forma que si aparece con mayor intensidad la banda correspondiente al ARNr 28S indicaría una menor degradación y por tanto una mejor calidad del ARN total.

3. Cuantificación de los ácidos nucleicos

La cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro (GeneQuant, Ammershan Pharmacia), tomando las medidas de absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm.

Para el ADN la concentración fue calculada respecto a la medida A_{260} , considerando que una unidad de A_{260} corresponde a 50 μg de ADN, mientras que para el ARN se considera que una unidad de A_{260} corresponde a 40 μg de ARN.

La relación de las medidas de A_{260}/A_{280} muestra una estima de la pureza del ácido nucleico extraído, de forma que se considera un alto grado de pureza cuando esta relación se encuentra entre 1.7-1.9.

II) Métodos y técnicas comunes empleadas en el análisis de los genes objeto de estudio:

1) Diseño de oligonucleótidos para su uso en PCR

Para las reacciones de amplificación se diseñaron oligonucleótidos a partir de las secuencias nucleotídicas de los genes estudiados disponibles en la red (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para su diseño se utilizó el programa de generación de oligonucleótidos "QuickPri" del paquete informático WinStar.

Las principales características de las parejas de oligonucleótidos diseñadas fueron:

- Tamaño del oligonucleótido: 17-24 pb
- Formación de dímeros: ≤ 3 pb
- Formación de horquillas: ≤ 3 pb
- Residuos ambiguos: 0
- T_m : 48-70°C

En cada diseño de parejas de oligonucleótidos se determinó el tamaño del fragmento a amplificar adecuado para su posterior aplicación (Secuenciación, PCR-

RFLP, PCR-SSCP, Análisis de fragmentos en un analizador automático de fragmentos (ABI PRISM) y PCR alelo-específica).

2) Confirmación del éxito de las reacciones de amplificación por PCR

Todas las reacciones de amplificación se confirmaron mediante electroforesis horizontales en geles de agarosa a distintas concentraciones (1.5-2.5%) en tampón TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90mM, EDTA 2 mM pH=8) y aplicando voltajes de 120-140 voltios durante 30 min. A continuación los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio (1mg/ml) durante 10 min, se continuó la electroforesis otros 10 min y finalmente los geles se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta que lleva acoplado un procesador de imágenes (Gel Doc 2000, BIO-RAD). Las imágenes pueden ser visualizadas y editadas utilizando el software "Quantity One 4.3.0" (BIO-RAD), confirmando la existencia de bandas de migración nítidas con el tamaño esperado por comparación con patrones de tamaño molecular, lo que permitió optimizar las condiciones de amplificación.

Para la confirmación de la PCR se cargó en cada pocillo del gel 4 µl de la reacción de PCR junto con 1 µl de tampón de carga (azul de bromofenol 0.25% y sacarosa 40% en solución acuosa).

3) Secuenciación:

Se realizó la secuenciación directa en ambos sentidos de los productos de amplificación, sin recurrir a técnicas de clonación.

Para obtener la secuencia nucleotídica de los genes analizados, se diseñaron parejas de oligonucleótidos que permitiesen amplificar fragmentos con un tamaño no superior a 600 pb, ya que éste es el límite de resolución del secuenciador automático.

Se amplificaron los fragmentos correspondientes por PCR y se confirmaron las reacciones de amplificación mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa.

Tras la confirmación de la amplificación se realizó la purificación del producto amplificado. Cuando en el patrón de los productos amplificados no se observaba amplificación inespecífica, éstos fueron purificados directamente de la solución de PCR, con el kit "QIAquick PCR Purification" (QIAGEN). Cuando a pesar de la

optimización no pudo evitarse la amplificación inespecífica, se aisló el fragmento de gel de agarosa con el kit "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN). La elución del ADN, en ambos casos, se realizó con 30 μ l de agua bidestilada.

La purificación también fue confirmada mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio, permitiendo la cuantificación de del producto purificado.

Para la cuantificación del producto purificado se cargó en cada pocillo del gel 1 μ l de éste disuelto en 3 μ l agua bidestilada junto con 1 μ l de tampón de carga y se estimó la intensidad por comparación con patrones de tamaño molecular de concentración conocida.

A continuación se realizaron las reacciones de secuenciación en un volumen final de 10 μ l conteniendo 4 μ l de Pre-mix (ByeDye Terminator V3.0, Applied Biosystems), 1 μ l de "Pellet Paint" (reactivo que permite la tinción del pellet para ser visualizado durante la precipitación) (NOVAGEN), 5 pmoles del oligonucleótido específico y 5 μ l (10-20 ng) del producto de PCR purificado. Las condiciones de la reacción de secuenciación fueron 94°C 3min, seguido de 25 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos y 60°C durante 4 min. Las reacciones de secuenciación se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR 2400 (Applied Biosystems).

Tras la reacción de secuenciación se realizó la precipitación del ADN, para eliminar restos de reactivos que pudieran interferir durante la carrera (dideoxinucleótidos marcados, restos de oligonucleótidos, etc.), con etanol al 60% seguido de una segunda centrifugación a 14000rpm durante 20 min y tras la decantación del sobrenadante se realizó un lavado con etanol al 70% seguido de una centrifugación a 14.000 rpm durante 5 min. El precipitado se dejó secar debajo de un flexo durante 5 min y se almacenó a -20°C hasta cargarlo en el secuenciador.

Para cargar las muestras en el analizador genético se resuspendió el precipitado en 25 μ l de formamida desionizada, dejando rehidratar durante 10 min, y se desnaturalizó (94°C durante 3 min). Posteriormente las muestras se pasaron a tubos ABI 310 de 0.5 ml (Applied Biosystems) y se taparon con "Septum" (Applied Biosystems), para el análisis en un equipo automático de secuenciación ABI 310.

Una parte de las muestras fueron analizadas en un equipo ABI 377 en el servicio de secuenciación del CIB (Centro de Investigaciones Biológicas).

Los equipos ABI 310 y 3100 constan de un sistema de electroforesis capilar acoplado a un láser y conectado a un ordenador, de forma que la detección se basa en un sistema de marcaje con moléculas fluorescentes.

La electroforesis se realiza a través de un polímero presente en un capilar (polímero POP 4, en el caso de análisis del tamaño de los fragmentos, o polímero POP 6, en secuenciación, ambos de Applied Biosystems). Este capilar (Corto de 47 cm, en el caso de fragmentos cortos, menores de 400 pb; o largo de 61 cm, en el caso de fragmentos de mayor tamaño, superior a 400 pb, ambos de Applied Biosystems) está acoplado al láser, de modo que cuando los fragmentos separados a lo largo del capilar son excitados por el láser, emiten una señal fluorescente debido al fluorocromo con el que están marcados, señal que es registrada en el ordenador.

Mediante un software específico (GeneScan Analysis, para el análisis del tamaño de los fragmentos, o Sequence Analysis, para la secuenciación, ambos de Applied Biosystems), las señales registradas son transformadas en un gráfico de picos (denominado electroferograma, en el caso del análisis del tamaño de los fragmentos, o cromatograma, en el caso de la secuenciación), en el que cada pico corresponde a una señal fluorescente, es decir, a un fragmento de ADN.

Los equipos disponibles fueron un ABI PRISM 310 (1 capilar) y un ABI 3100 (16 capilares), este último forma parte del equipamiento del servicio de la Unidad de Análisis del Genoma (INIA).

4) Edición, ensamblaje y alineamiento de secuencias:

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas de los fragmentos analizados se realizó la edición, ensamblaje de las mismas, y su posterior alineamiento para realizar por comparación la búsqueda de mutaciones. Para ello, se utilizaron los programas EditSeq (edición) y MegaAlign (alineamiento), del paquete de programas WinStar y CAP3(ensamblaje) (*Contig Assembly Program*) disponible en la red (<http://bio.ifom-firc.it/ASSEMBLY/assemble.html>).

5) Búsqueda de significado por cambio aminoacídico y búsqueda de dianas de restricción

Una vez realizado el alineamiento de las secuencias nucleotídicas para la búsqueda de mutaciones, se identificó si estas mutaciones producían algún cambio aminoacídico en la proteína codificada o generaban un codon stop. También se trató de determinar la presencia de dianas de restricción polimórficas para comprobar el posible genotipado a través de la metodología de PCR-RFLP. Para ello, se utilizó el programa "Restriction Site Analysis Simple", disponible en la red (<http://web.umassmed.edu/bioapps/rsites.html>).

Por otro lado se trató de determinar, de forma teórica, si los cambios aminoacídicos generados tenían alguna manifestación en la estructura secundaria de la proteína y por tanto alguna implicación funcional, para ello se utilizó el programa de simulación de estructuras secundarias PsiPred, disponible en la red (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) y el programa de búsqueda de dominios (basado en la comparación con dominios en la base de datos)(SMART), también disponible en la red (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

6) Genotipado de polimorfismos mediante el análisis del tamaño de los fragmentos amplificados

Los polimorfismos de tipo INDELS (Inserción-delección) pueden genotiparse amplificando la región que contiene esta mutación por PCR y determinando el tamaño del fragmento. Si el cambio de tamaño es muy pequeño (aproximadamente inferior a 10 nucleótidos), para su detección se requiere el empleo de geles de poliacrilamida de alta resolución o bien el uso de un analizador automático de fragmentos.

Se diseñaron parejas de oligonucleótidos que permitiesen amplificar los fragmentos polimórficos y que tuviesen un tamaño 150-250 pb para un análisis posterior en el analizador genético.

Uno de los oligonucleótidos de cada pareja se marcó con una sustancia fluorescente para su posterior detección. Este marcaje fluorescente se basa en la unión de fluorocromos que al ser excitados con el láser emiten luz a distinta longitud

de onda del espectro visible. El fluorocromo empleado para el marcaje de los oligonucleótidos utilizados fue 6-Fam que emite fluorescencia azul.

Las reacciones de amplificación fueron específicas para cada pareja de oligonucleótidos y se confirmaron en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio, permitiendo además cuantificar la intensidad de amplificación por comparación con marcadores de tamaño molecular.

Para cargar las muestras en el analizador genético, a 1 μ l de la reacción de amplificación se le añadieron 20 μ l de formamida desionizada y se pasaron a placas de 96 pocillos (Applied Biosystems) que se taparon con "Septum" (Applied Biosystems) y se analizaron en un equipo de electroforesis capilar de análisis de fragmentos ABI PRISM 3100.

7) PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*):

Esta técnica se basa en la utilización de enzimas de restricción que cortan la doble cadena de ADN en lugares específicos de reconocimiento o dianas de restricción y permiten detectar polimorfismos en dichas dianas de reconocimiento específicas.

La técnica consiste en una amplificación por PCR del locus o fragmento polimórfico, se somete a la posterior digestión con el enzima de restricción correspondiente, separación de los fragmentos resultantes mediante electroforesis en distintos tipos de geles y visualización de los fragmentos ordenados por tamaños.

En este trabajo la separación de los fragmentos resultantes de las digestiones se realizaron mediante electroforesis horizontales en geles de agarosa de alta resolución (Metaphor) al 2-3.5% (según los tamaños de los fragmentos a separar) en tampón TBE aplicando voltajes de 120-130 voltios durante 60 min y tinción con bromuro de etidio.

En cada pocillo del gel se cargaron 20 μ l de la reacción de digestión mezclados con 2 μ l de tampón de carga. Los tamaños de las bandas se estimaron por comparación con determinados patrones de tamaño molecular.

8) PCR-SSCP (*Single Stranded Conformational Polymorphism*):

Esta técnica se basa en los cambios en la conformación de la molécula de ADN de cadena sencilla producidos como consecuencia de mutaciones en las cadenas de ADN, lo que provoca diferencias de movilidad electroforética.

La técnica consiste en amplificar por PCR el locus o fragmento polimórfico, y tras una fase de desnaturalización, se somete a una electroforesis en condiciones no desnaturalizantes.

En este trabajo la electroforesis no desnaturalizante se realizó en geles de poliacrilamida empleando el kit de SSCP "GeneGel SSCP gels" y "GeneGel SSCP buffer B" (Pharmacia Biotech), y utilizando el equipo de electroforesis GenePhor (Pharmacia Biotech) que permite mantener unas condiciones de carrera altamente estables (temperatura, humedad y voltaje). Para ello a 2 μ l de la reacción de PCR se le añadió 1 volumen de tampón de carga (4.75 ml formamida, 0.125 ml cianol xileno 1%, 0.125 ml azul de bromofenol 1%), se sometió a una desnaturalización (95°C durante 5 min) y se cargó en cada pocillo. Se utilizó el patrón de tamaños moleculares "1000 Base-Pair ladder" (Amersham Pharmacia Biotech).

Durante la carrera se aplicaron tres fases de voltaje: fase 1 (150 voltios durante 20 min), fase 2 (300 voltios durante 45 min) y fase 3 (350 voltios durante 20 min) a una Tª constante de 15°C.

Una vez finalizadas las carreras, los geles se fijaron y tiñeron con nitrato de plata utilizando el equipo de tinción "Automated Gel Stainer" (Amersham Pharmacia Biotech) empleando los reactivos de tinción del kit "Plus One DNA Silver Staining" (Amersham Pharmacia Biotech).

La preparación de los geles y tampones se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

9) PCR alelo-específica:

Esta técnica se basa en la generación de oligonucleótidos específicos para cada uno de los nucleótidos que constituyen el polimorfismo. Esta especificidad se consigue diseñando dos oligonucleótidos de manera que en el extremo 3´ se localice

la posición polimórfica, de forma que se dé la unión específica de cada oligonucleótido con su alelo correspondiente y la consiguiente extensión.

En general, cada oligonucleótido específico se marca con un fluorocromo distinto y la amplificación se realiza en una única reacción de PCR compartiendo el oligonucleótido antisentido y se realiza una electroforesis capilar en un equipo de secuenciación automática. Otra opción es el diseño de oligonucleótidos específicos que varíen en tamaño de forma que en una sola reacción de PCR los fragmentos que resultan puedan ser visualizados en una electroforesis horizontal en geles de agarosa.

La estrategia que se ha seguido en este trabajo ha sido la de realizar las reacciones de PCR por separado, con cada uno de los oligonucleótidos específicos y visualización en geles de agarosa, ambas reacciones también por separado, de forma que la doble amplificación (en ambas reacciones), indicaría la presencia de heterocigotos, mientras que la amplificación exclusiva con uno de los oligonucleótidos indicaría la presencia de homocigotos para uno de los alelos.

10) Localización de un gen candidato

La localización física consiste en localizar el gen sobre un cromosoma o fragmento cromosómico a través de técnicas moleculares y/o citogenéticas (panel de células híbridas somáticas (Figura 22), hibridación *in situ* fluorescente (Figura 23)).

Figura 22: Panel de células híbridas somáticas

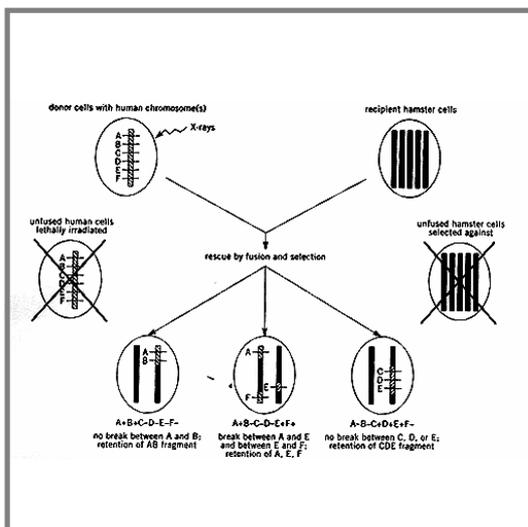
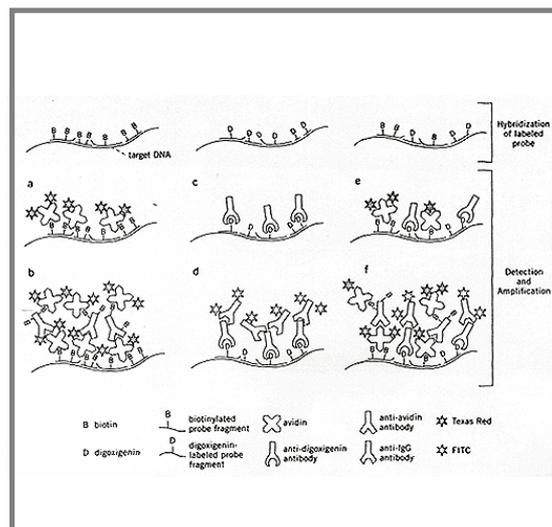


Figura 23: Método FISH



En este trabajo se ha realizado la localización física de un gen no localizado en la especie porcina empleado la técnica de localización a través de un panel de células híbridas somáticas radiadas (<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/RH/IMpRH.htm>).

La localización genética o de ligamiento consiste en localizar el gen entre marcadores o genes ya descritos y localizados. Esta localización se basa en el análisis de ligamiento o de recombinación.

Recombinación es el proceso por el cual se generan cromosomas distintos a los parentales durante la meiosis, por tanto cuanto más ligados estén dos loci menor será la probabilidad de que se dé recombinación.

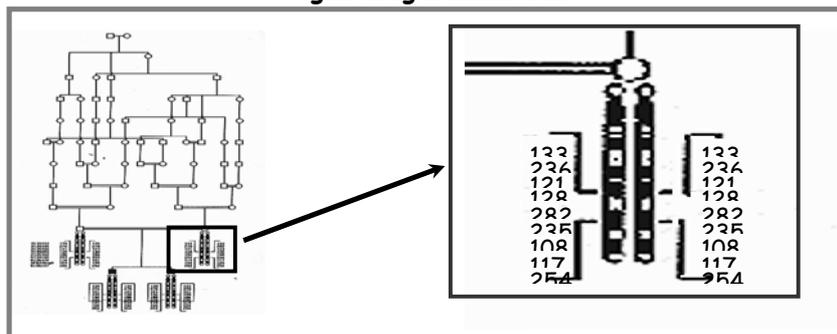
Esta frecuencia de recombinación (r) es la que determina la distancia (d) existente entre dos loci, a través de las funciones de mapeo (Tabla 10).

Tabla 10: Funciones de mapeo más usadas:

- función de mapeo de Morgan	$d=r$ $d_{AC}=d_{AB}+d_{BC}$	$r_{AC}=r_{AB}+r_{BC}$
- función de mapeo de Haldane	$d_{AC}=d_{AB}+d_{BC}$	$r_{AC}=r_{AB}+r_{BC}-2 r_{AB} r_{BC}$
- función de mapeo de Kosambi	$r_{AC}=r_{AB}+r_{BC}-2 r_{AB} r_{BC} * C$	$C=1-\text{Interferencia}$
- función de mapeo de Carter y Falconer	$r_{AC}=r_{AB}+r_{BC}-2 r_{AB} r_{BC} * C$	$C=8r^3$

El análisis de ligamiento se basa en la observación de segregación de los gametos. A partir de una familia grande con genealogía conocida, y una vez determinados los alelos que presentan dichos individuos en la familia para los loci polimórficos analizados, se establecen el orden y distancia relativa de los loci (Figura 24).

Figura 24: Construcción de un mapa de ligamiento a partir de una familia grande con genealogía conocida.



En este trabajo la localización genética o de ligamiento se realizó utilizando la información del genotipado de determinados polimorfismos detectados en el gen objeto de estudio para el cruce experimental F2 de Ibérico x Landrace, junto con la información disponible en este material de marcadores de tipo microsatélite, (se dispone de información de marcadores de tipo microsatélite para todos los cromosomas) información que se almacenó utilizando el programa informático GEMMA.

Este programa es una base de datos desarrollada por los laboratorios del INRA de Toulouse que permite gestionar toda la información relativa a animales (genealogía y tipos de muestra), marcadores (protocolos, cebadores, alelos), y preparación e interpretación de geles, determinando y registrando los genotipos. Por otra parte, este programa permite verificar la coherencia de los genotipos asignados, dada la información de pedigrí, calcular parámetros de informatividad, heterocigosidad, PIC y frecuencias alélicas y exportar estos datos como archivos con formatos ASCII, GEMMA o CRIMAP.

Para la generación de los mapas de ligamiento en este trabajo se emplearon las opciones "Build" "Twopoint" y "Chrompic" del programa informático CRIMAP versión 2.4 (Green et al., 1990). Este programa establece el orden de los loci en el cromosoma, según su valor de verosimilitud y una vez establecido el orden de los loci, se establece el perfil de lodscore, la fracción de recombinación y las distancias relativas calculada mediante la función de mapeo de Kosambi, generando el correspondiente mapa de ligamiento.

I. ANÁLISIS DEL GEN *MC1R*

1. $\chi^2 \chi^2 \chi^2 - 0 - 0 - 0$ $A \mu \chi^2 \chi^2 \chi^2$ $\chi^2 \chi^2$

I. ANÁLISIS DEL GEN *MC1R*. I.a. Búsqueda de polimorfismos en el gen mediante secuenciación. I.b. Análisis de la diversidad genética en poblaciones de cerdo ibérico

Ia. Búsqueda de polimorfismos en el gen mediante secuenciación

1. Secuenciación de ADN

El análisis de este gen se realizó en ADN obtenido de muestras de sangre, de hígado (para las muestras de cerdos vietnamitas) y de pelo (para cerdos de la raza Pampa).

Se analizó la secuencia nucleotídica del gen a través de secuenciación directa del gen, en ambos sentidos, en muestras de animales pertenecientes a las siguientes razas y poblaciones porcinas: 2 animales ibéricos con capa negra, 2 con capa colorada, 2 con capa retinta, 2 animales pertenecientes a la población Manchado de Jabugo, 2 animales pertenecientes a la raza Duroc, 2 animales pertenecientes a la raza Landrace, 2 animales pertenecientes a la raza Meishan, 2 animales pertenecientes a una población de origen vietnamita, 2 animales pertenecientes a la raza Pampa, 4 animales pertenecientes a la raza Mangalitzta (2 colorados y 2 golondrinos), 2 animales pertenecientes a la raza Vasca y 2 jabalíes europeos.

Para la secuenciación del gen se utilizaron dos parejas de oligonucleótidos descritas previamente, MERL1-EXT4 y EPIG1-EPIG3 e indicadas en el anexo 2 (Kijas et al. 1998), que permiten amplificar 801pb del único exón. Además se diseñaron otras tres parejas de oligonucleótidos diferentes (MC1RFW1-MC1RRW1; MC1RFW2-MC1RRW2; MC1RFW3-MC1RRW3, indicadas en el anexo 2) a partir de la secuencia porcina publicada (GenBank nº de acceso: AF326520). En total se han amplificado 1828 pb del gen *MC1R* que incluye la totalidad de su único exón y parte de las regiones 5' y 3' no codificantes.

Las reacciones de PCR fueron realizadas en volúmenes de 25 µl, conteniendo buffer estándar (75mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄), MgCl₂, dNTPs, oligonucleótidos, Tth (Biotools) y ADN (cantidades indicadas en la Tabla 11). Las condiciones de amplificación fueron 94°C durante 3 min, seguido de 32 ciclos a 94°C (45 s), T^a anillamiento específica de cada pareja de oligonucleótidos (45s)

(indicada en la tabla 11), 72°C(45s) y una fase de extensión final a 72°C durante 7 min. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA).

Tabla 11: Condiciones de amplificación de los cinco fragmentos amplificados del gen *MC1R*

Fragmento	1	2	3	4	5
Oligonucleótidos	MC1RFW1-MC1RRW1 (538 pb)	MC1RFW2-MC1RRW2 (572 pb)	MERL1-EXT4 (449 pb)	EPIG1-EPIG3 (405 pb)	MC1RFW3-MC1RRW3 (454 pb)
Reactivos					
MgCl ₂	2.5mM	2.5mM	1mM	1mM	2.5 mM
dNTPs	240µM	240µM	200µM	200µM	200µM
Oligocleótidos	12.5 pmol	12.5 pmol	10 pmol	10 pmol	12.5 pmol
Tth	0.75u	0.75u	0.6u	0.6u	0.5u
ADN	75ng	75ng	50ng	50ng	60 ng
T ^a anillamiento	65°C	63°C	53°C	53°C	63°C

El producto resultante de la amplificación fue visualizado en un gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio, confirmando la amplificación del fragmento correspondiente por comparación con el patrón de peso molecular BioMarker Low (BioVentures). El fragmento amplificado fue purificado y secuenciado en un equipo de electroforesis capilar, ABI 310.

Las secuencias obtenidas fueron editadas, ensambladas y alineadas para la búsqueda de mutaciones en las muestras disponibles.

Tabla 12: Polimorfismos y haplotipos detectados para el gen *MC1R* en los 26 animales analizados

	Fragmento 1 MC1RFW1-MC1RRW1		Fragmento 2 MC1RFW2-MC1RRW2						Fragmento 3 MERL1-EXT4				Fragmento 4 EPIG1-EPIG3		Fragmento 5 MC1RFW3-MC1RRW3		Haplotipos		
Posición nt	432	500	603	608	640	668	759	802	878	896	1110	1132	1190	1197	1318	1554	1556	1797	
2 Jabalí	C	C	A	G	C	G	G	C	G	-	G	T	G	G	C	G	G	A	MC1R*1
2 Landrace	C	C	A	G	C	G	G	C	G	-CC-	G	T	G	A	C	G	G	A	MC1R*6
2 Duroc	C	C	A	G	C	C	G	C	G	-	G	T	G	G	T	A	G	A	MC1R*4
2 Mangalitza colorado	C	C	A	G	C	C	G	C	G	-CC-	G	T	G	A	C	G	G	--	MC1R*8
2 Ibérico rubio	C	C	A	G	C	G	G	C	G	-CC-	G	T	G	A	C	G	G	A	MC1R*6
2 Ibérico colorado	C	C	A	G	C	G	G	C	G	-CC-	G	T	G	G	C	G	G	A	MC1R*7
2 Ibérico entrepelado	C	C	A	G	C	G	G	C	G	-CC-	G	T	G	A	C	G	G	A	MC1R*6
2 Mangalitza golondrino	T	C	A	G	C	G	G	C	G	-	G	T	G	G	C	G	G	A	MC1R*9
2 Meishan	C	T	G	A	T	G	A	T	A	-	A	C	A	G	C	G	A	--	MC1R*2
2 Cerdos vietnamitas	C	T	G	A	T	G	A	T	A	-	A	C	A	G	C	G	A	--	MC1R*2
2 Pampa	C	C	A	G	C	G	G	C	G	-CC-	G	T	G	A	C	G	G	A	MC1R*6
2 Ibérico negro	C	C	A	G	C	G	G	C	G	-	G	T	G	A	C	G	G	A	MC1R*3
2 Cerdos vascos	C	C	A	G	C	G	G	C	G	-	G	T	G	A	C	G	G	A	MC1R*3

- ★ Nuevos polimorfismos, no descritos previamente
- ★ Polimorfismos descritos, Kijas et al. 1998
- ★ Polimorfismos descritos, Kijas et al. 2001

Los resultados del alineamiento de las secuencias obtenidas de la amplificación de los cinco fragmentos solapados del gen se muestran en la tabla 12, donde se indican los animales secuenciados y las posiciones donde se han detectado sitios polimórficos, referidas a la secuencia publicada (Nº acceso AF326520).

En la tabla 12 se muestran los 18 polimorfismos detectados en 1828 pb secuenciadas del gen, en los 26 individuos analizados pertenecientes a 13 orígenes o tipos distintos. De estos polimorfismos 16 corresponden a polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) y 2 son INDELS. Por otra parte, 9 de estos polimorfismos ya habían sido detectados previamente (Kijas et al., 1998; Kijas et al., 2001, Giuffra et al., 1999), y 9 son nuevos polimorfismos localizados en la región no codificante del gen.

La combinación de los polimorfismos detectados determinan 8 haplotipos diferentes, de los cuales 5 habían sido descritos previamente (Kijas et al., 1998, 2001; Giuffra et al., 1999) y constituyen los alelos del gen (*MC1R*1*, *MC1R*2*, *MC1R*3*, *MC1R*4*, *MC1R*6*) y 3 corresponden a nuevas combinaciones de polimorfismos incluyendo las detectadas en las regiones no codificantes. Por otro lado, no se detecta la presencia del haplotipo *MC1R*5*, descrito en jabalí japonés.

2.Descripción de los haplotipos detectados

Alelo/Haplotipo *MC1R*1*

Alelo considerado silvestre, constituido por la secuencia nucleotídica que da lugar a la proteína silvestre, indicada en el anejo 2 como *MC1R*1*.

Alelo/Haplotipo *MC1R*2*

Alelo determinado por la presencia de cinco mutaciones de tipo SNPs, en la región codificante del gen, en las posiciones 878, 1110, 1132 1197 y 1556, dos de las cuales producen cambios en la secuencia aminoacídica de la proteína, indicada en el anejo 2 como *MC1R*2*. Además se detecta la presencia de otros 6 SNPs en la región no codificante del gen, en las posiciones 500 (C/T), 603 (A/G), 608 (G/A), 640 (C/T), 759 (G/A) y 802 (C/T) y una delección en la posición 1797 (-A).

La mutación localizada en la posición 1110 de la secuencia nucleotídica del gen (G/A), produce un cambio aminoacídico de Valina a Metionina, es decir un

aminoácido hidrofóbico es sustituido por uno neutro, esta mutación había sido descrita en trabajos previos como V92M. Por otro lado, la mutación localizada de la posición 1132 de la secuencia nucleotídica del gen (T/C), produce un cambio aminoacídico de Leucina a Prolina, es decir de un aminoácido hidrofóbico también a un aminoácido neutro, también descrita en trabajos anteriores como L99P. Ambas mutaciones indicadas en el Anejo 2 como MC1R*2 y traen como consecuencia un cambio en la estructura secundaria de la molécula (Anejo 2).

Este haplotipo aparece en muestras de animales pertenecientes a las razas Meishan y Cerdos de origen vietnamita.

Alelo/Haplotipo MC1R*3

Alelo determinado por la presencia de una mutación en la posición 1197 de la secuencia nucleotídica del gen (G/A) y produce un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína, indicada en el Anejo 2 como MC1R*3.

Este cambio consiste en una sustitución de Aspártico por Asparagina, es decir de un aminoácido ácido a un aminoácido polar, cambio descrito en trabajos anteriores como D121N y que conlleva una modificación en la estructura secundaria de la proteína (Anejo 2).

Alelo/Haplotipo MC1R*4

Alelo determinado por la presencia de dos mutaciones en la región codificante del gen, en las posiciones 1318 y 1554 de la secuencia nucleotídica del gen (C/T y G/A, respectivamente) y 1 mutación en la región no codificante del gen, en la posición 668 (G/C).

La mutación localizada en la posición 1318 produce un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína. Este cambio es de una Adenina a Valina, es decir de un aminoácido hidrofóbico a otro hidrofóbico, cambio descrito en trabajos anteriores como A161V.

La mutación localizada en la posición 1554 produce un cambio de aminoácido en la secuencia de la proteína, este cambio consiste en una sustitución de Alanina a

Treonina, es decir de un aminoácido hidrofóbico a un aminoácido polar, también descrito en trabajos anteriores como A240T.

Estos cambios en la secuencia aminoacídica, representados en el Anejo 2 como MC1R*4, conllevan un cambio en la estructura secundaria de la proteína (Anejo 2).

Alelo/Haplotipo MC1R*6

Alelo determinado por la presencia de dos mutaciones, una inserción –CC- en la posición 896, descrita en trabajos previos como nt67insCC, y una sustitución (G/A) en la posición 1197 de la secuencia nucleotídica del gen.

La mutación localizada en la posición 1197 es compartida con el alelo MC1R*3, mientras que la inserción en la posición 896 del gen produce un cambio en el marco de lectura de la secuencia aminoacídica y por tanto genera una proteína con dominios diferentes a la proteína silvestre (Anejo 2, indicado como MC1R*6).

Alelo/Haplotipo MC1R*7

Alelo determinado por la presencia exclusiva de la inserción en la posición 896 de la secuencia nucleotídica del gen. Dicha mutación es compartida con el alelo MC1R*6, por tanto presenta la misma consecuencia en la secuencia de la proteína y su misma funcionalidad, indicada en el Anejo 2 como MC1R*7.

Alelo/Haplotipo MC1R*8

Haplotipo constituido por la secuencia que caracteriza al haplotipo MC1R*6 junto con dos mutaciones en las regiones no codificantes (posiciones 668 y 1797), haplotipo que se detectó en animales pertenecientes a la población con capa colorada de la raza Mangalitza.

Alelo/Haplotipo MC1R*9

Haplotipo constituido por la secuencia silvestre (MC1R*1), junto con una mutación en la región no codificante en posición 432, detectado en animales pertenecientes a la población con capa golondrina de la raza Mangalitza.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la secuenciación para el gen *MC1R* muestran el elevado índice de polimorfismos presentes en este gen. Nueve polimorfismos se detectaron en la región codificante y otros nueve se detectaron en la región no codificante del mismo, en 1828 pb analizadas. Esto supone una frecuencia aproximada de 1 polimorfismo por cada 100 pb, frecuencia superior a la esperada (en la especie humana se calcula una frecuencia de 1 por cada 500 pb).

Los polimorfismos detectados en la región codificante del gen determinan los seis alelos que han sido descritos previamente, estos son *MC1R*1*, *MC1R*2*, *MC1R*3*, *MC1R*4*, *MC1R*5* y *MC1R*6*, con función fisiológica atribuida (Kijas et al., 1998, 2001; Giuffra et al., 2000)

En las poblaciones y razas de cerdos analizados en este trabajo, se detectaron la presencia de ocho haplotipos distintos (*MC1R*1* - *MC1R*4* y *MC1R*8* - *MC1R*9*), definidos por las posiciones polimórficas, tanto en la región codificante como en la no codificante, y pese a que los haplotipos *MC1R*8* y *MC1R*9*, en principio no tienen una implicación funcional porque los polimorfismos que los definen no están localizados en regiones codificantes (el polimorfismo que determina el alelo *MC1R*5*, definido por Giuffra et al. (2000), no genera un cambio aminoacídico y por tanto tampoco tiene una implicación funcional), sí permitirían la discriminación de unas poblaciones de otras.

Concretamente, la delección (-A-) localizada en la posición 1797 del gen, presente en los haplotipos *MC1R*2* y *MC1R*8*, se detectó en cerdos que comparten un origen asiático (Meishan, Cerdos de origen vietnamita y Mangalitza colorado) excepto para la variedad de Mangalitza golondrino (*MC1R*9*), que no contiene esta delección, por lo que, dentro de los animales pertenecientes a la raza Mangalitza, se podrían diferenciar ambas variedades por esta delección, por el oligonucleótido que presenta en la posición 432 del gen y por la inserción de dos citosinas en la posición 896 del gen (previa confirmación del mismo en un mayor número de muestras).

En las muestras de animales pertenecientes a razas estudiadas previamente para el gen *MC1R* (Kijas et al. 1998; 2001), los resultados obtenidos coinciden,

detectándose la presencia de los alelos *MC1R**1 en jabalí europeo, *MC1R**2 en Meishan, *MC1R**4 en Duroc y *MC1R**6 en Landrace. En este trabajo no se detectó la presencia del alelo *MC1R**5, alelo descrito por Giuffra et al., (2000) en poblaciones de jabalíes japoneses, probablemente porque no se han estudiado en el presente análisis.

I.b. Análisis de la diversidad genética en poblaciones de cerdo ibérico

Los polimorfismos que representaban interés fueron genotipados en un mayor número de animales. Este genotipado a gran escala se realizó a través de tres técnicas distintas, dependiendo del polimorfismo: PCR-RFLP, análisis del tamaño de los fragmentos amplificados en un analizador automático (ABI PRISM) y PCR-SSCP.

Los polimorfismos localizados en las posiciones 1554, 1556, 1110 y 1197 generan dianas de restricción polimórficas para los enzimas *BstU* I (pos. 1554 y 1556) y *BspH* I (pos. 1110), descritos anteriormente por Kijas et al. (1998) y *Nsp* I (pos. 1197), no descrita previamente, por lo que se genotiparon aplicando la metodología de PCR-RFLP. Las reacciones de digestión se realizaron en volúmenes de 20 µl conteniendo 10 µl del producto de PCR, 2 µl de buffer de digestión 10x correspondiente a cada una de las enzimas y 2 u de enzima (New England Biolabs). Los fragmentos digeridos, las condiciones de digestión y fragmentos esperados aparecen indicados en la tabla 13.

Tabla 13: Características de las reacciones de digestión para el genotipado por PCR-RFLP de polimorfismos en el gen *MC1R*

Fragmento	3 MERL1-EXT4	3 MERL1-EXT4	4 EPIG1-EPIG3
Enzima de restricción	Nsp I	BspH I	BstU I
Diana	Pu C A T G Py	T C A T G A	C G C G
Buffer	NEB2	NEB4	NEB2
Tª digestión	37°C	37°C	60°C
Fragmentos de los alelos (pb)	449 272/177	449 260/189	405 222/183

Los fragmentos resultantes se visualizaron en geles de agarosa al 2.5% de alta resolución (Metaphor) y tinción con bromuro de etidio.

Para el genotipado de la inserción de 2 citosinas en la posición 896 del gen, se procedió a realizar el análisis de los fragmentos amplificados en un equipo de electroforesis capilar, ABI PRISM 3100. Para ello se diseñó una pareja de oligonucleótidos (MC1RA-MC1RB, indicada en el Anejo 2), cuyo oligonucleótido antisentido fue modificado en el extremo 5' con el fluorocromo 6-FAM, que permiten amplificar un fragmento de 203 pb –205 pb. La PCR se realizó en volúmenes de 10 µl conteniendo buffer standard 1X, 2mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 4 pmoles de cada oligonucleótido, 0.3 u Tth (Biotools) y 30 ng de ADN. Las condiciones de amplificación fueron 94°C durante 3min, seguido de 32 ciclos a 94°C (45s), 63°C(45s), 72°C (45s) y una fase final de extensión de 72°C durante 7 min. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, MA).

El producto de amplificación se sometió a una electroforesis vertical en un analizador automático, ABI 3100, y los fragmentos fueron interpretados con el software GenScan.

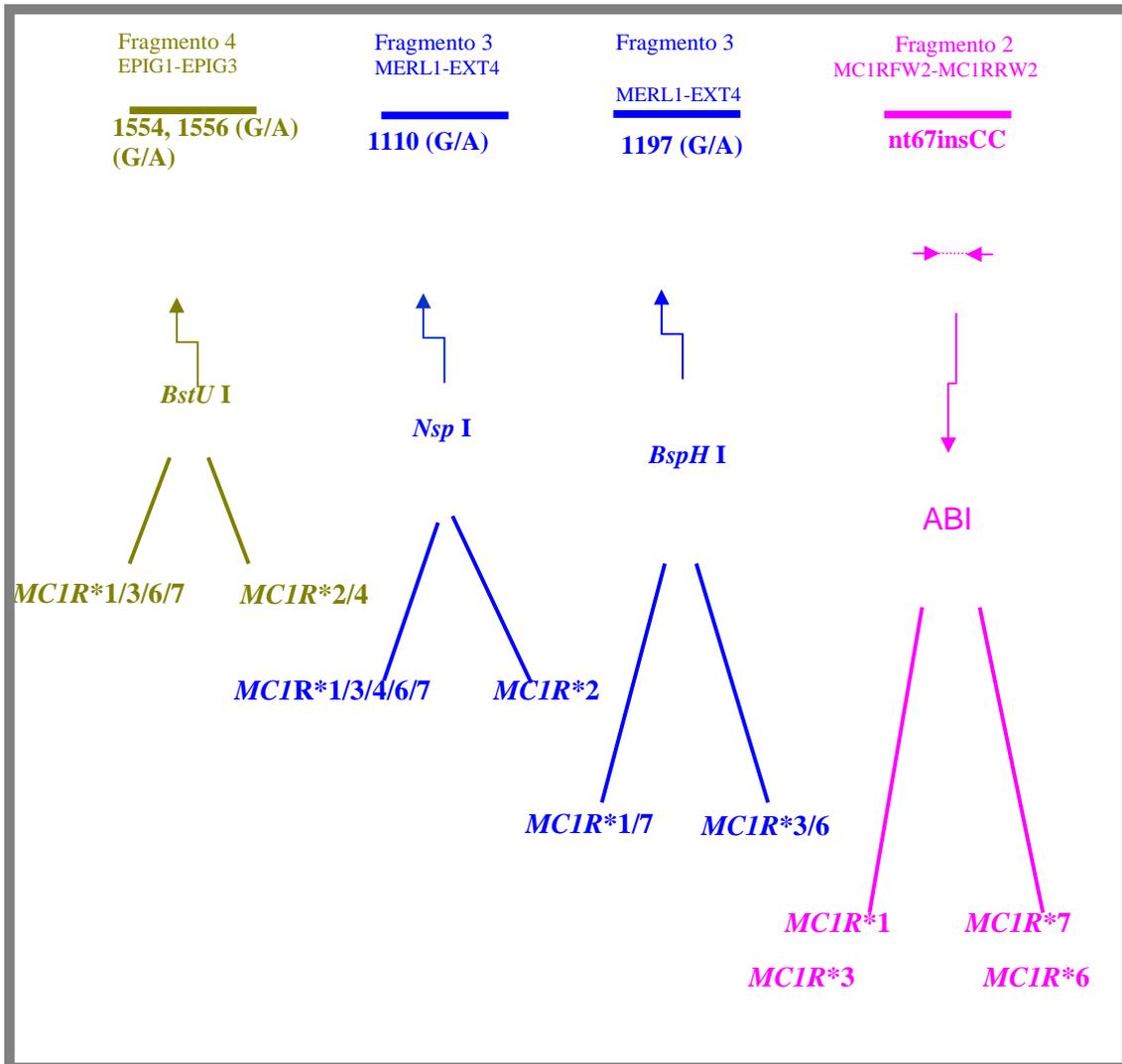
El genotipado de estos cuatro polimorfismos descritos se realizó en animales de las razas Ibérica (15 animales pertenecientes a la línea Torbiscal, 31 animales con capa negra, 109 con capa colorada, 79 con capa entrepelada, pertenecientes a distintas ganaderías), 14 Manchado de Jabugo, 104 animales Duroc y 31 jabalíes.

Por otro lado se realizó el genotipado de estos polimorfismos en los individuos del cruce experimental de Ibérico (Guadyerbás) y Landrace, incluyendo 33 F₀, 70 F₁ y 377 F₂ y 87 F₃ para la construcción de un nuevo mapa de ligamiento del cromosoma 6 porcino y realizar un análisis fino de detección de QTL.

Genotipado de los haplotipos del *MC1R*1* al *MC1R*7*

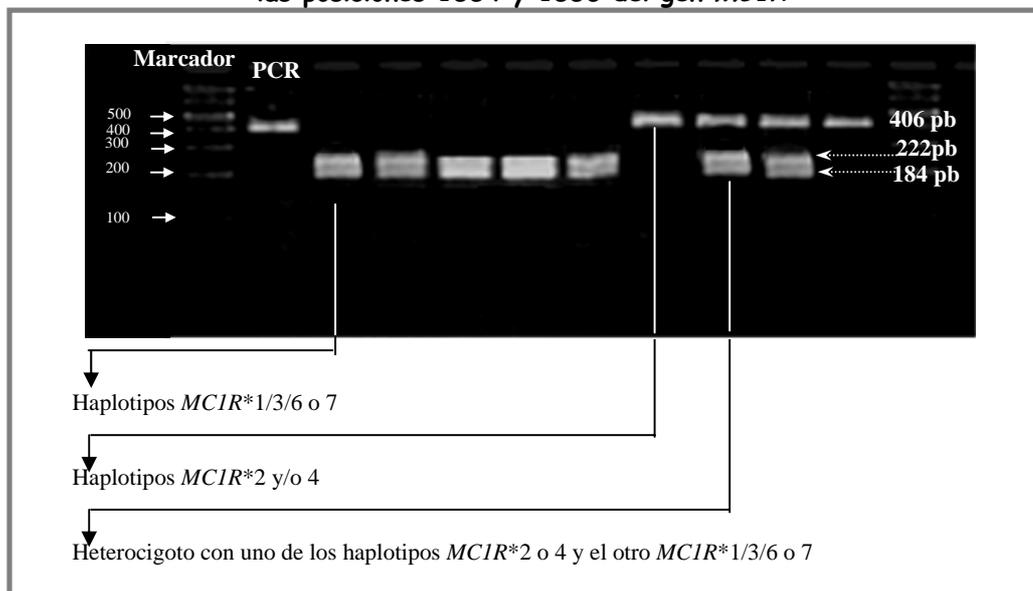
Siguiendo el criterio indicado en la Figura 25, en base a los polimorfismos detectados, se genotiparon los haplotipos *MC1R*1* al *MC1R*4*, *MC1R*6* y *MC1R*7* ya que son los que segregan en las poblaciones y razas analizadas y se distinguen por posiciones polimórficas en la región codificante.

Figura 25: Criterio para la determinación de los haplotipos del gen *MC1R*



La discriminación de los haplotipos *MC1R**1, 3, 6 y 7 de los haplotipos *MC1R**2 y 4 se realizó en base a los nucleótidos que presentan en las posiciones 1554 y 1556. Estos polimorfismos fueron genotipados, como se menciona anteriormente, mediante PCR-RFLP (*BstU* I) para la discriminación de estos alelos (Figura 26).

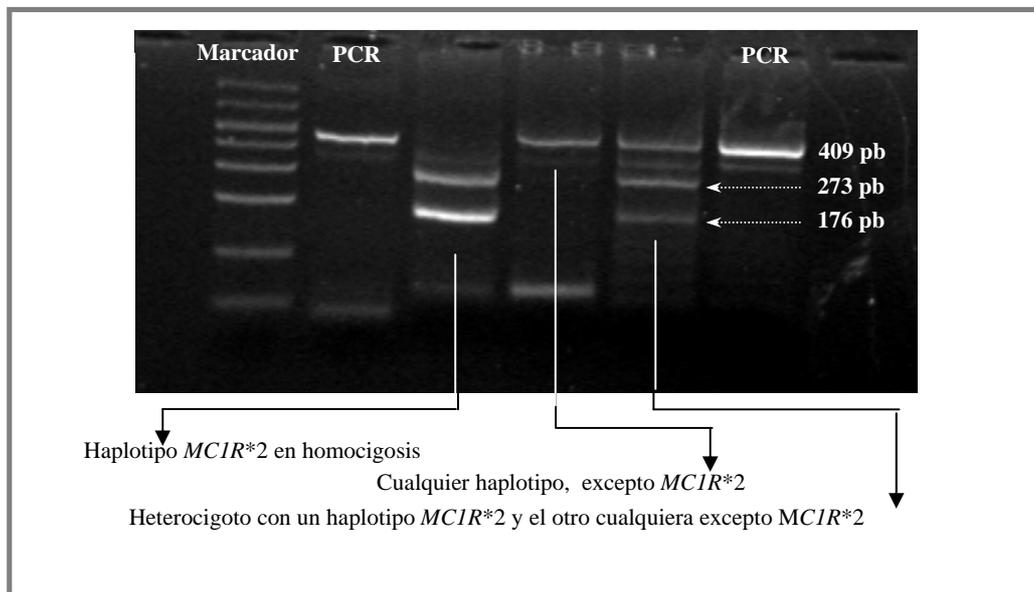
Figura 26: Patrón electroforético del RFLP *BstU* I para los SNPs localizados en las posiciones 1554 y 1556 del gen *MC1R*



Los individuos que presentan los haplotipos *MC1R**2 y 4 no presentan la diana de restricción activa y por tanto el producto amplificado no es digerido con el enzima, generando únicamente el fragmento de 406 pb, mientras que los individuos que presentan los haplotipos *MC1R**1, 3, 6 o 7, presentan la diana de restricción activa y por tanto el producto de amplificación es digerido con la enzima generando dos fragmentos de 184 y 222 pb.

Por otro lado, la discriminación del haplotipo *MC1R**2 del resto de haplotipos se realizó en base al nucleótido que presentan en la posición 1110 de la secuencia nucleotídica. Este polimorfismo fue genotipado, como se menciona anteriormente, por PCR-RFLP (*Nsp* I) para la discriminación de los alelos (Figura 27).

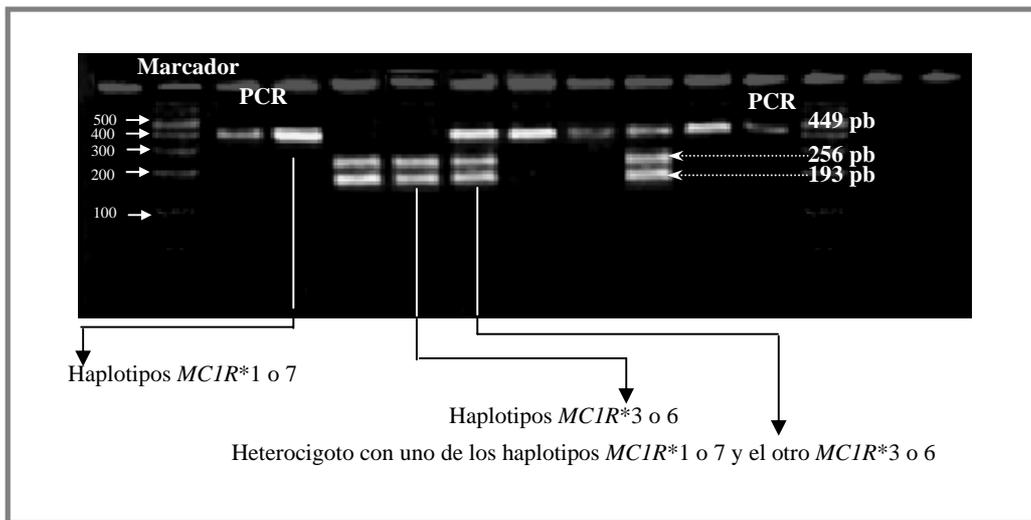
Figura 27: Patrón electroforético del RFLP *Nsp* I para el SNP localizado en la posición 1110 del gen *MC1R*



Los individuos que presentan el haplotipo *MC1R**2 tienen la diana de restricción activa y por tanto el fragmento amplificado es digerido con el enzima de restricción dando como resultado dos fragmentos de 176 y 273 pb, mientras que los individuos que no presentan este haplotipo no tienen la diana de restricción activa por lo que el fragmento amplificado no es digerido y como consecuencia se genera un único fragmento de 449 pb.

La discriminación de los haplotipos *MC1R**1 y 7 de los haplotipos *MC1R**3 y 6, se realizó en base al nucleótido que presentan en la posición 1197 de la secuencia nucleotídica del gen. Este polimorfismo fue genotipado, como se menciona anteriormente, por PCR-RFLP (*BstH* I) para la discriminación de los alelos (Figura 28).

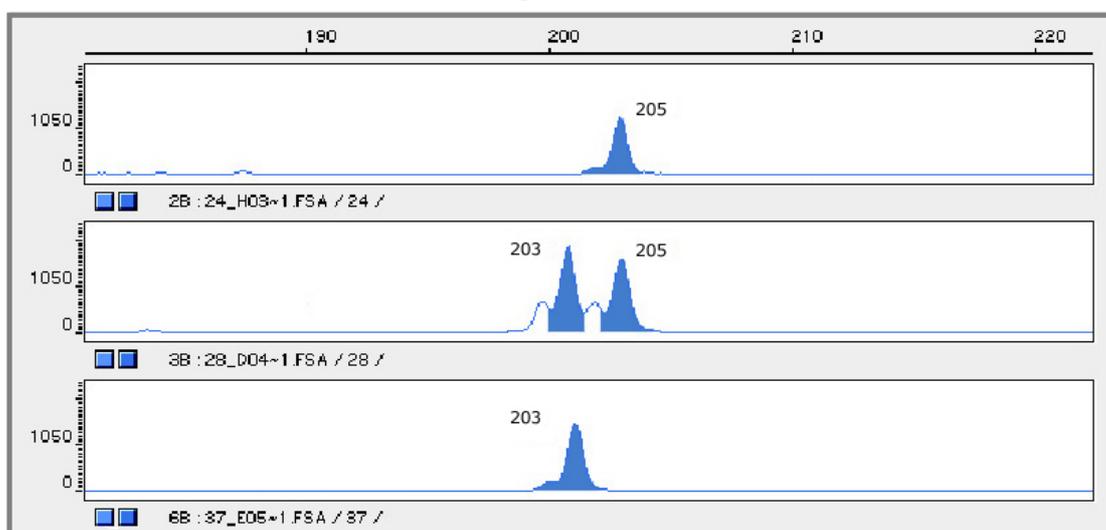
Figura 28: Patrón electroforético del RFLP *BspH* I para el SNP localizado en la posición 1197 del gen *MC1R*



Los individuos que presentan los haplotipos *MC1R**3 y 6 presentan la diana activa y por tanto el fragmento amplificado es digerido con el enzima de restricción generando dos fragmentos de 193 y 256 pb, mientras que los individuos que presentan los haplotipos *MC1R**1 y 7 no presentan la diana activa por lo que el fragmento amplificado no es digerido con el enzima de restricción y genera un único fragmento de 449 pb.

Por último la discriminación de los haplotipos *MC1R**1 de *MC1R**7 y *MC1R**3 de *MC1R**6 se realizó en base a la presencia o ausencia de la inserción detectada en la posición 896 del gen. Para ello se utilizó la metodología de PCR y posterior análisis del tamaño de los fragmentos amplificados en un equipo de electroforesis capilar de análisis de fragmentos, como se menciona anteriormente (Figura 29).

Figura 29: Electroferogramas obtenidos para la inserción -CC- en la posición 896 del gen *MC1R*



Esta metodología permite discriminar los individuos homocigotos con inserción, cuyo tamaño de fragmento amplificado fue de 205 pb, de los homocigotos sin inserción, cuyo tamaño de fragmento amplificado fue de 203 pb, y de los heterocigotos que presentaron unos tamaños de los fragmentos amplificados de 203 y 205 pb.

Los resultados del genotipado de los animales analizados aparecen representados en la Tabla 14, donde se indica la población y raza a la que pertenecen los individuos, el número de individuos analizados, entre paréntesis, y el número de individuos detectados para cada uno de los genotipos.

Tabla 14: Resultado del genotipado de los haplotipos del gen *MC1R* en poblaciones de cerdo

	Poblaciones de la raza Ibérica				Manchado de Jabugo (14)	Duroc (104)	Jabalí (31)
	Negros (31)*	Colorados (109)**	Torbiscal (15)	Entrepelados (79)			
<i>MC1R</i> *1/1	--	--	--	--	--	--	25
<i>MC1R</i> *1/3	--	--	--	--	--	--	2
<i>MC1R</i> *1/6	--	--	--	--	--	--	1
<i>MC1R</i> *1/7	--	--	--	--	--	--	3
<i>MC1R</i> *3/3	31	--	--	--	--	--	--
<i>MC1R</i> *3/6	--	2	1	--	--	--	--
<i>MC1R</i> *3/7	--	6	2	11	1	--	--
<i>MC1R</i> *4/4	--	--	--	--	--	104	--
<i>MC1R</i> *4/6	--	--	--	--	2	--	--
<i>MC1R</i> *6/6	--	48	9	30	11	--	--
<i>MC1R</i> *6/7	--	45	3	25	--	--	--
<i>MC1R</i> *7/7	--	8	--	13	--	--	--

*En una población con color de capa negra, considerada ibérica, y no incluida en esta tabla, se detectó la presencia del haplotipo *MC1R**2.

**De los 109 animales con capa colorada genotipados, 15 corresponden a la línea Torbiscal, cuyos resultados aparecen en la columna siguiente.

Por otro lado, en la Tabla 15 se indican las frecuencias de los haplotipos detectadas para cada una de las poblaciones de cerdo ibérico analizadas.

Tabla 15: Frecuencias de los haplotipos del gen *MC1R* en poblaciones de cerdo

	Poblaciones de la raza Ibérica				Manchado de Jabugo (14)	Duroc (105)	Jabalí (31)
	Negros (31)*	Colorados (109)**	Torbiscal (15)	Entrepelados (79)			
<i>MC1R</i> *1	--	--	--	--	--	--	0.903
<i>MC1R</i> *3	1.000	0.037	0.100	0.070	0.036	--	0.032
<i>MC1R</i> *4	--	--	--	--	0.071	0.995	--
<i>MC1R</i> *6	--	0.626	0.733	0.560	0.857	0.005	0.016
<i>MC1R</i> *7	--	0.307	0.167	0.390	0.036	--	0.049

* En una población con color de capa negra, considerada ibérica, y no incluida en esta tabla, se detectó la presencia del alelo *MC1R**2

**De los 109 animales con capa colorada genotipados, 15 corresponden a la línea Torbiscal, cuyos resultados aparecen en la columna siguiente.

2. Genotipado del polimorfismo localizado en la posición 668 del gen

La mutación detectada en la posición 668 del gen, una sustitución de una Guanina por una Citosina en la región no codificante del gen, no se detecta en las muestras de cerdos ibéricos, sin embargo se detectó en las muestras de los animales de la raza Duroc analizados. Esta mutación no genera diana de restricción polimórfica ni cambio en el tamaño del fragmento amplificado, pero sí se produce un cambio en la conformación de la molécula de ADN, lo que permitió su genotipado aplicando la metodología de PCR-SSCP.

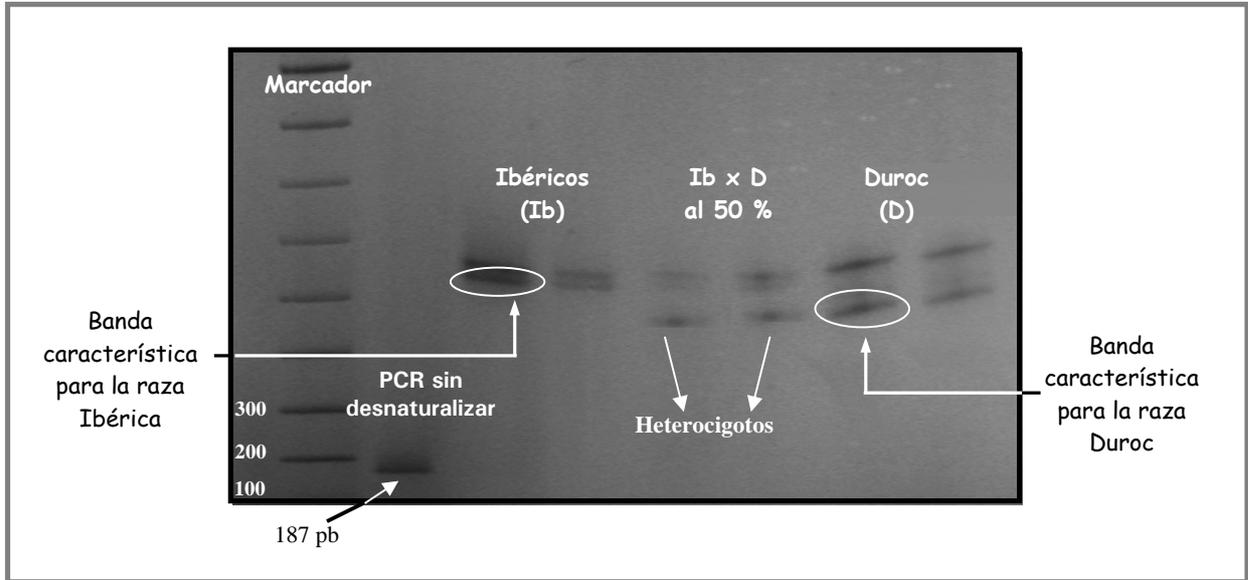
Para el genotipado de este polimorfismo se diseñó una nueva pareja de oligonucleótidos (MC1RSSCPf-MC1RSSCPr, indicada en el Anejo 2), que permiten amplificar un fragmento de 174 pb y que contiene la posición polimórfica.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ l conteniendo buffer estándar 1X, 2mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 12.5 pmoles de cada oligonucleótido, 0.5 u Tth (Biotools) y 60ng de ADN. Las condiciones de amplificación fueron 94°C durante 3min, seguido de 30 ciclos a 94°C (45s), 62.5°C(45s), 72°C (45s) y una fase final de extensión de 72°C durante 7 min. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, MA).

El producto de amplificación fue purificado a partir de banda en el gel (para evitar las bandas aparecidas por amplificación inespecífica) y sometido a una electroforesis no desnaturizante en las condiciones mencionadas anteriormente.

Este polimorfismo fue genotipado (Figura 30) en 40 animales pertenecientes a la raza Duroc (de distintos orígenes), 40 animales pertenecientes a la raza Ibérica (de distintos orígenes) y 5 animales cruzados Duroc x Ibérico al 50%.

Figura 30: Patrón electroforético para el SSCP G/C en la posición 668 del gen *MC1R*



Esta metodología permite discriminar individuos homocigotos de heterocigotos, ya que los individuos homocigotos G/G presentan dos bandas una de las cuales aparece a distinta altura que los homocigotos C/C, y los individuos heterocigotos presentan las tres bandas.

El genotipado de éste polimorfismo se realizó en 40 muestras de animales Ibéricos (negros, colorados, entrepelados y rubios), 40 animales de la raza Duroc (procedentes de distintas ganaderías) y 5 animales cruzados al 50% (IBxD).

El resultado del genotipado de estos individuos aparece representado en la tabla 16, donde se muestran entre paréntesis el número de animales genotipados para cada raza, y el número de animales detectados para cada genotipo, indicado éste con la base nucleotídica que presentaron para la posición polimórfica.

Tabla 16: Resultado del genotipado del polimorfismo localizado en la posición 668 del gen *MC1R*

Genotipo	Ibéricos(n=40)	Duroc(n=40)	Cruzados IbxD 50%(n=5)
<i>G/G</i>	40	0	0
<i>G/C</i>	0	0	5
<i>C/C</i>	0	40	0

Por tanto, la frecuencia con la que aparece el alelo G en la población Ibérica es de 1, mientras que la población Duroc aparece el alelo alternativo, C, también a una frecuencia de 1, por lo que podría considerarse candidato a marcador racial de la raza Duroc.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Respecto al análisis de los haplotipos del gen *MC1R* en las poblaciones de cerdo ibérico analizadas, se detectaron la presencia de tres haplotipos, *MC1R*3*, *MC1R*6*, descritos en trabajos anteriores (Kijas et al., 1998, 2001) y *MC1R*7*, nuevo haplotipo.

El haplotipo *MC1R*3*, se detectó en la población de cerdos ibéricos con capa negra, este resultado coincide con la funcionalidad atribuida para la mutación que lo constituye, ya que la transversión G/A localizada en el nucleótido 1197 del gen, produce un cambio en la secuencia proteínica, éste es una sustitución de un aminoácido ácido (Aspártico) a un aminoácido polar (Asparagina) que a su vez provoca un cambio en la estructura secundaria de la proteína (Anejo xxx). Este cambio, según describen Kijas et al. (1998), produciría la activación constitutiva del receptor MC1R, de forma que se produce la síntesis exclusiva del pigmento eumelanina, pigmento negro.

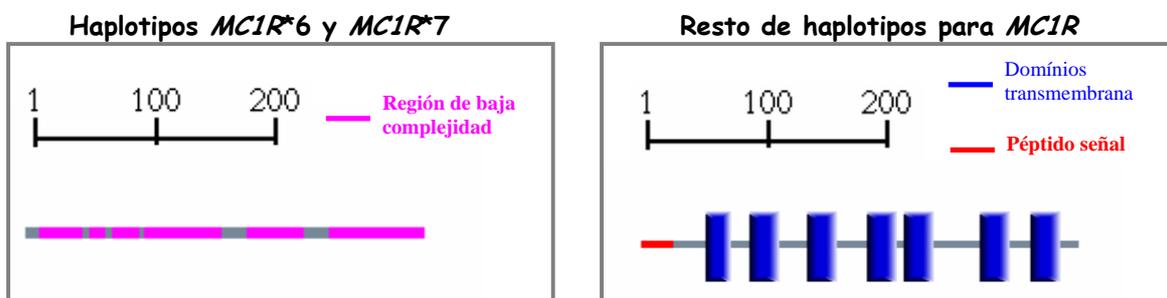
Este haplotipo detectado en la población de cerdos ibéricos con capa negra, es compartido con otras razas que presentan un patrón de color de capa predominantemente negra, como es la raza de origen europeo, Hampshire (Kijas et al., 1998).

Otras razas con color de capa negra, como Meishan, Large Black y Cerdos de origen vietnamita, presentan otro haplotipo que también determina un color de capa negra, *MC1R*2*, haplotipo que presenta una mutación que también conlleva la activación de manera constitutiva del receptor, sin embargo, estas razas son de origen asiático. Esto podría implicar un origen distinto de color de capa negra en razas asiáticas y europeas.

En las poblaciones de cerdos ibéricos con capa colorada y entrepelada se detectó la presencia de tres haplotipos, *MC1R*3*, *MC1R*6* y *MC1R*7*.

El haplotipo *MC1R*6*, está constituido por dos mutaciones, una compartida con *MC1R*3* y una inserción de dos citosinas en el nucleótido 896. Esta última provoca la aparición de un codon STOP en el codon 56 de la proteína, de forma que se genera una proteína no funcional (Figura 31) y por tanto se da exclusivamente síntesis del pigmento phaeomelanina, pigmento colorado. Por tanto, la presencia de este alelo en las poblaciones con capa colorada y entrepelada es esperada.

Figura 31: Predicción de dominios (programa SMART) para la proteína MC1R.



Este haplotipo es compartido con otras razas porcinas con color de capa colorada, analizadas en otros trabajos, como las razas Linderöd, Tamworth y Hereford (Kijas et al., 2001).

Pero este haplotipo no es el que determina exclusivamente el color de capa colorado. En la raza Duroc, característicamente colorada, no se detectó este haplotipo, ni en este trabajo, ni en trabajos previos (Kijas et al., 1998, 2001), para esta raza el color de capa colorado viene determinado por la presencia del haplotipo *MC1R*4*, también portador de una mutación (G/A en posición 1554) que parece

provocar la inactivación del receptor generando exclusivamente la síntesis del pigmento colorado (Kijas et al., 1998).

Sin embargo, el haplotipo *MC1R*6* también se detecta en razas porcinas con color de capa blanca, en este trabajo en la raza Landrace, y en trabajos anteriores en las razas Landrace, Yorkshire y Pietrain (Kijas et al., 2001). En el caso de estas razas, se postula que para la aparición de este color de capa blanco es esencial el papel determinante del gen *KIT*, y que estas razas expresarían el alelo blanco dominante para este gen, de manera que si no se diese la expresión de este alelo dominante, estos cerdos tendrían un color de capa colorado (Kijas et al., 1998, 2001).

El haplotipo *MC1R*7* es una nueva combinación de polimorfismos, esta constituido exclusivamente por la secuencia considerada silvestre junto a la inserción de las dos citosinas (posición 896), de manera que funcionalmente tendría las mismas consecuencias que el haplotipo anterior (*MC1R*6*). Este haplotipo no se había detectado en ninguno de los trabajos publicados anteriormente, sin embargo en este trabajo se detecta en poblaciones de cerdo ibérico con capa colorada y entrepelada.

El haplotipo *MC1R*3* también se detectó aunque en heterocigosis y a baja frecuencia en poblaciones de cerdos ibéricos con color de capa colorada y entrepelada, en contra de la dominancia atribuida tradicionalmente para este alelo que determina el color de capa negra. El hecho de que se detecte la presencia del alelo predominantemente negro en heterocigosis en animales con color de capa colorada, hace suponer que en el proceso de biosíntesis de pigmentos de la capa deben de estar implicados otros loci modificadores.

De los resultados del genotipado de animales con capa colorada, destacar el hecho de que en animales de la línea Torbiscal también se ha detectado la presencia del alelo *MC1R*3* en heterocigosis. Como se menciona en capítulos anteriores, esta línea cerrada y altamente controlada fue formada a partir de cuatro estirpes, dos coloradas y dos negras y fue seleccionada hacia el color de capa colorado, eliminando el "alelo" responsable del color negro, sin embargo los resultados obtenidos hacen suponer que no se ha eliminado completamente el alelo negro, en este caso el alelo

MC1R*3. Por otro lado para esta línea el alelo determinante del color negro se supone dominante sobre el colorado, ya que al realizar cruzamientos entre animales de la línea Torbiscal (colorados) y animales de la línea Guadyerbas (negros), el resultado de este cruce siempre genera individuos con capa negra (Silió, comunicación personal), además en esta misma línea no se ha confirmado que exista asociación entre la presencia del alelo ***MC1R*3*** con una coloración más intensa (capa retinta) frente menor intensidad (capa rubia) lo que podría implicar codominancia, por lo que estos resultados apoyan la idea de la existencia de loci modificadores en el proceso de biosíntesis.

Un caso similar al que ocurre con las poblaciones de la raza Ibérica, también se produce con la raza Mangalitza, de origen húngaro.

Para esta raza, en los animales analizados que pertenecen a la población denominada golondrino, no se detecta ninguna mutación en la región codificante, de manera que, en principio, presentaría la secuencia silvestre, del jabalí (***MC1R*1***). Sin embargo para la población de cerdos con capa colorada, en este trabajo se detectaron las mutaciones que determinarían el haplotipo ***MC1R*6***, (se ha denominado haplotipo ***MC1R*8***, por tener una nueva mutación, en la región no codificante).

Por otro lado, en un trabajo anterior (Ciobanu et al., 2001), se detectaron animales de esta variedad colorada que contenían la mutación en posición 896 del gen y establecieron su equivalencia con el alelo ***MC1R*3*** (*E^P*, siguiendo la nomenclatura del locus *Extension*) y animales que no contenían esta mutación y consideraban que también portaban el alelo silvestre (***MC1R*1***), sin embargo, en este trabajo no analizaron la presencia o ausencia de la inserción en la posición 1197, que determina los alelos ***MC1R*6*** y ***7***.

De los resultados obtenidos de estos trabajos podría establecerse que el alelo que consideraban ***MC1R*3*** para los animales con color de capa colorada, también contendría la inserción en posición 1197, es decir, correspondería al alelo ***MC1R*6*** y que el alelo que ellos consideraban silvestre, podría contener también la inserción, de manera que constituiría el haplotipo ***MC1R*7***, descrito en la raza Ibérica.

Además, en el genotipado de los alelos de este gen se detectó la introgresión en ganaderías de cerdo ibérico de alelos detectados y fijados en otras razas porcinas, concretamente:

- en una ganadería con capa negra, considerada ibérica se detectó la presencia a elevada frecuencia del haplotipo *MC1R*2* además del haplotipo *MC1R*3*. Este haplotipo, alelo *MC1R*2*, descrito anteriormente, se detectó y está fijado en animales con color de capa negra de origen asiático (Meishan y Large Black), lo que indicaría que en esta ganadería ha existido introgresión de alelos pertenecientes posiblemente a animales de la raza de origen asiático Large Black.

- en la población de cerdos Manchado de Jabugo, representados una pequeña muestra de animales, se detectó la presencia de cuatro haplotipos *MC1R*3*, *MC1R*4*, *MC1R*6* y *MC1R*7*, lo que indica un origen heterogéneo para esta población.

La ganadería Manchado de Jabugo se formó con la recuperación de ejemplares pertenecientes a otras ganaderías ibérica, de ahí el hecho de que en ésta se detecten esa heterogeneidad al presentar cuatro haplotipos para este gen, pese a contar con un bajo número de muestras (14). Pero un dato importante es que se detecta la presencia del haplotipo *MC1R*4*, característico y fijado en la raza Duroc, lo que indica que en la recuperación de esta raza estuvo implicado algún animal con ascendencia Duroc.

- en la población considerada actualmente entrepelada (dentro de las variedades coloradas) no se ha detectado la presencia del haplotipo *MC1R*2*, característico de la raza de origen asiático Large Black, raza que contribuyó a la formación de la población considerada entrepelada.

Se han desarrollado otras metodologías para la identificación de estos haplotipos, concretamente se ha desarrollado un método de genotipado de estos haplotipos, patentado, utilizando la tecnología de la pirosecuenciación (Gustafsson et al., 2001).

Estudios sobre este gen en otras especies, indican que la presencia del receptor MC1R no funcional, tanto en ovino (Klungland et al., 1995) como en ratón

(Marklund et al., 1996), se debe a una delección de una base, sin embargo en el caballo (Marklund et al., 1996), la disminución de la actividad de este receptor se debe a una sustitución de una base nucleotídica. En el caso de la especie porcina, se presentan ambos casos, es decir la ausencia o disminución de la actividad del receptor MC1R se debe a la sustitución de un nucleótido, como ocurre en aquellos animales que presentan el haplotipo *MC1R*4* (G/A en posición 1554, A240T), o bien se debe a una delección de dos nucleótidos (-CC- en la posición 896), como ocurre en aquellos individuos que presentan los haplotipos *MC1R*6* o *MC1R*7*.

Por otro lado, en la especie ovina (Klungland et al., 1995), se detectó la misma mutación, una sustitución T/C en posición 1132 de la secuencia, detectada para el haplotipo *MC1R*2* porcino. El cambio aminoacídico que produce en ambos casos consiste en una sustitución de Leucina por Prolina en el aminoácido 99, coincidiendo con el cambio que se produce en el ratón en la misma posición (Robbins et al., 1993). En las tres especies este cambio provoca la activación constitutiva del receptor, llevando a la síntesis del pigmento eumelanina, pigmento que es sintetizado en las razas con color de capa negra Meishan y cerdos de origen vietnamita. Por otra parte la sustitución G/A localizada en la posición 1179 de la secuencia, determinante del haplotipo *MC1*3* y que genera un cambio aminoacídico en el tercer dominio transmembrana de la proteína muestra características comunes a la mutación C125R detectada en zorro y que determina el fenotipo Alaska (Vage et al., 1997).

II. ANÁLISIS DEL GEN *AGOUTI*

... XZXY-9-9 AWJ UWZ XUX- -

II. ANÁLISIS DEL GEN *AGOUTI*. II.a. Búsqueda de polimorfismos en el gen mediante secuenciación. II.b. Análisis de la diversidad genética en poblaciones de cerdo ibérico

II.a. Búsqueda de polimorfismos en el gen mediante secuenciación

El estudio de este gen se realizó en muestras de ADN genómico procedente de sangre. Se analizó la secuencia nucleotídica de los cuatro exones que constituyen este gen, a través de secuenciación directa, en ambas direcciones, del producto de PCR de 8 animales de las razas Ibérica, (incluyendo 2 cerdos con color de capa negra, 2 con capa colorada, 2 con capa retinta y 2 con capa rubia), 2 animales de la raza Duroc, 2 de la raza Landrace y 2 jabalíes.

Para ello se utilizaron cuatro parejas de oligonucleótidos, cada pareja amplifica uno de los exones y una parte de los intrones adyacentes, generados a partir de la secuencia porcina publicada e indicados en el Anejo 3 (GenBank nº acceso: AJ251836 y AJ251837).

Las amplificaciones se realizaron en volúmenes de 25 µl conteniendo buffer estándar 1X, MgCl₂, dNTPs, ambos oligonucleótidos, Tth (Biotools) y ADN en las cantidades indicadas en la tabla 17, para cada pareja de oligonucleótidos. Las condiciones de amplificación fueron 94°C durante 3min, seguido de 32 ciclos a 94°C (45s), T^a de anillamiento específica para cada pareja de oligonucleótidos (45s) (indicada en la Tabla 17) y 72°C (45s), seguido de una fase de extensión a 72°C durante 7min.

El producto resultante de la amplificación fue visualizado en un gel de agarosa al 2.5% y tinción con bromuro de etidio, confirmando la amplificación del fragmento correspondiente por comparación con el patrón de peso molecular BioMarker Low (BioVentures). El fragmento amplificado fue purificado y secuenciado en un secuenciador ABI 310.

Tabla 17: Condiciones de amplificación de los cuatro fragmentos analizados para el gen *Agouti*

Fragmento	1	2	3	4
Reactivos	AGFW1-AGRW1	AGFW2-AGRW2	AGFW3-AGRW3	AGFW4-AGRW4
MgCl ₂	1.5 mM	2 mM	2 mM	2 mM
dNTPs	200µM	200µM	200µM	200µM
Oligonucleótidos	12.5 pmol	12.5 pmol	12.5 pmol	12.5 pmol
Tth	0.3 u	0.5 u	0.5 u	0.5 u
ADN	60 ng	60 ng	60 ng	60 ng
Tª anillamiento	55°C	58°C	56°C	59°C
Tamaño fragmento(pb)	355	373	310	499

Las secuencias obtenidas fueron editadas, ensambladas y alineadas para la búsqueda de mutaciones en las muestras analizadas.

Los resultados obtenidos del alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los cuatro fragmentos que incluyen los cuatro exones del gen *Agouti*, se muestran en la tabla 18, donde se indican los polimorfismos detectados, las posiciones donde se han localizado y las poblaciones que los presentan.

Tabla 18: Posiciones polimórficas detectadas en la secuencia nucleotídica analizada del gen *Agouti*

	Exón 1	Intrón 1 nt 67	Exón 2	Intrón 2	Exón 3 nt 41	Intrón 3	Exón 4
2 Jabalíes		-C-			G		
2 Landrace		-C-			G		
2 Duroc		- -			G		
2 Ibérico rubio		- -			G		
2 Ibérico colorado		- -			G		
2 Ibérico entrepelado		- -			A		
2 Ibérico negro		- -			G		

Como se muestra en la tabla anterior, se detectó la presencia de dos mutaciones, una inserción de una Citosina en la posición 67 de la secuencia nucleotídica del primer intrón del gen y una segunda mutación que consistía en una transversión de Guanina a Adenina en la posición 41 de la secuencia nucleotídica del tercer exón del gen.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La primera de las mutaciones detectadas (inserción -C-), se localiza en la región no codificante del gen por lo que no conlleva cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína.

La segunda mutación detectada (G/A), conlleva un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína (Anejo 3), éste es de Glutámico a Lisina, es decir de un aminoácido ácido a uno básico. Esta sustitución conlleva un cambio en la estructura secundaria de la proteína (Anejo 3).

A diferencia de los resultados obtenidos para el gen *MC1R*, este gen presenta un bajo número de polimorfismos. Sólo se han detectado dos polimorfismos (una inserción en el intrón 1 y una transversión G/A en el exon 3) en los cuatro exones del gen y parte de las regiones intrónicas adyacentes, en un total de 1537 pb en 7 poblaciones de cerdos analizadas.

En un trabajo anterior (Leeb et al., 2000), se detectaron tres mutaciones, una de ellas, la misma inserción de una citosina en el intrón 1 que también se ha detectado en este trabajo. Además detectaron una sustitución de A/G también en el intrón 1 y otra sustitución T/C en el exón 4. Pese a esto, en total se han detectado cuatro mutaciones a lo largo de la secuencia nucleotídica del gen *Agouti*, dos de las cuales se localizan en regiones no codificantes.

II.b. Análisis de la diversidad genética en poblaciones de cerdo ibérico

Los polimorfismos detectados que presentaban interés fueron genotipados en un mayor número de muestras. Este genotipado a gran escala se realizó utilizando dos

técnicas, dependiendo del polimorfismo, estas fueron PCR-RFLP y análisis de fragmentos en un ABI 3100.

- Transversión en el nucleótido 41 del tercer exón

Dado que se había detectado la presencia de la mutación (G/A, en posición 41 del tercer exón) exclusivamente en animales ibéricos con capa entrelapada y que este polimorfismo puede tener significación funcional, se realizó el genotipado en un mayor número de muestras, poblaciones y razas.

Esta mutación produce una diana polimórfica para el enzima de restricción *Aci* I (..CCGC..), en el tercer fragmento amplificado, por lo que permitía su genotipado a través de la metodología de PCR-RFLP.

Las reacciones de digestión se realizaron en volúmenes de 20 µl conteniendo 10 µl del producto de PCR (fragmento 1; oligonucleótidos AGFW3-AGRW3), buffer de digestión 1x (NEB3), suministrado con el enzima, y 2 u del enzima (New England BioLabs), la digestión se realizó a 37°C durante toda la noche, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El resultado de la digestión se visualizó en un gel de agarosa de alta resolución (Metaphor) al 2% y tinción con bromuro de etidio.

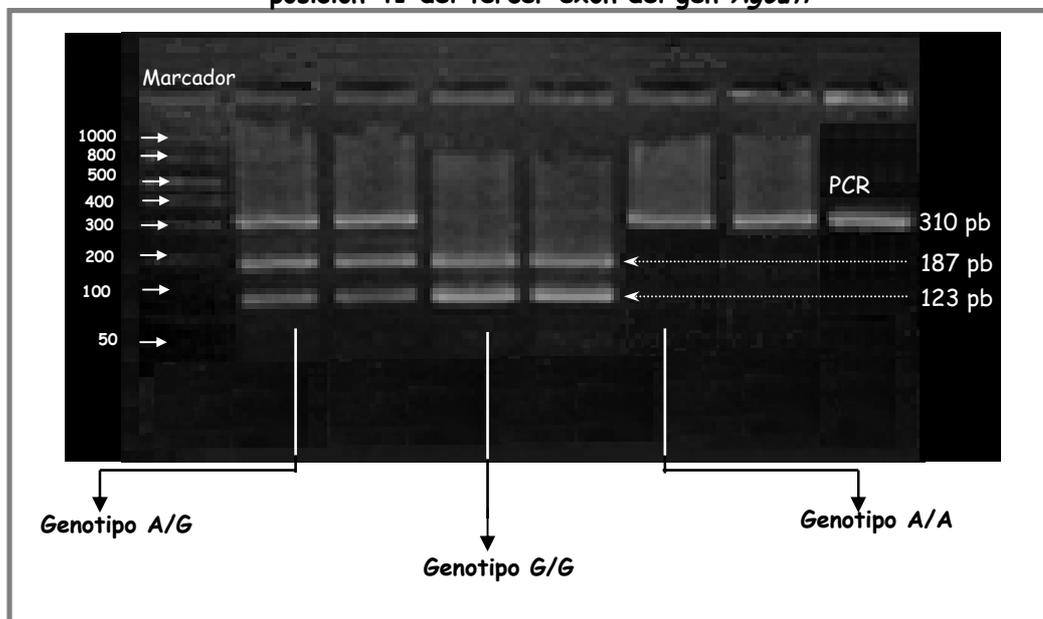
El genotipado (Figura 32) de este polimorfismo se realizó en cerdos de la raza Ibérica con color de capa negra y colorada, entre los cuales se encuentran animales de la variedad Torbiscal, y cerdos pertenecientes a las razas Duroc, Landrace, Large White, Pietrain y jabalí (Tabla 19).

Tabla 19: Animales genotipados por PCR-RFLP para el gen *Agouti*

	Ib. negro	Ib. colorado	Duroc	Landrace	Large White	Pietrain	Jabalí
Animales genotipados	27	95 (16 Torbiscas)	17	16	15	12	15

Ib: Ibéricos

Figura 32: Patrón electroforético para el RFLP *Aci* I del SNP localizado en posición 41 del tercer exón del gen *Agouti*



Los tres posibles genotipos para este polimorfismo se pueden distinguir ya que los animales que contienen la mutación (A) no presentan la diana de restricción activa y por tanto el producto amplificado no es digerido con el enzima de restricción, generando un único fragmento de 310 pb, mientras que los animales no portadores de la mutación presentan la diana de restricción activa y por tanto el producto amplificado es digerido por el enzima generando dos fragmentos digeridos de 187 y 123 pb y los heterocigotos presentarían los tres fragmentos, correspondientes al fragmento de amplificación no digerido y digerido.

Los resultados del genotipado en un mayor número de muestras, poblaciones y razas aparecen representados en las tablas 20 y 21, donde se indican las poblaciones y razas a las que pertenecen las muestras analizadas, el número de animales detectados para cada uno de los genotipos (Tabla 20) y las frecuencias alélicas (Tabla 21).

Tabla 20: Resultado del genotipado del polimorfismo localizado en el nucleótido 41 del tercer exón del gen *Agouti*

Genotipo	A/A	A/G	G/G
Población (n)			
Ibéricos negros (15)			15
Ibéricos colorados (64)	18	15	31
Ibéricos entrepelados (31)	5	12	14
Duroc (17)	2	7	8
Landrace (16)			16
Large White (15)		1	14
Pietrain (12)			12
Jabalí (15)		1	14

Tabla 21: Frecuencias alélicas del polimorfismo localizado en el nucleótido 41 del tercer exón del gen *Agouti*

Alelo	A	G
Población (n)		
Ibéricos negros (15)		1.00
Ibéricos colorados (64)	0.40	0.60
Ibéricos entrepelados (31)	0.35	0.65
Duroc (17)	0.32	0.68
Landrace (16)		1.00
Large White (15)	0.03	0.97
Pietrain (12)		1.00
Jabalí (15)	0.03	0.97

Como se muestra en las tablas anteriores, esta mutación no se detectó en animales pertenecientes a las poblaciones de cerdos ibéricos con capa negra ni en animales de las razas Landrace y Pietrain, se detectó a muy baja frecuencia en animales de la raza Large White y jabalíes y aparece a una considerable frecuencia en las poblaciones de cerdos ibéricos con capa colorada y entrepelada y en animales de la raza Duroc.

Por otro lado, en la población Torbiscal (16 animales analizados), incluida dentro del grupo de animales ibéricos colorados, no se detecta ningún individuo que contenga esta mutación.

- Inserción en el nucleótido 67 del intrón 1

Puesto que la inserción localizada en el nucleótido 67 (-C-) fue detectada en jabalíes (además de en animales de la raza Landrace) y no aparecía en animales ibéricos, se realizó el genotipado de este polimorfismo en un mayor número de muestras.

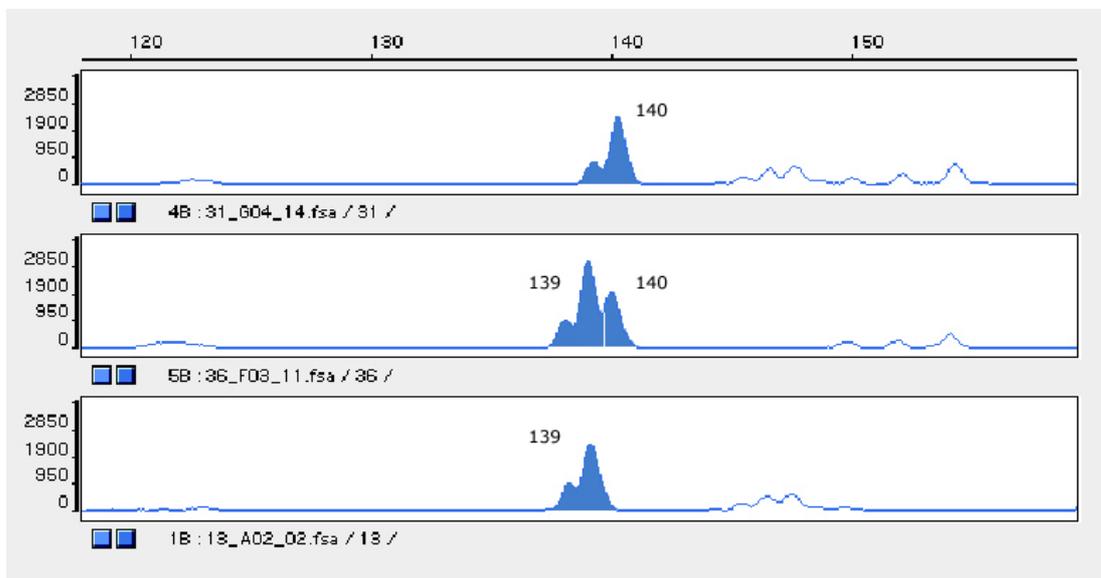
Esta inserción produce un cambio en el tamaño del fragmento amplificado de 1 pb, por lo que para su genotipado se realizó el análisis del tamaño de los fragmentos amplificados en un equipo de electroforesis capilar.

Para su genotipado se diseñó una nueva pareja de oligonucleótidos, AGABIFW-AGRW1, indicados en el Anejo 3, de los cuales el oligonucleótido AGABIFW se marcó en el extremo 5' con el fluorocromo 6-FAM, amplificando un fragmento de 143 pb para su detección en un equipo de secuenciación.

La PCR se realizó en volúmenes de 25 µl conteniendo buffer estándar 1X, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 12.5 pmoles de cada oligonucleótido, 0.5 u de Tth (Biotools) y 60 ng de ADN. Las condiciones de amplificación fueron 94°C durante 3min, seguido de 32 ciclos a 94°C (45s), 48.5°C (45s), 72°C(1min) y una fase final de extensión a 72°C durante 30 min para favorecer la incorporación de +A durante la PCR y evitar la aparición "picos fantasma", permitiendo así distinguir fragmentos que se diferencian únicamente en una base.

El genotipado de este polimorfismo (Figura 33) se realizó en 39 jabalíes y 13 cerdos de la raza Ibérica (con capa negra y colorada).

Figura 33: Electroferogramas obtenidos para la inserción -C- en el nucleótido 67 del primer intrón del gen *Agouti*



Para los individuos que presentan la inserción en homocigosis se detecta un único pico con un tamaño de 140 pb, mientras que para los homocigotos sin la inserción se detecta también un único pico con un tamaño de 139 pb y para los individuos heterocigotos se detectan dos picos, el de menor tamaño 139 pb con mayor altura (consecuencia de la unión del pico correspondiente al alelo +A y el otro alelo) y el pico de 140 pb.

Los resultados del genotipado de este polimorfismo aparecen reflejados en la tabla 22, donde se indica las poblaciones analizadas y el número de individuos encontrados para cada genotipo

Tabla 22: Resultado del genotipado de la inserción -C- localizada en el nucleótido 67 del primer intrón del gen *Agouti*

Genotipo	-C-	-C-	- -
	-C-	- -	- -
Población (n)			
Jabalíes (38)	4	19	15
Ibéricos (13)	0	3	10

Como se puede ver en la tabla, en la población de jabalíes se detectaron animales que tenían esta inserción en homocigosis, en heterocigosis e individuos que no presentaban la inserción. Por otro lado, en la población de cerdos ibéricos (correspondientes a animales de diversas ganaderías) se detectaron tanto animales que no presentaban esta inserción como individuos ibéricos que compartían la inserción en heterocigosis.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La inserción -C- localizada en el intrón 1 detectada por secuenciación en jabalíes y en cerdos de la raza Landrace, tendría como consecuencia una variación en el tamaño de la cola de poli-C (Leeb et al., 2000) y quizá podría tener alguna consecuencia funcional. Pero en el genotipado de esta inserción en animales de la raza Ibérica y en jabalíes, se obtuvo como resultado la detección de este polimorfismo en ambas poblaciones, por lo tanto, ya que se presenta tanto en el jabalí, como en animales con capa blanca (Landrace), capa negra (Ibéricos) y capa colorada (Ibéricos), no se puede establecer ninguna asociación con los patrones de color.

La mutación G/A localizada en el exón 3 produce un cambio aminoacídico, cambio no conservativo ya que se trata de una sustitución de un aminoácido ácido (Glutámico) por uno básico (Lisina), lo que podría conllevar un cambio en la estructura secundaria de la proteína (Anejo 3) y por tanto podría alterar su funcionalidad. Dado el cambio que produce esta mutación, se estudió la presencia de este alelo en diversas poblaciones, obteniendo como resultado que en la población de cerdos ibéricos con capa negra, el alelo (G) silvestre aparece fijado. Por otro lado, el alelo (A) mutado aparece tanto en animales ibéricos con color de capa colorada, entrepelada y en animales pertenecientes a otras razas, aunque a menor frecuencia, por lo que no se puede establecer una clara asociación con ningún patrón de color.

En ratón, se han establecido claramente mutaciones en la secuencia del gen *Agouti* asociados con determinados patrones de color. Para el alelo *nonagouti* (*a*), alelo recesivo que en homocigosis provoca la aparición en la región dorsal y ventral de una banda negra, se establece una total correlación con una delección de 19 pb desde

el nucleótido en posición 202 al 220 del ADNc del gen, lo que conlleva la codificación de una proteína truncada (Kuramoto et al., 2001) que genera este fenotipo, sin embargo este patrón de color no se observa en la especie porcina. Por otro lado, varios trabajos, principalmente en la especie humana y ratón, han tratado de asociar mutaciones detectadas, tanto a nivel de ADN, ARN y diferencias en los transcritos, con efectos sobre la obesidad, diabetes y susceptibilidad tumoral. (Fan et al., 1997; Bultman et al., 1994; Michaud et al., 1994; Hustad et al., 1995; Gun et al., 2001). Por lo que no puede descartarse que las mutaciones anteriormente citadas, puedan tener alguna asociación con este otro aspecto funcional de la proteína.

Pese a su importante papel como regulador en el proceso de biosíntesis de los pigmentos, en este gen no se ha detectado ninguna mutación que aparentemente tenga asociación con ningún patrón de coloración de la capa porcina ni en este trabajo, ni en trabajos anteriores (Leeb et al., 2000). Quizá un motivo de que no se detecte ninguna mutación en este gen, que esté asociada con los patrones de color, puede ser el hecho de que este gen sea tan esencial en el proceso de biosíntesis de los pigmentos y que sus efectos epistáticos sean grandes. Una mutación en éste puede ser letal, como ocurre con el alelo amarillo letal en ratón (A^Y) (Michaud et al., 1994). También podría ocurrir que las mutaciones que existen en este gen sean de tipo regulador y estén localizadas en regiones mas alejadas del propio gen y no hayan sido detectadas aún.

III. ANÁLISIS DEL GEN *PINK*

.....
XZXY-0-0-0
ADJUDZ
A-ZZ

III. ANÁLISIS DEL GEN *PINK*. III.a. Caracterización y búsqueda de polimorfismos en el gen mediante secuenciación. III. b. Diversidad genética en poblaciones de cerdo ibérico. III. c. Localización del gen

III.a. Caracterización y búsqueda de polimorfismos en el gen mediante secuenciación

1. Secuenciación del ADNc

1.1. RT-PCR

Dada la compleja estructura de este gen en humano, constituido por 25 exones, el análisis de éste se realizó sobre ADN copia (ADNc).

El ARN se extrajo de piel de animales pertenecientes a las razas Ibérica con color de capa negra (Guadyerbás), retinta, colorada y rubia (Torbiscales), Landrace, Large White, cerdos vietnamitas, Duroc y jabalí (2 muestras de cada tipo).

El ARN extraído de piel sirvió como molde para la síntesis del ADNc. La retrotranscripción (RT), se realizó en volúmenes de 20 µl conteniendo 200 ng hexámeros aleatorios, 500 µM dNTPs, "First-Strand" buffer 5x, 10 mM DTT, 40 u del inhibidor de RNasas RNasin (Promega), 200 U de transcriptasa inversa (SUPERScript II RNase H-)(Gibco) y 2 ng de ARN total. Las incubaciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Gibco), en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA).

Para el análisis de este gen se diseñaron parejas de oligonucleótidos a partir de las secuencias de ADNc disponibles en la especie humana (GenBank nº acceso: NM_000275) y en ratón (Genbank nº acceso: NM_021879), en las regiones más conservadas.

Se partió de una región del ADNc donde existía una elevada similitud entre especies (entre los exones 11 y 14) (Anejo 4). Para ello se diseñó una primera pareja de oligonucleótidos (P1F-P1R) (Anejo 4), se amplificó por PCR y a continuación se secuenció el fragmento en ambos sentidos. A partir de este fragmento (P1), se fueron diseñando el resto de parejas de oligonucleótidos (P2 – P7) (Anejo 4), de forma que uno de los oligonucleótidos era diseñado a partir de secuencia porcina conocida hasta

completar toda la extensión del gen excepto los extremos ya que la similitud existente en estas regiones (5´ y 3´) entre las dos especies de referencia es muy baja, lo que dificulta el diseño de oligonucleótidos efectivos.

Las amplificaciones se realizaron en volúmenes de 25 µl conteniendo buffer estándar 1x, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 12.5 pmoles de ambos oligonucleótidos, 0.5 U Tth (Bitools) y 2 µl ADNc. Las condiciones de amplificación fueron 94°C durante 3 min, seguido de 40 ciclos a 94°C (45s), T^a anillamiento (45s) (indicada en la tabla 23, según la pareja de oligonucleótidos utilizada), 72°C (45s) y una fase de extensión de 72°C durante 7 min. Estas amplificaciones fueron realizadas en un termociclador PTC-100 (MJ Research, MA).

Tabla 23: T^{as} de anillamiento específicas para cada pareja de oligonucleótidos que permiten amplificar el ADNc del gen *P*

Fragmento	1	2	3	4	5	6	7
Oligonucleótidos	P1F-P1R	P2F-P2R	P3F-P3R	P4F-P4R	P5F-P5R	P6F-P6R	P7F-P7R
T ^a anillamiento	54.7°C	59°C	55°C	53.5°C	58°C	56.7°C	58.5°C
Tamaño fragmentos (pb)	237	375	564	300	379	416	305

La amplificación de estos fragmentos fue confirmada con una electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% y comparando el tamaño esperado con el patrón de peso molecular BioMaker Low (BioVenture).

Los productos resultantes de la amplificación fueron purificados y secuenciados en un secuenciador ABI PRISM 310.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas en la secuenciación fueron editadas, ensambladas y se realizó la comparación de las secuencias con la base de datos de secuencias de ADN utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponible en la red (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Las parejas de oligonucleótidos se utilizaron para secuenciar el ADNc en un individuo (cerdo con capa negra), y una vez determinado que todos los fragmentos obtenidos correspondían a los fragmentos esperados del ADNc se procedió a la

amplificación por PCR y secuenciación del resto de las muestras de las que se extrajo el ARN.

1.2. RACE

Para la secuenciación de los extremos (5´ y 3´) del gen se recurrió al empleo de la metodología denominada RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*).

También denominada "one-sided PCR" o "anchored PCR", consiste en amplificar secuencias de ácidos nucleicos entre una región interna conocida y el extremo 5´ o 3´ desconocidos a partir del ARN mensajero.

La técnica 3´ RACE se basa en el aprovechamiento de la cola de poli-A que posee de forma natural el ARN mensajero y la técnica 5´ RACE se basa en la generación de un extremo conocido, por la adición de un adaptador en este extremo del gen. En ambos casos, se requiere un oligonucleótido interno y específico del gen que permita la amplificación desde ese punto hasta el extremo del mismo.

Para la caracterización de los extremos del ADNc del gen *P* se utilizó el kit "SMART RACE" (Clontech). La síntesis del ADNc y amplificaciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de la caracterización del extremo 3´, tras la síntesis del ADNc se realizó una amplificación por PCR utilizando el oligonucleótido específico P-3´ RACE F (indicado en el anejo 4) junto con el oligonucleótido suministrado con el kit, PUM (*Primer Universal Mix*). La amplificación fue confirmada en un gel de agarosa al 1.5% y el tamaño del fragmento se estimó por comparación con el marcador de tamaño molecular CUP (puC18 digerido con *Apa* I, *Bgl* I y *Hind* III) y BioMarker Low (BioVentures). Posteriormente se realizó la purificación y secuenciación del fragmento.

La secuenciación del fragmento amplificado (750 pb) se realizó con el mismo oligonucleótido utilizado para la amplificación (P3´ RACE F), pero dado el tamaño del fragmento generado no fue posible la lectura completa del fragmento (no se pudo realizar la lectura con el otro oligonucleótido por la existencia de la cola de poli-A), por lo que se diseñó otro oligonucleótido P3´ RACE_2F en una zona interna del fragmento ya secuenciado para permitir la lectura completa del extremo.

Para la caracterización del extremo 5´, se recurrió a la metodología de la PCR anidada, para ello se utilizaron dos oligonucleótidos: Pex10R con el que se realizó la amplificación primaria junto con el oligonucleótido PUM suministrado con el kit y una amplificación secundaria con el oligonucleótido P5´RACE R y el oligonucleótido NUP (*Nested Universal Primer*) también suministrado con el kit e indicados en el anejo 3. La amplificación fue confirmada en un gel de agarosa al 1.5% y el tamaño del fragmento se estimó por comparación con el marcador de tamaño molecular CUP (puC18 digerido con *Apa* I, *Bgl* I y *Hind* III) y BioMarker Low (BioVenture). Posteriormente se realizó la purificación y secuenciación del fragmento.

La secuenciación del fragmento amplificado (540 pb) se realizó en ambos sentidos con los mismos oligonucleótidos con los que se realizó la amplificación secundaria (P5´RACER y NUP), permitiendo la lectura total del extremo.

Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas. Se confirmó que estos fragmentos correspondían a los esperados por comparación con la base de datos de secuencias de ADN en el programa BLAST.

Esta técnica requiere una elevada calidad en el extracto de ARN por lo que la caracterización de los extremos 5´ y 3´ de este gen se realizó sobre una muestra de ARN procedente de piel de un animal ibérico con capa negra que presentaba la mejor calidad (evaluada en gel y por espectrofotometría).

Tras la confirmación de la secuencia obtenida, se procedió al diseño de parejas de oligonucleótidos para ambos extremos que permitiesen amplificar estas regiones del ADNc en el resto de las muestras utilizadas para la secuenciación del ADNc (Pe3´FW-Pe3´RW y Pe5´FW-P5´RACER).

Las amplificaciones se realizaron en volúmenes de 25 µl conteniendo buffer estándar 1x, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 12.5 pmoles de ambos oligonucleótidos, 0.5 u Tth (Bitools) y 2 µl ADNc. Las condiciones de amplificación fueron 94°C durante 3 min, seguido de 40 ciclos a 94°C (45s), T^a anillamiento (45s) (indicada en la tabla 24, según la pareja de oligonucleótidos utilizada), 72°C (45s) y una fase de extensión de 72°C durante 7 min. Estas amplificaciones fueron realizadas en un termociclador PTC-100 (MJ Research, MA).

Tabla 24: T^{as} de anillamiento y tamaños de los fragmentos amplificados específicos para cada pareja de oligonucleótidos que permiten amplificar los extremos del gen *P*

	Extremo 3'	Extremo 5'
Fragmento	P3' FW-P3' RW	P5' FW-P5' RW
T ^a anillamiento	54.7°C	59°C
Tamaño del fragmento (pb)	524	426

Las secuencias obtenidas para el ADNc completo (incluidos los extremos) fueron editadas y ensambladas.

El ADNc para el gen *P* porcino esta constituido por 24 exones, denominados siguiendo la nomenclatura humana del 1 al 18 y del 20 al 25 (Anejo 4). El exón 19 no ha sido detectado en ninguno de los animales analizados a pesar de que en la secuenciación se diseñó una pareja de oligonucleótidos que incluían, en el caso de que existiera, este exón (P4F-P4R, que amplificaron un fragmento que incluye desde el exón 17 al 21).

Paralelamente a la secuenciación completa del ADNc del gen *P*, que se realizó sobre una muestra de ARN de piel de origen ibérico, se realizó la secuenciación sobre ADNc de los mismos fragmentos en muestras de piel de animales pertenecientes a las razas Ibérica, con color de capa negra, retinta, colorada y rubia, Large White, Landrace, Duroc, Meishan, cerdo vietnamita y Jabalí.

Del resultado de la comparación de las secuencias nucleotídicas obtenidas se detectó la presencia de 10 mutaciones puntuales o polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Se trata de sustituciones (transiciones/ transversiones), localizadas en los exones 2 (1 SNP), 4 (2 SNPs), 6 (1 SNP), 10 (1 SNP), 15 (1 SNP) , 16 (2 SNP), 18 (1 SNP) y 23 (1 SNP), estos se indican en el Anejo 3 (recuadradas en rojo). Por otro lado, en la tabla 25 se indica la posición nucleotídica polimórfica, referida a la secuencia silvestre, jabalí), y las razas y poblaciones analizadas.

Tabla 25: Posiciones nucleotídicas polimórficas (SNPs) en el ADNc del gen *P* en las poblaciones y razas porcinas analizadas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	21	22	23	24	ADNc Gen <i>P</i> 25
		272	510	511	794				1208					1666	1808	1858	2040						2462	
2 Jabalíes		G	C	G	G				C					G	C	G	G						G	
2 Landrace		G	C	G	G				C					G	C	G	G						G	
2 Large White		G	C	G	G				T					G	C	G	G						G	
2 Duroc		G	C	A	A				C					G	T	A	G						A	
2 Ibérico rubio		G	T	G	G				C					G	C	G	C						G	
2 Ibérico colorado		G	C	G	G				C					G	C	G	G						G	
2 Ibérico entrepelado		G	T	G	G				C					G	C	G	G						G	
2 Cerdos vietnamitas		G	C	G	G				T					A	C	G	G						G	
2 Ibérico negro		G	T	G	G				C					G	C	A	C						G	
2 Meishan		A	C	A	G				C					G	T	G	G						G	

2. Secuenciación y búsqueda de polimorfismos en el intrón 9

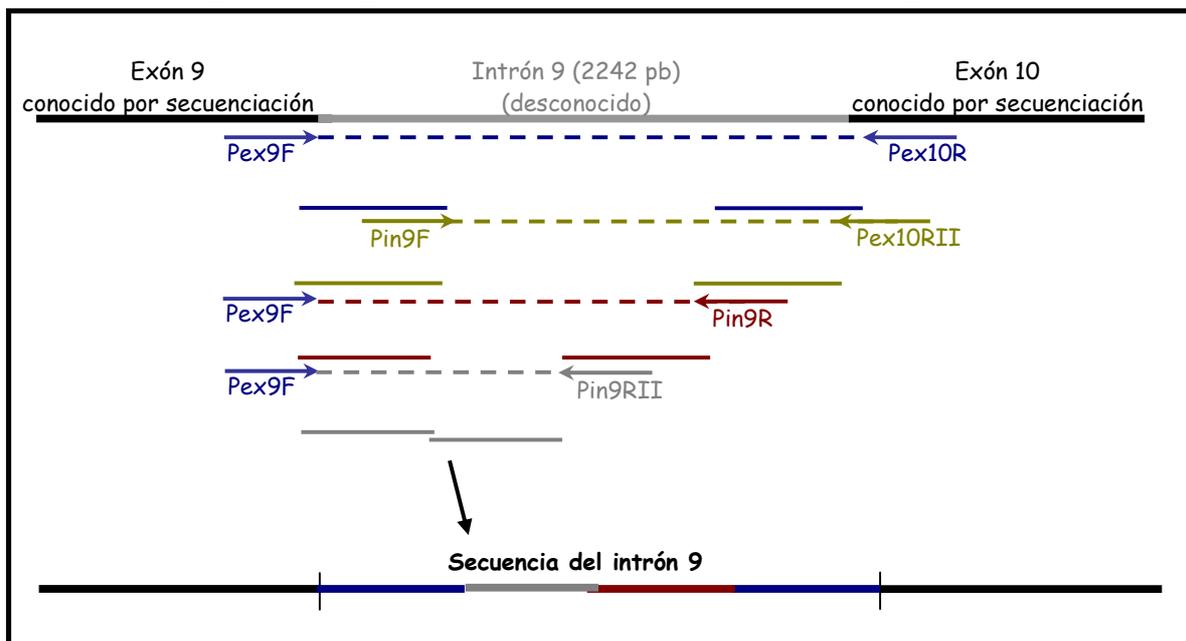
Para la búsqueda de un método de genotipado para el polimorfismo localizado en la posición 1208 del exón 10 del gen, localizado a 2 pb del extremo de este, se realizó la secuenciación completa del intrón 9.

La secuenciación del intrón 9 del gen se realizó sobre muestras de ADN procedentes de sangre de 2 animales de la raza Duroc, 2 de la raza Large White, 2 ibéricos con color de capa negra, 2 ibéricos con color de capa rubia, 2 ibéricos con color de capa colorada y 2 ibéricos con capa retinta.

Para la secuenciación del intrón en primer lugar se diseñó una pareja de oligonucleótidos (Pex9F-Pex10R, indicada en el Anejo 4) que abarcara toda la extensión del mismo, para ello los oligonucleótidos se diseñaron en regiones próximas

al final de los exones adyacentes (ya conocidos por secuenciación del ADNc). Dado que el tamaño del intrón (2242 pb) no permitía la lectura completa en el equipo de secuenciación, se diseñó otra pareja de oligonucleótidos, de forma que uno de los oligonucleótidos estaba dentro de la región conocida del intrón y otro en el exón 10 (Pin9F-Pex10II, indicada en el Anejo 4). Posteriormente se diseñó otro oligonucleótido dentro de la nueva región secuenciada del intrón (Pin9R) (Anejo 4) que junto a uno de los diseñados anteriormente, Pex9F, permitió obtener la secuencia contigua. Por último se diseñó un tercer oligonucleótido dentro de la nueva región secuenciada del intrón 9 (Pin9RII, indicada en el Anejo 4) que junto con el anterior, Pex9F, permitió obtener secuencias solapadas del intrón, de manera que por ensamblaje se obtuvo la secuencia completa del mismo. (Figura 34).

Figura 34: Esquema de la secuenciación del intrón 9 del gen *P*



Las líneas discontinuas indican la región amplificada y las líneas continuas la región secuenciada.

Las amplificaciones se realizaron en volúmenes de 25 μ l conteniendo buffer estándar 1x, 2 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 12.5 pmoles de ambos oligonucleótidos, 0.5 u Tth (Bitools) y 2 μ l ADNc. Las condiciones de amplificación fueron 94°C durante 3 min, seguido de 32 ciclos a 94°C (45s), T^a anillamiento (45s) (indicada en

la tabla 26, según la pareja de oligonucleótidos utilizada), 72°C (45s) y una fase de extensión de 72°C durante 7 min. Estas amplificaciones fueron realizadas en un termociclador PTC-100 (MJ Research, MA).

Tabla 26: T^{as} de anillamiento de los fragmentos amplificados específicos para cada pareja de oligonucleótidos que permitieron amplificar todo el intrón 9 del gen *P*

Parejas de				
Oligonucleótidos	Pex9F-Pex10R	Pin9F-Pex10RII	Pex9F-Pin9R	Pex9F-Pin9RII
T ^a anillamiento	55°C	50,5°C	53°C	54°C

Tras confirmar que la secuencia total obtenida, correspondía con el fragmento esperado en una muestra de un animal ibérico con capa negra, se realizó la secuenciación de estos mismos fragmentos solapados en el resto de muestras indicadas anteriormente.

Las secuencias obtenidas para el intrón 9 fueron editadas y ensambladas.

Como resultado del alineamiento y comparación de las secuencias nucleotídicas del intrón 9 se detectó la presencia de 4 mutaciones puntuales (SNPs), indicados en el Anejo 4 (recuadradas en azul).

En la tabla 27, se muestran las posiciones polimórficas detectadas y las poblaciones y razas en las que fueron detectadas.

Tabla 27: Posiciones polimórficas detectadas en la secuencia nucleotídica del intrón 9 del gen *P*

	Intrón 9 del gen <i>P</i> (2242 pb)			
	293	856	1920	1921
2 Large White	G	T	T	G
2 Duroc	A	C	T	G
2 Ibérico rubio	G	T	C	A
2 Ibérico colorado	G	T	C	A
2 Ibérico retinto	G	T	C	A
2 Ibérico negro	G	T	T	G

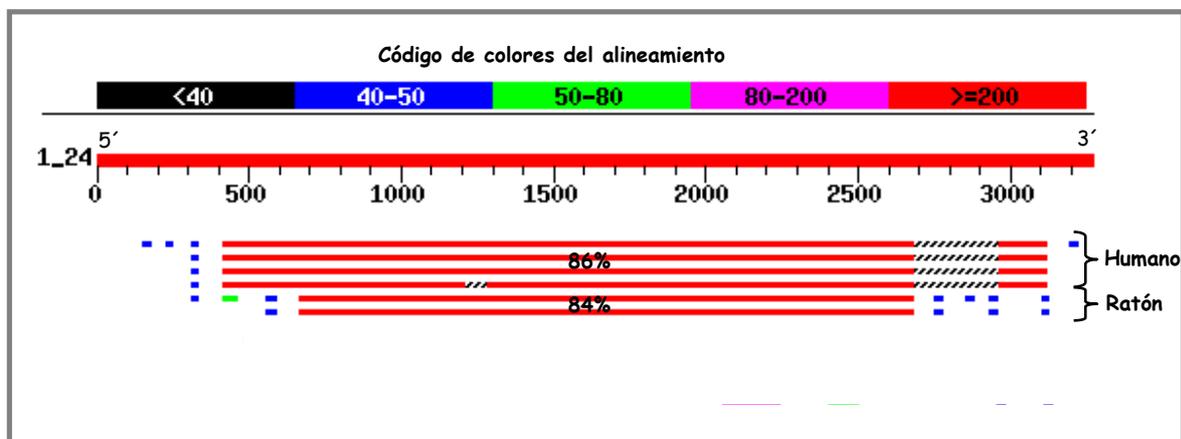
De estos SNPs, indicados en la figura anterior, dos de ellos (A/G en la posición 293 y C/T en la posición 856) se detectaron en los animales analizados de la raza Duroc, pero no se detectaron en los animales de la raza Ibérica. Los otros dos SNPs detectados fueron transversiones C/T (posición 1920) y A/G (posición 1921) en animales de la población ibérico con capa colorada (rubia, colorada y retinto).

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este trabajo se ha detectado la expresión del gen *P* en el tejido epitelial y dérmico, ya que se ha realizado el análisis del mismo a partir de RNA procedente de muestras de piel, de acuerdo con trabajos anteriores en los que determinan que la expresión de este gen en la especie humana y ratón se produce en los melanocitos (Puri et al, 2000). Este análisis ha consistido en la caracterización del mismo a través de la secuenciación del ADNc amplificado mediante RT-PCR.

La secuencia nucleotídica obtenida para el gen *P* porcino esta constituida por 3267 pb, que comprende 24 exones y presenta una homología con la especie humana del 86 %, mientras que con el ratón es del 84%. La región en la que presentan una menor identidad las secuencias de la especie humana, ratón y cerdo corresponde a la región 5´ del gen, región no codificante, sin embargo, la región 3´ en la especie humana y cerdo presenta una elevada identidad y no con la región 3´ en ratón (Figura 35).

Figura 35: Alineamiento comparativo de la secuencia nucleotídica del ADNc del gen *P* de cerdo con las secuencias de la especie humana y ratón (BLAST)



Esta secuencia nucleotídica codifica para una proteína de 846 aminoácidos (7 aminoácidos mas que la proteína en la especie humana) que contiene 12 dominios transmembrana (Figura 36) y que comparte una homología con la especie humana del 70% mientras que con el ratón presenta un 64% de homología a lo largo de toda la secuencia aminoacídica (Figura 37).

Figura 36: Predicción de dominios (SMART) para la proteína P porcina

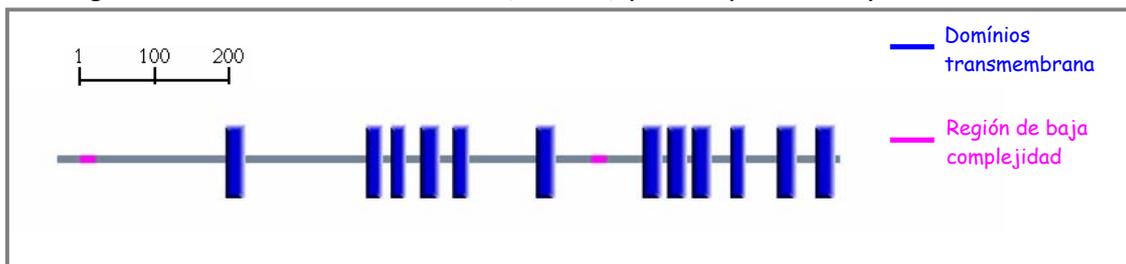
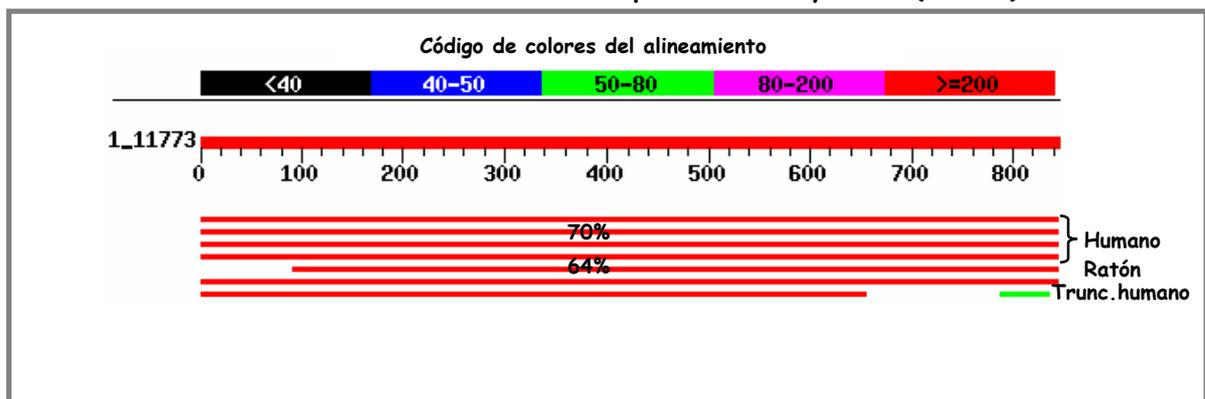


Figura 37: Alineamiento comparativo de la secuencia aminoacídicas de la proteína P de cerdo con las secuencias de la especie humana y ratón (BLAST)



Al igual que ocurre en la especie humana, el mensajero silvestre de este gen no presenta el exón 19. En la especie humana se ha descrito la existencia de mensajeros que contienen la secuencia del exón 19, dentro de éste aparece un codon STOP lo que da lugar a una proteína truncada (Figura 37) y este mensajero se ha asociado con el albinismo oculocutáneo tipo II (Lee et al., 1995). En cerdo no existe este fenotipo,

por tanto, no es de extrañar que no se haya detectado ningún mensajero que contuviese este exón.

En total, se han detectado 10 polimorfismos de tipo SNP como resultado de la comparación de las secuencias del ADNc en las 20 muestras analizadas correspondientes a 10 poblaciones y razas porcinas. Esto supone una frecuencia aproximada de 1 SNP por cada 300 pb en la región codificante. En la secuenciación del intrón 9 del gen se detectaron 4 SNPs en 2242 pb secuenciadas en 10 muestras analizadas correspondientes a 5 poblaciones y razas porcinas, lo que supone una frecuencia aproximada de 1 SNP por cada 500 pb en la región no codificante del gen. A pesar de que en principio se supone que las regiones no codificantes son más susceptibles a la mutación ya que no conlleva cambio en la proteína, en la secuenciación de este gen, en ADNc y región no codificante, la frecuencia de SNPs en la región codificante es aparentemente superior a la detectada para la región no codificante, pero no se puede obviar el hecho de que la secuenciación del intrón 9 se realizó en un número inferior de razas y poblaciones porcinas. Probablemente la secuenciación del intrón 9 en el mismo número de razas y poblaciones porcinas que las realizadas para el ADNc conllevara la obtención de una frecuencia de mutación en esta región más elevada.

III. b. Diversidad genética en poblaciones de cerdo ibérico

Genotipado de polimorfismos

Los polimorfismos detectados fueron estudiados y se realizó el genotipado en un mayor número de muestras para aquellos que representaron interés para este trabajo, bien por presentar asociación con algún patrón para el color, por aparecer segregando en la población ibérica o por aparecer como posible marcador racial. Este genotipado se realizó a través de las técnicas PCR-RFLP, SSCP y PCR alelo-específica.

PCR-RFLP: Las mutaciones localizadas en las posiciones 1208, 1858, 2040, 2462 del ADNc y 293 del intrón 9 del gen generan dianas polimórficas para los enzimas de restricción *Tsp45 I*, *Bst U I*, *Dpn II*, *Tfi I* y *Aci I*.

Para el genotipado de estos polimorfismos en un mayor número de muestras de ADN se diseñaron parejas de oligonucleótidos específicas dentro de los exones (Pin9F-Pex10R, Pex16F-Pex16R, PEX18F-PEX18R, Pex23F-Pex23R y Pex9F-Pin9RII), (cuyas posiciones y secuencias pueden ser observadas en el anejo 4), que permiten amplificar fragmentos que contienen la posición polimórfica.

Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 25 μ l conteniendo buffer estándar 1x, 2 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 12.5 pmol de cada oligonucleótido, 0.5 u Tth y 60 ng de ADN. Las condiciones de amplificación fueron de 94°C durante 3 min seguido de 32 ciclos a 94°C (45s), T^a de anillamiento específica de cada pareja de oligonucleótidos, indicadas en la tabla 28, (45s), 72°C (45s), seguido de una fase final de extensión a 72°C durante 7 min. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 (MJ Research).

Tabla 28: T^{as} de anillamiento de los fragmentos amplificados específicos para cada pareja de oligonucleótidos que contiene la posición a genotipar en el ADNc del gen *P*

Fragmento	Exón10	Exón16	Exón18	Exón 23	Intrón9
Oligonuc.	Pin9F-Pex10R	Pex16F-Pex16R	Pex18F-Pex18R	Pex23F-Pex23R	Pex9F-Pin9RII
Posición	1208 ADNc	1858 ADNc	2040 ADNc	2462 ADNc	293 Intron
T ^a anill.	50°C	60°C	49.5°C	52°C	54°C
Tamaño fragmento (pb)	179	112	102	75	1170

Tras confirmar la amplificación en geles de agarosa al 2-3.5%, el producto de amplificación fue sometido a una digestión con el enzima de restricción correspondiente.

Las reacciones de digestión se realizaron en volúmenes finales de 20 μ l conteniendo 10 μ l de la PCR, buffer de digestión correspondiente a cada enzima de restricción (suministrado con el enzima), BSA (en el caso de que lo requiriera) y 2 u del enzima correspondiente a cada digestión (New England BioLabs), indicado en la tabla 29.

Tabla 29: Enzimas de restricción y condiciones de digestión para los RFLP genotipados del gen *P*

Fragmento	Exón 10	Exón 16	Exón 18	Exón 23	Intrón 9
Enzima Diana	<i>Dpn</i> I G A T C	<i>Bst</i> U I C T C G T G	<i>Tsp45</i> I G T Pu AC	<i>Aci</i> I C C G C	<i>Tfi</i> I G A Py T C
Buffer	Específico	NEB2	NEB1 + BSA	NEB3	NEB3
Tª digestión	37°C	60°C	65°C	37°C	65°C
Fragmentos generados(pb)	179 129/50	106 48/58	102 65/37	75 53/22	1170/73 877/220/73

El resultado de la digestión se visualizó en un gel de agarosa de alta resolución (Metaphor) al 3% (Exón10, 16 y 18), al 3.5% (Exón 23) o agarosa de baja resolución al 1.5% (Intrón 9) y tinción con bromuro de etidio.

Estos polimorfismos fueron genotipados en los animales que se indican en la tabla 30, dependiendo del interés del polimorfismo.

Tabla 30: Animales genotipados para cada uno de los polimorfismos del gen *P* analizados por PCR-RFLP

Exón 10	Exón 16	Exón 18	Exón 23	Intrón 9
15 Ib (≠ orígenes)	22 Ib negros	9 Ib negros	200 Ib (≠ orígenes)	30 Ib (≠ orígenes)
20 Large White	20 Ib (≠ orígenes)	72 Ib colorados	104 Duroc	27 Duroc
5 C. vietnamitas	18 Duroc	6 Ib moteados		
5 Duroc	2 Jabalíes	2 Meishan		
5 Pietrain		2 Pietrain		
5 Landrace		2 Landrace		
5 Meishan				

Ib: Ibéricos

PCR-SSCP: El polimorfismo localizado en la posición 510 del exón 4 del ADNc fue genotipado en un mayor número de muestras empleando la técnica de PCR-SSCP. Para ello, se diseñó una pareja de oligonucleótidos que permitiese el genotipado en muestras de ADN genómico (Pex4F-Pex4R, indicada en el anejo 4) a partir de la secuencia nucleotídica de cerdo, amplificando un fragmento de 147pb que contenía la posición polimórfica e incluida en el exón 4.

La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo buffer estándar 1x, 2mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 12.5 ng de cada oligonucleótido, 0.5 u de Tth (Biotools) y 60 ng de ADN. Las condiciones de amplificación fueron de 94°C durante 3 min seguido de 32 ciclos a 94°C (45s), 54°C (45s), 72°C (45s) y una fase final de extensión a 72°C durante 7 min. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 (MJ Research).

La amplificación fue confirmada en geles de agarosa al 3% y tinción con bromuro de etidio.

El producto resultante de la amplificación fue sometido a una electroforesis en condiciones no desnaturizantes en geles de poliacrilamida en las condiciones anteriormente mencionadas.

Este polimorfismo fue genotipado en 14 animales ibéricos con capa negra, 101 animales ibéricos con capa colorada, 6 animales ibéricos con capa entrepelada, 5 animales ibéricos moteados y 13 animales Duroc.

PCR alelo específica: El SNP localizado en el intrón 9 en la posición 1920 fue genotipado en un mayor número de muestras a través de la técnica de PCR alelo-específica. Para ello se diseñaron dos protocolos de amplificación y tres oligonucleótidos (PCR-Cf, PCR-Tf y PCR-r) (indicados en el anejo 4), uno de ellos, el oligonucleótido antisentido, común para ambas amplificaciones y dos específicos para cada alelo (específico en el último nucleótido del extremo 3´).

La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo buffer estándar 1x, 2mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 12.5 ng de cada oligonucleótido, 0.5 u de Tth (Biotools) y 60 ng de ADN. Las condiciones de amplificación fueron de 94°C durante 3 min seguido de 32 ciclos a 94°C (45s), T^a anillamiento específica de cada par de oligonucleótidos e indicada en la tabla 31, (45s), 72°C (45s) y una fase final de extensión a 72°C durante 7 min. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 (MJ Research).

Tabla 31: Condiciones de amplificación de las parejas de oligonucleótidos para la PCR alelo-específica del intrón 9 del gen *P*

Fragmento	Intrón 9 (1920)	Intrón9 (1920)
Oligonucleótidos	PCR-Cf-PCR-r	PCR-Tf-PCR-r
T ^a anillamiento	54°C	50°C
Tamaño fragmento (pb)	178	173

La amplificación fue confirmada en geles de agarosa al 2.5% y tinción con bromuro de etidio.

La confirmación de la eficacia de la técnica y del diseño óptimo de los oligonucleótidos se realizó genotipando 20 animales previamente secuenciados.

Este polimorfismo fue genotipado en 5 animales ibéricos con capa negra, y 260 animales ibéricos con capa colorada, pertenecientes a la línea Torbiscal.

Para otros polimorfismos detectados por secuenciación (polimorfismo localizado en la posición 511 del exón 4 y polimorfismo localizado en la posición 856 del intrón 9 del gen), antes de buscar algún método de genotipado a gran escala, se realizó su genotipado a través de secuenciación en un mayor número de muestras, indicadas en la tabla 32. Para ello se utilizaron las parejas de oligonucleótidos anteriormente descritos Pex4F-Pex4R y Pex9F-Pin9RII.

Tabla 32: Animales secuenciados para confirmar los SNPs de las posiciones 511 del ADNc y 856 del intrón 9

Exón 4 (pos. 511)	Intrón 9 (pos. 856)
14 Ib negros	10 Ib (≠ orígenes)
33 Ib colorados	10 Duroc (≠ orígenes)
6 Ib entrepelados	
5 Ib moteados	
13 Duroc	

Ib: Ibéricos

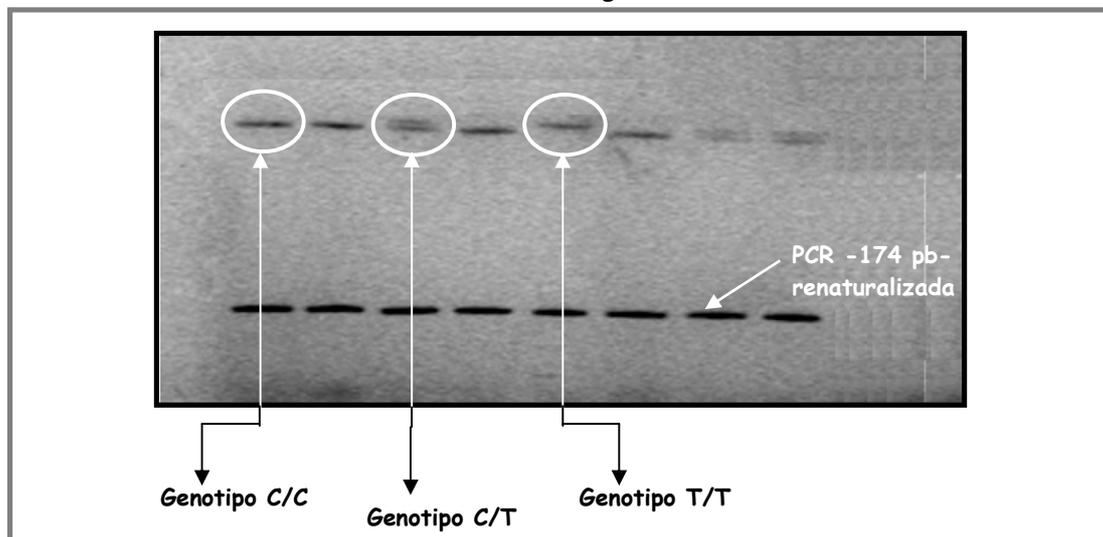
Polimorfismos en el ADNc

El polimorfismo localizado en la posición 272 del exón 2 del ADNc, ha sido detectado en animales pertenecientes a la raza Meishan, se trata de una transversión de Guanina a Adenina, sustitución que no produce ningún cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína (Anejo 4).

El polimorfismo localizado en la posición 510 del exón 4 del ADNc del gen, detectado en la población ibérica, consiste en una transversión de Citosina por Timina, sustitución que produce un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína, este cambio consiste en una sustitución de Arginina por Cisteína (Anejo 4), este es un cambio de un aminoácido básico a un aminoácido polar.

Dado que este SNP producía un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína, se realizó el genotipado del mismo en un mayor número de muestras de animales pertenecientes a distintas razas y poblaciones porcinas. El genotipado se realizó empleando la metodología de PCR-SSCP (Figura 38), anteriormente mencionada.

Figura 38: Patrón electroforético para el SSCP localizado en la posición 510 del exón 4 del gen *P*



*Se comprobó que la mutación localizada en el siguiente nucleótido (posición 511 del exón 4), no alterase el patrón electroforético.

Los individuos homocigotos para la mutación (T/T) presentan una única banda a una altura superior que los individuos homocigotos sin la mutación (C/C) y, por tanto los individuos heterocigotos presentan las dos bandas correspondientes a las hebras de ADN con la mutación y sin la mutación.

Los resultados del genotipado de este polimorfismo se muestran en las tablas 33 y 34, donde se indican las poblaciones y razas analizadas, el número de animales detectados para cada genotipo (Tabla 33) y las frecuencias alélicas (Tabla 34).

Tabla 33: Resultado del genotipado para el SNP en la posición 510 del exón 4 del gen *P*

Posición 510 Exón 4 Población (n)	C/C	C/T	T/T
Ibéricos negros (14)	3	4	7
Ibéricos colorados (101)	71	28	2
Ibéricos entrepelados (6)	4	1	1
Manchados (5)	5	--	--
Duroc (13)	13	--	--

Tabla 34: Frecuencias alélicas para el SNP en la posición 510 del exón 4 del gen *P*

Posición 510 Exón 4 Población (n)	C	T
Ibéricos negros (14)	0.357	0.643
Ibéricos colorados (101)	0.842	0.158
Ibéricos entrepelados (6)	0.750	0.250
Manchados (5)	1.000	--
Duroc (13)	1.000	--

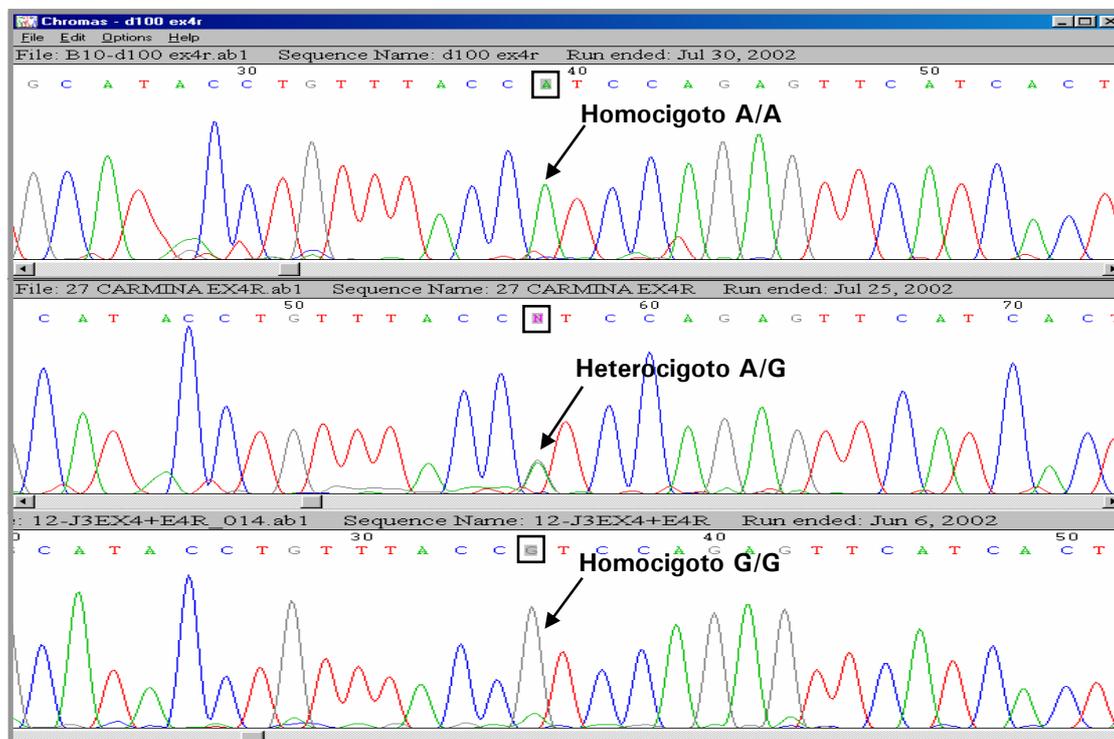
Como se muestra en las tablas anteriores, esta mutación sólo fue detectada en animales de las poblaciones de cerdo ibérico, concretamente en las poblaciones con color de capa negra a elevada frecuencia (0.643) y en las poblaciones con capa colorada y entrepelada a menor frecuencia (0.158 y 0.250, respectivamente). No se detectó ni en animales con capa manchada ni en animales de la raza Duroc analizados.

El polimorfismo localizado en la posición 511 del exón 4 del ADNc del gen, una transversión de Guanina por Adenina, produce un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína, este cambio consiste en una sustitución de Arginina a Histidina (Anejo 4). Éste es un cambio de un aminoácido básico a un aminoácido neutro, para el mismo aminoácido que el cambio generado por la mutación en la posición 510 anteriormente descrita.

Al igual que el SNP anterior, dado que éste producía un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína y además se había detectado su presencia en animales pertenecientes a la raza Duroc (además de detectarse en animales de la raza Meishan) y no en animales de la raza Ibérica, interesaba el genotipado de un mayor número de muestras para su posible aplicación como marcador racial.

Por este motivo y antes de buscar un método de genotipado a gran escala, se procedió a la secuenciación de un número mayor de muestras (Figura 39), descrito anteriormente, para estimar la frecuencia de este polimorfismo en las poblaciones y razas objeto de estudio y realizar una posterior búsqueda de un método de genotipado a gran escala si fuese de interés.

Figura 39: Cromatogramas de la secuenciación del fragmento que contiene el polimorfismo en la posición 511 del exón 4 del gen *P*



Como se observa en la figura anterior, a través de secuenciación se puede detectar el nucleótido localizado en la posición polimórfica, determinando si los individuos analizados son homocigotos para A, heterocigotos A/G u homocigotos para G. En el primer cromatograma se representa un individuo homocigoto A/A. En el segundo un individuo heterocigoto A/G y en el tercero un individuo homocigoto G/G.

Los resultados de la secuenciación del fragmento que contiene este SNP en la posición 511 del ADNc del gen aparecen representados en las tablas 35 y 36, donde se indica la población y raza a la que pertenecen los animales analizados, el número de animales detectados para cada genotipo (Tabla 35) y las frecuencias alélicas (Tabla 36).

Tabla 35: Resultado del genotipado para el SNP en la posición 511 del exón 4 del gen *P*

Posición 511 Exón4	A/A	A/G	G/G
Población (n)			
Ibéricos negros (14)	--	--	14
Ibéricos colorados (33)	--	1	33
Ibéricos entrepelados (8)	--	--	8
Manchados (5)	--	3	2
Duroc (15)	10	5	--

Tabla 36: Frecuencias alélicas para el SNP en la posición 511 del exón 4 del ADNc del gen *P*

Posición 511 Exón4	A	G
Población (n)		
Ibéricos negros (14)	--	1.000
Ibéricos colorados (33)	0.015	0.985
Ibéricos entrepelados (8)	--	1.000
Manchados (5)	0.300	0.700
Duroc (15)	0.833	0.167

Como se muestra en las tablas anteriores, el nucleótido Adenina aparece a elevada frecuencia en las diversas poblaciones de cerdos de la raza Duroc, mientras

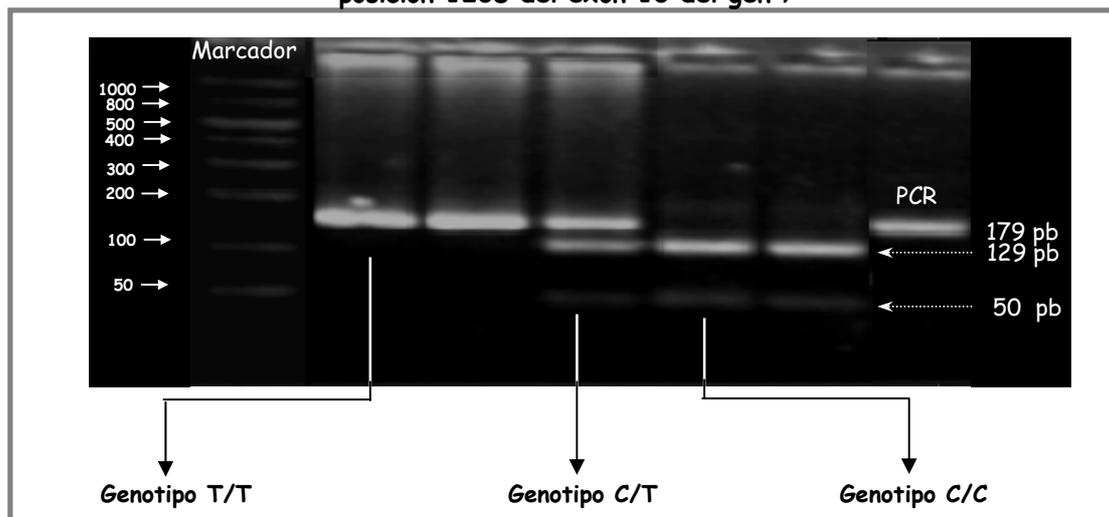
que en las poblaciones analizadas de cerdos de la raza Ibérica, no se detecta esta mutación excepto en un individuo perteneciente a una población de cerdos ibéricos con capa colorada que presenta esta mutación en heterocigosis.

El polimorfismo localizado en la posición 794 del exón 6 del DNAc, es una transversión de una Guanina por una Adenina, sustitución que no produce ningún cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína (Anejo 4) y que ha sido detectado en animales pertenecientes a la raza Duroc y en ningún otro animal de los secuenciados.

El polimorfismo localizado en la posición 1208 de la secuencia nucleotídica del ADNc del gen *P*, incluido dentro del exón 10, es una transversión de Citosina por Timina. Esta sustitución no conlleva ningún cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína para la que codifica (Anejo 4), sin embargo, ya que se detectó en animales pertenecientes a las razas Large White (con capa blanca) y Cerdos vietnamitas (con capa negra), pero no en animales con color de capa colorada, se realizó el genotipado en un mayor número de muestras de poblaciones porcinas pertenecientes a diferentes razas.

El genotipado de este SNP se realizó empleando la metodología de PCR-RFLP *Dpn* II (Figura 40), anteriormente mencionada.

Figura 40: Patrón electroforético para el RFLP *Dpn* II para el SNP localizado en posición 1208 del exón 10 del gen *P*



Los individuos que presentan la mutación (T) no presentan la diana de restricción activa y por tanto para los individuos homocigotos (T/T) el producto de amplificación no es digerido con el enzima generando un único fragmento de 179 pb, mientras que los homocigotos sin esta mutación (C/C), presentan la diana de restricción activa por lo que el fragmento amplificado se digiere dando lugar a dos fragmentos de 129 y 50 pb y los heterocigotos (C/T) presentan los tres fragmentos, correspondientes al fragmento amplificado sin digerir y digerido.

Los resultados del genotipado de este SNP se muestran en la tabla 37, donde se indican las poblaciones y razas a las que pertenecen las muestras analizadas y el número de animales detectados para cada genotipo.

Tabla 37: Resultado del genotipado del SNP en posición 1208 del exón 10 del gen *P*

Posición 1208 Exón10	C/C	C/T	T/T
Población (n)			
Ibéricos (15)	15	--	--
distintas poblaciones			
Large White (20)	20	--	--
Cerdos vietnamitas (3)	--	1	2
Meishan (5)	5	--	--
Pietrain (5)	5	--	--
Landrace (5)	5	--	--
Duroc (5)	5	--	--

Los resultados que muestran la tabla anterior, reflejan que sólo se detecta la presencia de esta mutación en los cerdos de origen vietnamita, ninguno de los animales pertenecientes al resto de razas porcinas analizadas, incluidos los animales de la raza Large White genotipados (por secuenciación se había detectado un individuo de esta raza portador en heterocigosis de esta mutación), presentaron esta mutación.

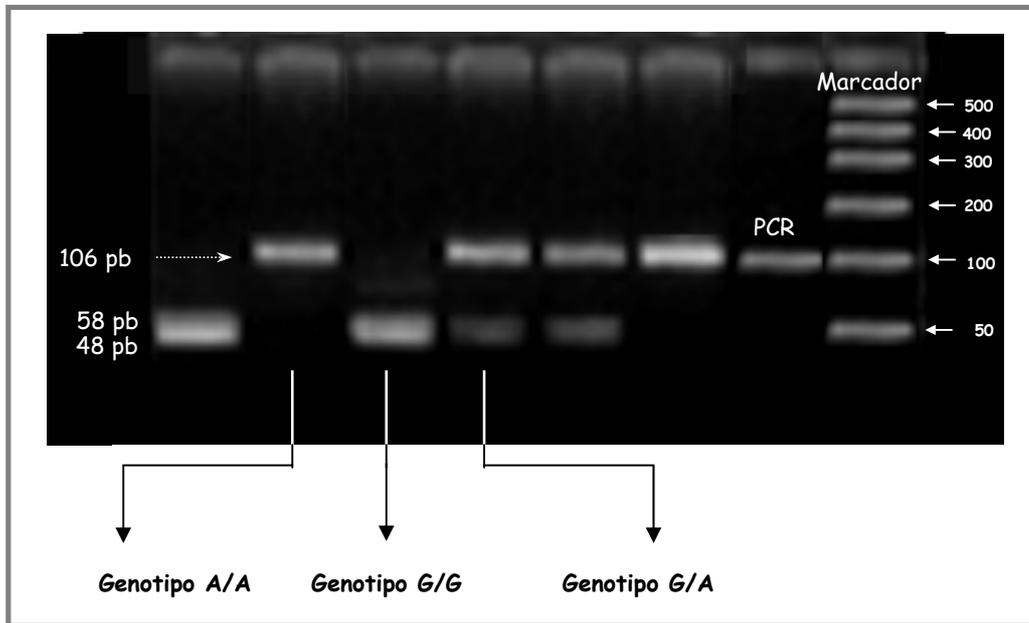
El polimorfismo detectado en la posición 1666 de la secuencia nucleotídica del ADNc del gen *P*, incluida dentro del exón 15, una transversión de Guanina por Adenina, produce un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína, este cambio consiste en una sustitución de Glicina por Aspártico (Anejo 4), éste es un cambio de un aminoácido neutro a un aminoácido ácido. Este SNP fue detectado exclusivamente en animales pertenecientes a una población de cerdos de origen vietnamita.

El polimorfismo localizado en la posición 1808 del exón 16 del ADNc, corresponde a una transversión de Citosina a Timina, sustitución que no genera ningún cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína (Anejo 4). Este SNP fue detectado en animales pertenecientes a la raza Duroc y en un animal de los dos secuenciados de la raza Meishan, sin embargo no se detectó en ningún animal de la raza Ibérica.

El polimorfismo localizado en la posición 1858 de la secuencia nucleotídica del ADNc del gen *P*, incluida dentro del exón16, es una transición de Guanina por Adenina, mutación que produce un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína, este cambio consiste en una sustitución de Arginina por Prolina (Anejo 4), éste es un cambio de un aminoácido básico a un aminoácido neutro. Este SNP fue detectado en uno de los dos animales secuenciados pertenecientes a una población de cerdo ibérico con color de capa negra, además de Duroc.

Dado el interés de este polimorfismo por provocar un cambio aminoacídico y aparecer en animales de las razas Ibérica (uno de los dos individuos con capa negra secuenciados contenía la mutación en heterocigosis) y Duroc, se realizó el genotipado en un mayor número de muestras, para ello se empleó la metodología de PCR-RFLP *BstU* I (Figura 41).

Figura 41: Patrón electroforético obtenido del RFLP *Bst*U I para el SNP localizado en la posición 1858 del exón 16 del gen *P*



Los individuos que presentan la mutación (A) no presentan la diana de restricción activa, lo que permite distinguir los individuos homocigotos sin la mutación (G/G) cuyo resultado tras la digestión del fragmento amplificado sería de dos fragmentos de 58 y 48 pb, mientras que para los individuos homocigotos con la mutación (A/A) el fragmento amplificado no es digerido generando un único fragmento de 106 pb, y los individuos heterocigotos presentarían los tres fragmentos: 106, 58 y 48 pb.

Los resultados del genotipado de este polimorfismo aparecen en las Tablas 38 y 39, donde se indica la población y raza a la que pertenecen los animales genotipados y el número de animales detectados para cada genotipo (Tabla 38) y frecuencias alélicas (Tabla 39).

Tabla 38: Genotipado del SNP en posición 1858 del ADNc del exón 16 del gen *P*

Posición 1858 Exón16	G/G	G/A	A/A
Población(n)			
Ibéricos negros (22)	22	--	--
Otros Ibéricos (16)	11	3	2
Duroc (16)	2	8	6
Jabalí (2)	2	--	--

Tabla 39: Frecuencias alélicas para el SNP en la posición 1858 del ADNc del exón 16 del gen *P*

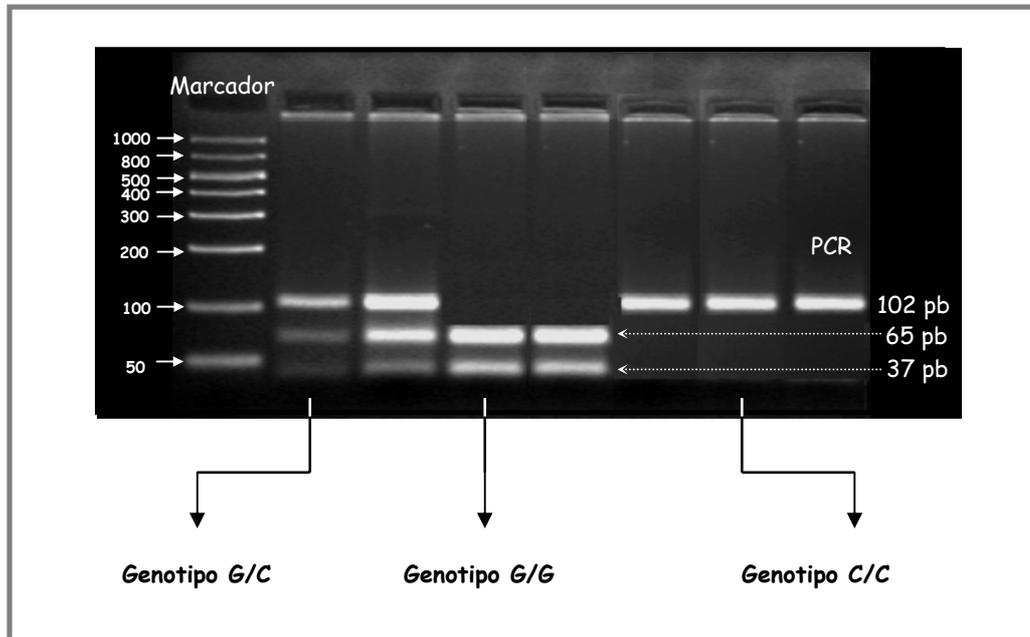
Posición 1858 Exón 16	G	A
Población (n)		
Ibéricos negros (22)	1.000	--
Otros ibéricos (16)	0.781	0.219
Duroc (16)	0.375	0.625

En ninguno de los animales pertenecientes a la población de cerdo ibérico negro se volvió a detectar la mutación, sin embargo si apareció en otros cerdos ibéricos (con capas coloradas, entrepeladas y retintas) y en animales de la raza Duroc.

El polimorfismo localizado en la posición 2040 de la secuencia nucleotídica del ADNc del gen *P*, incluido dentro del exón 18, es una transición de Citosina por Guanina y produce un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína, este cambio consiste en una sustitución de Leucina por Valina (Anejo 4), éste es un cambio de un aminoácido hidrofóbico por otro aminoácido hidrofóbico.

Este SNP fue detectado en animales pertenecientes a poblaciones con color de capa rubia y negra de la raza Ibérica y dado el interés de éste por aparecer segregando en la población de cerdos ibéricos, se realizó el genotipado en un mayor número de muestras de animales pertenecientes a distintas poblaciones y razas. Para ello se empleó la metodología de PCR-RFLP *Tsp45 I* (Figura 42), mencionada anteriormente.

Figura 42: Patrón electrofórico para el RFLP *Tsp45 I* para el SNP localizado en posición 2040 del exón 18 del gen *P*



Los individuos que presentan la mutación (C), no presentan la diana de restricción activa y por tanto no son digeridos por el enzima, de manera que permite distinguir los individuos homocigotos con la mutación (C/C) por presentar un único fragmento tras la digestión del producto amplificado de 102 pb, mientras que los individuos homocigotos sin la mutación (G/G), tras la digestión del producto amplificado, presentan dos fragmentos de 65 y 37 pb, y los heterocigotos presentan los tres fragmentos de 102, 65 y 37 pb.

El resultado del genotipado de este polimorfismo aparece representado en la tabla 40, donde se indica la población y raza a la que pertenecen las muestras analizadas y el número de animales detectados para cada genotipo.

Tabla 40: Resultado del genotipado para el SNP en la posición 2040 del exón 18 del gen *P*

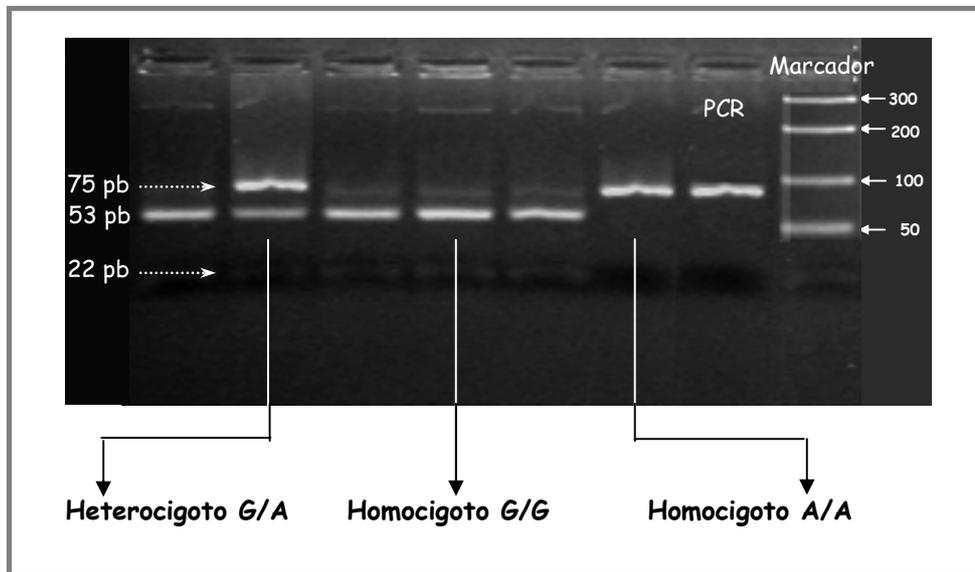
Posición 2040 Exón18	C/C	C/G	G/G
Población (n)			
Ibéricos negros (38)	9	13	16
Ibéricos colorados (72)	41	28	3
Ibéricos manchados (6)	2	4	--
Meishan (2)	2	--	--
Pietrain (2)	2	--	--
Landrace (2)	2	--	--
Large White (2)	2	--	--
Mangalitza (2)	2	--	--
Duroc (2)	2	--	--

Como se muestra en la tabla anterior, esta mutación se detectó en animales pertenecientes a poblaciones de la raza Ibérica, concretamente en las poblaciones de cerdo ibérico con color de capa negra se detectó a una frecuencia elevada $\{frec(G)=0.592\}$, mientras que en la población de cerdos con capa colorada la frecuencia de este alelo era menor $\{frec(G)=0.236\}$.

El polimorfismo localizado en la posición 2462 del exón 23 del ADNc del gen consiste en una transversión de Guanina por Adenina, sustitución que no genera ningún cambio en la secuencia nucleotídica de la proteína. Este polimorfismo fue detectado en animales pertenecientes a la población Duroc y no se detectó en animales ibéricos, por lo que se analizó este SNP como marcador racial para Duroc.

El genotipado de un mayor número de muestras se realizó empleando la metodología de PCR-RFLP (*Aci* I) (Figura 43), mencionada anteriormente. El genotipado se realizó sobre 210 animales de la raza Ibérica (de diversos colores de capa y ganaderías) y sobre 104 animales Duroc (de diversas ganaderías).

Figura 43: Patrón electroforético para el RFLP *Aci* I para el SNP detectado en posición 2462 del exón 23 del gen *P*



Los individuos portadores de la mutación (A) no presentan la diana de restricción activa, por tanto permite distinguir los individuos homocigotos sin la mutación (G/G) cuyo producto de amplificación es digerido con el enzima generando dos fragmentos de 53 y 22 pb de los individuos homocigotos con la mutación (A/A) cuyo producto de amplificación no sería digerido por el enzima generando un único fragmento de 75 pb, los heterocigotos presentarían los tres fragmentos: 75, 53 y 22 pb.

El resultado del genotipado a gran escala de este polimorfismo se muestra en las tablas 41 y 42, donde se indican los animales genotipados, el número de animales detectados para cada genotipo (Tabla 41) y el número la frecuencia alélica (Tabla 42).

Tabla 41: Resultado del genotipado del SNP en posición 2463 del exón 23 del gen *P*

	<i>G/G</i>	<i>G/A</i>	<i>A/A</i>
Ibéricos negros (31)	31*	--	--
Ibéricos colorados (110)	110	--	--
Ibéricos entrepelados (81)	81	--	--
Duroc (104)	3	45	56
Manchados de Jabugo (5)	2	3	--

Tabla 42: Frecuencia alélicas del SNP en posición 2463 del exón 23 del gen *P*

	<i>G</i>	<i>A</i>
Ibéricos negros (31)	1.000*	--
Ibéricos colorados (110)	1.000	--
Ibéricos entrepelados (81)	1.000	--
Duroc (104)	0.245	0.755

En ninguno de los animales ibéricos se detectó la presencia de la mutación (excepto en una población con color de capa negra, no incluida en la tabla), sin embargo se detectó a frecuencia elevada (0.755) en los animales de la raza Duroc.

Para las poblaciones de cerdo ibérico con capa negra, entrepelada, colorada, rubia y manchada, se detectó la presencia, respecto a la secuencia considerada silvestre del jabalí, de 2 SNPs que están segregando en estas poblaciones, los SNPs localizados en las posiciones 510 y 2040 de la secuencia nucleotídica del ADNc del gen *P*.

En los animales analizados pertenecientes a estas poblaciones (con capa negra y colorada –Torbiscal-) se detectan los cuatro posibles haplotipos constituidos por la combinación de ambos SNPs (Tabla 43).

Tabla 43: Haplotipos constituidos por la combinación de los 2 SNPs del ADNc que aparecen segregando en los animales de la raza Ibérica

Haplotipos	SNP Posición 510	SNP Posición 2040	Ibéricos negros (N=20)	Ibéricos colorados (N=69)
H. I	T/T	G/G	12	2
H. II	T/T	C/G	4	0
H. III	T/T	C/C	0	0
H. IV	C/C	C/C	2	40
H. V	C/C	G/G	1	0
H. VI	C/C	C/G	0	2
H. VII	C/T	G/G	1	1
H. VIII	C/T	C/G	0	24
H. IX	C/T	C/C	0	0

Como se puede observar en la tabla anterior no se detectó ningún animal que estuviera constituido en homocigosis por el haplotipo T/T en posición 510 y C/C en posición 2040 (haplotipo H. III) y tampoco se detectó ninguno que estuviera constituido por el haplotipo C/T en posición 510 y C/C en posición 2040 (haplotipo H. IX).

Por otro lado, los haplotipos H.II y H.V fueron detectados en animales pertenecientes a poblaciones de cerdo ibérico con capa negra, mientras que no se detectó en aquellos que presentaban color de capa colorada, y los haplotipos H. VI y H.VIII fueron detectados en animales pertenecientes a poblaciones de cerdo ibérico con color de capa colorada y no en aquellos que presentaban color de capa negra.

Según los resultados obtenidos del genotipado, el haplotipo más frecuente en la población de cerdos ibéricos con capa negra es el constituido por T/T en posición 510 y G/G en posición 2040 $\{frec(H. I) = 0.600\}$, mientras que en las poblaciones de cerdos con capa colorada los haplotipos más frecuentes son el constituido por C/C en

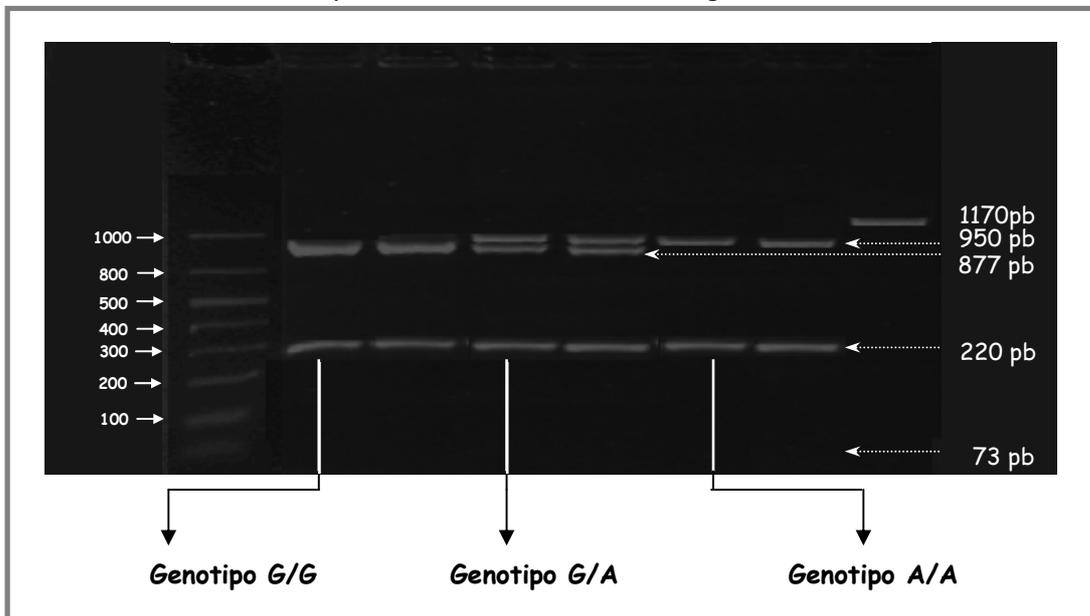
posición 510 y C/C en posición 2040 {frec(H. IV)=0.579}, seguido del haplotipo constituido por C/T en posición 510 y C/G en posición 2040 {frec(H. VIII)=0.348}.

Polimorfismos en el intrón 9

Dado el interés como marcadores de los polimorfismos detectados en las posiciones 293 y 856 del intrón 9 del gen en los animales de la raza Duroc y ausentes en los animales de la raza Ibérica secuenciados, se realizó el genotipado en un mayor número de muestras.

La mutación (A/G) localizada en posición 293 del gen, una transversión de Alanina por Guanina, genera una diana de restricción polimórfica para el enzima de restricción *Tfi* I, lo que permitió realizar el genotipado de este polimorfismo en un mayor número de muestras de animales de distintas poblaciones pertenecientes a las razas Duroc e Ibérica a través de la metodología de PCR-RFLP (*Tfi* I) (Figura 44), mencionada anteriormente.

Figura 44: Patrón electroforético para el RFLP *Tfi* I para el SNP localizado en la posición 293 del intrón 9 del gen *P*



Los individuos homocigotos con la mutación (A/A) se distinguen porque no presentan la diana de restricción polimórfica activa (existe una diana siempre activa en

la región amplificada), de manera que tras la digestión sólo se pueden observar las bandas de 950 y 220 pb, mientras que los homocigotos sin la mutación (G/G) presentan la diana de restricción polimórfica activa, de forma que tras la digestión se pueden observar bandas de 877, 220 y 73 pb, y por tanto, en los heterocigotos (G/A) se detecta la presencia de las cuatro bandas de 950, 977, 220 y 73 pb.

Los resultados del genotipado de este polimorfismo aparecen representados en las tablas 44 y 45, donde se indica la raza a la que pertenecen los animales analizados, el número de animales detectados para cada uno de los genotipos (tabla 44) y frecuencias alélicas (Tabla 45).

Tabla 44: Resultado del genotipado para el polimorfismo localizado en la posición 293 del intrón 9 del gen *P*

Posición 293	A/A	A/G	G/G
Raza (n)			
Ibéricos (30)	3	2	25
Duroc (27)	11	11	5

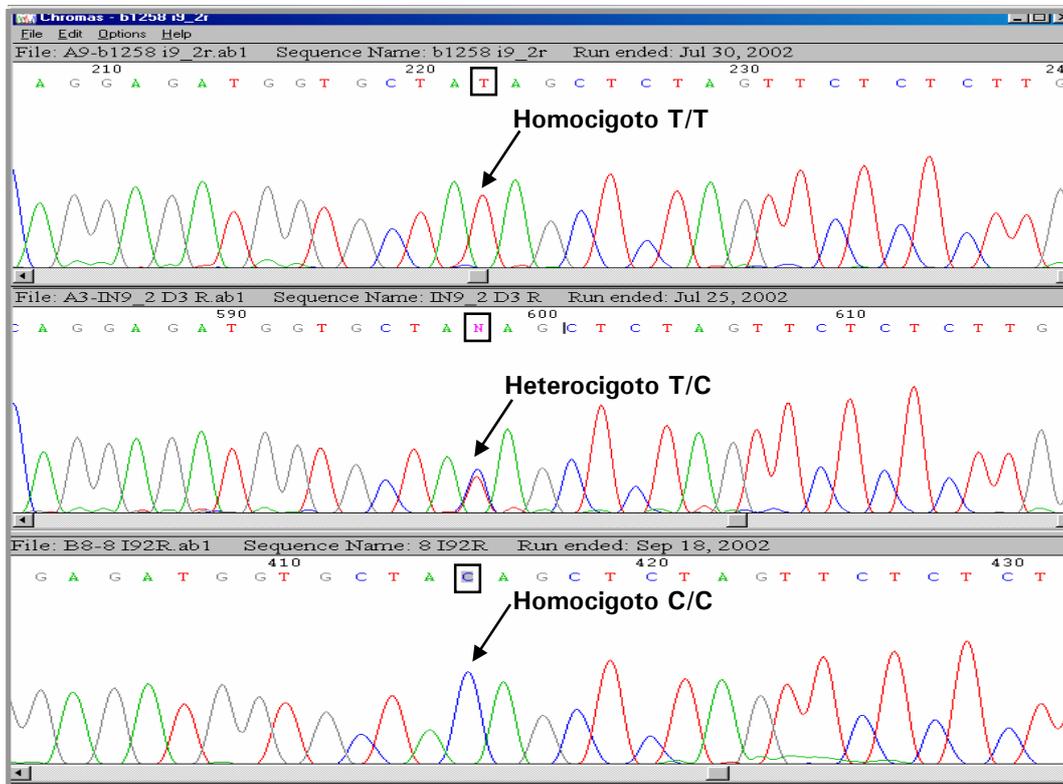
Tabla 45: Frecuencias alélicas para el polimorfismo localizado en la posición 293 del intrón 9 del gen *P*

Posición 293	A	G
Raza (n)		
Ibéricos (30)	0.133	0.869
Duroc (27)	0.611	0.389

Como se muestra en las tablas anteriores se detectó la presencia de este SNP en ambas poblaciones, concretamente en las poblaciones de la raza Duroc aparece a frecuencia mas elevada (0.611) que en las poblaciones de la raza Ibérica (0.133).

El otro SNP detectado (T/C, en la posición 856 del intrón) en los animales secuenciados de la raza Duroc, no generaba diana polimórfica para ningún enzima de restricción por lo que antes de buscar un método para el genotipado a gran escala, se realizó la secuenciación de este fragmento, conteniendo la posición polimórfica, en un mayor número de muestras de animales de las razas Duroc e Ibérica (Figura 45).

Figura 45: Cromatogramas de la secuenciación del fragmento que contiene el polimorfismo en la posición 856 del intrón 9 del gen *P*



En la figura 45, aparecen representados los cromatogramas obtenidos para un individuo homocigoto para T/T, un heterocigoto T/C y un homocigoto C/C, indicados por el pico del color que corresponde.

Los resultados de la secuenciación aparecen representados en la tabla 46, donde se indica la raza a la que pertenecen los animales analizados y el número de animales detectados para cada genotipo.

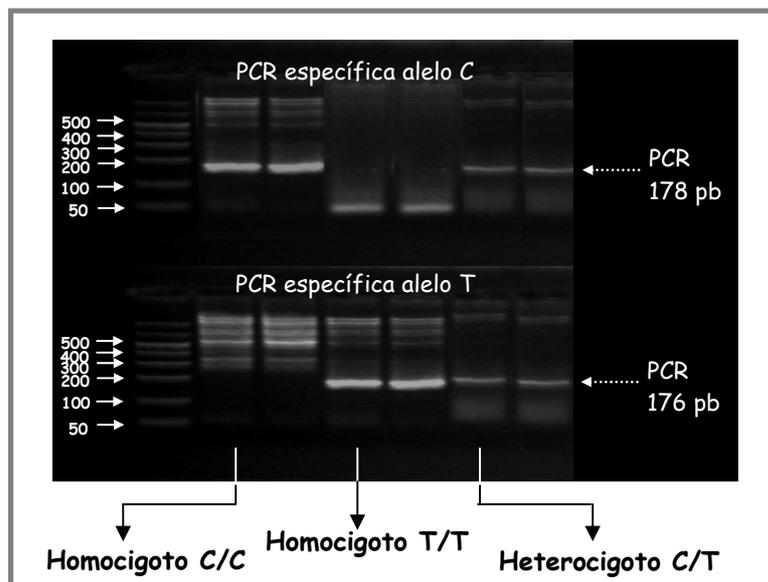
Tabla 46: Resultado del genotipado para el polimorfismo localizado en la posición 856 del intrón 9 del gen *P*, mediante secuenciación

Posición 856	T/T	T/C	C/C
Raza (n)			
Ibéricos (10)	5	3	2
Duroc (10)	3	2	5

Como se puede observar en la tabla anterior, este SNP aparece tanto en animales pertenecientes a poblaciones de la raza Duroc como Ibérica, por tanto, no se buscó un método de genotipado que permitiese el análisis de este polimorfismo en un mayor número de muestras.

El SNP localizado en la posición 1920 del intrón 9 del gen, detectado en animales ibéricos con color de capa colorada, rubia y retinta, fue genotipado en un mayor número de muestras empleando la metodología de PCR alelo-específica (Figura 46), mencionada anteriormente.

Figura 46: Patrón electroforético de la PCR alelo-específica para el SNP localizado en la posición 1920 del intrón 9 del gen *P*



La amplificación con sólo una de las dos parejas de oligonucleótidos es indicativa de homocigosis para uno de los dos alelos, mientras que la doble amplificación indica heterocigosis, ya que el oligonucleótido sólo se une al alelo específico e incluso se puede detectar una diferencia de intensidad entre los individuos homocigotos y los heterocigotos.

Los resultados del genotipado de estos polimorfismos en un mayor número de muestras se representan en la tabla 47, donde se indica el número de animales detectados para cada uno de los genotipos.

Tabla 47: Resultado del genotipado para el polimorfismo localizado en la posición 1920 del intrón 9 del gen *P*, mediante PCR alelo-específica

Posición 1920	T/T	T/C	C/C
Población (n)			
Ibéricos colorados (16)	1	2	13
Ibéricos negros (10)	5	4	1

Como se observa en la tabla anterior, la base mutada aparece tanto en animales ibéricos con capa colorada como negra, aunque a una mayor frecuencia (0.875) en animales con capa colorada.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El polimorfismo localizado en la posición 510 del ADNc del gen, exón 4, produce un cambio aminoacídico no conservativo en la secuencia de la proteína y un posible cambio en la estructura secundaria de la misma (Anejo 4), por lo que podría tener alguna consecuencia funcional. Sin embargo este polimorfismo fue genotipado (PCR-SSCP) en un mayor número de muestras encontrando que éste aparece segregando tanto en animales con color de capa negra, como capa colorada y no aparece fijado en ninguna de ellas, por lo que no se puede establecer asociación con ningún patrón de color.

El polimorfismo localizado en la posición 511 del ADNc del gen, exón 4, también produce un cambio no conservativo, de una aminoácido básico a uno neutro, y podría producir un cambio en la estructura secundaria de la proteína (Anejo 4), este cambio se produce sobre el mismo aminoácido que el que provoca la sustitución en la posición 510, mencionada anteriormente. Por otro lado esta mutación fue detectada en animales de la raza Duroc, de forma que todos los animales portaban al menos uno de sus alelos con la mutación (sólo se detectan animales homocigotos y heterocigotos para la mutación) y por tanto podría tener algún significado funcional.

Estas dos mutaciones, 510 y 511, producen una variación distinta sobre el mismo aminoácido. Además se produce en un aminoácido que en la especie humana coincide con el generado por el alelo mutado de la posición 510 de la secuencia nucleotídica (Anejo 4).

La mutación localizada en la posición 1666, exón 15, detectada en los cerdos de origen vietnamita, también provoca un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína (Anejo 4). Comparando la secuencia aminoacídica de la especie humana con la secuencia porcina portadora de la mutación y no portadora (Anejo 4), se observa que este cambio se produce en una posición conservada entre la especie humana y cerdo, es decir en un aminoácido conservado, lo que podría ser indicativo de la relevancia de esta mutación. Este SNP no fue analizado en un mayor número de muestras ya que no se disponía de ellas, sin embargo, en otras razas con color de capa negra, como Meishan esta mutación no fue detectada, por lo que no cabe esperar que esta mutación este asociada con el patrón de color de las razas con capa negra.

El polimorfismo localizado en la posición 1858 de ADNc del gen, exón 16, conlleva un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína y podría alterar la estructura secundaria de la misma (Anejo 4), además este cambio aminoacídico generado comparando con la secuencia aminoacídica de la especie humana (Anejo 4), se produce en una posición conservada respecto a la secuencia porcina, lo que podría ser indicativo de su relevancia. Este polimorfismo aparece segregando en la población de cerdo ibérico con color de capa colorada y en la raza Duroc, pero no aparece fijado en ninguna de las dos poblaciones y además se detectó en un animal con capa negra por lo que no se puede establecer una asociación con el color de la capa.

El polimorfismo localizado en la posición 2040 del ADNc del gen, exón 18, provoca un cambio aminoacídico no conservativo y podría conllevar un cambio en la estructura secundaria de la proteína (Anejo 4), además este cambio comparado con la secuencia en la especie humana (Anejo 4) se produce en una posición también conservada. Este polimorfismo fue genotipado en animales pertenecientes a distintas razas porcinas y sólo fue detectado en animales de la raza Ibérica. Sin embargo no aparece fijada en ninguna de las poblaciones (negros, colorados, entrepelados y manchados), sino que aparecen segregando a diversas frecuencias (0.592 en las poblaciones con capa negra y 0.236 en las poblaciones con capa colorada), por lo que no se pudo establecer ninguna asociación con el color.

Las mutaciones localizadas en las posiciones 272, 794, 1808 y 2462 del ADNc y las detectadas en el intrón 9 no generaron cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína, por ello no alteran la estructura secundaria de la proteína y por tanto no cabe esperar que produzcan ninguna alteración en la funcionalidad de la misma. Sin embargo los polimorfismos localizados en las posiciones 2462 del ADNc (exón 23), 293 y 856 del intrón 9 del gen detectados en animales Duroc, a pesar de no conllevar ningún cambio aminoacídico, al no ser detectado en ningún animal ibérico se realizó su análisis como candidato a ser marcador racial de Duroc.

Para ninguno de los polimorfismos detectados se pudo establecer una asociación directa con los patrones de color característicos de las poblaciones analizadas en este trabajo, ya que no aparecen fijadas, si bien alguno de estos aparece a una frecuencia elevada en alguna de las poblaciones, como es el caso de polimorfismo localizado en la posición 510, exón 4, y el localizado en la posición 2040, exón 18, que aparecen a una frecuencia aproximada de 0.6 en la población de cerdos ibéricos con capa negra y producen cambios en los aminoácidos que codifican, sin embargo, también fueron detectados en animales con color de capa colorada y manchada.

A pesar de que en principio no cabe suponer que una mutación que no produzca ningún cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína vaya a estar asociada con ningún patrón de color, sin embargo sí puede tratarse de una mutación que este ligada a la mutación que verdaderamente produzca determinada alteración en el patrón del carácter, así por ejemplo para el locus *KIT*, a pesar de que no se ha conseguido caracterizar la mutación causal del fenotipo *Belt* (cinchado), se ha establecido la asociación de este fenotipo con una mutación puntual (SNP) en el gen *KIT* que aunque no es la mutación causal sí esta ligada (Giuffra et al., 1999).

Por este motivo se genotipó el polimorfismo localizado en la posición 1208 del ADNc del gen, exón 10, detectado en animales de la raza Large White y Cerdos de origen vietnamita, que no conlleva ningún cambio aminoacídico. En el genotipado de un mayor número de muestras de cerdos Large White y Cerdos de origen vietnamita, sólo se volvió a detectar esta mutación en animales vietnamitas, con color de capa negra, pero no se detectó en animales de otras razas porcinas con color de capa

también negra (Ibérico y Meishan), y dado el reducido número de muestras disponibles para esta raza (sólo se contaba con 3 muestras de cerdos vietnamitas), no se puede establecer una asociación con el patrón de color.

Para la raza Duroc, dado el interés de la búsqueda de marcadores raciales, hubo determinados polimorfismos que a pesar de no provocar ningún cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína, han sido analizados y genotipados en un mayor número de muestras. Esto se hizo partiendo de aquellos polimorfismos cuyo método de genotipado resultó más sencillo, en primer lugar aquellos en los que fuera asequible y sencillo el diseño de oligonucleótidos dentro del exón que permitiese el genotipado en muestras de ADN y que además se generaba una diana de restricción polimórfica y por tanto pudieran ser genotipados por PCR-RFLP. De esta forma se ha podido detectar un marcador racial candidato para la raza Duroc, éste es el polimorfismo localizado en la posición 2462 del exón 23. Aunque este SNP no aparece fijado sí esta a una frecuencia alta (0.755) en Duroc y no se ha detectado en ningún animal perteneciente a la raza ibérica, excepto en una población con color de capa negra en la que se detectó esta mutación en heterocigosis. Sin embargo en esta misma población también se habían detectado para el gen *MC1R* alelos que no son característicos de la raza Ibérica, lo que hace pensar en una posible introgresión de genes pertenecientes a otras razas porcinas.

Este marcador racial candidato de Duroc, al igual que los detectados en el gen *MC1R*, también ha sido confirmado en animales cruzados Ibérico x Duroc al 50 %, detectándose la presencia de dicho alelo en heterocigosis, como cabía esperar.

Al igual que el anterior, este marcador, se ha podido detectar en animales pertenecientes a la población Manchado de Jabugo. En este caso, este alelo puede proceder de la raza Berkshire (ya que no se conoce su genotipo para este polimorfismo porque no se dispuso de ningún tipo de muestras de esta raza porcina), raza que forma parte del origen común para esta población y para Duroc. Alternativamente, como se menciona para el gen *MC1R*, la presencia de este marcador sugiere que en la recuperación de esta raza habría participado algún animal con ascendencia Duroc. Dado el antecedente para el alelo *MC1R**4 en la población Manchado de Jabugo, alelo que está fijado en la raza Duroc y ausente en la raza

Berkshire (presenta el alelo *MC1R*6*) parece más probable, respecto al alelo del gen *Pink*, la hipótesis de que este alelo proceda de la raza Duroc.

Otro de los polimorfismos detectados, en la posición 511, exón 4, fue genotipado en un mayor número de muestras para confirmar su aplicación como marcador racial de Duroc, sin embargo, se detectó la presencia de un individuo, en una población perteneciente a la raza Ibérica, que era heterocigoto para dicho polimorfismo, y ya que la pureza de este animal o población no se pudo confirmar a través de otro procedimiento y en principio no se podía dudar acerca de su origen, se descartó como marcador.

III. c. Localización del gen

1. Localización física

Para realizar la localización física del gen se dispuso de un panel de células híbridas irradiadas hámster- cerdo constituido por 118 híbridos desarrollado por el INRA de Toulouse (<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/RH/IMpRH.htm>).

Se diseñó una pareja de oligonucleótidos (Pex13F-Pex13R, indicada en el Anejo 4) a partir de la secuencia nucleotídica de cerdo obtenida, amplificando un fragmento de 100 pb, en una región en donde existía una baja similitud entre la secuencia en la especie humana, ratón y cerdo, de manera que el fragmento amplificado fuese específico de la especie porcina y estuviera incluida dentro del exón 13 para permitir su amplificación a partir de muestras de ADN genómico.

La amplificación se realizó en un volumen final de 15 μ l conteniendo buffer estándar 1x, 0.6 mM $MgCl_2$, 120 μ M dNTPs, 7.5 pmol de cada oligonucleótido, 0.18 u de Tth (Biotools) y 12.5 ng de ADN. Las condiciones de amplificación fueron de 94°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos a 94°C(45s), 54°C (45s), 72°C (45s) y una fase final de extensión a 72°C durante 5 min. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 (MJ Research).

La confirmación de las amplificaciones se realizó en geles de agarosa al 3% (Figura 47) y tinción con bromuro de etidio, incluyendo en todas las tandas de amplificaciones un control positivo (con ADN genómico de cerdo), un control negativo

de especificidad de amplificación en cerdo (con ADN genómico de hámster) y un control negativo de contaminación (con agua).

Las amplificaciones de los 118 híbridos se realizaron por duplicado para evitar error y la información de los clones positivos fue enviada al INRA (<http://imprh.toulouse.inra.fr>), para la obtención del resultado de la localización, dando como resultado la localización del gen *P* en el cromosoma 15 porcino (Figura 48).

Figura 47: Patrón electroforético de la PCR diseñada para el IMpRH

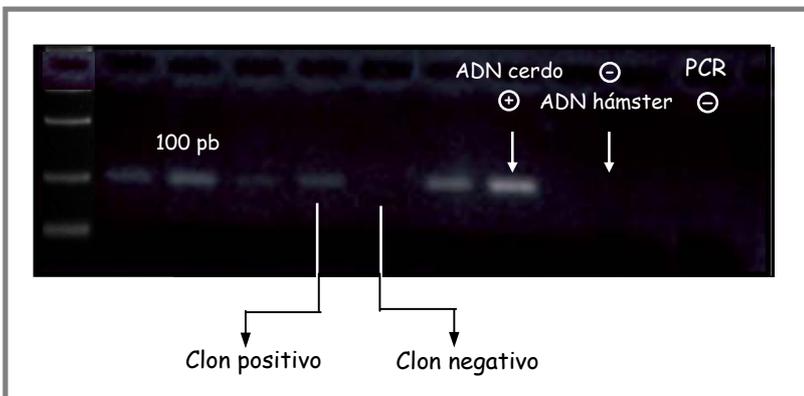
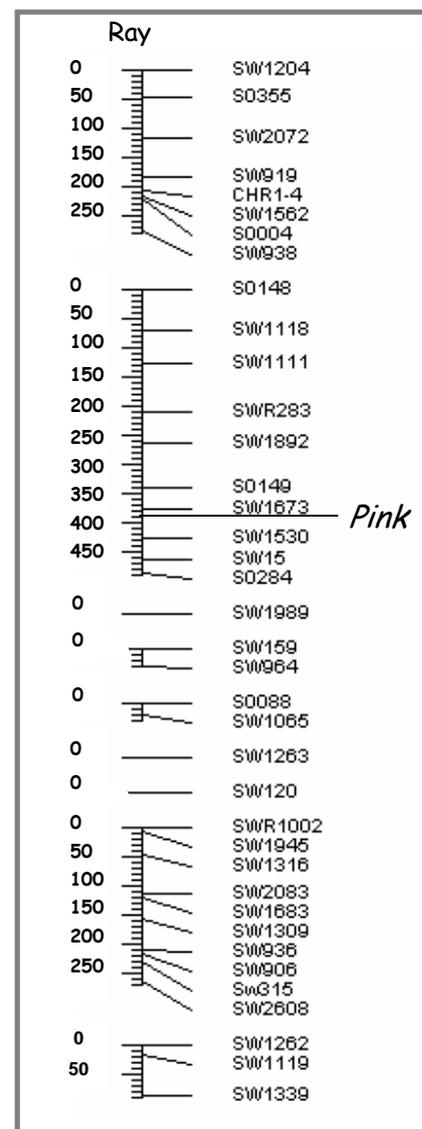


Figura 48: Mapa físico del SSC6, localización física del gen *P*



El gen *P* quedó localizado en el brazo largo del cromosoma 15 porcino (q21-q22), a una distancia de 0.19 Ray del microsatélite *sw1673*, posición que fue asignada con un Lod Score de 16,64.

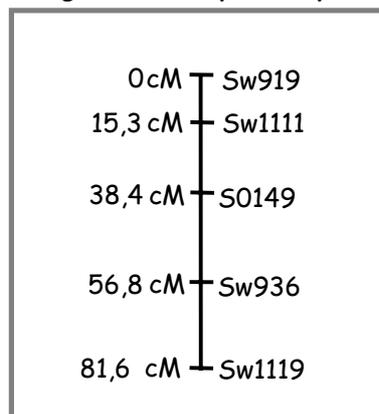
2. Localización genética

Para la localización genética del gen se utilizó el polimorfismo detectado en el exón 18. A través de la técnica PCR-RFLP se genotiparon los individuos procedentes del cruce Ibérico x Landrace, 31 F₀, 70 F₁ y 369 F₂.

La elevada informatividad de este marcador, ya que uno de los alelos está fijado en la población Landrace y el otro está a elevada frecuencia en la población analizada de cerdos de la raza Ibérica, permite trazar la segregación del gen durante la meiosis.

Esta información junto con la información disponible de otros marcadores de tipo microsatélite para el cruce Ibérico x Landrace en el cromosoma 15 (Figura 49), permitieron realizar un análisis de ligamiento, utilizando el programa informático CRIMAP, y generar un mapa genético con la localización del gen entre los marcadores.

Figura 49: Mapa de ligamiento disponible para el cromosoma SSC15

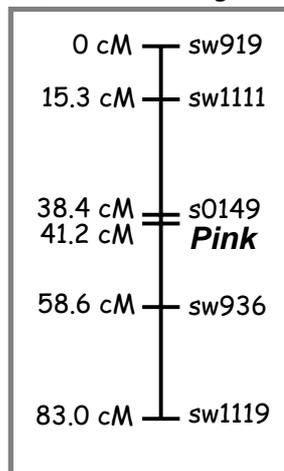


El mapa de ligamiento del cromosoma 15 obtenido para machos mostró un tamaño del cromosoma de 58.8 cM, localizando al gen *P* a 1.2 cM del marcador *s0149* y a 17.1 cM del marcador *sw936*, por otro lado, el mapa de ligamiento para

hembras mostró un tamaño del cromosoma de 108.5 cM, localizando al gen *P* a 3.4 cM del marcador *s0149* y a 18.4 cM del marcador *sw936* y el mapa de ligamiento promedio para ambos sexos (Figura 50) mostró un tamaño de cromosoma de 83.0 cM, localizando al gen *P* a 2.8 cM del marcador *s0149* y a 17.4 cM del marcador *sw936*.

Como resultado de este análisis se localizó al gen *P* en el cromosoma 15, ligado a los microsatélites *s0149* (Lod Score = 92.26) y *sw936* (Lod Score = 22.34).

Figura 50: Mapa genético promedio para ambos sexos del SSC15, localización genética del gen *P*

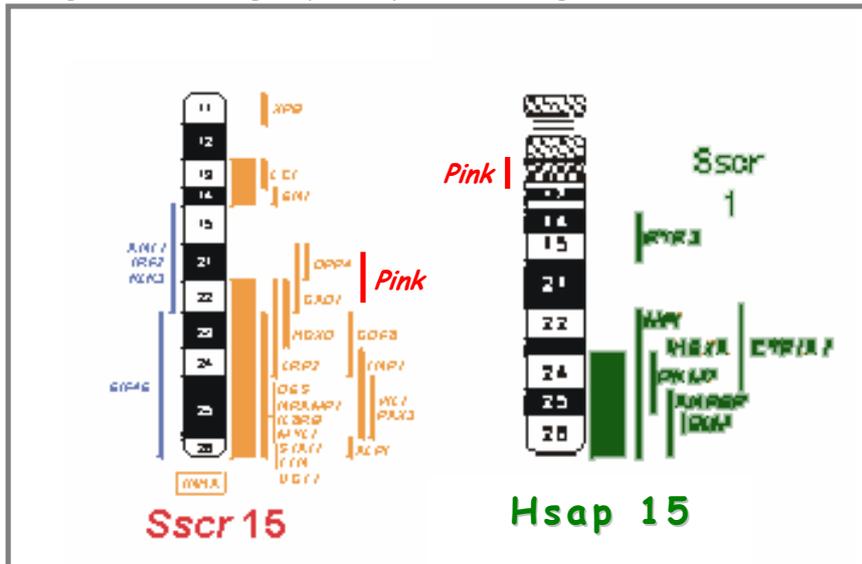


El polimorfismo localizado en posición 2040 del ADNc del gen fue utilizado para realizar la localización genética o de ligamiento ya que contenía una elevada informatividad en el cruce experimental Guadyerbass (portador de la mutación) x Landrace (sin mutación).

Los resultados obtenidos para la localización de este gen, tanto la localización física, como la localización genética, coinciden en que el gen *P* está situado en el brazo largo del cromosoma 15 (q21-q22).

Por ello, este resultado aporta nuevos datos relevantes para el mapeo comparativo de ambas especies ya que asigna una nueva región homóloga entre la especie humana (Hsap 15 q11.2-q12) y cerdo (Sscr 15 q21-22), donde previamente no se había establecido homología (Figura 53).

Figura 53: Mapa comparativo del cromosoma Hsap 15 con el cromosoma Sscr 15, estableciendo la nueva región de homología (por la presencia del gen *Pink*) entre humano y cerdo



IV. ANÁLISIS DE LOS
EFECTOS DE LOS
POLIMORFISMOS DE LOS
GENES *MC1R* Y *PINK* Y DE SU
INTERACCIÓN SOBRE EL
COLOR DE LA CAPA EN LA

ΣCHN - A-ZZ
// 0050R

IV. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *MC1R* Y *PINK* Y DE SU INTERACCIÓN SOBRE EL COLOR DE LA CAPA EN LA LÍNEA IBÉRICA TORBISCAL

ANTECEDENTES

Como se menciona anteriormente, las proteínas MC1R, Agouti y P forman parte del principal sistema regulador conocido de síntesis de pigmentos en mamíferos. En muchos casos los análisis fisiológicos sobre el papel de determinadas mutaciones en estos genes sobre la funcionalidad de la proteína son contradictorios, como es el caso del papel de la mutación Val92Met en el gen *MC1R* (Valverde et al., 1995; Flanagan et al., 2000; Box et al., 1997). Según Akey et al. (2001), estos resultados contradictorios podrían resolverse en el contexto de las interacciones gen a gen.

De hecho, interacciones entre los polimorfismos de los genes *MC1R* y *Pink* han sido asociados con determinados patrones de color de la piel en la especie humana (Akey et al., 2001). En el citado trabajo se detecta la asociación entre la interacción del polimorfismo localizado en la región no codificante del gen *Pink* (IVS13-15) y la mutación Val92Met en el gen *MC1R* con el color de la piel en humano, medida como un carácter cuantitativo a través de espectrometría de reflectancia en una población vietnamita.

1. Recogida de datos

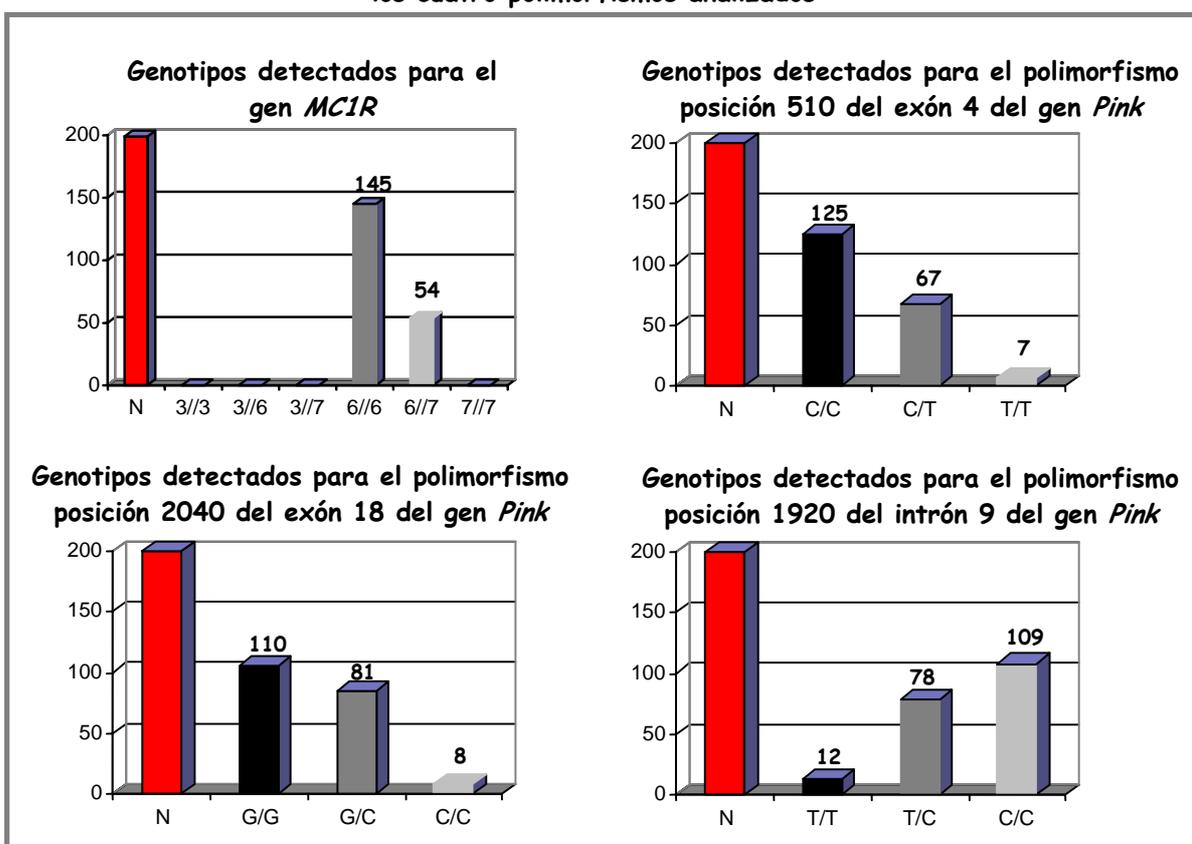
Se realizó un análisis para evaluar los posibles efectos de los polimorfismos de los genes *MC1R* y *Pink*, así como su interacción, sobre el color en la capa en una población de cerdos ibéricos con color de capa colorada. Ésta fue la línea Torbiscal, concretamente 49 reproductores de ambos sexos y 199 descendientes pertenecientes a 35 familias.

Para estos animales se genotiparon (en ADN genómico, a partir de muestras de sangre impregnadas en "FTA CARDS") los polimorfismos de los genes *MC1R*, *Agouti* y *Pink* que aparecían segregando a frecuencia intermedia en la línea Torbiscal. Estos polimorfismos fueron los alelos *MC1R**3, *MC1R**6 y *MC1R**7 del gen *MC1R* y los polimorfismos detectados en la posición 510 del exón 4, en la posición 2040 del exón

18 y en la posición 1920 del intrón 9 del gen *Pink*, según los métodos de genotipado descritos en los apartados anteriores.

En la figura 54 se muestran los resultados del genotipado de los cuatro polimorfismos analizados, donde se indica el número de animales detectado para cada genotipo en cada uno de los polimorfismos analizados.

Figura 54: Gráficas resultado del genotipado de los 199 animales de la línea Torbiscal para los cuatro polimorfismos analizados



Como se observa en la figura anterior, el alelo *MC1R**3 no ha sido detectado en esta población analizada de la línea Torbiscal, a pesar de que este alelo fue detectado en otro grupo de animales analizados anteriormente de la misma línea a una frecuencia de 0.1 (capítulo Análisis del gen *MC1R*). Por otro lado, se observa que para los cuatro polimorfismos analizados la frecuencia de uno de los genotipos homocigotos es baja, e incluso en algún caso no se detectan, como ocurre con el genotipo *MC1R**7/*MC1R**7.

Por otro lado, se tomaron las medidas, para los 199 descendientes, de color de la capa con un espectrocolorímetro.

Esta medida se basa en la espectrometría de reflectancia (Shriver et al., 2000), sistema utilizado por su similitud con la percepción visual (Commission International de L'Éclairage). Este sistema define tres colores primarios: rojo, verde y azul, a partir de los cuales se calculan matemáticamente las coordenadas de color del sistema Cie (Giesse, 1995), estas son: L (luminosidad), "a" (cantidad de rojo o verde) y "b" (cantidad de amarillo o azul).

La medida de "a" se encuentra relacionada con el contenido en pigmento (Johansson et al., 1991), la medida de "b" se encuentra relacionada con las diferentes formas de la mioglobina (Pérez-Álvarez et al., 1998) y la medida L se encuentra relacionada con la luminosidad. Por otro lado se realizó el cálculo de los parámetros h (Hue) y C (Croma), según las fórmulas:

$$h = \arctang(b/a) \times 57,59$$

Para pasar de radianes a grados

Valor que varía de 0 a 60
en la carne

$$C = ((a)^2 + (b)^2)^{0.5}$$

Valor que varía de 0 a 200
en la carne

El color de la capa fue determinado mediante un colorímetro Minolta (Chroma Meter CR 2000, Minolta Camera, Osaka, Japon). Para ello se utilizó un iluminante D65 que representa mejor la luz del día ya que incluye una parte del espectro en el próximo ultravioleta y el observador CIE 1964 que abarca un ángulo de visión de 10°. Previamente el aparato se calibró utilizando una placa de calibración para el color blanco.

Para realizar la toma de medidas se procedió al rapado de pelo con el fin de homogeneizar la medida y se tomaron las lecturas de los valores para a, b y L por duplicado (en el lado derecho e izquierdo detrás de la última costilla a 2 cm de la columna).

Los datos del genotipado y medidas de pigmentación fueron almacenados mediante la utilización del programa EXCEL (Office 2000), que también se utilizó para el cálculo de los parámetros h y C.

En la tabla 48 se muestran los valores de la media, desviación típica y rango de variación de los parámetros registrados del color de la capa en los 199 animales analizados.

Tabla 48: Características de las medidas tomadas o calculadas del color de la capa (N=199), medida por espectrometría de reflectancia

	Valor a	Valor b	Valor L	Valor h	Valor C
Media (DT)	7.056 (1.996)	8.842 (1.278)	53.771 (3.050)	49.721 (10.309)	9.737 (1.213)
Rango de variación	2.5 - 11.0	6.1- 12.4	44.6- 60.9	32.2- 79.6	6.8 - 15.6

Se ha establecido la correlación de estos parámetros de color con la apreciación visual (Carrasco et al., 2001), de forma que se ha encontrado una correlación negativa entre la apreciación visual de la intensidad de color y el parámetro instrumental L, mientras que la coordenada "a" se ha correlacionado positivamente. Por otro lado, Zhu y Brewer (1998) propusieron que los parámetros instrumentales que mejor definen la percepción visual son L y el balance entre rojo y amarillo.

El color resulta de la capacidad de reflexión de las diferentes radiaciones luminosas del espectro visible y sus atributos son (Albertí, 2001):

La claridad, es el atributo de la sensación visual por la que el área en que se presenta el estímulo parece emitir más o menos luz en proporción a la emitida por un área similar iluminada que se perciba como blanco, este atributo viene representado por el parámetro L.

El tono (Hue, h), es el atributo de la percepción del color indicado por azul, verde, amarillo, rojo, púrpura, etc. Según la CIE es el atributo de la sensación visual según el cual el estímulo aparece como uno de los colores percibidos rojo, amarillo, verde o azul o a ciertas proporciones de dos de ellos.

El Cromo (C), es el atributo de la sensación visual que permite valorar el color de un área que aparece más o menos coloreada, dando la sensación de colores vivos o apagados y se relaciona con la saturación del color.

De los parámetros medidos y calculados, el parámetro L es el que mayor correlación parece presentar con la apreciación visual (Carrasco et al., 2001). Por tanto y además por homología con el trabajo realizado en la especie humana (Akey et al., 2001), exclusivamente se ha considerado el parámetro L, que indica luminosidad o claridad, para realizar este análisis de asociación.

2. Análisis estadístico

2.1 Análisis de asociación de los polimorfismos considerados individualmente con el color

Los análisis de asociación de cada polimorfismo con la cantidad de color fueron realizados utilizando el programa informático SAS a través del procedimiento de mínimos cuadrados considerando como variables independientes el genotipo (tres niveles, ambos homocigotos y el heterocigoto), la familia (35 niveles) y el sexo (dos niveles).

Los resultados del análisis realizado para ver el efecto de los polimorfismos considerados individualmente sobre la intensidad de color aparecen representados en la tabla 49, donde se indican los valores del estadístico F y los valores de probabilidad asociada.

Tabla 49. Resultados del análisis de asociación de los polimorfismos de los genes *MC1R* y *Pink* y sobre el parámetro L

Gen	Polimorfismo	SNP	Frecuencias	F	Prob>F
<i>MC1R</i>	<i>MC1R</i> *6/7 (posición 1197)	G/A	0.865/0.135	0.04	0.852
	Posición 510 exón 4	C/T	0.825/0.175	1.13	0.325
<i>Pink</i>	Posición 2040 exón 18	G/C	0.775/0.225	3.05	0.051
	Posición 1920 intrón 9	T/C	0.209/0.791	3.20	0.043

Como se muestra en la tabla anterior, de los cuatro SNPs analizados el localizado en la posición 1920 del intrón 9 del gen *Pink* tiene un valor de $F = 3.20$ ($P = 0.043$), lo que indica que existe una asociación estadísticamente significativa con la intensidad de color medida a través del parámetro L, cuyos efectos estimados para los genotipos aparecen representados en la tabla 50. Además, el SNP localizado en la posición 2040 del exón 18 está próximo a la significación estadística ($F = 3.05$ y $P = 0.051$).

Tabla 50. Resultados del efecto estimado de cada uno de los genotipos del polimorfismo localizado en la posición 1920 del intrón 9 del gen *P* sobre el parámetro L

Genotipo	Efecto	Probabilidad
T/T	1.38 (1.03)	NS
T/C	2.08 (0.93)	0.027
C/C	0.00	

Los resultados que se muestran en la tabla anterior, indican que existe un efecto de dominancia del genotipo heterocigoto sobre ambos homocigotos, y este efecto es estadísticamente significativo con una probabilidad de 0.027.

2.1 Análisis de asociación de la interacción de los polimorfismos de los genes *MC1R* y *Pink* con el color

El test de asociación para dos loci fue realizado empleando el programa SAS por un método similar a un análisis factorial de la varianza de dos vías con un test para la detección de interacción. Considerando dos loci Q y q para un carácter, cada uno con dos alelos (ij y kl), denominados 1 y 2, las frecuencias alélicas de los loci Q y q son P_{Q1} , P_{Q2} , P_{q1} y P_{q2} , respectivamente, de manera que el valor del fenotipo puede expresarse como una función del valor genético aditivo y dominante de un locus sencillo mas el valor genético de la epistasia:

$$Y_{ijklmn} = \mu_0 + G_{ijkl} + \text{sex}_m + \text{fam}_n + \varepsilon_{ijklmn}$$

$$G_{1111} = a_Q + a_q + e_{AA}, G_{1112} = a_Q + d_q + e_{AD}$$

$$G_{1122} = a_Q - a_q - e_{AA}, G_{1211} = d_Q + a_q + e_{DA}$$

$$G_{1212} = d_Q + d_q + e_{DD}, G_{1222} = d_Q - a_q - e_{DA}$$

$$G_{2211} = -a_Q + a_q - e_{AA}, G_{2212} = -a_Q + d_q - e_{AD}$$

$$G_{2222} = -a_Q - a_q + e_{AA}$$

Siendo:

Y_{ijklmn} , el valor fenotípico para el individuo $ijklmn$.

sex_m , sexo (3 niveles).

fam_n , familia (35 niveles).

G_{ijkl} , el valor fenotípico medio para los individuos que tienen el genotipo Q_iQ_j y q_kq_l para los loci Q y q respectivamente.

ε_{ijklmn} , el error residual.

μ_0 , el valor genotípico medio.

a_Q, a_q, d_Q y d_q , los valores genotípicos aditivos y dominantes para los loci Q y q , respectivamente.

e_{AA}, e_{AD}, e_{DA} y e_{DD} , los cuatro valores genotípicos de la epistasia que son independientes: aditivo x aditivo, aditivo x dominante, dominante x aditivo y dominante x dominante.

El nivel de epistasia fue testado a través del cálculo del estadístico F:

$$F_{ep} = \frac{GL_F (S_R^2 - S_F^2)}{GL_F - GL_R \quad S_F^2}$$

GL_F , grados de libertad del modelo completo
 GL_R , grados de libertad del modelo reducido
 $GL_F = 158$
 $GL_F - GL_R = 2$
 (Cheverud & Routman; 1995)

Siendo S_F^2 y S_R^2
 las varianzas residuales estimadas a partir de los datos observados en el modelo completo y reducido (donde todos los valores genotípicos de la epistasia se asumen nulos)

Este modelo se aplicó a las tres posibles combinaciones de los polimorfismos correspondientes a los dos loci: el polimorfismo del gen *MC1R* combinado con los tres SNPs del locus *Pink*.

Los resultados de los análisis del efecto de la interacción de los polimorfismos detectados en los genes, *MC1R* y *Pink* sobre el color de la capa aparecen representados en la tabla 51, donde se indican los valores del estadístico F y su probabilidad asociada.

Tabla 51. Resultados del análisis de asociación de la interacción los polimorfismos de los genes *MC1R* y *Pink* sobre el parámetro L

<i>MC1R</i>	<i>Pink</i>	F _{EPISTASIA}	Prob>F _{EPISTASIA}
<i>MC1R</i> *6/ <i>MC1R</i> *7 (G/A)	Posición 510 exón 4 (C/T)	2.50	0.085
<i>MC1R</i> *6/ <i>MC1R</i> *7 (G/A)	Posición 2040 exón 18 (G/C)	2.01	0.137
<i>MC1R</i> *6/ <i>MC1R</i> *7 (G/A)	Posición 1920 intrón 9 (T/C)	1.61	0.203

Como se muestra en la tabla anterior, de las tres interacciones posibles entre los polimorfismos de ambos genes ninguna resulta estadísticamente significativa, sin embargo la interacción entre el polimorfismo del gen *MC1R* y la transversión C/T en posición 510 del exón 4 del gen *Pink* esta próxima a la significación estadística, con un valor de F de 2.50 (P = 0.085).

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el análisis de asociación de los polimorfismos de ambos genes considerados individualmente con la intensidad de color medida a través del parámetro L, permiten detectar una asociación estadísticamente significativa del polimorfismo localizado en la posición 1920 del intrón 9 del gen *Pink*. El efecto detectado de la mutación en el intrón 9 del gen *Pink* no tiene una interpretación clara ya que se encuentra en una región no codificante y por tanto no tiene una implicación directa en la proteína. Sin embargo, este tipo de cambios pueden estar implicados en alteraciones en el proceso de splicing (splicing alternativo), de manera que genere una proteína con alteraciones de algún dominio lo que provoque cambios en la estructura y funcionalidad de la proteína o alternativamente puede encontrarse en desequilibrio de ligamiento con una variante funcional sin identificar, una mutación localizada en alguna región del gen que no ha sido estudiada (regiones reguladoras). El efecto detectado consiste en la dominancia del heterocigoto sobre los genotipos

homocigotos, es decir que los individuos portadores de la mutación en heterocigosis tiene un valor de L superior que los homocigotos portadores de la mutación y no portadores y este valor de L es inverso a la intensidad de color, por tanto los individuos tanto homocigotos con la mutación como sin la mutación tienen mayor intensidad de color en la capa que los heterocigotos.

En general, las mutaciones detectadas y genotipadas para el gen *Pink* en porcino no se corresponden, ni son homólogas a las detectadas en la especie humana. Además las mutaciones entre las cuales se ha detectado un efecto de la interacción entre los genes *MC1R* y *Pink* con el color de la capa en la especie humana (Akey et al., 2001) también está implicado un polimorfismo localizado en un intrón, por tanto, el hecho de que se detecte asociación entre el polimorfismo del intrón 9 en cerdo con el parámetro L y no tratarse del mismo para el que se ha encontrado asociación en humano apoya el hecho de que este polimorfismo podría encontrarse en desequilibrio de ligamiento con la mutación causal localizada en una región reguladora, ya que la secuencia codificante, DNAC, ha sido analizado por completo en este trabajo y no se ha detectado la mutación causal.

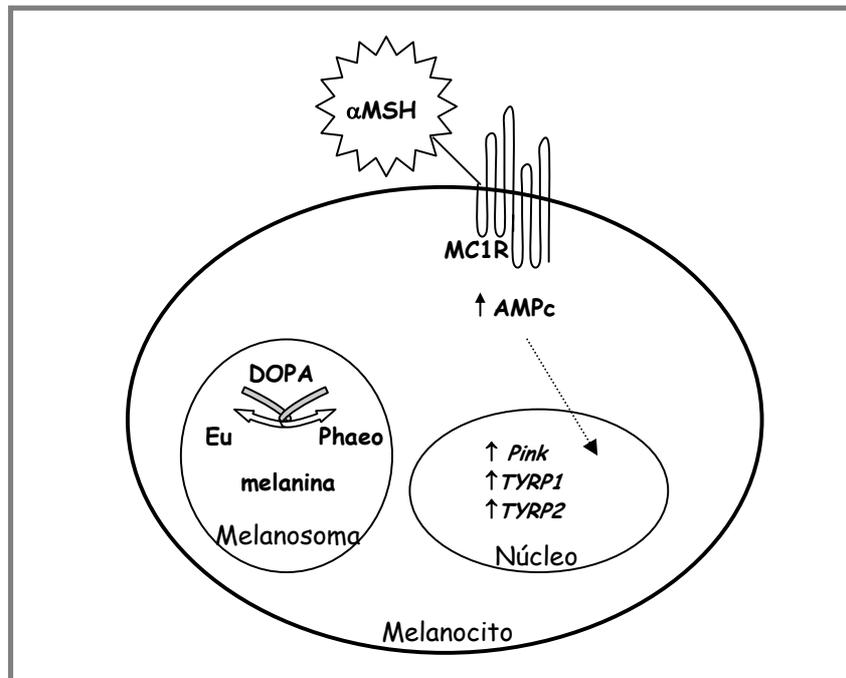
Por otro lado, se ha detectado una asociación entre el polimorfismo localizado en la posición 2040 del exón 18 del gen *Pink* con la intensidad de color medida a través del parámetro L próxima a la significación estadística. El posible efecto sobre la intensidad de color parece más claro, ya que esta mutación produce un cambio aminoacídico, una sustitución de Leucina por Valina, lo que podría repercutir en la estructura secundaria de la proteína y por tanto en su estructura terciaria y funcionalidad. Sin embargo, este efecto no aparece claro, quizá debido al reducido número de muestras con las que se contó para este análisis.

Al igual que ocurre con la asociación del polimorfismo anteriormente comentado, se ha detectado un efecto próximo a la significación estadística entre la interacción del polimorfismo del gen *MC1R* (*MC1R*6/MC1R*7*) y el polimorfismo localizado en posición 510 del exón 4 del gen *Pink* sobre la intensidad de color medida a través del parámetro L. Ambas mutaciones generan cambios en la secuencia aminoacídica de la proteína.

Los haplotipos *MC1R**6 y *MC1R**7 del gen *MC1R* se diferencian en una transversión G/A en la posición 1197 de la secuencia del gen, y aunque los productos resultantes de ambos haplotipos son proteínas no funcionales, el hecho de presentar esta mutación podría implicar algún cambio funcional, de hecho el portar esta mutación parece producir una activación constitutiva del receptor *MC1R* en el haplotipo silvestre (*MC1R**1). La transversión producida en la posición 510 del exón 4 del gen *Pink*, también genera un cambio aminoacídico de Arginina a Cisteína, cambio no conservativo ya que se trata de una sustitución de un aminoácido básico por uno polar, lo que podría generar un cambio en la estructura y alterar la funcionalidad de la proteína P.

Akey et al., (2001) proponen que la interacción de las proteínas *MC1R* y P, sintetizadas en los melanocitos, sea consecuencia del mecanismo de señalización intracelular, ya que aunque ambas proteínas no interaccionan físicamente, ambas están implicadas en el proceso de codificación de proteínas que participan en la señalización intracelular (Figura 55).

Figura 55: Esquema del proceso de biosíntesis de pigmentos, relación entre los genes *MC1R*-*Pink* (Akey et al., 2001)



Un aspecto a resaltar es el hecho de haber contado con un número reducido de muestras lo que ha determinado que no se detecten algunos haplotipos para el gen *MC1R* (alelo *MC1R*3*, que aparece segregando a frecuencia baja en la población Torbiscal), que no aparezcan determinados genotipos homocigotos (para el haplotipo *MC1R*7*) y que otros aparezcan a baja frecuencia, por lo que la interpretación de los resultados debe hacerse con precaución y se ha de verificar si estas asociaciones que están próximas a la significación estadística corresponden a efectos reales o son causa del azar. Esto se podría confirmar aumentando el número de muestras.

En vista a estos resultados, el tratar el carácter pigmentación como un carácter cuantitativo ofrece complejas relaciones entre el fenotipo y genotipo, y por ello debe contemplar las interacciones gen a gen y la epistasia.

V. APLICACIÓN DE LOS
GENES *MC1R* Y *PINK* A LA
VERIFICACIÓN DEL ORIGEN
RACIAL DE ANIMALES
IBÉRICOS Y SUS PRODUCTOS

ΣCHN Y A-ZZ // H-RKNA-J-ADA

V. APLICACIÓN DE LOS GENES *MC1R* Y *PINK* A LA VERIFICACIÓN DEL ORIGEN RACIAL DE ANIMALES IBÉRICOS Y SUS PRODUCTOS

ANTECEDENTES

Los polimorfismos detectados para los genes *MC1R*, *Agouti* y *Pink* fueron estudiados como posibles marcadores raciales para confirmar la veracidad de la raza ibérica tanto en animales vivos como en productos elaborados.

La probabilidad de fraudes e introgresión se presenta en la raza Ibérica, debido a sus especiales características fisiológicas y de producción, en relación a cruzamientos principalmente con la raza Duroc y razas procedentes del este de Europa, además de existir riesgo de introgresión de alelos de jabalí. Por ello se han seleccionado para esta aplicación aquellos polimorfismos que presentan distintos alelos para la raza ibérica y dichas razas.

Para el gen *MC1R* se detectaron dos polimorfismos candidatos a marcador racial para la raza Duroc, estos fueron el localizado en la posición 1556 (que constituye el haplotipo *MC1R*4*) y el localizado en la posición 668 (en la región no codificante del gen).

Ambos fueron confirmados en un alto número de animales, sin embargo, el emplear dos marcadores en un mismo gen (se heredaran ligados), no aportan mayor información, ya que ambos están fijados en la población Duroc, por lo que se escogió para su empleo como marcador racial de la raza Duroc frente a Ibérico, el localizado en la posición 1556 debido a su facilidad de genotipado, mediante PCR-RFLP.

En este mismo gen también se estableció el haplotipo *MC1R*1* como marcador racial para el jabalí (frecuencia de 0.903) frente a Ibérico, y se genotipó empleando la metodología de PCR-RFLP y análisis del tamaño de los fragmentos amplificados en un secuenciador automático (capítulo "I. Análisis del gen *MC1R*").

Para el gen *Agouti* no se detectó ningún polimorfismo candidato para ser utilizado como marcador racial.

Para el gen *Pink*, se analizaron varias posiciones polimórficas como candidatas a marcador racial para Duroc (posiciones 511 y 2462). De las posiciones analizadas,

el polimorfismo localizado en la posición 2462 del ADNc fue confirmado como marcador racial para esta raza frente a Ibérico a través del genotipado a gran escala empleando la metodología de PCR-RFLP y detectando esta mutación con una frecuencia de 0.755 en las poblaciones de la raza Duroc (capítulo "III. Análisis del gen *Pink*").

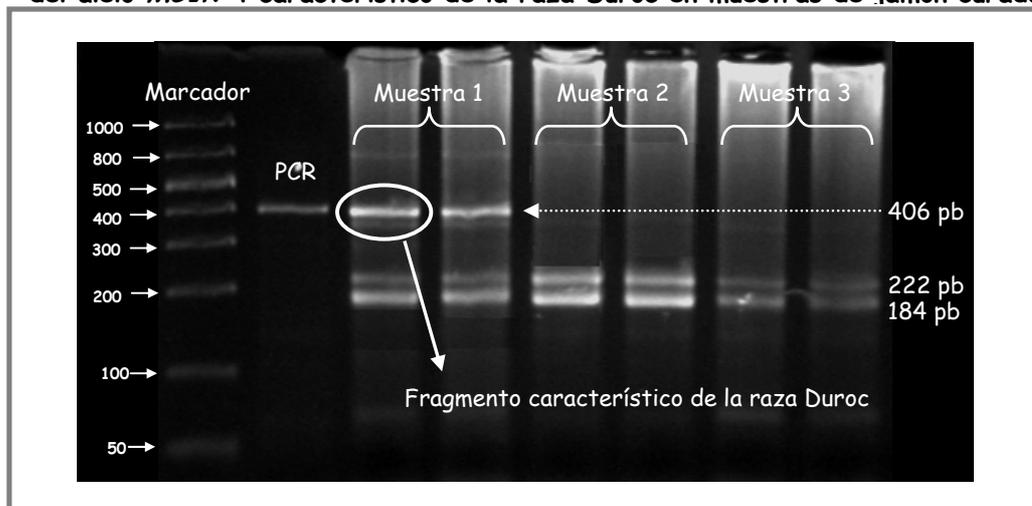
1. Genotipado de los marcadores en productos curados

Los polimorfismos de los genes *MC1R* (posición 1556) y *Pink* (posición 2462) candidatos a marcadores raciales para la raza Duroc fueron genotipados en ADN procedente de productos elaborados, concretamente correspondían a tres muestras de jamón curado.

Para ello se extrajo el ADN de los productos curados empleando el kit de extracción de ácidos nucleicos "PUREGENE: DNA Isolation Cell and Tissue" (GENTRA). Posteriormente se realizó el genotipado de ambos polimorfismos a través de PCR-RFLP (*BstU* I para el SNP en posición 1556 del gen *MC1R* y *Aci* I para el SNP en posición 2462 del gen *Pink*), como se menciona en los apartados anteriores.

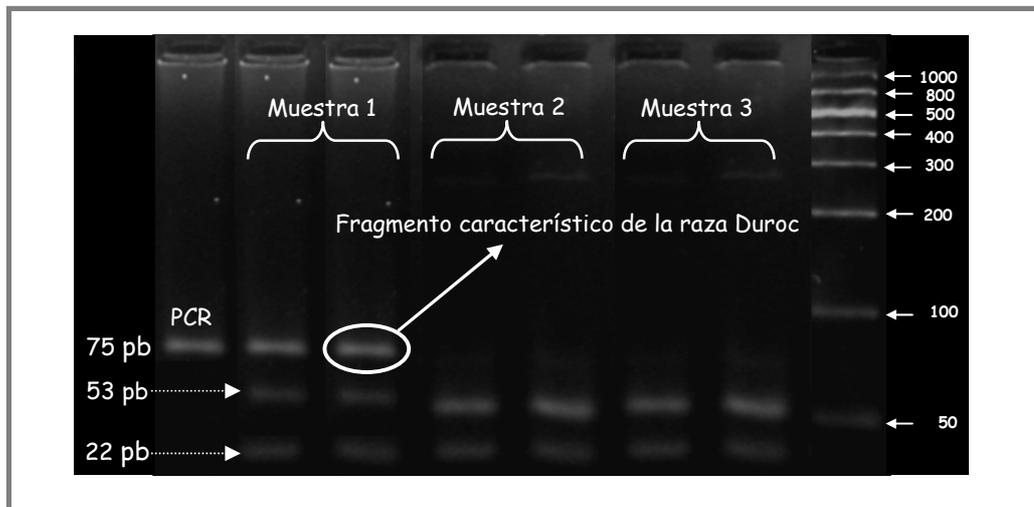
Para el polimorfismo del gen *MC1R* (posición 1556), los resultados que se obtuvieron de las 3 muestras de jamón analizadas confirmaron que, en uno de ellos se detectaba la presencia del SNP en posición 1556 que constituye el alelo *MC1R**4, característico de la raza Duroc, como se muestra en la figura 56.

Figura 56: Patrón electroforético del RFLP *BstU* I, utilizado para la discriminación del alelo *MC1R**4 característico de la raza Duroc en muestras de jamón curado



Para el polimorfismo localizado en la posición 2462 del gen ADNc del gen *Pink*, los resultados que se obtuvieron de las 3 muestras analizadas confirmaron que en la misma muestra en la que se detectó el alelo *MC1R**4 del gen *MC1R*, se detecta la presencia de la base mutada para la posición 2462, característica de la raza Duroc, como se muestra en la figura 57.

Figura 57: Patrón electroforético del RFLP *Aci* I, utilizado para la discriminación de la mutación en el gen *Pink* característica de la raza Duroc en muestras de jamón curado



Estos resultados indican que en esta muestra se detectan alelos pertenecientes a la raza Duroc y por tanto se puede confirmar que esta pieza no es de origen puro ibérico, sin embargo para las otras dos muestras analizadas, dado que para ninguno de los dos marcadores se ha detectado la presencia de alelos Duroc, no se puede descartar el origen ibérico de ambas piezas.

Por otro lado, se incorporaron a este estudio otro tipo de marcadores, 4 microsatélites (Figura 58) (sw413, alelo 157 pb; sw1057, alelo 187 pb; s0070, alelo 292 pb; sw24, alelo 102 pb) (Fabuel et al. Enviado) y 9 AFLPs (Figura 59) (Alves et al., 2002).

Figura 58: Electroferogramas de animales *Duroc* (D) e *Ibérico* (Ib) mostrando un marcador diagnóstico AFLP (M)

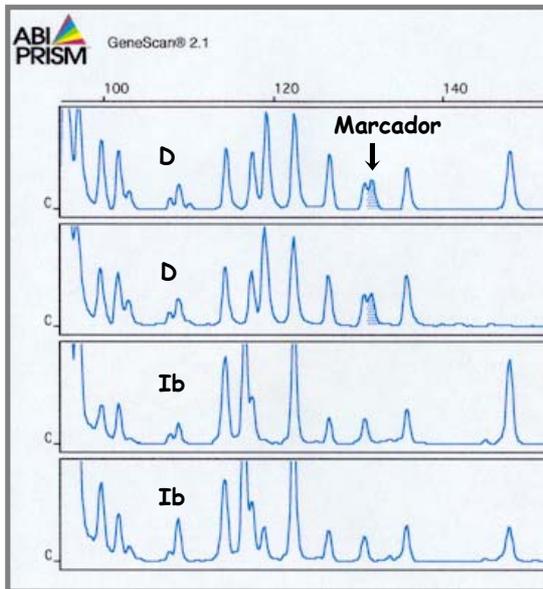
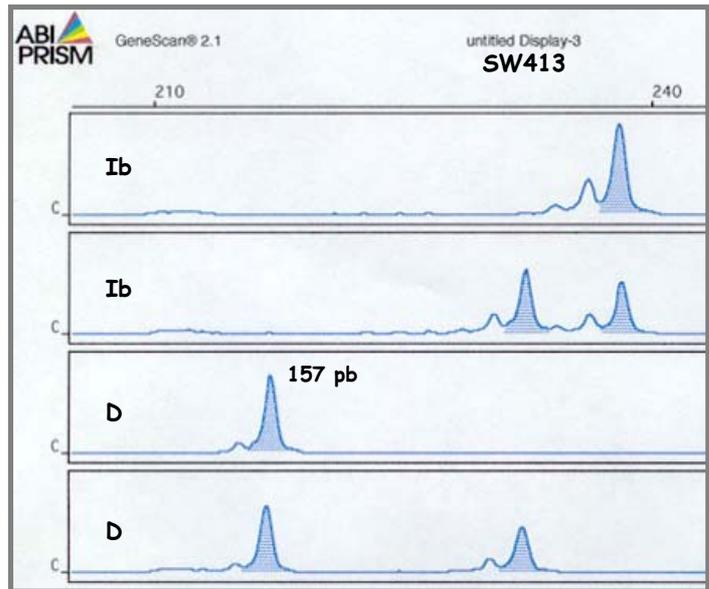


Figura 59: Electroferogramas de los genotipos de animales *Duroc* (D) e *Ibérico* (Ib) para el alelo marcador del microsatélite SW413.



2. Cálculo de la utilidad de un marcador racial

La utilidad de un marcador genético para la discriminación del origen racial puede medirse por la probabilidad de exclusión del origen ibérico (Alves et al., 2001), que es proporcional a la frecuencia alélica del marcador en la población intrusa (principalmente *Duroc*).

De esta forma se establece que la probabilidad de exclusión del origen ibérico es $P_E^{(i)} = 2kg_i$, siendo k la proporción de genes *Duroc* en animales cruzados, que suele tener valores de 1/2 o 1/4 (cruzados al 50% o 25%, respectivamente) y g_i la frecuencia alélica del marcador en la población *Duroc*.

Por otro lado, la probabilidad de aceptar por error una muestra como procedente de un animal ibérico puro siendo cruzado es $1 - P_E^{(i)}$, y con un número total de marcadores N , la probabilidad de error conjunta es $\prod_{i=1}^N (1 - P_E^{(i)})$.

Por tanto, la probabilidad conjunta de exclusión del origen ibérico es:

$$P_{EC} = 1 - \prod_{i=1}^N (1 - P_E^{(i)})$$

Se han calculado las probabilidades de exclusión independientes y conjunta del origen ibérico para los marcadores raciales de los genes del color *MC1R* y *Pink*, en animales vivos, carne o productos con un 25% o 50% de genes Duroc:

$$\begin{aligned} (25\%) P_E^{MC1R} &= 0.500 & (50\%) P_E^{MC1R} &= 1.000 \\ (25\%) P_E^{PINK} &= 0.376 & (50\%) P_E^{PINK} &= 0.755 \end{aligned}$$

Se han incorporado en el cálculo de la probabilidad de exclusión conjunta del origen ibérico los marcadores microsatélites y AFLPs. Las probabilidades de exclusión obtenidas con esta información quedan representadas en la tabla 52.

Tabla 52: Cálculo de la probabilidad de exclusión conjunta del origen ibérico puro utilizando diversos marcadores diagnóstico, para un número de muestras de 1, 2, 3, 4 y 5 de animales vivos o productos con un 25% o 50% de genes Duroc

Número de muestras analizadas Marcadores	25% genes Duroc				
	1	2	3	4	5
<i>MC1R</i> + <i>Pink</i>	0.693	0.906	0.971	0.991	0.998
<i>MC1R</i> + <i>Pink</i> + 4 μ satélites	0.854	0.979	0.997	0.999	1.000
<i>MC1R</i> + <i>Pink</i> + 9AFLP	0.933	0.996	0.999	1.000	1.000
<i>MC1R</i> + <i>Pink</i> + 4 μ satélites +9AFLP	0.968	0.999	1.000	1.000	1.000

Número de muestras analizadas Marcadores	50% genes Duroc				
	1	2	3	4	5
<i>MC1R</i> + <i>Pink</i>	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>MC1R</i> + <i>Pink</i> + 4 μ satélites	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>MC1R</i> + <i>Pink</i> + 9AFLP	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>MC1R</i> + <i>Pink</i> + 4 μ satélites +9AFLP	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Como se puede observar en la tabla anterior, a través del genotipado del gen *MC1R* en animales portadores con un 50% de genes Duroc se puede excluir del origen ibérico a partir de una sola muestra. Para animales portadores con un 25% de genes Duroc, el uso de los 9 AFLP, 4 microsatélites y ambos genes del color prácticamente permite la exclusión del origen ibérico a partir de una sola muestra (0.968).

Como se menciona anteriormente en el gen *MC1R* también se detectó un candidato a marcador racial para jabalí, éste fue el haplotipo *MC1R*1*. Este haplotipo no aparece fijado en jabalí pero si aparece a frecuencia elevada (0.903) y no se detectó en ningún animal ibérico, por lo que se calculó la probabilidad de exclusión del origen ibérico para animales portadores de un 50% y un 25% de genes de jabalí, a través del empleo de este marcador, aunque hay que corroborar estos datos debido al reducido número de muestras de jabalí genotipadas.

$$(25 \%) P_E^{MC1R} = 0.452 \quad (50\%) P_E^{MC1R} = 0.903$$

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Las técnicas basadas en el análisis del ADN más usadas para la identificación de especies y razas porcinas se basan en la amplificación de ADN repetitivo o en la amplificación aleatoria de regiones polimórficas desconocidas:

Los microsatélites son los marcadores genéticos hoy día más populares por su elevado polimorfismo y se utilizan frecuentemente para el diagnóstico de paternidad e identificación individual. Se ha propuesto su empleo para la asignación de muestras anónimas a poblaciones conocidas mediante el cálculo de la probabilidad de pertenencia a una población basado en las frecuencias alélicas de múltiples loci (Davies et al., 1999; Götz & Thaller, 1998). Trabajos realizados sobre este tema (Óvilo et al., 2000; Toro et al., 2000; Fabuel et al., Enviado), indican que son pocos los alelos de microsatélites específicos de raza y se encuentran a bajas frecuencias lo que reduce su potencial discriminante.

La técnica RAPD (Random Amplified Polymorphism ADN) es muy utilizada en la caracterización de variedades vegetales y aplicada con éxito en la identificación de

razas bovinas (Gwakisa et al., 1994). El principal problema de esta técnica es su baja repetibilidad, incompatible con un método de diagnóstico fiable y rápido.

La técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ha sido empleada con éxito en estudios genéticos de plantas y recientemente se ha extendido a animales como ratas (Otsen et al., 1996), ganado bovino (Ajmone-Marsan et al., 1997), gallinas (Herbergs et al., 1999) y cerdos (Óvilo et al., 2000; Alves et al., 2002).

En los últimos años ha aumentado en gran medida el conocimiento del genoma porcino de modo que el problema del origen racial puede abordarse con nuevos enfoques metodológicos basados en el análisis de la secuencia de ADN de genes caracterizados en porcino.

Entre otros, el análisis del ADN mitocondrial se ha utilizado extensamente como marcador genético en estudios de poblaciones y más recientemente en estudios de autenticación de la especie utilizada como materia prima tanto en productos pesqueros como cárnicos (Montiel-Sosa et al., 2000; Matsunaga et al., 1998). El ADN mitocondrial porcino consta de 16.6 Kb y se ha secuenciado en su totalidad (Lin et al., 1999). El análisis de mutaciones puntuales del gen del *citocromo b* y de la región *D-Loop* ha permitido identificar haplotipos característicos de razas de origen asiático y europeo, así como confirmar la introgresión vía hembras de algunas de estas razas (Alves et al., Enviado).

Por otro lado, los genes del color de la capa muestran un alto grado de polimorfismo responsable de las distintas variantes fenotípicas, que pueden ponerse de manifiesto mediante distintas técnicas de análisis molecular de fácil y rápido empleo. Dada la asociación entre el color de la capa y la formación de razas e incluso poblaciones porcinas, se considera que los polimorfismos presentes en los genes que controlan este carácter podrían ser buenos candidatos como marcadores diagnóstico raciales y poblacionales y por tanto, podrían servir como herramienta útil en problemas de determinación del origen racial e incluso poblacional que posibiliten la verificación del origen genético de animales y productos y en estudios de diversidad.

En este trabajo se muestra como determinados polimorfismos para los genes del color, que están fijados en razas porcinas (como es el caso del haplotipo *MC1R*4*

en Duroc), o están a elevadas frecuencias (como el polimorfismo en el gen *Pink* detectado en la raza Duroc (posición 2642 del ADNc), junto a otro tipo de marcadores, AFLP y microsatélites, permiten la exclusión del origen ibérico en un animal que porte un 25% de genes Duroc.

Además, se ha probado el genotipado de estos polimorfismos en productos elaborados, jamón curado, de forma que tanto el protocolo de extracción de ADN como el método de genotipado han resultado efectivos, aportando dos marcadores raciales como herramienta útil en problemas de identificación del origen racial, tanto para animales vivos como productos.

Para excluir el origen ibérico respecto a muestras portadoras de genes de jabalí no se cuenta con otros marcadores moleculares candidatos a marcadores raciales, y la información aportada por el polimorfismo del gen *MC1R* no es suficiente para excluir un animal como ibérico.

Respecto a la comparación del tipo de marcadores utilizados para este tipo de análisis se podría destacar que el uso de los marcadores de tipo PCR-RFLP frente a microsatélites y AFLPs resulta ventajoso desde el punto de vista del genotipado, tanto por su sencillez como por su bajo coste y requerimientos de equipamiento. La técnica de PCR-RFLP simplemente consiste en la amplificación por PCR del fragmento que contiene la posición polimórfica utilizando oligonucleótidos sin marcar, una posterior digestión con un enzima de restricción y visualización en geles de agarosa. La metodología de los AFLP requiere del empleo de varias enzimas de restricción, incorporación de adaptadores, ligamiento y amplificación por PCR y visualización en geles de poliacrilamida, más difíciles de manejo y mayor coste que los geles de agarosa, o bien la amplificación con oligonucleótidos marcados con un fluoróforo, más caros, y posterior procesamiento de las muestras en un equipo de electroforesis capilar, por tanto esta metodología resulta mucho más compleja que un PCR-RFLP. La metodología de los microsatélites es sencilla, ya que consiste en una amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos, pero su visualización es más compleja respecto a la técnica PCR-RFLP ya que requiere bien el empleo de geles de

poliacrilamida, o bien modificar los oligonucleótidos incorporando un marcaje fluorescente, lo que encarece la técnica, y disponer de un equipo de electroforesis capilar.

A pesar del bajo grado de polimorfismo que presenta generalmente un SNP (bialélico), la información que puede aportar este tipo de marcadores en estos análisis es importante, ya que con un solo SNP fijado en la población Duroc, (posición 1556 del gen *MC1R*), se puede excluir un animal del origen ibérico siendo portador del 50% de genes Duroc, mientras que con 9 AFLPs se consigue una probabilidad de exclusión de 0.968 (Alves et al. 2001). Por otro lado, para igualar o aumentar la probabilidad de exclusión obtenida con el empleo de 9 AFLPs aplicados a una sola muestra portadora de un 25% de genes Duroc (0.781), bastaría con emplear exclusivamente 3 SNPs fijados en la población intrusa (en este caso Duroc), consiguiendo una probabilidad de exclusión de 0.875. Sin embargo, no es fácil encontrar SNPs que estén por un lado presentes a elevada frecuencia en una de las poblaciones y totalmente ausentes en la otra, y aún más difícil es que estén fijados en la población intrusa, por lo que en este tipo de análisis parece mas apropiada la combinación del empleo de diferentes tipos de marcadores.

Sin embargo, el problema real que se suele plantear es una situación en la que en una partida de animales o productos se quiere confirmar o excluir el origen ibérico, por tanto el realizar el análisis en un número de muestras igual a dos, simplemente con el empleo del panel de 4 microsatélites y ambos genes (*MC1R* y *Pink*), se podría prácticamente excluir el origen ibérico en muestras portadoras de un 25% de genes Duroc (0.997), lo que evitaría el uso de marcadores de tipo AFLP que encarecería y haría más compleja la metodología. Y si se quiere confirmar o excluir el origen ibérico a partir de un lote de muestras superior a dos, bastaría con el empleo exclusivamente de los dos genes, *MC1R**1 y *Pink*, con una probabilidad de exclusión de 0.971 evitando el uso también de los microsatélites, lo que facilitaría el proceso de exclusión.

VI. APLICACIÓN DEL GEN
MC1R COMO MARCADOR
GENÉTICO PARA EL
MAPEO FINO DE QTL EN
EL CROMOSOMA 6
PORCINO

U
M
Z
M
C
H
R
/
/
Q
T
L

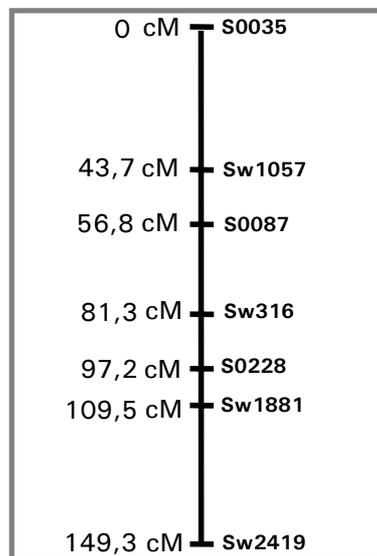
VI. APLICACIÓN DEL GEN *MC1R* COMO MARCADOR GENÉTICO PARA EL MAPEO FINO DEL QTL EN EL CROMOSOMA 6 PORCINO

ANTECEDENTES

En estudios previos (Óvilo et al., 2000; Clop et al., en prensa), se detectó la presencia de varios QTL en el cromosoma 6 para caracteres de crecimiento, engrasamiento y contenido de ácidos grasos en un cruce experimental F₂ de las razas Ibérico y Landrace, a partir de la información aportada por 7 microsatélites localizados en este cromosoma (Figura 60).

Por otro lado, el análisis del gen *MC1R* ha permitido detectar polimorfismos que hacen adecuado este locus como marcador, ya que esta localizado (Mariani et al., 1996) en un extremo del cromosoma 6, región donde existe una baja informatividad con los marcadores disponibles hasta el momento.

Figura 60: Mapa de ligamiento para el cromosoma SSC6, con 7 microsatélites



Para estudiar el interés de este gen como marcador genético en primer lugar se comprobó la localización genética o de ligamiento.

1. Localización genética del gen *MC1R*

Para realizar la localización genética de este gen se hizo uso de la información del genotipado de la inserción –CC- localizada en la posición 896 del gen, realizado mediante el análisis del tamaño de los fragmentos amplificados en un equipo de electroforesis capilar, en el material correspondiente al cruce experimental Ibérico x Landrace (31 F₀, 70 F₁, 369 F₂ y 87 F₃). Para este cruce se dispone de información del genotipado de 90 microsatélites repartidos a lo largo de los 18 autosomas, obtenido para la realización de un barrido genómico de baja densidad.

Los datos del genotipado del cruce fueron almacenados mediante la utilización del programa informático GEMMA.

La información obtenida del genotipado de éste marcador y del resto de marcadores de tipo microsatélite disponibles en este momento del cromosoma 6 (s0035, sw1329, sw1057, s0087, sw1376, sw316, sw71, s0228, DG32, sw1881, sw1328, sw2419 y sw607) se utilizó conjuntamente para generar un nuevo mapa de ligamiento para el cromosoma 6, para lo que se empleó el programa CRIMAP. De los 13 microsatélites citados 7 se habían genotipado previamente y otros 6 se han incorporado en el presente trabajo para aumentar la densidad de marcadores y la potencia del diseño para la detección de QTL.

La información de los microsatélites utilizados tanto para la generación de este nuevo mapa de ligamiento como para el análisis de detección de QTL aparece en la tabla 53, donde se indica el número de alelos para cada marcador así como la informatividad y la heterocigosidad de los mismos.

Tabla 53: Información de los marcadores utilizados para la construcción del mapa de ligamiento del cromosoma 6 en el cruce experimental Ibérico x Landrace

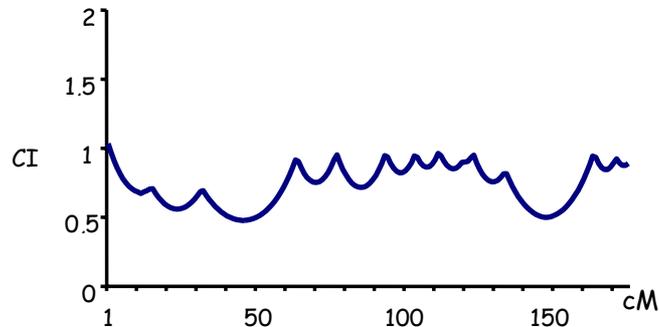
Marcador	Posición cM	Nº alelos	Ie	Heterocigosidad
MC1R	0	2	1	1.00
s0035	14.7	4	0.79	0.77
sw1329	31.6	5	0.89	0.86
sw1057	63.4	6	0.85	0.94
S0087	76.8	4	1	1
sw1376	93.4	6	1	1
sw316	103.4	7	0.85	0.84
sw71	111.3	5	0.87	0.79
S0228	119.3	5	0.6	0.51
D632	122.8	8	1	1
sw1881	133.6	9	0.75	0.83
sw1328	164.4	6	0.91	0.90
sw2419	171.8	8	0.92	0.93
sw607	176.5	5	0.74	0.80

La informatividad ha sido calculada a través del índice de informatividad de Ron (Ie) (Ron et al., 1995). $Ie = 1 - 1/2(P_i + P_j)$, donde P_i es la frecuencia del alelo A_i en la muestra de hembras Landrace y P_j es la frecuencia del alelo A_j en la muestra de hembras Landrace, aplicada a cada uno de los tres machos parentales. Como se observa en la tabla anterior para los marcadores utilizados la informatividad de los mismos en ningún caso es inferior a 0.6.

La heterocigosidad observada es la proporción de heterocigotos observada en una muestra de la población. La heterocigosidad para cada uno de los marcadores fue calculada, como el número de heterocigotos observado para cada marcador en la población F_1 del cruce, de manera que para ninguno de ellos la heterocigosidad observada fue inferior a 0.5.

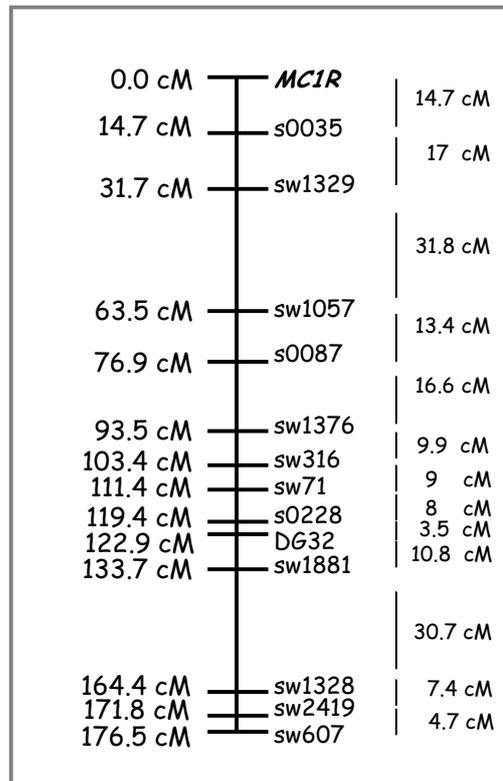
Por otro lado, como se observa en la tabla anterior, los marcadores utilizados se encuentran repartidos uniformemente a lo largo del cromosoma, a una distancia media de 13.6 cM. El contenido informativo en el cromosoma aparece representado en la figura 61, donde se observa que el contenido informativo a lo largo del cromosoma en ningún caso es inferior a 0.5.

Figura 61: Representación gráfica del contenido informativo aportado por los marcadores a lo largo del cromosoma 6 porcino



En el mapa genético resultante del análisis de ligamiento para hembras se obtuvo un tamaño para el cromosoma 6 de 204.5 cM y el gen *MC1R* quedó localizado a una distancia de 18.2 cM del marcador más próximo (*s0035*). Para machos el tamaño del cromosoma fue de 149.4 cM y el gen *MC1R* quedó localizado a una distancia de 10.3 cM del marcador *s0035*. Y para el promedio de ambos sexos el tamaño del cromosoma 6 fue de 176.5 cM, quedando el gen *MC1R* a 14.7 cM de *s0035*, este último es el mapa indicado en la figura 62.

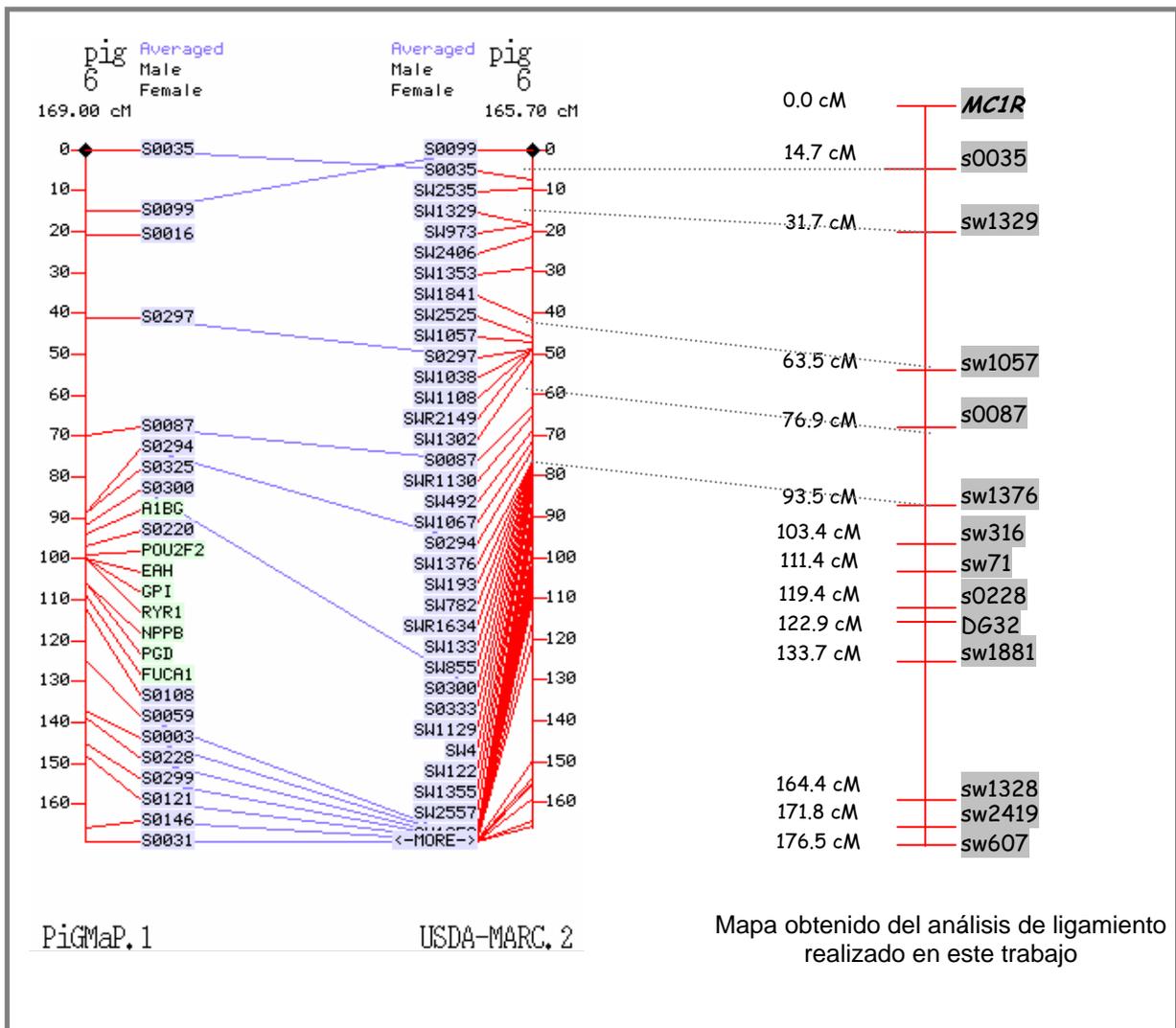
Figura 62: Nuevo mapa de ligamiento promedio de ambos sexos para el SSC6 incorporando el marcador *MC1R*



Los resultados de la localización genética del gen *MC1R* confirmaron, como se esperaba, que éste se localiza en el extremo del cromosoma 6, en una región en donde no se disponía de ningún otro marcador de tipo microsatélite, lo que permitió aumentar la informatividad de esta región.

Por otro lado, el orden obtenido de los marcadores en el cromosoma concuerda con los mapas de ligamiento disponibles (Figura 63) y accesibles a través de la red (PIGMAP, <http://iowa.thearkdb.org/browser?species=pig&objtype=map>; USDA MARC, <http://www.genome.iastate.edu/maps/marcmap.html>) y las distancias asignadas no difieren mucho de las asignadas en los mapas anteriormente mencionados.

Figura 63: Mapas de ligamiento para el cromosoma SSC6



2. Análisis de detección de QTL incorporando el locus *MC1R* como marcador

En este trabajo se han analizado los caracteres porcentaje de ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, área del lomo y porcentaje de grasa intramuscular. Estos caracteres fueron medidos en los animales F₂ a una edad promedio de sacrificio de 175 ± 0.3 días y con un peso a la canal de 74 ± 0.6 kg en nueve lotes distintos.

En la tabla 54 se representan los valores estadísticos de los caracteres analizados, media y desviación típica para los caracteres porcentaje de ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, área del lomo y porcentaje de grasa intramuscular.

Tabla 54: Registros fenotípicos de la F₂ para los caracteres analizados

Carácter	N	Media	σ
Ácido palmítico	369	21.03	1.42
Ácido palmitoleico	369	2.49	0.38
Ácido esteárico	369	10.93	1.30
Área lomo	448	33.97	5.08
% grasa intramuscular	449	1.51	0.56

El análisis se realizó incrementando la densidad de marcadores de tipo microsatélite e incluyendo el gen *MC1R* en el cromosoma 6 porcino.

2.1 Análisis de detección de QTL univariante

Para el análisis de detección de QTL se utilizó el programa informático "QTL Express", disponible en la red (<http://qtl.cap.ed.ac.uk/documentation/intro.html>).

El programa "QTL Express" es un programa basado en el análisis de regresión en poblaciones F₂ derivadas del cruce de dos líneas divergentes o de familias de medios hermanos y donde se asume que el QTL tiene alelos fijados alternativamente en cada una de las líneas parentales y los marcadores están segregando y presentan distintos niveles de informatividad.

Este método fue desarrollado por Haley y Knott en 1992 y modificado posteriormente por Haley et al. en 1994.

El modelo lineal usado para la regresión es:

$$y = \text{sexo} + \text{familia} + \text{covariable} + c_a a + c_d d + e$$

donde,

y : fenotipo

c_a : variable regresora del efecto aditivo, es la probabilidad (P(QQ)-P(qq))

c_d : variable regresora del efecto dominante, es la probabilidad (PQq)

a: efecto aditivo

d: desviación dominante

La familia y el sexo se incluyen como efectos fijos, en este caso hay 62 niveles para la familia y 2 niveles para el sexo. Se consideraron como covariables el espesor de la grasa dorsal para corregir el contenido en ácidos grasos y el peso de la canal para corregir el porcentaje de grasa intramuscular y área del lomo.

La regresión se realizó en cada cM, regresando los fenotipos a los coeficientes c_a y c_d . Para cada localización se calcula su valor de F, comparando el modelo donde existe un QTL con un modelo en el que no existe dicho QTL. Las estimas de a y d se calculan en la mejor posición estimada, con un valor del estadístico F mayor. La contribución del QTL a la fracción aditiva de la varianza fenotípica explicada por el modelo se calcula como $h^2 = a^2/2\sigma^2_y$.

Los niveles de significación genómica necesarios para la interpretación de los resultados se tomaron del trabajo de Clop et al. (en prensa), ya que los datos presentados corresponden aproximadamente a los mismos para los que se calcularon estos niveles, estos son de 8.53, 10.39 y 13.07 al 5%, 1% y 0.1%, respectivamente. Estos umbrales se calcularon mediante métodos de permutación (Churchill & Doerge, 1994), permutando durante 20000 tiempos por cada sexo y familia a lo largo de los 18 autosomas. El umbral cromosómico al 5% considerado fue de 5.20 (Óvilo et al., 2002).

Los resultados obtenidos del análisis de detección de QTL en el cromosoma 6, utilizando el programa "QTL Express" aparecen representados en la tabla 55 y la

representación gráfica de los mismos aparecen en la figura 64, donde se indican los valores que toma F a lo largo de la extensión del cromosoma para cada carácter.

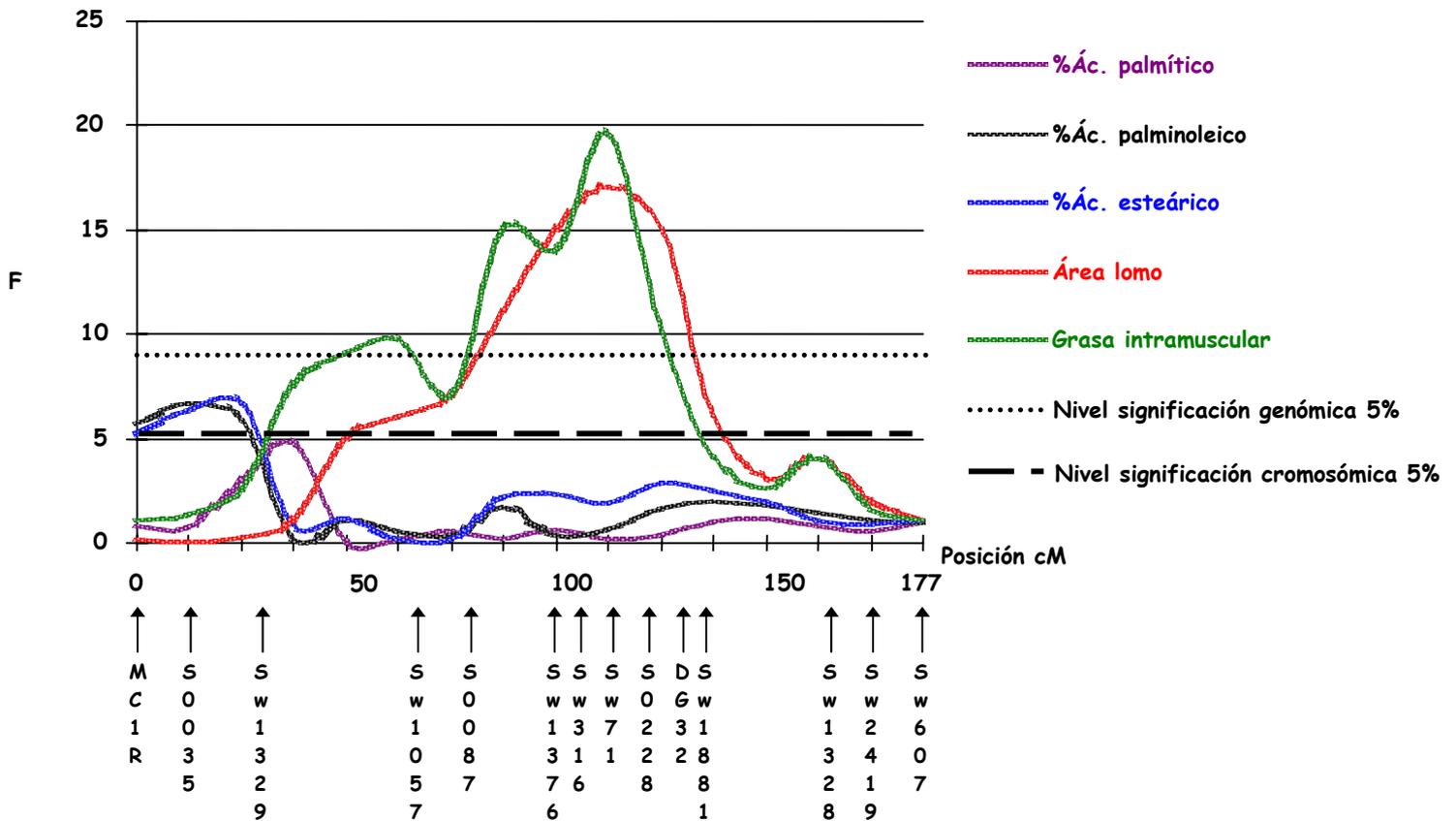
Tabla 55: Resultados del análisis de QTL, modelo univariante, en el cromosoma 6 porcino, para el cruce Ib x L

Carácter	Posición cM	F	a	s.e	d	s.e	h^2_{QTL}
*Ác. palmítico	55	4.62	0.176	0.117	0.489	0.184	0.008
*Ác. palmitoleico	9	6.57	-0.063	0.035	-0.160	0.053	0.014
*Ác. esteárico	20	6.73	0.156	0.104	0.548	0.167	0.007
**Área del lomo	137	16.69	-1.834	0.393	1.609	0.565	0.065
**Grasa intramuscular	131	18.97	0.285	0.051	-0.14	0.071	0.132

*corregido por espesor de grasa dorsal

** corregido por el peso de la canal

Figura 64: Representación gráfica de los valores de F para los cinco caracteres analizados a lo largo del cromosoma 6



Como se muestra en la tabla y gráfica anteriores se obtuvieron QTL estadísticamente significativos para el área del lomo y para el porcentaje de grasa intramuscular localizados a 131 y 137 cM. Sin embargo, no alcanzan la significación estadística a nivel genómico los QTL detectados para los caracteres porcentaje de ácido palmítico, palmitoleico y esteárico, pero el porcentaje de ácido palmitoleico y esteárico si superan el umbral cromosómico (5.20), y el palmítico esta próximo a éste.

Para los caracteres área del lomo y porcentaje de grasa intramuscular se detectó en un trabajo anterior (Óvilo et al., 2002), la existencia de un QTL con efectos pleiotrópicos para ambos caracteres, por lo que no se realizó el siguiente análisis de pleiotropía.

Sin embargo, dada la relativa proximidad de los valores máximos de F para los caracteres porcentaje de ácido palmítico, palmitoleico y esteárico obtenida en este análisis, se procedió a realizar un contraste para determinar la existencia de pleiotropía o ligamiento para los QTL detectados para estos caracteres.

2.2 Análisis de detección de QTL bivalente

Hasta el momento no se ha desarrollado un método que permita el análisis de pleiotropía para más de dos caracteres, de forma que se aplicó el método desarrollado por Knott y Haley (2000) de análisis de detección bivalente que es una extensión del análisis de regresión para la detección de QTL para caracteres sencillos (Haley et al. 1994).

El modelo en este caso es $Y = X\beta + E$, donde:

Y: matriz $n \times t$, siendo n el número de individuos F2 y t el número de caracteres

X: matriz $n \times p$, siendo n el número de individuos F2 y p el número de variables (niveles de los efectos fijos: sexo(2) y familias(68), y covariables: peso de la canal y 2 funciones de la probabilidad genotípica para estimar el efecto aditivo y dominante para las localizaciones consideradas).

β : matriz que contiene las estimas para cada carácter de los efectos fijos, covariables y efectos genotípicos.

E: matriz que contiene el error para cada carácter e individuo.

En este análisis se realizan tres contrastes para cada par de caracteres. I. Test para determinar la presencia de un QTL con efectos pleiotrópicos sobre los dos caracteres frente a la hipótesis nula de no existencia de QTL. II. Test para determinar la presencia de dos QTL ligados frente a la hipótesis nula de no QTL. III. Una comparación entre ambos modelos, un modelo en el que existen dos QTL ligados frente a la hipótesis nula de un QTL con efectos pleiotrópicos.

Para cada localización, estos estadísticos se distribuyen aproximadamente como una chi-cuadrado con cuatro grados de libertad para la hipótesis nula de que no exista un QTL, o con un grado de libertad para la hipótesis nula de un QTL con efectos pleiotrópicos.

Los límites de significación necesarios para discriminar los modelos de dos QTL ligados frente a un QTL con efectos pleiotrópicos fueron calculados utilizando el método "Bootstrap" no paramétrico (una simulación de 1000 réplicas) (Lebreton et al., 1998).

En la tabla 56 aparecen representados los resultados obtenidos del análisis realizado con el modelo de un QTL con efectos pleiotrópicos, dos QTL ligados y la comparación de un modelo en el que existen dos QTL ligados frente al modelo en el que existe un QTL con efectos pleiotrópicos para los caracteres porcentaje de ácido palmítico, ácido palmitoleico y ácido esteárico, analizados dos a dos.

Para el modelo de pleiotropía el test se calcula en la posición que explica la mayoría de la varianza para los dos caracteres analizados conjuntamente. Para el modelo de ligamiento el test se calcula para las mejores posiciones de cada uno de los dos caracteres por separado.

No se realizó el cálculo de los umbrales de significación para el valor del test estadístico para los modelos de pleiotropía y ligamiento ya que se considera que los valores obtenidos superan los umbrales esperados.

Tabla 56: Valores estadísticos de los modelos de análisis de QTL utilizando el modelo de pleiotropía (P), ligamiento (L) y L vs P de los caracteres porcentaje de ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1) y ácido esteárico (C18:0). Valores del test estadístico, estimas de los efectos aditivos y dominantes y posiciones.

Caracteres		Modelo	Valor	Carácter 1			Carácter 2		
1	2		Test	Posición	a(s.e.)	d(s.e.)	Posición	a(s.e.)	d(s.e.)
C16:0	C16:1	P	17.59	53	0.32(0.11)	-0.01(0.03)		0.59(0.19)	0.02(0.06)
		L	30.00	55	0.32(0.10)	-0.07(0.03)	10	0.55(0.16)	-0.13(0.05)
		L vs P	12.41						
C16:0	C18:0	P	18.49	51	0.32(0.11)	0.19(0.10)		0.61(0.20)	0.29(0.17)
		L	27.07	53	0.32(0.11)	0.23(0.10)	22	0.59(0.18)	0.45(0.16)
		L vs P	8.58						
C16:1	C18:0	P	14.30	12	-0.07(0.02)	-0.13(0.04)		0.17(0.07)	0.40(0.10)
		L	18.32	14	-0.07(0.02)	-0.13(0.04)	23	0.24(0.07)	0.45(0.12)
		L vs P	4.02						

En la tabla 57 aparecen representados los límites de significación obtenidos mediante el método "bootstrap" para los caracteres, analizados dos a dos. Estos umbrales son necesarios para la interpretación de los resultados obtenidos en el modelo de ligamiento frente a pleiotropía (L vs P).

Tabla 57: Valores de los límites de significación para cada pareja de caracteres, calculados mediante el método "bootstrap"

Límites de significación	al 99%	al 95%
C16:0 - C16:1	7.49	5.13
C16:0 - C18:0	9.60	6.59
C16:1 - C18:0	10.26	6.50

Según los resultados mostrados en la tabla anterior, para el par de caracteres ácido palmítico (C16:0) y ácido palmitoleico (C16:1) tanto el modelo de pleiotropía

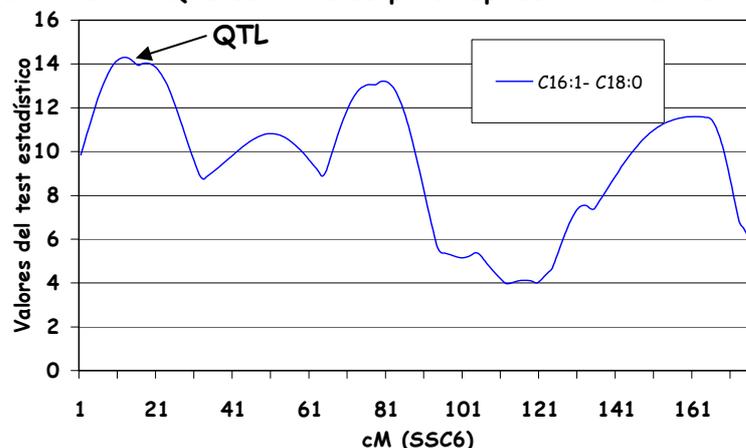
como el de ligamiento son significativos cuando se comparan con la hipótesis nula de no QTL, sin embargo, al comparar el modelo de dos QTL ligados frente a la hipótesis nula de un QTL con efectos pleiotrópicos, el valor del test estadístico es significativo (12.41) ya que supera el umbral de significación calculado tanto al 5% como al 1% (5.13 y 7.49, respectivamente), por tanto se puede rechazar la hipótesis nula de pleiotropía y se acepta el modelo de la existencia de dos QTL ligados, uno para cada carácter.

Asimismo, para el par de caracteres ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0) tanto el modelo de ligamiento como el de pleiotropía son significativos, y al comparar ambos modelos, al igual que en el análisis anterior, el valor del test estadístico también es significativo (8.58) al menos al nivel de significación del 5% (6.59), por tanto, se puede rechazar la hipótesis nula de pleiotropía y aceptar que se trata de dos QTL ligados, uno para cada carácter.

Sin embargo, para el par de caracteres ácido palmitoleico (C16:1) y ácido esteárico (C18:0) ambos modelos (P y L) también son significativos, pero en este caso el valor del test estadístico obtenido al comparar el modelo de ligamiento frente al de pleiotropía no es significativo (4.02) ya que es inferior al umbral de significación calculado para este par de caracteres al 5 % (6.50), por tanto no se puede rechazar la hipótesis nula de existencia de un QTL con efectos pleiotrópicos.

La figura 65, muestra los resultados gráficos de los valores estadísticos del QTL para ácido palmitoleico y ácido esteárico en el cromosoma 6 para el test del modelo pleiotrópico frente a la hipótesis de no QTL.

Figura 65: Representación gráfica de los valores estadísticos para los caracteres ácido palmitoleico y ácido esteárico a lo largo del cromosoma 6 para el test de QTL con efectos pleiotrópicos frente al modelo sin QTL



DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Como se muestra en los resultados del análisis de un solo QTL, se confirma la presencia de los QTL para el área del lomo y porcentaje de grasa intramuscular. En un trabajo anterior sobre este mismo material (Óvilo et al. 2000), se determinó la presencia de estos QTL quedando localizados a 113 cM para el área del lomo y a 97 cM para el porcentaje de grasa intramuscular, con valores de F de 13.26 y 15.03, respectivamente. En este trabajo, en el que se han incorporado más marcadores, se ha alargado el tamaño del cromosoma aumentando la informatividad y se obtienen unas posiciones para estos QTL de 131 cM para el área del lomo y 132 cM para el porcentaje de grasa intramuscular, con unos valores de F de 16.69 y 18.97, respectivamente. Es decir, que la incorporación de nuevos marcadores hace que aumente la potencia del test estadístico y que varíen un poco las posiciones donde se detectan estos QTL teniendo en cuenta que ha variado el tamaño del cromosoma. En un trabajo posterior (Óvilo et al., 2002) se confirma que estos dos QTL en realidad corresponden a un único QTL con efectos pleiotrópicos.

Por otro lado, los QTL sugestivos para el porcentaje de ácido palmítico, palmitoleico y esteárico detectados en un trabajo anterior en este mismo material (Clop et al., en prensa), quedaron localizados en dicho estudio a 44 cM para el ácido palmítico, 0 cM para el ácido palmitoleico y 13 cM para el ácido esteárico, con valores de F de 5.51, 6.41 y 7.33, respectivamente, superando todos el umbral de significación cromosómica al 5% (5.20), pero no el umbral genómico. En este trabajo al aumentar la densidad de los marcadores, se obtienen unas posiciones para estos QTL de 55 cM para el ácido palmítico, 9 cM para el ácido palmitoleico y 20 cM para el ácido esteárico, con valores de F de 4.62, 6.57 y 6.73, es decir, que las posiciones de los QTL han variado de acuerdo con el cambio de longitud del cromosoma considerado, pero los QTL siguen sin alcanzar el umbral de significación genómica, aunque tanto el ácido palmitoleico como el esteárico siguen superando el umbral de significación cromosómica al 5% y el palmítico esta próximo.

De manera que al aumentar la densidad de marcadores, principalmente la incorporación del gen *MC1R* en el extremo del cromosoma, permite mejorar la estima

de la posición de los posibles QTL, principalmente para el ácido palmitoleico, que previamente había sido localizado a 0 cM por la falta de cobertura cromosómica.

Sin embargo, dada la relativa proximidad de los QTL detectados para los caracteres ácido palmítico, palmitoleico y esteárico y la correlación existente entre estos caracteres, se podría sospechar de la existencia de un solo QTL con efectos pleiotrópicos, por lo que se realizó el test de pleiotropía para estos caracteres tomados de dos en dos, comparando el modelo en el que existen dos QTL ligados, frente al modelo en el que se supone un único QTL con efectos pleiotrópicos. Como resultado de estos análisis el modelo más verosímil, según nuestros datos es la existencia de dos QTL ligados, uno para el ácido palmítico, localizado a 53-55 cM confirmado en las dos comparaciones (ácido palmítico- ácido palmitoleico y ácido palmítico- ácido esteárico) y otro a 12 cM con efectos pleiotrópicos para los caracteres ácido palmitoleico y ácido esteárico.

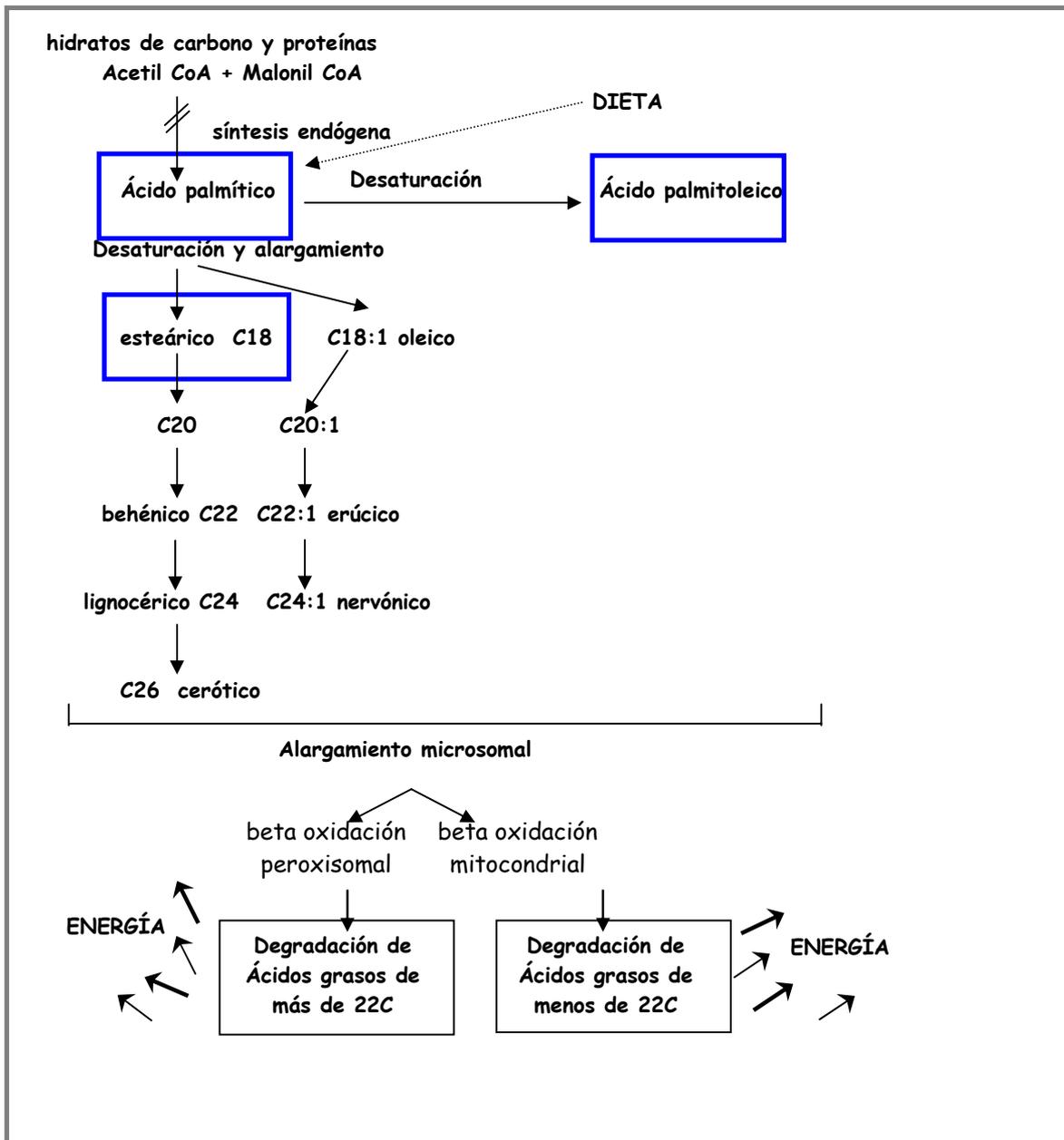
Los efectos aditivos obtenidos en el análisis (Tabla 56) concuerdan con las diferencias observadas entre las líneas parentales del cruce, ya que los alelos ibéricos producen un aumento de ácido palmítico y esteárico y una disminución de ácido palmitoleico (Serra et al., 1998).

Por tanto, el empleo de métodos de detección de QTL considerando pares de caracteres, es decir, contrastando la posibilidad de existencia de dos QTL ligados frente a la hipótesis nula de un QTL con efectos pleiotrópicos sobre dos caracteres, permite a partir de la misma información no sólo aumentar la precisión en la estima de la posición de estos QTL, sino también aumentar la potencia de detección (Knott & Haley, 2000). Esto queda reflejado en este análisis donde empleando el modelo en el que se considera un único QTL frente a la hipótesis de no QTL, principalmente en el caso del carácter ácido palmítico, el valor de F obtenido no supera el umbral de significación cromosómica al 5%, sin embargo al considerar la existencia de dos QTL ligados el valor del test estadístico alcanza la significación estadística, es decir permite detectar la presencia del QTL.

El hecho de detectar pleiotropía para los caracteres porcentaje de ácido palmitoleico y esteárico no es raro ya que en primer lugar aplicando el modelo de un QTL frente a ningún QTL, los QTL "sugestivos" resultantes quedan localizados en

posiciones relativamente próximas (9 y 20 cM), y por otro lado en el proceso de biosíntesis de estos ácidos grasos hay etapas comunes, como se muestra en la figura 66 y por tanto el gen responsable de este QTL puede ser un gen que codifique para alguna de las enzimas que participan en el proceso de elongación o desaturación común para ambos ácidos grasos.

Figura 66: Esquema de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos



Se han tratado de buscar posibles genes candidatos en esta ruta de síntesis y degradación de ácidos grasos que pudieran corresponder, por localización comparativa con la especie humana o por funcionalidad, a los genes responsables de estos QTL.

Existen múltiples genes descritos que participan en la ruta de síntesis y degradación de ácidos grasos, entre ellos el gen de la delta-9 -desaturasa (SCD), localizado en el cromosoma 10 (10q23-q24) en la especie humana, región que presenta homología con el cromosoma 14q porcino ; delta-6- desaturasa, localizada en el cromosoma 11 (11q11) en la especie humana, región que presenta homología con el cromosoma 2p porcino; gen de la proteína similar a la delta-4- desaturasa (HGNC), localizada en el cromosoma 14 (14q32.32) en la especie humana, región que presenta homología con el cromosoma 7q porcino; estero1-C5- desaturasa, localizada en el cromosoma 11 de la especie humana, cromosoma que presenta regiones homólogas con los cromosomas 2p y 9p porcinos; elongasa de ácidos grasos de cadena larga (LCE), localizada en la especie humana en el cromosoma 4 (4q25), región que presenta homología con el cromosoma 8 porcino; gen que codifica para una proteína similar a la elongasa de ácidos grasos-2, localizado en el cromosoma 13 de ratón, cromosoma que presenta regiones homólogas con los cromosomas 2, 7, 14, 16 y 18 de porcino; DEGS (degenerative spermatocyte homolog, desaturasa de lípidos), localizado en el cromosoma 1 (1q42.12) de humano, región que presenta homología con el cromosoma 6p porcino. Aunque ninguno de estos genes puede considerarse como candidato posicional, por mapeo comparativo, no se puede descartar la posibilidad de que alguno de ellos tenga efectos sobre los caracteres considerados.

DISCUSIÓN GENERAL

ZO'-N-N-D

MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado en este estudio ha correspondido principalmente a animales pertenecientes a la raza Ibérica, raza que ha permitido el estudio de la coloración de la capa por presentar una gran gama de tonalidades. Esta variedad en el color de la capa incluye desde el color negro hasta el colorado (con una gradación de intensidad o cantidad de pigmento –retinto, colorado y rubio-), a diferencia de las razas empleadas generalmente para estudios del color de la capa que muestran un único patrón para el color (Giuffra et al., 2000; Kijas et al., 1998, 2001; Marklund et al., 1998) y que en muchos casos se basan en el análisis de cruces experimentales entre razas que presentan colores de capa opuestos (negro-blanco, negro-colorado, colorado-blanco) (Giuffra et al., 1999; Marklund et al., 1998).

Asímismo, se ha dispuesto de poblaciones ibéricas puras (inscritas en el Libro Genealógico del cerdo Ibérico), lo que ha permitido una caracterización más precisa de los alelos que determinan el color de la capa, evitando el problema ocasionado por la introgresión de alelos procedentes de otras razas, ya que tradicionalmente se ha establecido la asociación de raza con un alelo para el color.

También se ha contado en este estudio con muestras de animales pertenecientes a otras razas, bien para ser tomadas como referencia, para confirmar la presencia en diversas razas de alelos descritos previamente (principalmente para el gen *MC1R*) y supuestamente asociados a sus patrones de color característicos, o bien como es el caso de la raza Duroc y del jabalí para confirmar que los polimorfismos de los genes analizados tenían valor como marcadores raciales.

Por último, se ha dispuesto de material procedente de un cruce experimental Ibérico x Landrace (Óvilo et al, 2000), que ha servido como herramienta para realizar análisis de ligamiento para la construcción de mapas genéticos, para la localización de nuevos genes y marcadores, y para la confirmación de la aplicación de estos genes como marcadores en el análisis de detección de QTL. Este tipo de estrategia se sigue de forma generalizada principalmente para la localización genética de genes no caracterizados en la especie objeto de estudio (Mariani et al., 1996).

INTERPRETACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES DEL COLOR

En este trabajo se han detectado distintos polimorfismos de tipo SNP e INDELS en los tres genes objeto de estudio relacionados potencialmente con la coloración de la capa y se ha realizado una aproximación a la interpretación de las mutaciones detectadas, empleando programas informáticos que permiten realizar una predicción de los dominios de la proteína y de sus estructuras secundarias a partir de los cambios aminoacídicos generados por las mutaciones en la secuencia de ADN o ADNc. De esta forma una mutación en el ADN que genera un cambio conservativo (aquel que no cambia el tipo de aminoácido) en la secuencia de aminoácidos es potencialmente menos importante que un cambio no conservativo (aquel en el que cambia el tipo de aminoácido). Igualmente un cambio aminoacídico que tiene como consecuencia un cambio en la estructura secundaria de la proteína potencialmente tiene mayor importancia por su posible repercusión en la estructura espacial de la misma y por tanto en su funcionalidad, que una sustitución aminoacídica que no genere ningún cambio en la estructura secundaria de la misma.

Sin embargo, los resultados obtenidos de la aplicación de los programas informáticos de predicción de estructuras secundarias no aportan información concluyente. Estos programas se basan en el uso de información procedente de secuencias homólogas y llevan asociada una probabilidad que en muchos casos no permite discriminar si es aceptable o no considerar que se produce un cambio. Sin embargo existen determinadas situaciones, como es el caso del cambio producido por la inserción –CC – en la posición 896 del gen *MC1R*, que produce un cambio en el marco de lectura de la secuencia y con ello una pérdida de dominios funcionales con lo que su estructura secundaria se ve claramente alterada. Por otro lado, los programas utilizados para la determinación de dominios a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína no permiten detectar más que cambios drásticos en los mismos, como por ejemplo la aparición o desaparición de dominios, de modo que salvo este tipo de mutaciones que producen cambios en el marco de lectura de la proteína o grandes inserciones/delecciones que provocan la desaparición de dominios funcionales, el resto de mutaciones no son evaluadas con este tipo de programas.

Aunque se ha tratado de dar una interpretación funcional a las mutaciones detectadas a través de análisis de asociación con los patrones de color y predicciones de dominios y estructuras secundarias, el establecimiento real del posible cambio funcional consecuencia de estas mutaciones sólo puede ser confirmado a través del estudio de las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas y estudios funcionales. Este tipo de análisis se realiza principalmente en especies modelo, humano y ratón, por lo que el estudio en porcino se realiza principalmente por comparación de los resultados obtenidos con estas especies.

Por ejemplo, la mutación detectada en el gen *MC1R* porcino que genera un cambio aminoacídico de Valina a Metionina en la posición 92 de la proteína, ha sido detectada igualmente en la especie humana sin atribuírsele ninguna implicación funcional, por lo que por homología se concluye que no existe asociación con patrones de color en cerdo (Kijas et al., 1998).

ANÁLISIS DE LOS GENES *MC1R*, *AGOUTI* Y *PINK*

El gen *MC1R* está implicado de forma muy directa en la generación de los patrones del color de la capa en porcino. Este trabajo ha permitido confirmar los haplotipos presentes en otras razas porcinas europeas, con resultados coincidentes con trabajos previos (Giuffra et al., 2000; Kijas et al., 1998; 2001), así como la identificación de tres nuevos haplotipos (*MC1R*7*, *MC1R*8* y *MC1R*9*). Por otro lado, se ha establecido la asociación de los distintos haplotipos para este gen con los patrones de color en cerdo ibérico, de forma que para las líneas y poblaciones ibéricas con color de capa negra queda fijado el haplotipo *MC1R*3*, mientras que para las poblaciones con capa colorada aparecen los haplotipos *MC1R*6* y 7. Un hecho que no queda aclarado es el que aparezcan individuos con color de capa colorada que presentan el alelo supuestamente dominante *MC1R*3* que determina el color negro. Explicaciones a este hecho podrían ser la existencia de loci modificadores que interviene de forma directa en el proceso de melanogénesis, o bien que no exista una dominancia completa del alelo *MC1R*3*, aunque parece claro (Silió, comunicación personal), que en el cruce de animales negros (ibéricos Guadyerbas) con colorados (ibéricos Torbiscales), siempre se obtienen animales con color de capa negro.

Para el gen *Agouti* no se ha detectado asociación de ningún polimorfismo con ningún patrón para el color, al igual que en trabajos anteriores, a pesar de que en especies como la humana y ratón se hayan detectado claras asociaciones con alteraciones en los patrones de color. Las mutaciones detectadas en este trabajo y en trabajos previos podrían estar implicadas en el otro papel funcional atribuido a esta proteína como consecuencia de su acción ectópica, y por otro lado, las mutaciones responsables de cambios en el patrón de color de la capa en este gen podrían corresponder a mutaciones reguladoras localizadas en regiones anteriores o posteriores al gen y que no han sido detectadas.

Para el gen *Pink*, no caracterizado previamente en la especie porcina, se ha obtenido su secuencia completa de ADN copia e intrón 9 y se ha realizado su localización. La localización del gen *P* en el cromosoma 15 porcino ha aportado nueva información al mapeo comparativo entre la especie humana y cerdo ya que en la región donde ha sido localizado el gen *P* no se había establecido previamente homología con ninguna región cromosómica en la especie humana. Por otro lado, del análisis de la secuencia nucleotídica del ADNc y del intrón 9 de este gen en distintas razas y poblaciones porcinas se han detectado 14 mutaciones puntuales, de las cuales ninguna se pudo asociar claramente con ninguno de los patrones de color característicos de las razas estudiados, ya que no aparecen fijados en ninguna población.

Sin embargo, a través del análisis de asociación de los polimorfismos que aparecen segregando en la línea Torbiscal y de sus interacciones con el color de la capa, se ha podido detectar un efecto estadísticamente significativo del polimorfismo localizado en la posición 1920 del intrón 9 del gen *P* sobre la intensidad de color medida a través del parámetro L. Aunque se trata de una mutación en una región no codificante podría bien tener alguna implicación durante el proceso de splicing, ya que esta localizada próxima al extremo 3' del intrón o bien estar en desequilibrio de ligamiento con la mutación causal no detectada. Además, se detectaron otros dos efectos próximos a la significación estadística, de un polimorfismo individual en el gen *P* y de la interacción de *MC1R* y *P* con la intensidad de color (valor L), con una explicación funcional más clara, ya que en este caso se trata de sustituciones que

producen cambios en la secuencia aminoacídica de la proteína lo que justificaría una implicación funcional. En cualquier caso sería necesario aumentar el número de muestras para confirmar la existencia de estos efectos o descartarlos de manera que los análisis estadísticos realizados fueran más equilibrados, ya que hay determinados alelos, genotipos y polimorfismos que no han sido detectados en las muestras genotipadas.

En resumen, el gen *MC1R* parece claro determinante del tipo de pigmento (rojo o negro) en cerdo. Para el gen *P* se ha identificado un efecto sobre la cantidad de color en animales de la línea Torbiscal, y posiblemente la interacción de ambos genes *MC1R* y *P* intervenga en el proceso de regulación de la cantidad y/o tipo de pigmento ya que las proteínas codificadas por ambos genes están implicados en el proceso de señalización intracelular necesario en el proceso de biosíntesis de pigmentos.

TRAZABILIDAD

Respecto al empleo de los polimorfismos en los genes del color como marcadores raciales útiles en estudios de trazabilidad, en este trabajo se han detectado dos marcadores raciales útiles para la detección de cruzamientos con la raza Duroc. Estos son un polimorfismo en el gen *MC1R* y otro en el gen *Pink*, que permiten junto con otros marcadores moleculares (AFLPs y microsátélites), la detección en una muestra portadora de un 25% de genes Duroc, la presencia de los mismos y por tanto su exclusión del origen ibérico. Además bastaría con el empleo de estos dos genes como marcadores raciales para Duroc en un lote de muestras superior a dos de animales portadores de un 25% de genes Duroc ,o carne o productos curados procedentes del mismo, para excluir este lote del origen ibérico. Esto se ha confirmado tanto para animales vivos, lo que ha permitido detectar la introgresión de genes pertenecientes a razas foráneas (principalmente Duroc), como en productos elaborados.

Conviene destacar que estos polimorfismos han permitido confirmar el origen heterogéneo de la población Manchado de Jabugo, población que en muchos casos se ha considerado ibérica. Sin embargo, para ambos polimorfismos de los genes *MC1R* y *Pink*, se detecta la presencia de alelos no característicos de la raza ibérica. Estos

alelos pueden proceder de Duroc, como es el caso claro del haplotipo *MC1R**4 fijado en esta población. Otra posibilidad es que estos alelos procedan en su origen de animales de la raza Berkshire, ya que se admite que en el origen de la población Manchado de Jabugo estuvieron implicados animales de la raza Large White y Berkshire, hecho reconocido por los responsables de su conservación y confirmado en un trabajo realizado sobre ADN mitocondrial (Alves et al., Enviado). Dentro de esta posibilidad podría estar el polimorfismo del gen *Pink*, ya que se desconoce el genotipo para este polimorfismo presente en la raza Berkshire, aunque dado el antecedente para el gen *MC1R*, se considera más probable la procedencia de este alelo de la raza Duroc.

Por otro lado, se ha establecido como marcador candidato para jabalí frente a ibérico el alelo *MC1R**1 del gen *MC1R*, que aunque no aparece fijado en la población de jabalíes (quizá por la introgresión de genes procedentes de cerdo doméstico) sí aparece a frecuencia elevada (0.903) y no ha sido detectado en cerdo ibérico. Aunque hay que tener en cuenta que se ha dispuesto de un número reducido de muestras, por lo que antes de establecer este haplotipo como marcador racial para jabalí sería conveniente su confirmación en un número mas elevado de muestras.

La ventaja del empleo de estos marcadores frente a otros tipos es fundamentalmente su fácil, rápido y económico genotipado, ya que se trata de una amplificación del fragmento polimórfico a través de PCR, su posterior digestión con un enzima de restricción y visualización en geles de agarosa.

GENES DE COLOR Y DETECCIÓN DE QTL

Se ha evaluado la utilización de los polimorfismos de estos genes analizados como marcadores genéticos para ser incorporados en los mapas de ligamiento, especialmente el gen *MC1R* por estar localizado en el extremo del cromosoma 6, en una región que hasta el momento era de baja informatividad ya que no se disponía de ningún marcador informativo en el extremo de este cromosoma para el cruce experimental Ibérico x Landrace.

La inserción –CC – localizada en la posición 896 del gen *MC1R* ha sido utilizada para el análisis de detección de QTL en el cruce experimental Ibérico x

Landrace, donde previamente se habían detectado QTL o QTL “sugestivos”. Este marcador junto con un aumento de densidad de los marcadores de tipo microsatélite, sirvió para confirmar y afinar la posición de los QTL para los caracteres área del lomo y porcentaje de grasa intramuscular además de aumentar la potencia de detección. Por otro lado, este aumento de densidad de marcadores en el cromosoma 6 porcino permitió aproximar las posiciones de los posibles QTL para ácido palmítico, palmitoleico y esteárico.

Sospechando de la existencia de QTL con efectos pleiotrópicos dada la proximidad de los QTL detectados y la relación fisiológica de los caracteres porcentaje de ácido palmítico, palmitoleico y esteárico se procedió a aplicar un test de detección de QTL bivalente, de forma que la explicación más verosímil, teniendo en cuenta los datos de que se dispone, era que esos tres QTL sugestivos que se obtenían del análisis de detección de QTL para un solo carácter podrían corresponder a dos QTL ligados, uno con efectos sobre el porcentaje de ácido palmítico y otro con efectos pleiotrópicos sobre los caracteres porcentaje de ácido palmitoleico y esteárico.

Este tipo de análisis ha sido realizado anteriormente en el mismo material, con una menor densidad de marcadores para el cromosoma 6, (Óvilo et al., 2002; Clop et al., Enviado), de manera que el realizar este análisis de detección de QTL, aumentando la informatividad a lo largo del cromosoma por la incorporación de nuevos marcadores, ha permitido confirmar determinados resultados con una mayor potencia estadística y obtener otros nuevos resultados. Por tanto, la incorporación de nuevos marcadores a los mapas de ligamiento permite afinar los análisis de detección de QTL lo que facilita la búsqueda de genes candidatos posicionales que lleven a la identificación de las mutaciones causales de las diferencias fenotípicas en estos caracteres.

PERSPECTIVAS

En vista de los resultados obtenidos en este trabajo y como continuación a éste, sería interesante realizar:

★ En primer lugar, aumentar el número de muestras empleadas para el análisis de asociación de los polimorfismos de los genes *MC1R* y *P* y de sus interacciones con los

patrones de color de capa colorada en la línea Torbiscal, lo que permitiría aclarar si esos indicios de asociación detectados en este trabajo son verdaderos o son efecto del azar.

★ Respecto al gen *MC1R* sería interesante confirmar la relación de dominancia existente entre los haplotipos *MC1R*3*, *MC1R*6* y *MC1R*7*. Una posible estrategia a seguir sería generar un cruce entre individuos heterocigotos para estos alelos y observar la segregación de color obtenida, lo que permitiría aclarar la existencia de loci modificadores y su interacción con el gen *MC1R*.

★ Por otro lado, aumentar el número de muestras de jabalí para establecer la frecuencia del haplotipo *MC1R*1* en esta población, permitiría plantearse el empleo del mismo como marcador racial de jabalí frente a ibérico en estudios de trazabilidad.

★ Respecto al gen *P* sería interesante analizar las regiones del gen que no han sido analizadas en este trabajo, regiones reguladoras y resto de intrones, ya que probablemente el SNP detectado en el intrón 9 del gen *P* responsable del efecto sobre la cantidad de color en la línea Torbiscal detectado en este trabajo se encuentre en desequilibrio de ligamiento con la mutación causal responsable de dicho efecto. Además se podría analizar si este efecto sobre la cantidad de color detectado en la línea ibérica Torbiscal también se detecta en animales pertenecientes a otras razas con color de capa colorada, como Duroc o Mangalitzza, comprobando primero la existencia de segregación de los polimorfismos en estas poblaciones.

★ Como muestran los resultados obtenidos de este trabajo, el color de la capa pese a ser un carácter de fácil apreciación, está sometido a un complejo sistema regulador en el que potencialmente deben de intervenir un elevado número de genes, por lo que se podría realizar el estudio de loci candidatos modificadores.

En general, se han descrito numerosos loci relacionados con el proceso de regulación de la síntesis y distribución de los pigmentos y melanocitos en mamíferos. A continuación se hace un resumen de aquellos que se consideran de especial interés en el determinismo del color y que han sido propuestos o caracterizados en diversas especies de mamíferos (humano, rata, ratón, caballo y perro) (Tabla 58).

Tabla 58: Genes propuestos y/o caracterizados para determinar el color de la piel

GEN	PROTEÍNA	FUNCIÓN	PORCINO
<i>Concentration (C/TYR)</i>	tirosinasa	cataliza el paso de tirosina a DOPA	Localizado 9 (p1.2-p1.4)
<i>Spotting (S/W)</i>	EDNRB	interviene en el proceso de distribución de los melanocitos	Localizado cromosoma 11
<i>Slaty (Stl)</i>	TRP2	participa en la estabilización de la tirosinasa	Localizado en el cromosoma 11
<i>Mahogany (Mg)</i>	Atractina	facilita las interacciones de las proteínas que intervienen en el proceso de melanogénesis	Localizado en el cromosoma 17
<i>Dilution (D)</i>	miosina V	transporte de melanina	No caracterizado
<i>Brown/black (B)</i>	Tryp1	ayuda a la estabilización de la tirosinasa	No caracterizado
<i>Mahoganoide (Md)</i>	Attractine	facilita las interacciones de las proteínas que intervienen en el proceso de melanogénesis	No caracterizada
<i>OA1 (Oa1)</i>	receptor-G	receptor de la proteína G	No caracterizada
<i>Underwhite (uw)</i>	MATP	facilita el transporte de la melanina	No caracterizado
<i>Ticking (T)</i>	--	interviene en la distribución de los melanocitos en áreas específicas	No caracterizado
<i>Silver (Si)</i>	silver	--	No caracterizado
<i>Super extension (SE)</i>	--	--	No caracterizado
<i>Brindle (K)</i>	--	--	No caracterizado
<i>Rufus (F)</i>	--	--	No caracterizado
<i>Graying (G)</i>	--	--	No caracterizado
<i>Merle (M)</i>	--	--	No caracterizado
<i>Roan (R)</i>	--	--	No caracterizado

La nomenclatura asignada a estos genes puede ser algo confusa, ya que el mismo gen descrito en varias especies, puede recibir en principio nombres distintos pero posteriormente se puede confirmar su equivalencia. A su vez, un locus identificado por primera vez a través de estudios de segregación es denominado por análisis de detección de QTL, por análisis de la secuencia génica o análisis funcionales con distinta nomenclatura cuando en realidad corresponde a un mismo gen. Así en la especie porcina se consideraba al locus *Extension* como el determinante del fenotipo predominantemente negro y en análisis moleculares se describió la existencia del gen *MC1R* como implicado en la ruta de biosíntesis de pigmentos, aunque posteriormente se confirmó que ambos son equivalentes (Kijas et al. 1998).

Varios de los genes mencionados en la tabla 54 pueden ser realmente alelos de un mismo gen, ya que en general el establecimiento de un nuevo locus se realiza por análisis de segregación de cruces entre animales que presentan fenotipos extremos para el carácter estudiado, bien sea el tipo de pigmento, la cantidad o la distribución del mismo. Así en porcino se consideraba un locus determinante del fenotipo cinchado (Locus *Belt*), sin embargo, en estudios posteriores se determinó que en realidad se trataba de un alelo del locus *KIT*, descrito previamente (Giuffra et al., 1999).

Entre los loci mencionados en la tabla anterior, podría resultar especialmente interesante en el material empleado en este trabajo:

★ El análisis de genes que codifican proteínas que intervienen de forma directa en la inhibición de la expresión del gen *Agouti*, estos son *Mahogany* y *Mahoganoide*, cuya función parece fundamental en el proceso de deposición del pigmento phaeomelanina (rojo) en humano y ratón (Edeal et al., 2000; Miller et al., 1997). Por tanto estos serían objeto de interés en el estudio de las líneas y poblaciones con color de capa colorada de la raza Ibérica.

★ Otro aspecto interesante de estudiar sería la interacción de los genes *MC1R* y *KIT*, propuesto por varios autores (Marklund et al., 1998; Giuffra et al., 1999; Pielberg et al., 2002), ya que la interacción de ambos parece determinar las variantes en la distribución del pigmento de la capa. Principalmente interesaría su estudio en los animales F₂ procedentes del cruce Ibérico x Landrace, ya que estos muestran una enorme variedad de distribución y tamaño de manchas blancas y negras.

★ Por otro lado, un estudio del análisis diferencial de expresión génica permitiría evaluar las diferencias de expresión provocadas por los polimorfismos detectados en los genes analizados, principalmente para aquellos en los que se ha detectado un efecto o indicio de efecto sobre la cantidad de color de la capa. Este tipo de estudios proporcionaría información acerca de la expresión del gen (inhibición parcial o total, o sobreexpresión) y además permitiría una búsqueda de posibles genes modificadores.

La evaluación de la expresión génica es un camino efectivo para identificar genes que estén implicados en la regulación de caracteres de importancia económica (Moody, 2001). En este sentido se han desarrollado numerosas metodologías que permiten el análisis de la expresión génica. Un resumen de los métodos más

extendidos incluiría: hibridación con un sustrato, método descrito por Sargent y Dawid (1983) que consiste en hibridar ARNm en exceso con librerías de ADNc (Northern blots); RT-PCR cuantitativa que permite la cuantificación de ARNm; "Differential Display" basado en el ARN "fingerprinting" (Liang y Pardee, 1992); Secuenciación de EST (Adams et al., 1991; Okubo et al., 1992), basada en el tiempo en que aparece una secuencia particular en una librería de EST de diferentes genes; Análisis seriado de la expresión génica "SAGE" (Velculescu et al., 1995), que esencialmente es una versión acelerada de la secuenciación de EST; Hibridación usando microarrays (Schena et al., 1995).

El determinar el tipo de metodologías a seguir para realizar un análisis de la expresión génica depende del objetivo a seguir, de manera que, en general metodologías del tipo "Differential Display" o microarrays, que permiten la búsqueda indiscriminada de genes con diferencias de expresión, son útiles por ejemplo en estudios de cambio de expresión génica en un tejido por el empleo de un inductor (Sayre et al., 2000; Green et al., 1996), cambios de expresión génica en un tejido en diferentes líneas o razas animales (Li et al., 1996; Janzen et al., 2000), o cambios de expresión génica en tejidos sanos y tumorales (Ahmed, 2002). Por otra parte el empleo de la metodología de RT-PCR cuantitativa aplicada a un gen permite evaluar las diferencias de expresión, a través de la cuantificación del ARNm, observadas en las variantes alélicas detectadas en este gen concreto, como en el trabajo realizado por Yamaguchi et al. (2002) donde estudian en la especie humana el efecto de un SNP en el gen *MYH* a través de la diferencia de expresión de su producto.

Por tanto, con el objetivo de evaluar la implicación de la mutación detectada en el intrón 9 del gen *P*, cuya interpretación sobre el efecto en la cantidad de color no parece clara, sería interesante realizar un análisis de expresión a través de la metodología de RT-PCR cuantitativa, de manera que permitiera determinar la cantidad de mensajero sintetizado en el tejido, en este caso piel, en aquellos individuos portadores de esta mutación comparado con individuos que no portan dicha mutación, lo que determinaría si esta mutación o una mutación en desequilibrio de ligamiento con ésta tiene realmente un efecto cuantitativo a nivel de transcripción del gen.

00Z075W-0Z00
00Z075W-0Z00

CONCLUSIONES

Como conclusiones del análisis realizado de los genes *MC1R*, *Agouti* y *Pink* en la especie porcina se destacan las siguientes:

 Para el gen *MC1R* se han detectado 18 polimorfismos que caracterizan ocho haplotipos distintos. Se han establecido claras asociaciones entre determinados mutaciones en el gen *MC1R* con determinados patrones del color, como se refleja en trabajos anteriores. Para la raza Ibérica, se ha establecido una clara asociación entre alelos para este gen y patrones de color, de forma que en los animales que presentan un patrón de color predominantemente negro aparece en homocigosis el alelo *MC1R**3, mientras que en animales con capa colorada se detectaron, en general, la presencia de los alelos *MC1R**6 y *MC1R**7. Sin embargo, aún no queda perfectamente esclarecida esta correlación por el hecho de detectarse animales que pese a tener un color de capa colorado presentan el alelo *MC1R**3, alelo determinante del color negro y supuestamente dominante, en heterocigosis. Este hecho sería un indicador de la complejidad del determinismo del color ya que implicaría la existencia de otros loci o genes modificadores. A su vez ha permitido detectar la introgresión en poblaciones de cerdos de la raza ibérica de alelos fijados para el gen *MC1R* en otras razas porcinas.

 Para el gen *Agouti* se han detectado dos polimorfismos, pero ninguno relacionado con los patrones de color existentes en la raza Ibérica, al igual que en trabajos anteriores en porcino, a pesar de que en otras especies de mamíferos (ratón y humano, principalmente), las mutaciones detectadas en regiones codificantes de este gen juegan un papel fundamental produciendo alteraciones en los patrones de color.

 El ADN copia del gen *Pink* ha sido caracterizado totalmente, al igual que su intrón 9, detectándose 14 polimorfismos de tipo SNP. Se ha establecido un efecto estadísticamente significativo entre el polimorfismo localizado en la posición 1920 del intrón 9 del gen con la intensidad de color en la línea ibérica Torbiscal medida a través del parámetro L. Además la localización del gen en el cromosoma 15 porcino (q21-q22) ha aportado nueva información para establecimiento de homología entre el cromosoma 15 humano y porcino.

 Se han detectado indicios de la existencia de efectos sobre la intensidad de color de la interacción de los genes *MC1R* y *Pink* en animales pertenecientes a la línea Torbiscal. Ambos genes codifican proteínas implicadas en la señalización intracelular del proceso de biosíntesis de pigmentos.

 El polimorfismo localizado en la posición 1554 del gen *MC1R* y el localizado en la posición 668 del gen *Pink*, quedan establecidos como marcadores diagnóstico que permiten, junto con la información aportada por otro tipo de marcadores, AFLP y microsatélites, detectar en una muestra portadora de un 25% de genes Duroc, en animales vivos o productos, la presencia de estos genes y por tanto excluir el origen ibérico. Además la información aportada exclusivamente por ambos genes permite, a partir de un lote de muestras superior a dos, excluir del origen ibérico a un individuo portador de un 25% genes Duroc o carne o producto elaborado de este mismo. La información aportada exclusivamente por el polimorfismo localizado en la posición 1554 del gen *MC1R* permite excluir del origen ibérico, a partir de una sola muestra, a un individuo portador de un 50% genes Duroc o carne o producto elaborado de este mismo.

 El alelo *MC1R**1 queda establecido como candidato a marcador racial para el jabalí ya que permite discriminar la presencia de alelos de jabalí dentro de las poblaciones de cerdo ibérico, aunque para su confirmación es necesario el análisis de un mayor número de muestras.

 La inserción localizada en la posición 896 de la secuencia nucleotídica del gen *MC1R* aportó un nuevo marcador molecular y permitió su incorporación en el mapa de ligamiento del cromosoma 6 disponible para el análisis de detección de QTL del cruce experimental Ibérico x Landrace. Esta información junto con la información aportada por otros microsatélites permitió alargar el tamaño del cromosoma y afinar y confirmar la presencia de los QTL detectados en trabajos anteriores en el cromosoma 6 para los caracteres área del lomo y porcentaje de grasa intramuscular, e incluso permitió, aplicando un modelo de detección de QTL para pares de caracteres, determinar la

existencia de dos QTL ligados, uno para el porcentaje de ácido palmítico y otro con efectos pleiotrópicos para los caracteres porcentaje de ácido palmitoleico y ácido esteárico.

RESUMEN

R
E
S
U
M
E
N

El objetivo planteado en este trabajo ha sido el análisis en la especie porcina de tres de los genes que codifican proteínas implicadas en el proceso de regulación de la melanogénesis en mamíferos, estos son *MC1R*, *Agouti* y *Pink*. El trabajo se ha centrado principalmente en la raza Ibérica, raza que presenta una gran diversidad de tonalidades representadas por sus diversas variedades (desde negro a rubio), además se han empleado muestras representativas de diversos orígenes de cerdos domésticos y jabalí.

El gen *MC1R* ya había sido estudiado en trabajos anteriores, detectándose la existencia de seis alelos. En este trabajo se ha analizado, a través de secuenciación del producto de amplificación, la totalidad del único exón (950 pb) del gen y parte de las regiones intrónicas adyacentes, en total se han secuenciado 1828 pb en 26 cerdos pertenecientes a las razas Duroc, Landrace, Meishan, Pampa, Mangalitza (colorado y golondrino), Vasco, Manchado de Jabugo, Ibérica (negra, colorada y entrepelada) y jabalí.

El resultado de este análisis ha permitido detectar 18 polimorfismos, 9 en la región codificante y otros 9 en la región no codificante del gen. La combinación de estos polimorfismos constituyen 8 haplotipos distintos, no se detecta la presencia del haplotipo *MC1R**5. Entre estos destaca la detección de tres nuevos haplotipos: *MC1R**7 constituido por la inserción de dos citosinas en la posición 896 del gen detectado en animales colorados de la raza Ibérica, *MC1R**8 constituido por la combinación del haplotipo *MC1R**6 junto a una delección en la región no codificante (posición 1797), detectado en animales con capa colorada de la raza Mangalitza y *MC1R**9 constituido por el alelo *MC1R**1 junto a una transversión en la región no codificante (posición 432) y detectado en animales con color de capa golondrina de la raza Mangalitza.

Respecto al análisis de la diversidad genética en las poblaciones de la raza Ibérica analizadas a través del genotipado a gran escala (metodologías de PCR-RFLP, PCR-SSCP y análisis del tamaño de los fragmentos amplificados), se ha detectado la presencia del haplotipo *MC1R**3 fijado en la población de cerdos con capa negra, de acuerdo con la funcionalidad atribuida a este haplotipo. Por otro lado, se ha detectado la presencia de los haplotipos *MC1R**6 y *MC1R**7 a elevada frecuencia en las

poblaciones con capa colorada (colorados y entrepelados) de acuerdo con la funcionalidad atribuida a estos haplotipos, sin embargo también se detecta la presencia del haplotipo *MC1R*3* a baja frecuencia y en heterocigosis en estas poblaciones, lo que no es compatible con la hipótesis tradicionalmente aceptada de dominancia completa.

Por otro lado, el genotipado de estas poblaciones permitió detectar la introgresión en dos poblaciones consideradas ibéricas de haplotipos detectados y fijados en otras razas porcinas, así en un población con color de capa negra se detectó la presencia del haplotipo *MC1R*2*, alelo procedente posiblemente de la raza de origen asiático Large Black. En la población Manchado de Jabugo, frecuentemente considerada ibérica, a pesar de contar con un número reducido de muestras, se detectó la presencia de cuatro haplotipos distintos, dando muestra de su heterogeneidad, entre estos alelos destacó la presencia del haplotipo *MC1R*4*, alelo fijado en la raza Duroc, lo que hace suponer que durante la recuperación de esta población intervino algún animal con ascendencia Duroc.

El gen *Agouti* ha sido objeto de estudios previos en diversas razas de cerdo detectándose la presencia de tres mutaciones, pero en ningún caso se ha podido establecer asociación con ningún patrón de color, a pesar de su importante papel en el proceso de melanogénesis. En este trabajo el gen se ha analizado a través de secuenciación directa del producto de amplificación de la secuencia completa de los cuatro exones que lo constituyen junto a las regiones intrónicas adyacentes, en total se han secuenciado 1537 pb en 7 poblaciones y razas porcinas.

El resultado de este análisis ha permitido detectar dos polimorfismos, una inserción en el intrón 1 y una transversión en el exon 3, sin embargo ninguno de estos polimorfismos ha podido asociarse con ninguno de los patrones de color analizados.

Hasta la realización del presente trabajo, el gen *Pink* no había sido caracterizado ni localizado en la especie porcina. El gen *Pink* tiene una estructura compleja, en la especie humana y ratón esta constituido por 25 exones, por lo que se ha realizado su análisis sobre ADN copia procedente de muestras de ARN de piel.

El análisis del mismo se ha realizado mediante secuenciación del ADNc a través del diseño de oligonucleótidos en las regiones mejor conservadas entre la especie

humana y ratón y empleando la metodología RACE para la caracterización de los extremos 5´ y 3´, lo que llevó a determinar la secuencia completa del ADNc y del intrón 9. Posteriormente se ha realizado su localización física, empleando un panel de células híbridas irradiadas, y genética o de ligamento a través de la construcción de un mapa de ligamiento, quedando localizado en el cromosoma 15 (q21-q22) y aportando nueva información al mapeo comparativo humano-cerdo.

En total se han caracterizado y analizado 3267 pb del ADNc y 2242 pb del intrón 9, detectándose 10 polimorfismos en el ADNc en 20 muestras de piel analizadas pertenecientes a las razas Landrace, Large White, Duroc, Vietnamita, Meishan e Ibérico (negro, rubio, colorado y entrepelado) y jabalí y 4 polimorfismos en el intrón 9 en 12 muestras analizadas pertenecientes a las razas Large White, Duroc, Ibérico (negro, rubio, colorado y entrepelado). De estos polimorfismos, los que presentaron interés bien por producir cambio aminoacídico y aparecer en muestras con un patrón de color concreto o bien por ser candidatos como marcadores raciales fueron genotipados en un mayor número de muestras (metodologías PCR-RFLP, PCR-SSCP, PCR alelo-específica). Del resultado del genotipado de estos polimorfismos no se pudo establecer una asociación directa con ningún patrón para el color, ya que ninguno de estos aparece fijado. Sin embargo, durante el genotipado de animales pertenecientes a poblaciones de la raza ibérica también se detectó la introgresión de genes pertenecientes a otras razas porcinas en las mismas poblaciones en las que se detectó introgresión para el gen *MC1R*.

Por otro lado, en la línea Ibérica Torbiscal se realizó un análisis de asociación de los polimorfismos detectados en los genes *MC1R* y *Pink* (*MC1R*: alelos *MC1R**3, *MC1R**6, *MC1R**7; *Pink*: posición 510 del exón 4, posición 2040 del exón 18 y posición 1920 del intrón 9), con la pigmentación de la piel medida mediante un espectrocolorímetro. En este análisis se detectó un efecto estadísticamente significativo entre el polimorfismo localizado en la posición 1920 del intrón 9 del gen *Pink* con la intensidad de color medida a través del parámetro L (luminosidad), y este efecto consiste en un aumento de la luminosidad por tanto una disminución en la cantidad de color en los individuos heterocigotos frente a ambos homocigotos.

Dado el antecedente en humano en el que se había detectado asociación de la interacción de dos polimorfismos en los genes *MC1R* y *Pink* con la pigmentación de la piel en una población humana vietnamita, se realizó un análisis de asociación de la interacción de los polimorfismos anteriormente mencionados en la población de cerdos ibéricos de la línea Torbiscal con el color de la capa, detectándose un efecto próximo a la significación estadística entre la interacción del polimorfismo del gen *MC1R* y el polimorfismo localizado en la posición 510 del exón 4 del gen *Pink* con la intensidad de color medida a través del parámetro L.

Como aplicación de los resultados del análisis de los polimorfismos de estos genes se planteó su empleo como marcadores raciales. Se ha comprobado su utilidad como marcadores raciales de Duroc frente a ibérico, por su facilidad de genotipado y elevada informatividad, el polimorfismo localizado en posición 1556 que constituye el haplotipo *MC1R**4 fijado en la raza Duroc y ausente en la raza Ibérica y el polimorfismo localizado en posición 2462 del gen *Pink* a frecuencia elevada en la raza Duroc (0.755) y ausente en la raza Ibérica. Además los protocolos de genotipado fueron verificados tanto en muestras de sangre como en productos curados. Por otro lado, se ha calculado que con la información aportada por estos polimorfismos junto con información disponible de otro tipo de marcadores (microsatélites y AFLPs) es posible la exclusión del origen ibérico de un animal de genotipo $\frac{1}{4}$ o $\frac{3}{4}$ Duroc, o de carne o productos elaborados con materia prima del mismo.

Un segundo ejemplo aplicado es el empleo del polimorfismo del gen *MC1R* (inserción -CC- en posición 896 del gen) como marcador genético en el extremo del mapa de ligamiento del cromosoma 6 en un cruce experimental Ibérico y Landrace. Lo que permitió, junto a la información procedente de la incorporación de un mayor número de microsatélites, confirmar la existencia de dos QTL detectados en trabajos previos para los caracteres área del lomo y porcentaje de grasa intramuscular, afinando las posiciones de los mismos y aumentando la potencia de detección. Por otro lado, para los caracteres porcentaje de ácido palmítico, palmitoleico y esteárico este mapeo de alta densidad permitió afinar las posiciones de los QTL sugestivos detectados en un trabajo anterior, principalmente para el ácido palmitoleico. En segundo lugar la aplicación de un modelo de análisis estadístico de detección de QTL

para pares de caracteres permitió concretar los efectos y posiciones de estos QTL, detectándose dos QTL ligados, uno con efecto sobre el porcentaje de ácido palmítico y otro con efectos pleiotrópicos sobre el porcentaje de ácido palmitoleico y esteárico.

M-17-05RAFiA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams M.D., Kelley J.M., Gocayne J.D., Dubnick M., Polymeropoulos M.H., Xiao H., Merril C.R., Wu A., Olde B. & Moreno R.F. (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequences tags and humane genome project. *Science* 252, 1651-1666.

Ahmed F.E. (2002). Molecular techniques for studying gene expression in carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health. Part. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Review* 20 (2), 77-116.

Ajmone-Marsan P., Velentini A., Cassandro M., Vecchiotti. Antaldi G., Bertoni G. & Kuiper M. (1997). AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle. *Anim. Genet.* 28, 418-426.

Akey J.M., Wang H., Xiong M., Wu H., Liu W., Shriver M.D. & Jin L. (2001). Interaction between the *melanocortin-1 receptor* and *P* genes contributes to inter-individual variation in skin pigmentation phenotypes in a Tibetan population. *Hum. Genet.* 108, 516-520.

Albertí P. (2001). Medición del color. En *Metodología para el estudio de la calidad de la canal y de la carne en rumiantes. Monografías INIA: Ganadera n.1*, 157-166.

Alves E., Fernández A., Barragán C., Castellanos C., Óvilo C., Rodríguez C. & Silió L. (2001). Verificación mediante marcadores genéticos del origen racial de cerdos y productos de tipo ibérico. *Sólo cerdo ibérico* 23-28.

Alves E., Castellanos C., Óvilo C., Silió L. & Rodríguez C. (2002). Differentiation of the raw of the Iberian pig meat industry based on the use of amplified fragment length polymorphism. *Meat Science* 61, 157-162.

Alves E., Óvilo C., Rodríguez M.C. & Silió L. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationship of Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. *Anim. Genet.* (Enviado)

Beermann F., Ruppert S., Hummler E., Bosch F.X., Muller G., Ruther U. & Schutz G. (1990). Rescue of albino phenotype by introduction of a functional *tyrosinase* gene into mice. *EMBO J.* 9, 2819-2826.

Bell J.A., Rinchik E.M., Raymond S., Suffolk R. & Jackson I.J. (1995). A high-resolution map of the brown (*b*, *Tryp1*) deletion complex of mouse chromosome 4. *Mamm. Genome.* 6, 389-395.

Bidanel J.P., Caritez J.C. & Legault C. (1989). Estimation of crossbreeding parameters between Large White and Meishan porcine breeds. I-Reproductive performance. *Genet. Sel. Evol.* 24, 507-526.

Boissy R.E., Oetting WS., Austin L.M., Wildenberg S.C., Boissy Y.L., Zhao Y., Sturm R.A., Hearing V.J., King R.A. & Nordlund J.J. (1996). Mutation in and lack of expression of *tyrosinase-related protein-1 (TRP-1)* in melanocytes from an individual with brown oculocutaneous albinism: a new subtype of albinism classified as OCA3. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 1145-1156.

Box N.F., Wyeth J.R., O'Gorman L.E., Mertin N.G. & Sturm R.A. (1997). Characterization of melanocortine stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1891-1897.

Box N.F., Wyeth J.R., Mayne C.J., O'Gorman L.E., Martin N.G. & Sturm R.A. (1998). Complete sequence and polymorphism study of the human *TYRP1* gene encoding tyrosinase-related protein 1. *Mamm. Genome.* 9, 50-53.

Brewer M.T., Lan H.Y. & Mc Keith F.K. (1998). Consumer evaluation of pork appearance with differing physiological and packaging conditions. *Journal of Muscle Foods* 9, 173-183.

Briggs H.M. & Briggs D.M. (1980). *Modern breeds of livestock*. Fourth Edition. Macmillan, New York.

Buckland R.A. (1985). Sequence and evolution of related bovine and caprine satellite DNAs. Identification of a short DNA sequence potentially involved in satellite DNA amplification. *Biochem. J.* 235, 879-882.

Bultman S.J., Michaud E.J. & Woychik R.P. (1992). Molecular characterization of the mouse *agouti* locus. *Cell* 71, 1195-1204.

Bultman S.J., Klebig M.L., Michaud E.J., Sweet H.O., Davisson M.T. & Woychik R.P. (1994). Molecular analysis of reverse mutations from nonagouti (a) to black-and-tan (a(t)) and white-bellied agouti (Aw) reveals alternative forms of agouti transcripts. *Genes Development* 8, 481-490.

Buntjer J.B., Lenstra J.A. & Haagsma N. (1995). Rapid species identification in meat by satellite DNA probes. *Z Lebensm Unters Forsch.* 201, 277-282.

Bushnell R.L. (1943). Linked color factors in Hampshire swine. Linkage of black and the basic white of the white belt pattern. *J. Hered.* 34, 303-306.

Carr-Saunders A.M. (1922). Note on inheritance in swine. *Science* 55, 19.

Carrasco J.A., Mingoarranz F.J., Ventanas J. & Cava R. (2001). Isotácticas sobre el color de lomos ibéricos curados.

Cheverud J.M. & Routman E.J. (1995). Epistasis and its contribution to genetic variance components. *Genetics* 139, 1455-1461.

Chowdhary B.P., de la Sena C.A. & Gustavsson I. (1994). In situ hybridization mapping in pigs: a summary of results from Uppsala. Proceedings of the 11th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals, Copenhagen. pp17-9.

Churchill G.A., Doerge R.W. (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138, 963-971.

Cionabu D.C., Day A.E., Nagy A., Wales R., Rothschild M.F. & Plastow G.S. (2001). Genetic variation in two conserved local Romanian pig breeds using type 1 DNA markers. *Genet. Sel. Evol.* 33(4), 417-432.

Clop A., Cercos A., Tomas A., Pérez-enciso M., Varona L., Noguera J.L., Sánchez A. & Amills M. (2002). Assignment of the *2,4-dienoyl-CoA reductase (DECR)* gene to porcine chromosome 4. *Anim. Genet.* 33(2), 164-165.

Clop A., Óvilo C., Pérez-Enciso M., Cercos A., Tomás A., Fernández A., Coll A., Folch J.M., Barragán C., Díaz I., Olivier M.A., Varona L., Silió L., Sánchez A. & Noguera J.L. Detection of QTL affecting fatty acid composition and metabolic ratios in an Iberian x Landrace F2 pig intercross. *Mamm. Genome.* (Enviado).

Clop A., Amills M., Fernández A., Capote J., Noguera J.L., Ramón C., Kelly L., Andersson L. & Sánchez A. Identification of cytochrome B haplotypes in six Spanish autochthonous and commercial pig breeds and inference of their Asiatic or European origin. *Genet. Sel. Evol.* (Enviado).

Clutton-Brock J. (1981). Pigs. In: domesticated animals from early times. (William Heineman ed). *British Museum Natural History*, pp. 71-77.

Collins D.W. & Jukes T.H. (1994). Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence. *Genomics* 20, 386-396.

Davies A.G., Villablanca F.X. & Roderik G.K. (1999). Determining the sources of individuals: multilocus genotyping in none equilibrium population genetics. *T. Ecol. Evol.* 14, 17-21.

Diéguez E. (2001). Base animal: pasado, presente y futuro. In: *Porcino ibérico, aspectos claves.* (Buxadé & Daza eds.). Mundi-Prensa. España pp. 49-82.

Edeal B., Rumph J.M., Mass R., Killinger K., Jerez N., Elnagar S., McDanel T., Aljumaah U., Pithpongsiriporn U., Nephawe K., Martinez G., Gladney C.D. Allan M.F. & Pomp D. (2000). Linkage mapping of the *Mahogany* (attractin) locus in cattle and pigs. *J. Anim. Sci.* 78, 2479-2480.

Everts R.E., Rothuizen J. & AvanOost B. (2000). Identification of a premature stop codon in the *melanocyte-stimulating hormone receptor* gene (*MC1R*) in Labrador and Golden retrievers with yellow coat color. *Anim. Genet.* 31, 193-199.

Fabuel E., Barragán C., Silió L., Rodríguez M.C. & Toro M.A. Análisis of genetics diversity and conservation priorities in Iberian pigs based on microsatellites markers. *J. Hered.* (Enviado).

Fan W., Boston B.A., Kesterson R.A., Hruby V.H. & Cone R.D. (1997). Role of melanocortigenic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385, 165.

Fan R. & Xiong M. (2002). High resolution mapping of quantitative trait loci by linkege disequilibrium analysis. *Eur. J. Hum.Genet.* 10(10), 607-615.

Flanagan N., Healy E., Ray A., Philips S., Todd C. Jackson I.J., Birch-Machin M.A. & Rees J.L. (2000). Pleiotropic effects of *the melanocortine 1 receptor (MC1R)* gene on human pigmentation. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2531-2537.

Forero F.J. (1999). Variedades y estirpes. En: Estudio comparativo de cinco estirpes de cerdo ibérico. (Ed. Diputación provincial de Huelva). España. pp45-48.

Giese J. (1995). Measuring physical properties of foods. *Food Technology* 49, 54-63.

Giuffra E., Evans G., Törnsten A., Wales R., Day A., Looft H., Plastow G & Andersson L. (1999). The *Belt* mutation in pigs in an allele at the dominant white (*/KIT*) locus. *Mamm. Genome* 10, 1132-1136.

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

Giuffra E., Törnsten A., Marklund S., Bongcam E., Chardon P., Kijas J.M.H., Anderson S.I., Archibald A.L. & Andersson L. (2002). A large duplication associated with dominant white color in pigs originated by homologous recombination between LINE elements flanking *KIT*. *Mamm. Genome* 13, 569-577.

Götz K.U. & Thaller G. (1998). Assignment of individuals to populations using microsatellites. *J. Anim.Breed. Genet.* 25, 89-94.

Green P., Falls K. & Crooks S. (1990). *CriMap*, Versión 2.4. Washintongton University School of Medicine, St Louis, MO.

Green M.L., Blaeser L.L., Simmen F.A. & Simmer R.C. (1996). Molecular cloning of spermidine/spermine N1-acetyltransferase from the periimplantation porcine uterus by messenger ribonucleic acid differential display: temporal and conceptus-modulated gene expression. *Endocrinology* 137, 5447-5455.

Grosz M.D. & MacNeil M.D. (1999). The "*spotted*" locus map to bovine chromosome 6 in a Hereford Cross population. *J.Hered.* 90, 233-236.

Gun T.M., Inui T., Kitada K., Ito S., Wakamatsu L., Boule D.M., Serikawa T. & Barsh G.S. (2001). Molecular and phenotype analysis of Attractin Mutant Mice. *Genetics* 158, 1683-1695.

Gustafsson A.C., Kijas J.M., Alberborn A., Uhlen M., Andersson L. & Lundeberg J. (2001). Screening and screening of single nucleotide polymorphisms in the pig melanocortin 1 receptor gene (MC1R) by pyrosequencing. *Anim. Biotech.* 12(2), 145-153.

Gwakisa P.S., Kemp S.J. & Teale A.J. (1994). Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. *Anim. Genet.* 25, 89-94.

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

Haley C.S., Knott S.A. & Elsen J.M. (1994). Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* 136, 1195-1207.

Herbergs J., Siwek M., Crooijmans R.P.M.A., van del Poel J.J. & Groenen M.A.M. (1999). Multicolor fluorescent detection and mapping of AFLP markers in chickens (*Gallus domesticus*). *Anim. Genet.* 30, 274-285.

Hetzer H.O. (1945) Inheritance of coat color in swine. III. Results of Landrace by Berksire crosses. *J. Hered.* 36, 255-256.

Hetzer H.O. (1945). Inherence of coat color in swine. I. General survey of major color variations in swine. *J. Hered.* 36, 121-128.

Hetzer H.O. (1945). Inheritance of coat color in swine. II. Results of Landrace by Poland China crosses. *J. Hered.* 36, 255-256.

Hetzer H.O. (1945). Inheritance of coat color in swine. IV. Analysis of hybrids of Landrace and large Black. *J. Hered.* 36, 309-312.

Hetzer H.O. (1946). Inheritance of coat color in swine. V. Results of Landrace by Duroc-Yersey crosses. *J. Hered.* 37, 217-224.

Hetzer H.O. (1947). Inheritance of coat color in swine. VI. Results of Yorkshire by Duroc-Yersey crosses. *J. Hered.* 38, 121-124.

Hetzer H.O. (1948). Inheritance of coat color in swine. Results of landrace by Hampshire crosses. *J. Hered.* 39, 123-128.

Hetzer H.O. (1948). Inheritance of coat color in swine. VII. Results of Landrace by Hampshire crosses. *J. Hered.* 39, 123-128.

Hetzer H.O. (1954). Effectiveness of selection for extension of black-spotting in Beltsville nº 1 swine. *J. Hered.* 45, 215-223.

Hirooka H., Koning D.J., van Arendonk J.A., Harlizius B., de Groot P.N. & Bovenhuis H. (2002). Genome scan reveals new coat color loci in exotic pig cross. *J. Hered.* 93, 1-8.

Hustad C.M., Perry W.L., Siracusa L.D., Raspberry C., Cobb L., Cattanach B.M., Kovatch R., Copeland N.G. & Jenkins N.A. (1995). Molecular genetics characterization of six recessive viable alleles of the mouse *agouti* locus. *Genetics* 140, 255-265.

Janzen M.A., Kuhlert D.L., Jungst S.B. & Louis C.F. (2000). ARPP-16 mRNA is up-regulated in the longissimus muscle of pigs possessing an elevated growth rate. *J. Anim. Sci.* 78, 231-236.

Johansson G., Tornberg E. & Lundström K. (1991). Meat colour in loin and ham muscles of normal meat quality from Hampshire, Swedish Landrace and Yorkshire pigs. En: Proc. Of the 37th ICoMST. September 1991. Kulmbach, Germany. pp 394-398.

Johansson M., Marklund L., Gustavsson U., Ringmar-Cederberg E., Andersson K., Edforde-Lilja I. & Andersson L. (1992). The gene for dominant white color in the pig is closely linked to ALB and PDGFRA on chromosome 8. *Genomics*. 14, 965-969.

Johansson M., Chaudhary R., Hellmén E., Hoyheim B., Chowdhary B. & Andersson L. (1996). Pigs with the dominant white coat color phenotype carry a duplication of the *KIT* gene encoding the mast/stem cell growth factor receptor. *Mamm. Genome*. 7, 822-830.

Juriloff D.M., Porter S.D. & Harris M.J. (1994). Three spontaneous mutations at the albino locus in SELH/Bc mice. *Genome*. 37, 190-197.

Kerr R., Stevens G., Manga P., Salm S., John P., Haw T. & Ramsay M. (2000). Identification of *P* gene mutations in individuals with oculocutaneous albinism in sub-Saharan Africa. *Hum. Mut.* 15, 166-172.

Kijas J.M.H., Moller M., Plastow G. & Andersson L. (2001). A frameshift mutation in *MC1R* and high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. *Genetics*. 158, 779-785.

Kijas J.M.H., Wales R., Törnsten A., Chardon P., Moller M. & Andersson L. (1998). Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pigs. *Genetics*. 150, 1177-1185.

Kim H., Schmidt C.J. Decker K.S. & Emara M.G. (2002). Chicken SNP discovery by ETS data mining. In: Plant, Animal & Microbe genomes X Conference, San Diego.

Kim K.S., Mendez A., Marklund S., Clutter A.C. & Pomp D. (2000). Linkage mapping of the porcine *Agouti* gene. *J. Anim. Sci.* 78, 1395-1396.

Klungland H., Vage H., Raya L.G., Adalsteinsson S. & Lien S. (1995) . The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Genome*. 6, 636-639.

Knott S.A., Marklund L., Haley C.S., Andersson K., Davies W., Ellegren H., Fredholm M., Hansson I., Haoyheim B., Lundström K., Moller M. & Andersson L. (1998). Multiple marker mapping of the quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and large white pigs. *Genetics* 121, 185-199.

Knott S.A. & Haley C.S. (2000). Multitrait squares for Quantitative trait loci detection. *Genetics* 159, 899-911.

Kobayashi T., Imokawa G., Bennett D.C. & Hearing N.J. (1998). Tyrosinase stabilization by Tryp1 (the *brown* locus protein). *J. Biol. Chem.* 273, 31801-31805.

Kosswig C. & Ossent H.P. (1931). Die Vererbung der Haarfarben beim Schwein. *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*. Abstamm – u. Vererbungslehre B. 22, 297-381.

Kosswig C. & Ossent H.P. (1932). Ein Beitrag zur Vererbung der Haarfarben beim Schwein. *Züchter* 4, 225-230.

Kosswig C. & Ossent H.P. (1934). Weitere Ergebnisse über die Vererbung der Haarfarben beim Schwein. Züchter 6, 306308.

Kronacher C. (1942). Vererbungversuche und Beobachtungen an Schweinen. Z. induktive Abstamm. -u. Vereblebre 34, 1-120.

Kuramoto T., Nomoto T., Sugimura T. & Ushijima T. (2001). Cloning of the rat *agouti* gene and identification of the rat *nonagouti* mutation. Mamm. Genome 12 (6), 469-471.

Kwon H.Y., Bultman S.J., Loffer C., Che W.J., Powell J.G., Usala J.G., Wilkison W., Hansmann I. & Woychik R.P.(1994). Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the *agouti* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 914, 9760-9764.

Laguna E. (1998). El cerdo ibérico. Mundi-Prensa. España.

Lamoreaux M.L., Zhou B.K., Rosemblat S. & Orlow S.J. (1995). The pinkeyed-dilution protein and the eumelanin/phaeomelanin switch: in support of a unifying hypothesis. Pigment Cell Res. 8, 263-270.

Lauvergne J.J. & Capote I. (1979). Etude de quelques variants colorés du porc Créole de la Guadeloupe. Annales de Genetique et de Sélection Animale. 11, 381-390.

Lebreton C.H., Visscher P.M., Haley C.S., Semikhodskn A. & Quarrie S.A. (1998). A nonparametric bootstrap method for testing close linkage vs pleiotropy of coincident quantitative trait loci. Genetics 150 (2), 931-943.

Lee S.T. Nicholls R.D., Jong M.T. Fukai K. & Spritz R.A. (1995). Organization and sequence of the human *P* gene and identification of a new family of transport proteins. Genomics. 20, 354-363.

Leeb T., Deppe A., Kriegesmann B. & Brenig B. (2000). Genomic structure and nucleotide polymorphisms of the porcine agouti signalling protein gene (*ASIP*). *Anim. Genet.* 31, 333-346.

Legault C. (1998). Genetics of Colour Variation. En: *The Genetics of the Pig*. (Eds. Rothschild M.F. & Ruvinsky A.). CAB INTERNATIONAL Publishing, Wallingford, United Kingdom. pp51-69.

Lemus-Flores C., Ulloa-Arvizu R., Ramos-Kuri M., Estrada F.J. & Alonso R.A. (2001). Genetics análisis of Mexican hairless pig populations. *J. Anim. Sci.* 79, 3021-3026.

Li M.D., Matteri R.L., Macdonal G.J., Wise T.H. & Ford J.J. (1996). Overexpression of beta-subunit of thyroid-stimulating hormone in Meishan swine identified by differential display. *J. Anim. Sci.* 74, 2104-2111.

Liang P. & Pardee A.B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.

Lin C.S., Sun Y.L., Liu C.Y., Yang P.C., Chang L.C., Cheng I.C., Mao S.J. & Huang M.C. (1999). Complete nucleotide sequence of pig (*Sus scrofa*) mitochondrial genome and dating evolutionary divergence within Artiodactyla. *Gene* 236 (1), 107-114.

López-Bote C. (1998). Sustained utilization of the Iberian pig breed. *Meat Science* 49 (1), 17-27.

Mariani P., Moller M.J., Sandberg K. & Andersson L. (1996). A missense mutation in the gene for *melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R)* is associated with the chestnut coat color in horses. *Mamm. Genome.* 7, 895-899.

Marklund L., Ellegren H., Johansson M., Gustavsson U., Nielsen P.B., Juneja N.K., Edfors-Lilja I. & Andersson L. (1992). Linkage analyses in the pig using a cross between the European wild pig and Large White breed. *Anim. Genet.* 23, 89.

Marklund L., Moller M.J., Sandberg L. & Andersson L. (1996). A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (*MC1R*) is associated with the chesnut coat color in horses. *Mamm. Genome.* 7, 895-899.

Marklund S., Kijas J., Rodríguez-Martínez H., Ronnstrand L. & Funa K. (1998). Molecular basis for the dominant white phenotype in the domestic pig. *Genome Res.* 8, 826-833.

Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Nakai H., Shibata K., Yamada J. & Shinmura Y. (1998). Determination of mitochondrial *Cytochrome b* gene sequence for red deer (*Cervus Elaphus*) and the differentiation of closely related deer meats. *Meat Science* 49, 2829-2832.

Michaud E.J., van Vugt M.J., Bultman S.J., Sweet H.O., Davisson M.T. & Woychik R.P. (1994). Differential expression of a new dominant *agouti* allele (*Aiapy*) is correlated with methylation state and is influenced by parental lineage. *Genes Develop.* 8, 1463-1472.

Miller K.A., Gunn T.M., Carrasquillo M.M., Lamoreaux M.L., Galbraith D.B. & Barsh G.S. (1997). Genetic studies of the mouse mutations *mahogany* and *mahoganoid*. *Genetics* 146(4), 1407-1415.

Moody D.E. (2001). Genomics techniques: An overview of methods for the study of gene expression. *J. Anim. Scien.* 79 (E. Suppl.) 128-135.

Montiel-Sosa J.F., Ruiz-Pesini E., Montoya J., Roncalés P., López-Pérez M.J. & Pérez-Martos A. (2000). Genetic diversity studies. *J. Anim. Breed. Genet.* 117, 217-224.

Murty V.V., Bouchard B., Mathew S., Vijayasaradhi S. & Houghton A.N. (1992). Assignment of the human *TYRP (brown)* locus to chromosome region 9p23 by nonradiative in situ hybridization. *Genomics*. 13, 227-229.

Nadeau J.H. & Sankoff D. (1998). Counting on comparative maps. *Trends in Genetics*. 14 (12), 495-501.

Newton J.M., Wilkie A.L., He L., Jordan S.A., Metallinos D.L., Holmes N.G., Jackson I.J. & Barsh G.S. (2000). *Melanocortin 1 receptor* variation in the domestic dog. *Mamm. Genome*. 11, 24-30.

Newton J.M., Cohen-Barak O., Hagiwara N., Gardner J.M., Davisson N.T., King R.A. & Brilliant M.H. (2001). Mutations in the human orthologue of the mouse *underwhite* gene (*uw*) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA 4. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 981-988.

Oetting W.S., Gardner J.M., Fryer J.P., Ching A., Durham-Pierre D., King R.A. & Brilliant M.H. (1998). Mutations of the human *P* gene associated with type II oculocutaneous albinism (OCA2). *Hum. Mut.* 12, 434.

Okubo K., Hori N., Matoba R., Niyama T., Fukushima A., Kojima Y., & Matsubara K. (1992). Large scale cDNA sequencing for análisis of quantitative and qualitative aspects of gene espression. *Nat. Genet.* 2, 173-179.

Ollivier L. & Sellier P. (1982). Pig genetics: a review. *Ann. Génét. Sél. Anim.* 14, 481-544.

Ollivier L. & Sellier P. (1982). Pig genetics: a review. *Ann. Génét. Sél. Anim.* 14, 481-544.

Otsen M. den Bieman M., Kuiper M.T., Pravenec M., Kren V., Kurtz T.W., Lacob H.J., Lankhorst A. & van Zutphen B.F. (1996). Use of AFLP markers for gene mapping and QTL detection in rats. *Genomics* 37, 289-294.

Óvilo C., Pérez-Enciso M., Barragán C., Clop A., Toro M., Rodríguez M.C., Oliver M., Barboni C. & Noguera J.L. (1999). Búsqueda de QTL en el cromosoma 6 para grasa intramuscular y pigmentos en un cruce F2 ibérico x Landrace. *ITEA. Vol. Extra* 20 (1), 240-251.

Óvilo C., Cervera M.T., Castellanos C. & Martínez Zapater J.M. (2000). Characterization of Iberian pig genotype using AFLP markers. *Anim. Genet.* 2000. 31, 117-122.

Óvilo C., Pérez-Erciso M., Barragán C., Clop A., Rodríguez C., Olivier M.A., Toro M.A. & Noguera J.L. (2000). A QTL for intramuscular fat and backfat thickness is located on porcine chromosome 6. *Mamm. Genome* 11, 344-346.

Óvilo C., Oliver A., Noguera J.L., Clop A., Barragán C., Varona L., Rodríguez C., Toro M.A., Sánchez A., Pérez-Enciso M. & Silió L. (2002). Test for positional candidate genes for body composition on pig chromosome 6. *Genet. Sel. Evol.* 34 (4), 465-479.

Óvilo C., Varona L., Barragán C., Clop A., Rodríguez C., Toro M.A., Silió L., Sánchez A. & Noguera J.L. (2002). Discrimination between linked and pleiotropic QTL on pig chromosome 6 by multitrait least squares analysis. *7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (Montpellier)* pp. 139.

Pérez-Álvarez J.A., Fernández-López J., Sayas-Barberá M.E. & Cartagena-García R. (1998). Caracterización de los parámetros de color de diferentes materias primas usadas en la industria cárnica. *Eurocarne* 63, 115-122.

Pérez-Enciso M., Clop A., Noguera J.L., Óvilo C., Coll A., Folch J.M., Babot D., Estany J., Oliver M.A., Díaz I. & Sánchez A. (2000). A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: evidence from an Iberian by Landrace intercross. *J. Anim. Sci.* 78 (10), 2525-2531.

Pérez-Enciso M., Clop A., Folch J.M., Sánchez A., Oliver M.A., Óvilo C., Barragán C., Varona L. & Noguera J.L. (2002). Exploring alternative models for sex-linked quantitative trait loci in outbred populations: application to an Iberian x Landrace intercross. *Genetics* 161 (4), 1625-1632.

Pielberg G., Olsson C., Syvänen A.C. & Andersson L. (2002). Unexpectedly high alleles diversity at the *KIT* locus causing dominant white color in the domestic pig. *Genetics*. 160, 305-311.

Puri N., Gardner J.M. & Brilliant M.H. (2000). Aberrant pH of melanosomes in pink-eyed dilution (*P*) mutant melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 115, 607-613.

Reinsch N., Thomsen H., Xu N., Brink M., Looft C. Kalm E., Brockmann G.A., Grupe S., Kuhn C., Schwerin M., Leyhe B., Hinedleder S., Erhardt G., Medjugorac I., Russ I., Foster M., Reents R. & Averdunk G. (1999). A QTL for the degree of spotting in catsheds synteny with the *KIT* locus on chromosome 6. *J. Hered.* 90, 629-634.

Rempel W. E. & Marshall M.L. (1990). Inheritance of coat color in swine. In: *Genetics of Swine*. Agriculture Research Service (Eds. Roman L. Hruska U.S.) Meat Animal Research Center. Clay Center. Nebraska.

Rieder S., Taourit S., Mariat D., Langlois B., Guerin G. (2001). Mutations in the agouti (*ASIP*); the *extension (MC1R)*, and the *brown (TRYP1)* loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mamm. Genome*. 12, 450-455.

Rinchik E.M., Bultman S.J., Horsthemke B., Lee S.T., Strunk K.M., Spritz R.A., Avidano K.M., Jong M.T. & Nicholls N.D. (1993). A gene for the mouse *pink-eyed dilution* locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature*. 361, 72-76.

Rinchik E.M., Stoye J.P., Frankel W.N., Coffin J., Kwon B.S. & Russell L.B. (1993). Molecular analysis of viable spontaneous and radiation-induced albino (*c*) locus mutations in the mouse. *Mutat. Res.* 286, 199-207.

Rinchik E.M., Tonjes R.R., Paul D. & Potter M.D. (1993). Molecular analysis of radiation-induced albino (*c*)-locus mutations that cause death at preimplantation state of development. *Genetics*. 135, 1107-1116.

Robbins L.S., Nadeau J.H., Johnson K.R., Kelly M.A., Rpselli-Rehfuss L., Baack E., Mountjoy K.G. & Cone R.D. (1993). Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from points mutations that alter MSH receptor function. *Cell*. 72, 827-834.

Rodrigañez J., Silió L. & Martín Rillo S. (1993). El cerdo ibérico y su sistema de producción. *Animal genetics resources information* 12, 93-103.

Rodrigañez J., Toro M.A., Rodríguez M.C. & Silió L. (2000). Alleles survival from Portuguese and Spanish strains in a population of Iberian pigs. *Options Méditerranéennes* 41, 57-61.

Ron M., Lewin H., Da Y., Band M., Yanai A., Blank Y., Feldmesser E. & Weller J.I. (1995). Prediction of informativeness for microsatellite markers among progeny of sires used for detection of economic trait loci in dairy cattle. *Anim. Genet.* 26, 439-441.

Rowett M.A. & Fleet M.R. (1993). Albinism in a Suffloek sheep. *J. Hered.* 84, 67-69.

Santschi E.M., Vrotsos P.D., Purdy A.K. & Mickelson J.R. (2001). Incidence of the *endothelin receptor B* mutation that causes lethal white foal syndrome in white-patterned horses. *Am. J. Vet. Res.* 62 (1), 97-103.

Sargent T.D. & Dawid I.B. (1983). Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Science* 222, 135-139.

Sayre B.L., Taft R., Inskeep E.K. & Killefer J. (2000). Increased expression of insulin-like growth factor binding protein-1 during induced regression of bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.* 63, 21-29.

Schena M., Shalon D., Davis R.W. & Brown P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.

Searle A.G. (1968). *Comparative Genetics of coat color in mammals*. (Ed. Logos Press). London.

Serra X., Gil F., Pérez-Enciso M., Oliver M.A., Vázquez J.M., Gispert M., Díaz I., Moreno F., Latorre R. & Noguera 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.

Shriver M.D. & Parra E.J. (2000). Comparison of narrow-band reflectance spectroscopy and tristimulus colorimetry for measurements of skin and hair color in persons of different biological ancestry. *Am. J. Phys. Anthropol.* 112 (1), 17-27.

Siracusa L.D. (1991). Genomic organization and molecular genetics of the *Agouti* locus in mice. *Ann. NY. Acad. Sci.* 26, 419-430.

Siracusa L.D. (1994). The *Agouti* gene: turned on to yellow. *Trends in Genetics*. 10, 423-428

Smith A.D.B., Robinson O.J. & Bryant D.M. (1939). The genetics of the pig. *Bibliographia Genetica* 12, 1-160.

Spillam W. J. (1907). Inheritance of the belt in Hampshire swine. *Science*. 25, 541-543.

Takeuchi S., Suzuki S., Hirose S., Yabuuchi M., Sato C., Yacamoto H. & Takahashi S. (1996). Molecular cloning and sequence analysis of the chick *melanocortine 1 receptor* gene. *Biochem. J. Biophys. Acta*. 1306, 122-126.

Toro M.A., Barragán C., Rodríguez J., Rodríguez C. & Silió. (2000). Estimating self and pairwise coancestry in Iberian pigs using molecular markers. *Cons. Genet*. 3, 309-320.

Toro M.A., Rodríguez J., Silió L. & Rodríguez M.C. (2000). Genealogical analysis of a closed herd of black hairless iberian pigs. *Cons. Biol*. 14, 1843-1851.

Tripathi R.K., Strunk K.M., Giebel L.B., Weleber R.G. & Spritz R.A. (1992). *Tyrosinase* gene mutations in type I (tyrosinase- deficient) oculocutaneous albinism define two cluster of missense substitutions. *Am. J. Medicine Genetics* 43, 865-871.

Vage D.I., Lu H., Klungland S., Lien S., Adalsteinsson S. & Cone R.D. (1997). A non-epistatic interaction of *Agouti* and *Extension* in the fox, *Vulpes vulpes*. *Nat. Genet*. 15, 311-315.

Valverde P., Healy E., Jackson I.J., Rees J.L. & Thody A.J. (1995). Variants of the *melanocyte-stimulating hormone receptor* gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat. Genet*. 11, 328-330.

Vaughan H.W. (1950). The Duroc-Jersey. In: Breeds of live stock in America. (Heer F.J. ed.) Columbus, Ohio pp.529-546.

Veculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B. & Kinzler K.W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484-487.

Vignal A., Milan D., SanCristobal M. & Eggen A. (2002). A review on SNP of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34, 275-305.

Wentworth E.N., & Lush J.L. (1923). Inherence in swine. *J. Agric. Res.* 23, 557-582.

Wiseman J. (1986). A history of the British pig. (Eds. Ebenezer Baylis & Sonn Ltd.). Worcester. UK.

Wright S. (1918). Color inherence in mammals. Swine. *J. Hered.* 9, 33-38

Xiong M., Fan R. & Jin L. (2002). Linkage disequilibrium mapping of quantitative trait loci under truncation selection. *Hum. Hered.* 53(3), 158-172.

Yamaguchi S., Shinmura K., Sayito T., Takenoshita S., Kuwano H. & Yokota J. (2002). A single nucleotide polymorphism at the splice donor site of the human *MYH* base excision repair genes results in reduced translation efficiency of this transcripts. *Genes & Cells* 7 (5), 461-474.

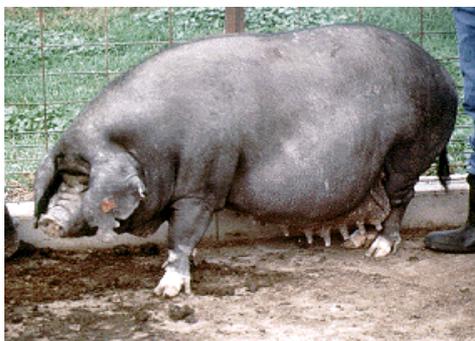
Yule G.U. (1906). On the theory of inheritance of quantitative compound characters on he basis of Mendel´s laws, a preliminary note. Rept. 3rd Intern. Confr, Genet. pp 140-142.

Zhu L.G. & Brewer M.S. (1998). Discoloration of fresh pork as related to muscle and display conditions. *J. Food. Science* 63, 763-767.

ANEJO 1.
FOTOS DE CERDOS
ANALIZADOS EN ESTE
TRABAJO

ANEXO 1. FOTOS DE CERDOS
ANALIZADOS EN ESTE
TRABAJO

Cerdo de la raza Meishan



Cerdo de la raza Pampa



Cerdo vietnamita



Cerdo vasco



Cerdo de la raza Duroc



Cerdos de la raza Mangalitza (colorado)



Cerdo de la raza Mangalitzza (golondrino)



Cerdo de la raza Landrace



Cerdo de la raza Pietrain



Cerdo de la raza Large White



**Cerdo F₂ procedente del cruce
Guadyerbas x Landrace**



ANEJO 2 .
MC1R

RHCZ . 2 . 0 U M Z A
Z U U U
A

cacgcccgcctttggggcgcgctctggggactttgccccactggggtgggacgtgtgcgggcagaagctgtccgggtgttgc
 cactgcaggacctcaggggaaggccttcgtgactgctaggggaagcaggcgcagcgcgcccgcg

- Exón del gen *MC1R* porcino, 963 pb
- Pareja de oligonucleótidos MC1RFW1-MC1RRW1, fragmento de 538 pb
- Pareja de oligonucleótidos MC1RFW2-MC1RRW2, fragmento de 572 pb
- Pareja de oligonucleótidos MERL1-EXT4, fragmento de 449 pb
- Pareja de oligonucleótidos EPIG1-EPIG3, fragmento de 405 pb
- Pareja de oligonucleótidos MC1RFW3-MC1RRW3, fragmento de 454pb
- Pareja de oligonucleótidos MC1RA-MC1RB, fragmento de 203/205 pb
- Pareja de oligonucleótidos MC1RSSCPf-MC1RSSCPf, fragmento de 174 pb

Alineamiento de las secuencias aminoacídicas resultantes para los alelos del gen *MC1R* detectados

Alelos	
MC1R*1	1 MPVLGPERLLASLS SAPPAPRLGLAANQTNQTGPQCLEVSI PDGLFSLGLVSLVEN
MC1R*2	1 MPVLGPERLLASLS SAPPAPRLGLAANQTNQTGPQCLEVSI PDGLFSLGLVSLVEN
MC1R*3	1 MPVLGPERLLASLS SAPPAPRLGLAANQTNQTGPQCLEVSI PDGLFSLGLVSLVEN
MC1R*4	1 MPVLGPERLLASLS SAPPAPRLGLAANQTNQTGPQCLEVSI PDGLFSLGLVSLVEN
MC1R*6	1 MPVLGPERLLASLS SAPPAPR F ASGWPPTRPTRRAPS AWRCPFPTGSSSAWG WASWRT
MC1R*7	1 MPVLGPERLLASLS SAPPAPR F ASGWPPTRPTRRAPS AWRCPFPTGSSSAWG WASWRT
MC1R*1	60 VLVVAIAKRNRLHSPMYFVCC LAVSDLLVSVSNVLETAV L LLEAGALAAQAAVVQQL
MC1R*2	60 VLVVAIAKRNRLHSPMYFVCC LAVSDLLVSVSNVLETAV M LLEAGALAAQAAVVQQL
MC1R*3	60 VLVVAIAKRNRLHSPMYFVCC LAVSDLLVSVSNVLETAV L LLEAGALAAQAAVVQQL
MC1R*4	60 VLVVAIAKRNRLHSPMYFVCC LAVSDLLVSVSNVLETAV L LLEAGALAAQAAVVQQL
MC1R*6	60 CWWWPPSPRTATCTRPCTTSSAAWPCRTCW-A---ATCWRRPCCCCWRRAPWPPRPWC
MC1R*7	60 CWWWPPSPRTATCTRPCTTSSAAWPCRTCW-A---ATCWRRPCCCCWRRAPWPPRPWC
MC1R*1	120 DNV D VLICGSMVSSLCFLGAI AVDRYVSIFYALRYHSIVTLP--- R AGRAIAAIWAGS
MC1R*2	120 DNV D VLICGSMVSSLCFLGAI AVDRYVSIFYALRYHSIVTLP--- R AGRAIAAIWAGS
MC1R*3	120 DNV D VLICGSMVSSLCFLGAI AVDRYVSIFYALRYHSIVTLP--- R AGRAIAAIWAGS
MC1R*4	120 DNV D VLICGSMVSSLCFLGAI AVDRYVSIFYALRYHSIVTLP--- R AGRAIAAIWAGS
MC1R*6	115 SSWTMS-TCSSAAPWCPASASWASPWTATCPSSTRCATTASRC PARGGSRPSGRAAC
MC1R*7	115 SSWTMSWTCSSAAPWCPASASWASPWTATCPSSTRCATTASRC PARGGSRPSGRAAC
MC1R*1	176 VLSSTLFIAYYHHTAVLLGLV SFFVAMLALMAVLYVHMLARACQHGRH IARLHKTQHPTR
MC1R*2	176 VLSSTLFIAYYHHTAVLLGLV SFFVAMLALMAVLYVHMLARACQHGRH IARLHKTQHPTR
MC1R*3	176 VLSSTLFIAYYHHTAVLLGLV SFFVAMLALMAVLYVHMLARACQHGRH IARLHKTQHPTR
MC1R*4	176 VLSSTLFIAYYHHTAVLLGLV SFFVAMLALMAVLYVHMLARACQHGRH IARLHKTQHPTR
MC1R*6	173 SPAPSSSPTTTTRPSCWASSASSWPCWRSWRYCTSTCWPGPASTAGT SPGSTRRSTPPAR
MC1R*7	174 SPAPSSSPTTTTRPSCWASSASSWPCWRSWRYCTSTCWPGPASTAGT SPGSTRRSTPPAR
MC1R*1	236 QGCGLK G AATLTILLGVFLLCWAPFFLHLSLVVLC PQHPTCGCVFKNVNLFLALVICNSI
MC1R*2	236 QGCGLK G AATLTILLGVFLLCWAPFFLHLSLVVLC PQHPTCGCVFKNVNLFLALVICNSI
MC1R*3	236 QGCGLK G AATLTILLGVFLLCWAPFFLHLSLVVLC PQHPTCGCVFKNVNLFLALVICNSI
MC1R*4	236 QGCGLK G AATLTILLGVFLLCWAPFFLHLSLVVLC PQHPTCGCVFKNVNLFLALVICNSI
MC1R*6	233 AAASRARPPSPSCWASSSSAGHPSSCTSPSSSSAPSTPPAAASSRTST SFWPSSSATPS
MC1R*7	234 AAASRARPPSPSCWASSSSAGHPSSCTSPSSSSAPSTPPAAASSRTST SFWPSSSATPS

— Cambios aminoacídicos

Proteína MC1R*6

Conf: 98876420321577877778887877678778887888666788776678887887888

Pred: CCCCCC **HHH** CCC

AA: MPVLGPERLLASLSAPPAAAPASGWPPTRPTRRAPSARCPFPTGSSSAWGWSAAWPC

10 20 30 40 50 60

Conf: 77678888788876777888787778887887788778877886888888877888876788

Pred: CCC

AA: RTCWRCPARGGSRPSGRAACSPAPSSPTTTTRPSCWASSASSWPCWRSWRYCTSTCWP

70 80 90 100 110 120

Conf: 888887777788888788888877688786788688788788888787876776655566

Pred: CCC

AA: GPASTAGTSPGSTRRSTPPARAAASRARPPSPSCWASSSSAGHPSSCTSPSSSSAPSTPP

130 140 150 160 170 180

Conf: 65677888874688888889

Pred: CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC

AA: AAASSRTSTSFWPSSSATPS

190 200

Proteína MC1R*7

Conf: 98876420321577877778887877678778887888666788776678887887888

Pred: CCCCCC CCC

AA: MPVLGPERLLASLSSAPPAAPASGWPPTRPTRRAPSARCPFPTGSSSAWGWSAAWPC

10 20 30 40 50 60

Conf: 77678888788876777888787778887788778877887788688888887888876788

Pred: CCC

AA: RTCWRCPARGGSRPSGRAACSPAPSSPTTTTRPSCWASSASSWPCWRSWRYCTSTCWP

70 80 90 100 110 120

Conf: 888887777788888788888877688786788688788788888787876776655566

Pred: CCC

AA: GPASTAGTSPGSTRRSTPPARAAAARARPPSPSCWASSSSAGHPSSCTSPSSSSAPSTPP

130 140 150 160 170 180

Conf: 65677888874688888889

Pred: CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC

AA: AAASSRTSTSFWPSSSATPS

190 200

Secuencias de oligonucleótidos para el gen *MC1R*

MC1RFW1: 5' - CCGGCTGTGGCGTGTCTGGA -3'

MC1RRW1: 5' -ACGGCGGCTTTTCTGGGCATCTTTA -3'

MC1RFW2: 5' -AGGGGCTCAGGCAGGACTTTA -3'

MC1RRW2: 5' - CGACACGGCCAGGCAGCAGACGAA- 3'

MC1RFW3: 5' -GCGCGGCCACCCTCACCATC -3'

MC1RRW3: 5' -CGCTCCCCGCCGTCTCT -3'

MERL1: 5' -RGTGCCTGGAGGTGTCCAT-3'

EXT4: 5' - GTAGTAGGCGATGAAGAGCGTGC -3'

EPIG1: 5' - CGGCCATCTGGCGGGCAGCGTGC - 3'

EPIG3: 5' - GGAAGGCGTAGATGAGGGGGTCCA -3'

MC1RA: 5' - CCAGCCAGGGCGAGTGTG -3'

MC1RB: 5' - CTGGGGGCCCGTCTGGTTGGTCTG -3'

MC1RSSCPf: 5' -CAAAATGTCCGGACCTGA- 3'

MC1RSSCPR: 5' -GTA CTGACTCGTCCT-3'

ANEJO 3 .
AGOUTI

— 1505A . W O U P Z A

Secuencia parcial publicada, exón 1 del gen *Agouti* porcino (GenBank nº acceso: AJ251836)

1
 acaacggggttggactttgcctgctgagcagattctagggcagggatacacaataacagtagagaacctccagtttctcc
 aaaagtagcaaacacagggatccatacagaaacatgtgagcatgcttaagtgcatgtgcagccccgcctccccctaccagggg
 tttgctcacagctacaacatcttgacaacctatttaaaccaacttgagtaactggcaacaaagtatcattttctgacaagctgagtca
 ttgagtctctgcagactttggaagaggggaatccttctactgaaacactggagaaccaggggatcccagagaggtatgtaataaattcc
 actcagatattggaattgtttccttttctcttttcttttctccccgcctccatcacattcaagagcaacaaattgtttccacctt
 gtcaagcaaggtgagaagaacattcataacttcttcattcttgagtggtctgcatcaaaggattgagagagctaatagcacctgg
 gtaattaagggtgcatctaagttatctgagagcatttgtatacgtgatagaattatccgaataggtaaatggtgtttcagatactca
 gcaaatccaattacaggtctccaagtccattct
 651

 Exón 1, 92 pb

 Pareja de oligonucleótidos AGFW1-AGFW1, fragmento de 355 pb

 Pareja de oligonucleótidos AGABIFW-AGFW1, fragmento de 143 pb

Secuencia parcial publicada, exon 2 del gen *Agouti* porcino (GenBank nº acceso: AJ251837)

901
 agagaccagttgcaattgcaatgcattcttttcttttcttctcaatcttctgccttcttcttcttctcacttctctctcatctctctctt
 ctctcttcttctctcatcagttccccttccctgtcctaagccttctgctggccctccagttccactgggacactggcatatggaatggggtc
 ggagcaccagcccaaggaacacaaagaaagcaggagggcacatccatttccaggaccctgaccacctgactgacttctct
 gtctcactcagcctcccaggatggatgtcactcgcctcctttagctaccctactggatgctgtgcttcttactgcctccagcca
 cctggcacctgaggaaaagtccaagatgaaagaagtctaaggagcaactcctccatgaacctgttgattcccttctgtctctatt
 gtgggtaagcagcctggcctggggcccagcctctgggctctggcctatgagaagggctgcaggatgtaaacacactccctaag
 ctgataccaggatccattaccaggatccattgcctaagtcagaactccttcatgttcattcctcaaacaccctggaggaataaagt
 gcccttaactcgtttaatttgggagagccctgctgccaccatctaatacaacttagcatgttagaggctctgagaaccctaa
 agtcaagacacttgctgaatgatggttaacttgagcatttctgaaactattgaatcacagaactctttt
 1677

 Exón 2, 170 pb

 Pareja de oligonucleótidos AGFW2-AGRW2, fragmento de 373 pb

Secuencia parcial publicada, exon 3 del gen *Agouti* porcino (GenBank n° acceso: AJ251837)

2281 ggattcaatcaggtatgccaaaactctgagaaatgagaactagaattataagaaatacaagtccatccatctacaagacactgagtc
 cctttccagggccttcttagattcccctttgctttccctcagaagactcttaactctcagtacctggccccaggccaacagccaggc
 taacaaacatctgctggcctaagtccaagatgtgatctatccagttaacctttcatctctcccagccctggggcttcccgagcc
 ccctctgctctcccacttcattgcagctcagggtcctcagaaactgactttgctcgttttgtctatctttgaagc**actgaacaagaat**
ccaaaagatcagcagaaaagaagcgggagaagagatcttccaaggtaggcctgggagttctcattgtggggttgagactaggctta
 aaagggagaaccctcaaaccctagctaagaactaaaagattttcctgcctacatcccaagaactgaaagctacaaaaaact
 tctggcctccagccctgaaccagaccccagaagctgagcttcgctaggcaagatggcttatctgctaaaagcatcttctatact
 agcttactctactctaaaattcaccatcactcttcttccgattaatgaatggttcccaaaccctcagtc
 2964

 Exón 3, 59 pb

 Pareja de oligonucleótidos AGFW3-AGRW3, fragmento de 310 pb

Secuencia parcial publicada, exón 4 del gen *Agouti* porcino (GenBank n° acceso: AJ251837)

5586 gatagcctctgatctgttgaaggtagaactaacagggattcggatacaccaaaaggggaagaaaagagacggtagtttaaaa
 ccgtggagctgagtggtatcccactgagagaagagggccaaatcgaagccagttaaatttgatgaggatagaggcaggtggg
 gcaaggaattcccaggcagaggtgaggaagagtggggacgggagggtggacggccttgggcagccccggcgttccccacag
 aaaaaggcttcgatgaagaaggtggcacagccccggccccggcctgccccctgctggccaaccgacagctgcaagcc
 tccggcgtcgcctgctgcgacccgtgctccttctgccagtccgcttcttccgagtgctgctcctgcccgcgtgctcaaccac
 ctgctgagcgcgcctgctcccgggtggcgcggcagggccaggtccccagacctgggggacctctggggcgttgatctc
 cagtaggtgtggcttcttaggaacgggtgctgggtgtggctactgacgttggggcggagcttccaggaggagggccttcaaggaga
 ctgggcgtgggctctgctaaattccaaatacacgcaggctgctcgaaggtgtgtg
 6234

 Exón 4, 177 pb

 Pareja de oligonucleótidos AGFW4-AGRW4, fragmento de 499 pb

Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen *Agouti* sin la mutación, Ag (G), y con la mutación, Ag (A)

Ag (G)	1	MDVTRLLLATLLVCLCFFTASSHLAPEEESKDERSLRSNSSMNLDFPSVSIVALNKKSK
Ag (A)	1	MDVTRLLLATLLVCLCFFTASSHLAPEEESKDERSLRSNSSMNLDFPSVSIVALNKKSK
Ag (G)	61	KISRKEAERSSSKKKASMKKVAQPRPPRPAPCVANRDSCKPPALACCDPCAFCQCRFFRS
Ag (A)	61	KISRKEAKERSSSKKKASMKKVAQPRPPRPAPCVANRDSCKPPALACCDPCAFCQCRFFRS
Ag (G)	121	ACSCRVLNPTC
Ag (A)	121	ACSCRVLNPTC

— Cambio aminoacídico

Predicción de las estructuras secundarias para las proteínas codificadas para los dos alelos del gen *Agouti* detectados

Conf: Confidence (0=low, 9=high)
 Pred: Predicted secondary structure (H=helix, E=strand, C=coil)
 AA: Target sequence
 ■ Cambios aminoacídicos

Proteína Agouti (G)

Conf: 967899999999999997244233543454201047871120233356763212475145
 Pred: CC [red]CC [red]CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC [red]
 AA: MDVTRLLLATLLVCLCFFFTASSHLAPEEKSKDERSLRSNSSMNLDFPSVSIVALNKKSK
 10 20 30 40 50 60

Conf: 667998876532028889986346887774134444424788887766444100001012
 Pred: [red]CCCCCCCCCCCCCCCC [red]CC [red]EEEEEECC
 AA: KISRKEAEKRSSKKKASMKKVAQPRPPRPAPCVANRDSCKPPALACCDPCAFCQCRFFRS
 70 80 90 100 110 120

Conf: 14456525889
 Pred: EEEEEEECCCCC
 AA: ACSCRVLNPTC
 130

Proteína Agouti(A)

Conf: 967899999999999997237766654565421356773313664467753212475135
 Pred: CC [red]CC [red]CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC [red]
 AA: MDVTRLLLATLLVCLCFFFTASSHLAPEEKSKDERSLRSNSSMNLDFPSVSIVALNKKSK
 10 20 30 40 50 60
 ↓

Conf: 656888877779999999986235787775012222314888887766444101112022
 Pred: [red]CC [red]CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC [red]EEEEEECC
 AA: KISRKEAKRSSKKKASMKKVAQPRPPRPAPCVANRDSCKPPALACCDPCAFCQCRFFRS
 70 80 90 100 110 120

Conf: 14456425889
 Pred: EEEEEEECCCCC
 AA: ACSCRVLNPTC
 130

Secuencias de oligonucleótidos para el gen *Agouti*

AGFW1: 5' - GCCCCGCCTCCCCCTACC -3'

AGRW1: 5' -TCCTTTGATGCAGACCCACTC -3'

AGFW2: 5' -CAGCCCAAAGGAACACAAAGAAAG -3'

AGRW2: 5' -GGCAATGGATCCTGGTAATGG -3'

AGFW3: 5' -GGCCTAAGTCCCAAGATGTGAT -3'

AGRW3: 5' -TTGGGATGTAGGCAGGAAAAAT -3'

AGFW4: 5' -ACCAAAAGGGGAAGAAAAAGAGA -3'

AGABIFW: 5' -AATTTGTTTCCTTTTCCTC -3'

ANEJO 4 .
PINK

ZZ-4.4 OUMZA
ZZ-4.4 OUMZA

Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del ADNc del gen *P* publicadas en la especie humana y ratón y parejas de oligonucleótidos diseñados para la secuenciación completa del ADNc en porcino

		Exón I
humano	1	-----TCTGAGT--TCTTACTTCTGAAGGCTGTGCTCCGCTCACCATCCAGAGCGG
ratón	1CTGAG...TCTTAC..C.AgGG.TGTGCTCCa..CAC.A...AGAGC..
		Exón II
humano	49	AGG--TGCGGACCTTAAACT-CACTCCTGGAGAAAGATCTGCAAGTGCGCAGAGAGAAGA
ratón	58	..G..T..GGAC..TAGACT.CACT.CTGGAGAgAGATC.GCgAGT...CAGA.AGA..A
humano	106	CTGGCAGTGGAG-CATGCATCTGGAGGGCAGAGACGGCAGGCGGTACCCCGCGCGCCGG
ratón	115	...GCAa.GGgG.CATGcG.CTaGAGaaCaAGaCa.CAGGC.G..C.C.G.CG.GC.GG
humano	165	CGGTGGAGCTCCTGCAGACGTCCGTGCCAG-CGGACTCGTGAACCTTGTGGCCGGCAAG
ratón	164	.aGTaGAGCT.C..CAGaCaTC..TGC...G.CGG.C.C....AACTT...GCC..CaG
humano	224	CGCAGGCTTCTCGGGGAGCCGGTGGAGCTGACCCTCGCACTCC---TGCCCCAGGGG
ratón	208	C.CAGG....CT.G..GA.CCG..aa.CTG...CC....ACT.C...TG..CCAGG.a
humano	280	GGC---TGCCGGCAGAGCTCTTGGGCTCCTGCAGGCCAGGAGTTTGCTTCAATTCCTCAC
ratón	263	GaC...TGC...CA.A...CT.G.G...CTGC.GG..AG.AG..T.CT..gTTCCT.A.
		Exón III
humano	337	AAAAGGGAGGTCTCACTCTTCTTTGCCCCAGATGTCCAGCTCCAGGTCTAAAGATTCTTG
ratón	318	.A.A.aGAG.T.T.gCTC....TT.C.C..GA.G...AGCTCCAG.T..AAAGA...T.
		Exón IV P7F
humano	397	CTTTACAGAAAACACTCCTTTGCTGAGGAATTCCTTACAGGAGAAAGGTCACGGTGCCAT
ratón	372	.TTTA.gGAaGACACTCCT.TGCT..GGAATTC.T..CaAaGAAAaGGTCACaG..CAT
		P-5' RACE R
humano	457	ACCTGTTTACCATCCAGAGTTCATCACTGCTGAAGAGTCTTGGGAAGACAGCTCTGCTGA
ratón	426	gCCTGTT.A.CA.CCAGaATTCAT.gCTaCTGAAGg.TC.TGGGAaA.gGC..TaCTG.
humano	517	CTGGGAGCGAAGATACCTGTAAAGCAGGGAGGTGTCTGGTCTGTCTGCATCTGCCTCCTC
ratón	478	CTGGGAGCaAAaATgC.TGCTggG.AaaGAGGT..CTGaT.TGTCTGCAT..GCCTCCTC
humano	577	CGAGAAGGGAGACCTTCTGGACAGCCCGCACATCCGACTCCGTCTTTCCAAGCTGAGGCG
ratón	530	.GAGAAa.GgGA.CTT..aGgCAG....CA..T..GA..CCa..T.TCCAAGCT.ggG.G
		Exón V P5F Exón VI
humano	637	CTGTGTGCAGTGGCTGAAAGTCATGGCCCTGTTTGCCCTTTGTGGTGTCTGTCTATTTT
ratón	584	CTGTGTGCgGTGG.TaAAgaTCA.aGGC.TGTTTG..TT.GTGGTGTCT.TG.TCTATTTT
humano	697	GTTCAGCCTATATCCGGATCAAGGAAAGCTCTGGCAGCTGTTGGCCTTATCACCGCTGGA
ratón	639	aTTCAGCCTgTATCCGGA.CAAGGAAAG.TCTGGCAGCTGTTGGC..TgTCACCGCTGGA
		Exón VII P7R
humano	757	GAACTACTCCGTGAACCTTAGCAGCCACGTGGACTCCACGCTGCTGCAGGTGGACCTGGC
ratón	696	aAACTACTC.GTGAACCT.AG.gG.CACG.GGACTCCA.G.TaCT.CAG.TGGACCTGGC
humano	817	AGGGGCCCTAGTGGCCAGTGGGCCGAGTCGTCTGGGAGGGAAGAGCACATCGTGGTGG
ratón	753	AGGGGCC.TAaTGGC.gG.GGaCaAGT.GT.C.GGGAAaGAAGaCa.gTCGTGGTGG.
		P2F Exón VIII
humano	877	GCTGACCCAGGATGACGCTTTGGGCTCCAGGTGGCGGCCACAGCAGGTCACCTACAA
ratón	805	G.TGACCCAGa..GACGC...GGGC..CAGa.GGCGGCgACCACAGCAG.TCAC..ACAA
humano	937	CTGGACGGTGTATTTAAATCCGAGGAGAAGCGAGCACTCAGTGATGAGCAGGACCTTTGA
ratón	862	.TGGAC.GT...TTTAAATCCa...AGAAG.GAGCAC..gGTGgTGAGCAGaACCTTTGA
		Exón IX
humano	997	GGTACTGACCAGAGAGACGGTGTCCATCAGCATCCGGCCCTCCCTGCAGCAGACCAGGC
ratón	915	GaTA.TGA.CAGgGAGgC.GT.TCCATCAGCATCCaGGCCTC.CT.CAaCAGAC.C.G.C
		P5R

humano	1057	T-GTCCCTCTTTTGGATGGCTCATCAGTACCTCCGCGGAAGTGTAGAAACCCAGGTGACCA
ratón	969	T.GT.CCTCTTTTG.TGGC.CATCAGT.CCT..G.G.AAG.GT.GAAgC.CAaGTGgCCA
Exón X		
humano	1116	TCGCGACGGCCATCCTCGCGGGCGTCTACGCGCTGATCATATTTGAGATCGTGCACAGAA
ratón	1026	..GCGg.GGC.ATCCT.GCaGG.GT.TA.aC.CTGATCATATTTGAGAT.GT.CACAGAA
humano	1176	CTCTGGCGGCCATGCTGGGTTCCCTTGCAGCACTGGCAGCACTGGCTGTGATTTGGCGATA
ratón	1083	C.CTGGCaGCCATG.TGGG..C.CTTGCAGCACTaGCAGC..TGGCTGTGgTTGG.GATA
Exón XI		
humano	1236	GACCCAGCCTGACCCATGTGGTGGAGTGGATTGATTTTGGAGACGCTGGCCCTGCTGTTTTG
ratón	1140	GACCCAGCCTGACCCA.GTGGTGGAGTGGATTGATT.GAGAC.CTGCCCTGCTGTTTTG
Exón XII		
humano	1296	GCATGATGATCTTAGTAGCCATATTTTCAGAAACGGGATTTTTCGATTATTGTGCTGTAA
ratón	1200	GCATGATGATCTTAGTAGCCgTATTTTCAGAAACaGGATTTTT.GATTA.TGTGCTGTAA
Exón XIII		
humano	1356	AGGCATACCGGCTCTCCCGGGGACGGGTGTGGGCCATGATCATCATGCTCTGTCTCATCG
ratón	1258	AGGCATA.CaaCT.TC.CGaGGA.GaGTGTGGGCCATGATC.TCATGCT.TGTCTCAT.G
humano	1416	CGGCCGTCTCTCTGCCTTCTTGGACAACGTCACCACCATGCTCCTCTTTCACGCCTGTGA
ratón	1314	C.GCCaTCCT.TCTGCCTTCTTaGACAA.GTCAC.AC.ATGCTCCT.TT.AC.CCTGT.A
Exón XIV		
humano	1476	CCATAAGTTTGTGTGAGGTGCTCAACCTTGATCCAAGACAAGTCCCTGATTGCAGAAGTGA
ratón	1372	CCATAAGTTaTGTGAaGTGCTCAA.CTTGATCCgAGACAAGTCCCT.ATTGCAGAAGTGA
humano	1536	TCTTCACAAACATTGGAGGAGCTGCCACTGCCATCGGGGACCCCTCAAATGTCATTATTG
ratón	1429	TCTTCACAAACATTGGAGGAGCTGCCACTGC.AT.GGGGACCC.CCAAATGT.AT.ATTG
Exón XV		
humano	1596	TTTCCAACCAAGAGCTGAGGAAGATGGCCTGGACTTTGCCGGATTCACTGCACACATGT
ratón	1489	TTTCCAA.CAgGAG.TGAGaAAaATGGCCTGGACTT.GC.GG.TTCAC.GCACACATGT
humano	1656	TCATTGGGATTTGCCTTGTCTCTCGTCTGCTTTCCGCTCCTCAGACTCCTTTACTGGA
ratón	1546	TC.T.GGaATTTGCCTTGTCTCTCGTCT.CTTTCC.CTCCTCAGACT.CT.TACTGGA
Exón XVI		
humano	1716	ACAGAAAGCTTTATAACAAGGAACCCAGTGAGATTGTTGAACCTGAAGCACGAGATTCACG
ratón	1605	ACAaAAAGCTTTATAACAAGGAgCC.AGTGAGAT.GT.GAACTGAAGCA.GAGATTCA.G
humano	1776	TCTGGCGCCTGACTGCTCAGCGCATCAGCCCGGCCAGCCGCGAGGAGACAGCTGTGCGCC
ratón	1663	TCTGGCGC..TGACTGC.CAGCGCATCAG.CCaGCCAGCCG.GAGGAGACAGCTGTGCGC..
humano	1836	GCCTGTGCTGGGGAAGGTGCTGGCACTGGAGCACCTGCTCGCCCGGAGGCTGCACACCT
ratón	1722	GC.TGCTGTGGaGAAaGTGCT.GC.CTGGAGCA.CTGCT.GC.CaaAGG.TGCACAC.T
Exón XVII		
humano	1896	TCCACAGACAGATCTCACAGGAGGACAAAAATGGGAGACCAATATCCAAGAACTCCAAA
ratón	1778	TCCACAGgCAaAT.TCACAGGAaGACAAAAATGGGAGACCAATAT.CAAGAgCT.CAAA
Exón XVIII		
humano	1956	AAAAGCATAGGATATCTGACGGGATTTGCTCGCCAAATGCCTGACAGTGTGGGATTTG
ratón	1834	gAAAGCA.AGGAT.TC.GACaGGA.TCTGCT.G.CAAgTGCCTGACgGTG.TGGGATTTG
Exón XX		
humano	2016	TTATCTTCATGTTTTTCTCAATTCGTTTGTCCCTGGCATTCACTTGATCTTGATGGA
ratón	1890	T.ATCT.CATGTT.TT.CTCAA.TC.TTTGTCCCTGGCATTCACTTGATCTTGATGGA
humano	2076	TTGCTATTCTGGGTGCCATCTGGTTGCTAATTTTAGCTGATATTCATGATTTGAGATAA
ratón	1950	TTGCTATTCTGGGTGCCATCTGGTTGCTAATTTTAGCTGATATTCATGA.TTTGAGAT.A
Exón XXI		
humano	2136	TTCTACACAGAGTGGAAATGGGCAACCCCTTCTGTTTTTTCAGCGCTCTTTGTTCTGATGG
ratón	2010	TTCTACACAGAGTaGAgTGGGcGc.CTTCT.TT.TTTGCAGCaCTTTTGT.CTGATGG
Exón XXII		
humano	2256	AGATGGTCCAGAGGAGCAGCGCCTCATAGCCGCCATTGTCTGGTGGTGGGTCTCAG
ratón	2121	AGATGGT.CCAGAaGA.CAGCGC.T.g.AGC.GCCATTGTCTCTGaTaGTGTGGGTCTCAG

			Exón XXIII
humano	2316	CCCTGGCGTTCGTCCTCGATTGACAACATCCCCTTCACTGCTACCATGATTC	
ratón	2177	CC.TGGCaTCaTCC.TGATTGACAACATCCCaTT.ACTGCTAC.ATGATTCC.GTaCTCC	
humano	2376	TGAACCTGAGCCACGACCCCTGAGGTTGGCCTGCCCGCACCGCCGCTCATGTATGCCCTGG	
ratón	2233	TGAACCTGAGCCA.GACCCTGAaaTTaG.TGCC.GCAC.GCC.CTCATGTATGCCCTGG	
			Exón XXIV
humano	2436	CCTTCGGTGCTTGCCCTGGGAGGCAACGGGACACTGATTGGCGCGTCGGCAAACGTCGTGT	
ratón	2290	CC.TCGGTGC.TGCCCTGGGAGG.AA.GGGACACT.AT.GG.GCaTC.aCAAA.GT.GT.T	
			Exón XXV
humano	2496	GTGCAGGGATTGCAGAACAGCATGGATATGGGTTCTCCTTCATGGAATTTTCAGGCTGG	
ratón	2348	GTGCAGGaAT.GCAGAg.AGCATGGgTATGgaTTCTC.TTCATGGAATTTTCAGG.TGG	
humano	2556	GCTTCCCAATGATGGTTGTGTCTGCACTGTTGGGATGTGTTATCTCCTTGTGGCTCATG	
ratón	2404	GCTTCCC.gTGATG.T.aTGTCTGCAC.aTTGGGATGTG.TATCTCCT.aT.GCTCA.a	
humano	2616	TGGTGGTGGGATGGAATTAATAGACATCCATCTATTGCTCGAAGACTAAAGGAACTTCA	
ratón	2459	T.GTGGTGGGATGGAATTAA.AG.CA.CCA.C.AT.a.T.G.AGAC.AAgAGgACTT.A	
humano	2676	TCCATCACAACCCATTAGTCATAAACT-ACCCTGACCCCACTGTTTGAAGAAGAAAAGG	
ratón	2515	TC.A.CA..A.C.AT.AG.CAT.Ag..T.A.C.T.A.C...C.G..T.AgG.gGAAg...	
humano	2735	TGCTTACCTGGAGATGCTACAGAGACACAGTGGAAATAG---ACCTTGACA-----CT	
ratón	2564	.GCTT.CCC...AG...CT.CgaAGA.g.Aa.GGA..AG...ACC.TGA.A.....C.	
humano	2785	AACACTCTAA-TTCAAGCGAATGTTGGAACACCATGACCTCCTCTGTGTCTCTTTCTCC	
ratón	2618	A.CA.TCT...TTCAGg.GgATG.TGGgA.AC.A.....C.TCT.....T.CTCC	
humano	2844	CCAAGGACAAAATGTAGAAAAGATGTGAGATAACTTACTCAAGATTCCCCCAGAAAAAT	
ratón	2659	C.g.aGACAAAA.GTgGgAAaA.....A.AA.T.A..CAAGATTCCC....gaAAAAAT	
humano	2904	ACGTATGT-TTAAAAACCCTTCTGCTATAC---ATAGAAAAAGACACACATCCACCTAA	
ratón	2705	ACaTATaT.TTgAAAA...TTC.TG..AT.C...ATAaGAAA.Gg.gCA.ATCCACC.AA	
humano	2960	A-ATTGACTGTACTGTTTAACTGTCAATTCTCCTGAGGCTAAACACAGTTTGTTTTCTT	
ratón	2759	A.A.T...TGT.C..TTAg..GTCAATTCT...AaG.TA.AC..AGTT..TT.T...T	
humano	3019	GTAATCACTTTTCATGTTAAAATAATCAGCATTCAAATTGTATGCTTTCTGAATATAGAC	
ratón	2806	GTAATCAC..T.CATGT.gAAATA...GCATTCAg.TTaTATa.....T.AATAT.G.C	
humano	3079	TTT--CTGGGAAAAGGTTTACTGCTCGTAAGGAAACATTTTATGTATT-----AAAATAA	
ratón	2857	TTT..CTGGGAAGaG...A..a.T..TAAGaAAA.ATTTTgTGTATT.....AAAATAA	
humano	3132	ACTGT-----	
ratón	2912	A.TGT.....	

- Pareja de oligonucleótidos P1F-P1R, fragmento de 273 pb
- Pareja de oligonucleótidos P2F-P2R, fragmento de 375 pb
- Pareja de oligonucleótidos P3F-P3R, fragmento de 564 pb
- Pareja de oligonucleótidos P4F-P4R, fragmento de 300 pb
- Pareja de oligonucleótidos P5F-P5R, fragmento de 379 pb
- Pareja de oligonucleótidos P6F-P6R, fragmento de 416 pb
- Pareja de oligonucleótidos P7F-P7R, fragmento de 305 pb
- Oligonucleótido P-5' RACE R, fragmento de 540 pb
- Oligonucleótido P-3' RACE F, fragmento de 700pb

Secuencia nucleotídica del ADNc del gen *P* porcino, indicando por la diferencia de color los límites de los exones

1

TAAGCAGGTGGGATTCANGGCAGAGTACGCGGNTCCCTTAGGGGACAGCCTCCTCATTCATTAGAGCTCTCACCTTGGACC
 AGTAACTCACTCTTGGAAAGAGGATCAAGTCTTAAAGTGAGAAGAGTGGCAACAGAAACATGCGTCTAGAGAACAGAGAAGG
 CAGGCCGACCTCTGGCGTGTGGAGATGGAGCTCCCTCAGGCGTCTGCCCCAGCCGTGCTGGCCTAGGAAGTCTGGGGCTGG
 TGGGACTCGACAGCAGCAACCACAGACACAGCAGGGAGGCAGCAAGGCAGGCTCCCGGGGCCCCACCTCAGTGGGGTGTCT
 GGGCAGAGCTGCTGGGTTCTATGGACCAGGATTTTGGCCATTCTCAGGAGCGGAGGTTCTACTGTCTTTCCCAAGCA
 TTTACAGCTCCAGGTCCAAGACCCCTGCTTTACGGAAAACACTCTTTGCTTGGAAAGTTTCTCCCAAGAGGAAGGTCACGG
 TGCATACCTGTTTACCTCCAGAGTTCATCACTGCTGATGAACCTTGGGAGAACAGCTCAGCTGAGTGGGAGGGAGGAGCC
 TGCTGAGCACAGAGTTGGCAGTTTCTTCTGGATCTGCCTCCACAGAGAAGGGGAGCTTCTGGACAGCGCTCATATCAGGTG
 CCATCTTTCCAAGCTAAGGTGCTGTGTGCAATGGCTGAAAGTCTCAGGCTTGTGTTGCTTTGTTGGTGTGTGCTCTATTTTA
 TTTAGCCTGTATCCAGATCAAGGAAAGTTCTGGCAGTTGTTGGCTGTGCACGTTGGAAAGCTATTCTGTGAACCTCAGC
 AGCCATGCAGACTCCATGTCTCCAGGTGGACCTGGCAGGGGCCCTGGTGGCCAGCGTCCAAGTCATCTCGGAAAGAAG
 AGCATGTGGCCGTGGAGGTGACCCAGGTAACGCTCCAGGATCCAGGCGGGCGGCCACAGCAGTCACTCATAACTGGAC
 GATATTTTTAAATCCAAGTGGAGGCGAGCACAGGTTGATGAGCAGGACCTTTGAGGTTCTGAGCAGAGAGCCTGTTCCAT
 CAACATTCGAGCCTCCCTCCAGCAGACCCAGATTGTTCTCTTTTGTATGGCTCATCAGTACCTCCGTGCAAGCATTGAAGCAC
 AAGTGACCATTGCTGCGGTATCCTTGTCTGGGGTCTATGTGCTGATTATATTTGAGATCTTCATAGAACACTGGCGGCTA
 TGTGGGTTCCCTTGGCAGCATTAGCAGCACTGGCTGTGATTGGTGACAGACCTACCCTGACCCAGGTGGTGGAGTGGATTGA
 TTTTGAGACGCTGGCCCTGCTTTTGGCATGATGATCTTAGTAGCCATATTTTCAGAAACTGGATTTTTTGATTACTGTGC
 TGTAAAGGCATACCAACTGTCCCGGGAAAGAGTGTGGCCATGATCATCATGCTGTGTCTCATTGCTGCTGCTTTCTGCC
 TTCTGGACAACGTTACCACGGCACTCCTCTTCACTCTGTGACCATAAAGATTGTGTGAGGTGCTCAACCTCGATCCAAGAC
 AAGTCTGATTGCAGAGGTGATCTTCACAAACATTGGAGGAGCTGCCACTGCCATTGGGGACCCGCCAAATGTCAATTATG
 TTTCCAACAGGAATTGAGGAAGATGGCTGGACTTCGCTGGCTCACCGCCACATGTTTGCTGGGATTTGCTTTGTTCT
 CTTGTTCTCTTTCCACTCCTCAGACTCCTTACTGGAACAGAAAGCTTTATAACAAGGAACCCAGTGAGATTGTTGAACT
 GAAGCATCAGATCCACGTCTGGCGCTTACTGCACAGCGCATCAGCCAGCCAGCTGGAGGAGACAGCGGTTCCGAGGCCCTGC
 TCCTGGAAAAGGTGCTGTCACTGGAGCGCTGCTGGCCGAAGGCTGCACAGCTTCCACAGACAGATCTCCAGGAAGATAA
 AAATTGGGAGACCAATATCCAGGAGCTACAGAAAAGCACAGGATATCAGACAGGACTCTGCTCACCATAATGCTGACTGT
 ACTGGGATTGGTCATCTTCAATGTTCTTCTCAATTCCTTTGTCCTGGTGTTCATCTTGATCTCGGGTGGATTGCTATTCTG
 GGTGCCATCTGGCTGCTAATTTTAGCTGATATTCATGATTTTGGAGATAATTTACACCGAGTGAATGGGCGACCCCTCTG
 TTCTTTGAGCACTCTTTATTTCTGATGGAGCATTGGCACATCTCACTTAAATAGAGTATGTCGGAGAGCAGACTCTTTG
 CTAATAAAGATGGTCCAGAAATCAGCGCTAGCAGCTGCCATCATCGTAGTCTGGGTGTCGGCCATTGCTCGTCTCT
 TGATTGACAACATCCCATTCCTGCCACCATGATTCCTGTGCTCCTGAACTTAAAGCAGAGATCCTGAGATCAGCCTGCCTGC
 ACCACTGTCATGTACGCCCTGGCCCTGGCGCTGCTGGGAGGTAACGGGACTGATTGGAGCATCAGCCAATGTTGTTT
 GTGCAGGAATTGCAGAGCAGCATGGATATGGAATCTCTTTTCAATGGAATTTTTCAGGCTGGGCTTCCAATGATGGTTGCT
 CCTGTATGGTTGGGATGTTTACCTCCTGTTGCTCAGCTCGTATGGGATGGAATTAATAGGTATACAGTGTGTAAGAC
 TGAAGGACACTTGAGCCATCACCACCATCAGTAGAAAACACCCCAAGACATTCTTTGGAGAAGAAAAGTGGCTTATTATG
 GAGGAGCTCTGAAATGGAGACCTTTGCTACCCTCTCTTATGTGGGTGAAAGCTAGCAAATTGTGGGAAATGCAAGATAGC
 CAAGATTCTAAAATAGGAAAATATGTATATTTCAAATACATCTTGTATATACTCTGTAGGAAAAGACACAAATGTAA
 TAATCCATTTCAAATGGTTTGTGTTTGTAAATGTCACCTCTCTGAGGCTGTCAATAGTTTTTCTCATGTAATCACTCT
 TTATGTTAAAAAATGAGTATTCATATTTGATGCCCTCTGAAATACATACTTCTTTGGAAAAGGCATACAGTTGGTAAGGA
 AACATTATATATTTAAAAAATGATTTGCTTGGACCAAGATCTTAGAATTTGTTAGTTTCTAGATTTTTTTAGTAG
 TTTACATTATATAAAAATTGCAATCTATCCACTGTGTTTTTCTCTGGCATTTTTAAAGTCATTAAGTCCAAGAAAATTTG
 ATNTGC

3267

- Posiciones polimórficas
- Codon de inicio y fin de la transcripción
- Pareja de oligonucleótidos Pex4F-Pex4R, fragmento de 147 pb
- Pareja de oligonucleótidos Pex9F-Pex10R, fragmento de 2306 pb
- Pareja de oligonucleótidos Pex13F-Pex13R, fragmento de 100 pb
- Pareja de oligonucleótidos Pex16F-Pex16R, fragmento de 106 pb
- Pareja de oligonucleótidos Pex18F-Pex18R, fragmento de 102 pb
- Pareja de oligonucleótidos Pex23F-Pex23R, fragmento de 75 pb
- Oligonucleótido P5' RACE F — Oligonucleótido P3' RACE F .. Oligonucleótido P3' RACE 2F

Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la proteína P humana y porcinas (conteniendo los SNPs detectados)

Pink Humano	1	MHLEGRDGRYPGAPAVELLQTSVPS-----GLAELVAGKRRLPRGAGGADPSHSCPR
Pink jabalí	1	MRLENREGRPTSGVLEMELPQASAPSRAGLGSGLVGLDSSNHRPQQGGSKAGSRGPYLS
Pink cerdo SNP272	1	MRLENREGRPTSGVLEMELPQASAPSRAGLGSGLVGLDSSNHRPQQGGSKAGSRGPYLS
Pink cerdo SNP510	1	MRLENREGRPTSGVLEMELPQASAPSRAGLGSGLVGLDSSNHRPQQGGSKAGSRGPYLS
Pink cerdo SNP511	1	MRLENREGRPTSGVLEMELPQASAPSRAGLGSGLVGLDSSNHRPQQGGSKAGSRGPYLS
Pink cerdo SNP794	1	MRLENREGRPTSGVLEMELPQASAPSRAGLGSGLVGLDSSNHRPQQGGSKAGSRGPYLS
Pink cerdo SNP1208	1	MRLENREGRPTSGVLEMELPQASAPSRAGLGSGLVGLDSSNHRPQQGGSKAGSRGPYLS
Pink cerdo SNP1666	1	MRLENREGRPTSGVLEMELPQASAPSRAGLGSGLVGLDSSNHRPQQGGSKAGSRGPYLS
Pink cerdo SNP1808	1	MRLENREGRPTSGVLEMELPQASAPSRAGLGSGLVGLDSSNHRPQQGGSKAGSRGPYLS
Pink cerdo SNP1858	1	MRLENREGRPTSGVLEMELPQASAPSRAGLGSGLVGLDSSNHRPQQGGSKAGSRGPYLS
Pink cerdo SNP2040	1	MRLENREGRPTSGVLEMELPQASAPSRAGLGSGLVGLDSSNHRPQQGGSKAGSRGPYLS
Pink cerdo SNP2462	1	MRLENREGRPTSGVLEMELPQASAPSRAGLGSGLVGLDSSNHRPQQGGSKAGSRGPYLS
Pink Humano	54	GAAGQSSWAPAGQEFASFLLTKGRSHSSLPQMSSSRKDCSFTENTPLLRNSLQEKGSRCI
Pink jabalí	61	GAAGQSCWVPMDDQDFGPFLTERRSHCPFPKHFSSRSKDCPFTENTPLLGSFSQEEGSRCI
Pink cerdo SNP272	61	GAAGQSCWVPMDDQDFGPFLTERRSHCPFPKHFSSRSKDCPFTENTPLLGSFSQEEGSRCI
Pink cerdo SNP510	61	GAAGQSCWVPMDDQDFGPFLTERRSHCPFPKHFSSRSKDCPFTENTPLLGSFSQEEGSRCI
Pink cerdo SNP511	61	GAAGQSCWVPMDDQDFGPFLTERRSHCPFPKHFSSRSKDCPFTENTPLLGSFSQEEGSRCI
Pink cerdo SNP794	61	GAAGQSCWVPMDDQDFGPFLTERRSHCPFPKHFSSRSKDCPFTENTPLLGSFSQEEGSRCI
Pink cerdo SNP1208	61	GAAGQSCWVPMDDQDFGPFLTERRSHCPFPKHFSSRSKDCPFTENTPLLGSFSQEEGSRCI
Pink cerdo SNP1666	61	GAAGQSCWVPMDDQDFGPFLTERRSHCPFPKHFSSRSKDCPFTENTPLLGSFSQEEGSRCI
Pink cerdo SNP1808	61	GAAGQSCWVPMDDQDFGPFLTERRSHCPFPKHFSSRSKDCPFTENTPLLGSFSQEEGSRCI
Pink cerdo SNP1858	61	GAAGQSCWVPMDDQDFGPFLTERRSHCPFPKHFSSRSKDCPFTENTPLLGSFSQEEGSRCI
Pink cerdo SNP2040	61	GAAGQSCWVPMDDQDFGPFLTERRSHCPFPKHFSSRSKDCPFTENTPLLGSFSQEEGSRCI
Pink cerdo SNP2462	61	GAAGQSCWVPMDDQDFGPFLTERRSHCPFPKHFSSRSKDCPFTENTPLLGSFSQEEGSRCI
Pink Humano	114	PVYHPEFITAEESWEDSSADWERRYLLSREVSGLSASASSEKGDLLDSPHIRLRLSKLRR
Pink jabalí	121	PVYRPEFITADEPWENSSAEWEGGALLSTELAVSSGSASTEKGELLDSAHIRCHLSKLRC
Pink cerdo SNP272	121	PVYRPEFITADEPWENSSAEWEGGALLSTELAVSSGSASTEKGELLDSAHIRCHLSKLRC
Pink cerdo SNP510	121	PVY C PEFITADEPWENSSAEWEGGALLSTELAVSSGSASTEKGELLDSAHIRCHLSKLRC
Pink cerdo SNP511	121	PVY H PEFITADEPWENSSAEWEGGALLSTELAVSSGSASTEKGELLDSAHIRCHLSKLRC
Pink cerdo SNP794	121	PVYRPEFITADEPWENSSAEWEGGALLSTELAVSSGSASTEKGELLDSAHIRCHLSKLRC
Pink cerdo SNP1208	121	PVYRPEFITADEPWENSSAEWEGGALLSTELAVSSGSASTEKGELLDSAHIRCHLSKLRC
Pink cerdo SNP1666	121	PVYRPEFITADEPWENSSAEWEGGALLSTELAVSSGSASTEKGELLDSAHIRCHLSKLRC
Pink cerdo SNP1808	121	PVYRPEFITADEPWENSSAEWEGGALLSTELAVSSGSASTEKGELLDSAHIRCHLSKLRC
Pink cerdo SNP1858	121	PVYRPEFITADEPWENSSAEWEGGALLSTELAVSSGSASTEKGELLDSAHIRCHLSKLRC
Pink cerdo SNP2040	121	PVYRPEFITADEPWENSSAEWEGGALLSTELAVSSGSASTEKGELLDSAHIRCHLSKLRC
Pink cerdo SNP2462	121	PVYRPEFITADEPWENSSAEWEGGALLSTELAVSSGSASTEKGELLDSAHIRCHLSKLRC
Pink Humano	174	CVQWLKVMGLFAFVVLCSILFSLYPDQGKFWQLLAVSPLEYSYVNLSSHADSMLLQVDLA
Pink jabalí	181	CVQWLKVSGLFVFFVVLCSILFSLYPDQGKFWQLLAVSPLEYSYVNLSSHADSMLLQVDLA
Pink cerdo SNP272	181	CVQWLKVSGLFVFFVVLCSILFSLYPDQGKFWQLLAVSPLEYSYVNLSSHADSMLLQVDLA
Pink cerdo SNP510	181	CVQWLKVSGLFVFFVVLCSILFSLYPDQGKFWQLLAVSPLEYSYVNLSSHADSMLLQVDLA
Pink cerdo SNP511	181	CVQWLKVSGLFVFFVVLCSILFSLYPDQGKFWQLLAVSPLEYSYVNLSSHADSMLLQVDLA
Pink cerdo SNP794	181	CVQWLKVSGLFVFFVVLCSILFSLYPDQGKFWQLLAVSPLEYSYVNLSSHADSMLLQVDLA
Pink cerdo SNP1208	181	CVQWLKVSGLFVFFVVLCSILFSLYPDQGKFWQLLAVSPLEYSYVNLSSHADSMLLQVDLA
Pink cerdo SNP1666	181	CVQWLKVSGLFVFFVVLCSILFSLYPDQGKFWQLLAVSPLEYSYVNLSSHADSMLLQVDLA
Pink cerdo SNP1808	181	CVQWLKVSGLFVFFVVLCSILFSLYPDQGKFWQLLAVSPLEYSYVNLSSHADSMLLQVDLA
Pink cerdo SNP1858	181	CVQWLKVSGLFVFFVVLCSILFSLYPDQGKFWQLLAVSPLEYSYVNLSSHADSMLLQVDLA
Pink cerdo SNP2040	181	CVQWLKVSGLFVFFVVLCSILFSLYPDQGKFWQLLAVSPLEYSYVNLSSHADSMLLQVDLA
Pink cerdo SNP2462	181	CVQWLKVSGLFVFFVVLCSILFSLYPDQGKFWQLLAVSPLEYSYVNLSSHADSMLLQVDLA
Pink Humano	234	GALVASGSPSRPGREEHIVVELTQDDALGSRWRRPQQVTHNWTIYFLNPSGGEHTVMSRTFE
Pink jabalí	241	GALVASGPSHLGKEEHVAVEVTQANAPGSRRRRPQQVTHNWTIYFLNPSGGEHTVMSRTFE
Pink cerdo SNP272	241	GALVASGPSHLGKEEHVAVEVTQANAPGSRRRRPQQVTHNWTIYFLNPSGGEHTVMSRTFE
Pink cerdo SNP510	241	GALVASGPSHLGKEEHVAVEVTQANAPGSRRRRPQQVTHNWTIYFLNPSGGEHTVMSRTFE
Pink cerdo SNP511	241	GALVASGPSHLGKEEHVAVEVTQANAPGSRRRRPQQVTHNWTIYFLNPSGGEHTVMSRTFE
Pink cerdo SNP794	241	GALVASGPSHLGKEEHVAVEVTQANAPGSRRRRPQQVTHNWTIYFLNPSGGEHTVMSRTFE
Pink cerdo SNP1208	241	GALVASGPSHLGKEEHVAVEVTQANAPGSRRRRPQQVTHNWTIYFLNPSGGEHTVMSRTFE
Pink cerdo SNP1666	241	GALVASGPSHLGKEEHVAVEVTQANAPGSRRRRPQQVTHNWTIYFLNPSGGEHTVMSRTFE
Pink cerdo SNP1808	241	GALVASGPSHLGKEEHVAVEVTQANAPGSRRRRPQQVTHNWTIYFLNPSGGEHTVMSRTFE
Pink cerdo SNP1858	241	GALVASGPSHLGKEEHVAVEVTQANAPGSRRRRPQQVTHNWTIYFLNPSGGEHTVMSRTFE
Pink cerdo SNP2040	241	GALVASGPSHLGKEEHVAVEVTQANAPGSRRRRPQQVTHNWTIYFLNPSGGEHTVMSRTFE
Pink cerdo SNP2462	241	GALVASGPSHLGKEEHVAVEVTQANAPGSRRRRPQQVTHNWTIYFLNPSGGEHTVMSRTFE

Pink Humano 294 VLTRETVSISIRASLQQTQAVPLLMHQYLRGSVETQVTIATAILAGVYALIIIFEIVHRT
 Pink jabalí 301 VLSREPVSINIRASLQQTQIVPLLMAHQYLRASIEAQVTIAAVILAGVYVLIIFEIVHRT
 Pink cerdo SNP272 301 VLSREPVSINIRASLQQTQIVPLLMAHQYLRASIEAQVTIAAVILAGVYVLIIFEIVHRT
 Pink cerdo SNP510 301 VLSREPVSINIRASLQQTQIVPLLMAHQYLRASIEAQVTIAAVILAGVYVLIIFEIVHRT
 Pink cerdo SNP511 301 VLSREPVSINIRASLQQTQIVPLLMAHQYLRASIEAQVTIAAVILAGVYVLIIFEIVHRT
 Pink cerdo SNP794 301 VLSREPVSINIRASLQQTQIVPLLMAHQYLRASIEAQVTIAAVILAGVYVLIIFEIVHRT
 Pink cerdo SNP1208 301 VLSREPVSINIRASLQQTQIVPLLMAHQYLRASIEAQVTIAAVILAGVYVLIIFEIVHRT
 Pink cerdo SNP1666 301 VLSREPVSINIRASLQQTQIVPLLMAHQYLRASIEAQVTIAAVILAGVYVLIIFEIVHRT
 Pink cerdo SNP1808 301 VLSREPVSINIRASLQQTQIVPLLMAHQYLRASIEAQVTIAAVILAGVYVLIIFEIVHRT
 Pink cerdo SNP1858 301 VLSREPVSINIRASLQQTQIVPLLMAHQYLRASIEAQVTIAAVILAGVYVLIIFEIVHRT
 Pink cerdo SNP2040 301 VLSREPVSINIRASLQQTQIVPLLMAHQYLRASIEAQVTIAAVILAGVYVLIIFEIVHRT
 Pink cerdo SNP2462 301 VLSREPVSINIRASLQQTQIVPLLMAHQYLRASIEAQVTIAAVILAGVYVLIIFEIVHRT

Pink Humano 354 LAAMLGSLAALAALAVIGDRPSLTHVVEWIDFETLALLFGMMILVAIFSETGFFDYCAVK
 Pink jabalí 361 LAAMLGSLAALAALAVIGDRPTLTQVVEWIDFETLALLFGMMILVAIFSETGFFDYCAVK
 Pink cerdo SNP272 361 LAAMLGSLAALAALAVIGDRPTLTQVVEWIDFETLALLFGMMILVAIFSETGFFDYCAVK
 Pink cerdo SNP510 361 LAAMLGSLAALAALAVIGDRPTLTQVVEWIDFETLALLFGMMILVAIFSETGFFDYCAVK
 Pink cerdo SNP511 361 LAAMLGSLAALAALAVIGDRPTLTQVVEWIDFETLALLFGMMILVAIFSETGFFDYCAVK
 Pink cerdo SNP794 361 LAAMLGSLAALAALAVIGDRPTLTQVVEWIDFETLALLFGMMILVAIFSETGFFDYCAVK
 Pink cerdo SNP1208 361 LAAMLGSLAALAALAVIGDRPTLTQVVEWIDFETLALLFGMMILVAIFSETGFFDYCAVK
 Pink cerdo SNP1666 361 LAAMLGSLAALAALAVIGDRPTLTQVVEWIDFETLALLFGMMILVAIFSETGFFDYCAVK
 Pink cerdo SNP1808 361 LAAMLGSLAALAALAVIGDRPTLTQVVEWIDFETLALLFGMMILVAIFSETGFFDYCAVK
 Pink cerdo SNP1858 361 LAAMLGSLAALAALAVIGDRPTLTQVVEWIDFETLALLFGMMILVAIFSETGFFDYCAVK
 Pink cerdo SNP2040 361 LAAMLGSLAALAALAVIGDRPTLTQVVEWIDFETLALLFGMMILVAIFSETGFFDYCAVK
 Pink cerdo SNP2462 361 LAAMLGSLAALAALAVIGDRPTLTQVVEWIDFETLALLFGMMILVAIFSETGFFDYCAVK

Pink Humano 414 AYQLSRGRVWAMIIMLCLIAAVLSAFLDNVTTMLLFTPVVIRLCEVLNLDPRQVLI AEVI
 Pink jabalí 421 AYQLSRGRVWAMIIMLCLIAAVLSAFLDNVTTALLFTPVVIRLCEVLNLDPRQVLI AEVI
 Pink cerdo SNP272 421 AYQLSRGRVWAMIIMLCLIAAVLSAFLDNVTTALLFTPVVIRLCEVLNLDPRQVLI AEVI
 Pink cerdo SNP510 421 AYQLSRGRVWAMIIMLCLIAAVLSAFLDNVTTALLFTPVVIRLCEVLNLDPRQVLI AEVI
 Pink cerdo SNP511 421 AYQLSRGRVWAMIIMLCLIAAVLSAFLDNVTTALLFTPVVIRLCEVLNLDPRQVLI AEVI
 Pink cerdo SNP794 421 AYQLSRGRVWAMIIMLCLIAAVLSAFLDNVTTALLFTPVVIRLCEVLNLDPRQVLI AEVI
 Pink cerdo SNP1208 421 AYQLSRGRVWAMIIMLCLIAAVLSAFLDNVTTALLFTPVVIRLCEVLNLDPRQVLI AEVI
 Pink cerdo SNP1666 421 AYQLSRGRVWAMIIMLCLIAAVLSAFLDNVTTALLFTPVVIRLCEVLNLDPRQVLI AEVI
 Pink cerdo SNP1808 421 AYQLSRGRVWAMIIMLCLIAAVLSAFLDNVTTALLFTPVVIRLCEVLNLDPRQVLI AEVI
 Pink cerdo SNP1858 421 AYQLSRGRVWAMIIMLCLIAAVLSAFLDNVTTALLFTPVVIRLCEVLNLDPRQVLI AEVI
 Pink cerdo SNP2040 421 AYQLSRGRVWAMIIMLCLIAAVLSAFLDNVTTALLFTPVVIRLCEVLNLDPRQVLI AEVI
 Pink cerdo SNP2462 421 AYQLSRGRVWAMIIMLCLIAAVLSAFLDNVTTALLFTPVVIRLCEVLNLDPRQVLI AEVI

Pink Humano 474 FTNIGGAATAIGDPPNVIIVSNQELRKNGLDFAGFTAHMFIGICLVLLVCFPLLRLLLYWN
 Pink jabalí 481 FTNIGGAATAIGDPPNVIIVSNQELRKNGLDFAGFTAHMFIGICVLLFSFPLLRLLLYWN
 Pink cerdo SNP272 481 FTNIGGAATAIGDPPNVIIVSNQELRKNGLDFAGFTAHMFIGICVLLFSFPLLRLLLYWN
 Pink cerdo SNP510 481 FTNIGGAATAIGDPPNVIIVSNQELRKNGLDFAGFTAHMFIGICVLLFSFPLLRLLLYWN
 Pink cerdo SNP511 481 FTNIGGAATAIGDPPNVIIVSNQELRKNGLDFAGFTAHMFIGICVLLFSFPLLRLLLYWN
 Pink cerdo SNP794 481 FTNIGGAATAIGDPPNVIIVSNQELRKNGLDFAGFTAHMFIGICVLLFSFPLLRLLLYWN
 Pink cerdo SNP1208 481 FTNIGGAATAIGDPPNVIIVSNQELRKNGLDFAGFTAHMFIGICVLLFSFPLLRLLLYWN
 Pink cerdo SNP1666 481 FTNIGGAATAIGDPPNVIIVSNQELRKNGLDFAGFTAHMFIGICVLLFSFPLLRLLLYWN
 Pink cerdo SNP1808 481 FTNIGGAATAIGDPPNVIIVSNQELRKNGLDFAGFTAHMFIGICVLLFSFPLLRLLLYWN
 Pink cerdo SNP1858 481 FTNIGGAATAIGDPPNVIIVSNQELRKNGLDFAGFTAHMFIGICVLLFSFPLLRLLLYWN
 Pink cerdo SNP2040 481 FTNIGGAATAIGDPPNVIIVSNQELRKNGLDFAGFTAHMFIGICVLLFSFPLLRLLLYWN
 Pink cerdo SNP2462 481 FTNIGGAATAIGDPPNVIIVSNQELRKNGLDFAGFTAHMFIGICVLLFSFPLLRLLLYWN

Pink Humano 534 RKLYNKEPSEIVELKHEIHVWRLTAQRISPASREETAVRGLLLEKVLSELERLLARRLHSF
 Pink jabalí 541 RKLYNKEPSEIVELKHEIHVWRLTAQRISPASREETAVRGLLLEKVLSELERLLARRLHSF
 Pink cerdo SNP272 541 RKLYNKEPSEIVELKHEIHVWRLTAQRISPASREETAVRGLLLEKVLSELERLLARRLHSF
 Pink cerdo SNP510 541 RKLYNKEPSEIVELKHEIHVWRLTAQRISPASREETAVRGLLLEKVLSELERLLARRLHSF
 Pink cerdo SNP511 541 RKLYNKEPSEIVELKHEIHVWRLTAQRISPASREETAVRGLLLEKVLSELERLLARRLHSF
 Pink cerdo SNP794 541 RKLYNKEPSEIVELKHEIHVWRLTAQRISPASREETAVRGLLLEKVLSELERLLARRLHSF
 Pink cerdo SNP1208 541 RKLYNKEPSEIVELKHEIHVWRLTAQRISPASREETAVRGLLLEKVLSELERLLARRLHSF
 Pink cerdo SNP1666 541 RKLYNKEPSEIVELKHEIHVWRLTAQRISPASREETAVRGLLLEKVLSELERLLARRLHSF
 Pink cerdo SNP1808 541 RKLYNKEPSEIVELKHEIHVWRLTAQRISPASREETAVRGLLLEKVLSELERLLARRLHSF
 Pink cerdo SNP1858 541 RKLYNKEPSEIVELKHEIHVWRLTAQRISPASREETAVRGLLLEKVLSELERLLARRLHSF
 Pink cerdo SNP2040 541 RKLYNKEPSEIVELKHEIHVWRLTAQRISPASREETAVRGLLLEKVLSELERLLARRLHSF
 Pink cerdo SNP2462 541 RKLYNKEPSEIVELKHEIHVWRLTAQRISPASREETAVRGLLLEKVLSELERLLARRLHSF

Pink Humano	594	HRQISQEDKNWETNIQELQKKHRISDGI	LAKCLTVLGFVIFMFFLNSFVPGIHLDLGWI
Pink jabalí	601	HRQISQEDKNWETNIQELQKKHRISDR	TLLTKCLTVLGLVIFMFFLNSFVPGVHLDLGWI
Pink cerdo SNP272	601	HRQISQEDKNWETNIQELQKKHRISDR	TLLTKCLTVLGLVIFMFFLNSFVPGVHLDLGWI
Pink cerdo SNP510	601	HRQISQEDKNWETNIQELQKKHRISDR	TLLTKCLTVLGLVIFMFFLNSFVPGVHLDLGWI
Pink cerdo SNP511	601	HRQISQEDKNWETNIQELQKKHRISDR	TLLTKCLTVLGLVIFMFFLNSFVPGVHLDLGWI
Pink cerdo SNP794	601	HRQISQEDKNWETNIQELQKKHRISDR	TLLTKCLTVLGLVIFMFFLNSFVPGVHLDLGWI
Pink cerdo SNP1208	601	HRQISQEDKNWETNIQELQKKHRISDR	TLLTKCLTVLGLVIFMFFLNSFVPGVHLDLGWI
Pink cerdo SNP1666	601	HRQISQEDKNWETNIQELQKKHRISDR	TLLTKCLTVLGLVIFMFFLNSFVPGVHLDLGWI
Pink cerdo SNP1808	601	HRQISQEDKNWETNIQELQKKHRISDR	TLLTKCLTVLGLVIFMFFLNSFVPGVHLDLGWI
Pink cerdo SNP1858	601	HRQISQEDKNWETNIQELQKKHRISDR	TLLTKCLTVLGLVIFMFFLNSFVPGVHLDLGWI
Pink cerdo SNP2040	601	HRQISQEDKNWETNIQELQKKHRISDR	TLLTKCLTVLGLVIFMFFLNSFVPGVHLDLGWI
Pink cerdo SNP2462	601	HRQISQEDKNWETNIQELQKKHRISDR	TLLTKCLTVLGLVIFMFFLNSFVPGVHLDLGWI

Pink Humano	654	AILGAIWLLILADIHFEEILHRVEWATLL	FFAALFVLM EAL AHLHLIEYVGEQTALLIK
Pink jabalí	661	AILGAIWLLILADIHFEEILHRVEWATLL	FFAALFILMEAL AHLHLIEYVGEQTALLIK
Pink cerdo SNP272	661	AILGAIWLLILADIHFEEILHRVEWATLL	FFAALFILMEAL AHLHLIEYVGEQTALLIK
Pink cerdo SNP510	661	AILGAIWLLILADIHFEEILHRVEWATLL	FFAALFILMEAL AHLHLIEYVGEQTALLIK
Pink cerdo SNP511	661	AILGAIWLLILADIHFEEILHRVEWATLL	FFAALFILMEAL AHLHLIEYVGEQTALLIK
Pink cerdo SNP794	661	AILGAIWLLILADIHFEEILHRVEWATLL	FFAALFILMEAL AHLHLIEYVGEQTALLIK
Pink cerdo SNP1208	661	AILGAIWLLILADIHFEEILHRVEWATLL	FFAALFILMEAL AHLHLIEYVGEQTALLIK
Pink cerdo SNP1666	661	AILGAIWLLILADIHFEEILHRVEWATLL	FFAALFILMEAL AHLHLIEYVGEQTALLIK
Pink cerdo SNP1808	661	AILGAIWLLILADIHFEEILHRVEWATLL	FFAALFILMEAL AHLHLIEYVGEQTALLIK
Pink cerdo SNP1858	661	AILGAIWLLILADIHFEEILHRVEWATLL	FFAALFILMEAL AHLHLIEYVGEQTALLIK
Pink cerdo SNP2040	661	AILGAIWLLILADIHFEEILHRVEWATLL	FFAALFILMEAL AHLHLIEYVGEQTALLIK
Pink cerdo SNP2462	661	AILGAIWLLILADIHFEEILHRVEWATLL	FFAALFILMEAL AHLHLIEYVGEQTALLIK

Pink Humano	714	MVPEEQRLIAAIVLVVWVSALASSLIDNIP	FTATMIPVLLNLSHDPEVGLPAPPLMYALA
Pink jabalí	721	MVPEDQRLAAAIVVVVWSAIASSLIDNIP	FTATMIPVLLNLSRDPEISLPAPPLMYALA
Pink cerdo SNP272	721	MVPEDQRLAAAIVVVVWSAIASSLIDNIP	FTATMIPVLLNLSRDPEISLPAPPLMYALA
Pink cerdo SNP510	721	MVPEDQRLAAAIVVVVWSAIASSLIDNIP	FTATMIPVLLNLSRDPEISLPAPPLMYALA
Pink cerdo SNP511	721	MVPEDQRLAAAIVVVVWSAIASSLIDNIP	FTATMIPVLLNLSRDPEISLPAPPLMYALA
Pink cerdo SNP794	721	MVPEDQRLAAAIVVVVWSAIASSLIDNIP	FTATMIPVLLNLSRDPEISLPAPPLMYALA
Pink cerdo SNP1208	721	MVPEDQRLAAAIVVVVWSAIASSLIDNIP	FTATMIPVLLNLSRDPEISLPAPPLMYALA
Pink cerdo SNP1666	721	MVPEDQRLAAAIVVVVWSAIASSLIDNIP	FTATMIPVLLNLSRDPEISLPAPPLMYALA
Pink cerdo SNP1808	721	MVPEDQRLAAAIVVVVWSAIASSLIDNIP	FTATMIPVLLNLSRDPEISLPAPPLMYALA
Pink cerdo SNP1858	721	MVPEDQRLAAAIVVVVWSAIASSLIDNIP	FTATMIPVLLNLSRDPEISLPAPPLMYALA
Pink cerdo SNP2040	721	MVPEDQRLAAAIVVVVWSAIASSLIDNIP	FTATMIPVLLNLSRDPEISLPAPPLMYALA
Pink cerdo SNP2462	721	MVPEDQRLAAAIVVVVWSAIASSLIDNIP	FTATMIPVLLNLSRDPEISLPAPPLMYALA

Pink Humano	774	FGACLGGNGTLIGASANVVCAGIAEQHGYG	FSFMEFFRLGFPMMVVSCVMGMYLLVAHV
Pink jabalí	781	LGACLGGNGTLIGASANVVCAGIAEQHGYG	FSFMEFFRLGFPMMVVSCVMGMYLLVAHV
Pink cerdo SNP272	781	LGACLGGNGTLIGASANVVCAGIAEQHGYG	FSFMEFFRLGFPMMVVSCVMGMYLLVAHV
Pink cerdo SNP510	781	LGACLGGNGTLIGASANVVCAGIAEQHGYG	FSFMEFFRLGFPMMVVSCVMGMYLLVAHV
Pink cerdo SNP511	781	LGACLGGNGTLIGASANVVCAGIAEQHGYG	FSFMEFFRLGFPMMVVSCVMGMYLLVAHV
Pink cerdo SNP794	781	LGACLGGNGTLIGASANVVCAGIAEQHGYG	FSFMEFFRLGFPMMVVSCVMGMYLLVAHV
Pink cerdo SNP1208	781	LGACLGGNGTLIGASANVVCAGIAEQHGYG	FSFMEFFRLGFPMMVVSCVMGMYLLVAHV
Pink cerdo SNP1666	781	LGACLGGNGTLIGASANVVCAGIAEQHGYG	FSFMEFFRLGFPMMVVSCVMGMYLLVAHV
Pink cerdo SNP1808	781	LGACLGGNGTLIGASANVVCAGIAEQHGYG	FSFMEFFRLGFPMMVVSCVMGMYLLVAHV
Pink cerdo SNP1858	781	LGACLGGNGTLIGASANVVCAGIAEQHGYG	FSFMEFFRLGFPMMVVSCVMGMYLLVAHV
Pink cerdo SNP2040	781	LGACLGGNGTLIGASANVVCAGIAEQHGYG	FSFMEFFRLGFPMMVVSCVMGMYLLVAHV
Pink cerdo SNP2462	781	LGACLGGNGTLIGASANVVCAGIAEQHGYG	FSFMEFFRLGFPMMVVSCVMGMYLLVAHV

Pink Humano	834	VVGWN
Pink jabalí	841	VMGWN
Pink cerdo SNP272	841	VMGWN
Pink cerdo SNP510	841	VMGWN
Pink cerdo SNP511	841	VMGWN
Pink cerdo SNP794	841	VMGWN
Pink cerdo SNP1208	841	VMGWN
Pink cerdo SNP1666	841	VMGWN
Pink cerdo SNP1808	841	VMGWN
Pink cerdo SNP1858	841	VMGWN
Pink cerdo SNP2040	841	VMGWN
Pink cerdo SNP2462	841	VMGWN

- Diferencias humano-cerdo
- Aminoácidos extra en cerdo,
- Polimorfismos en cerdo

Proteína Pink SNP posición 1666

Conf: 955677765478763000000257876665642124422466546777788787766665
 Pred: CCCCCCCCCCCCCCCC**EEE**CCCCCCCCCCCCCCCC**EEEE**CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
 AA: MRLENREGRPTSGVLEMELPQASAPSRAGLGLVGLDSSNHRPQQGGSKAGSRGPYLS
 10 20 30 40 50 60

Conf: 346762105776403566533677676532123445665345676123443455225200
 Pred: CCCCC**EE**CCCC**TTTT**CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC**TTTTTTTT**CCC**EE**
 AA: GAAGQSCWVPMQDFGPFLLTERRSHCFPKHFSRSKDPCTENTPLLGSFSQEEGSRCI
 70 80 90 100 110 120

Conf: 000542230466545441245402011000011223443211113366125678899999
 Pred: **EEE**CC**EE**CCCCCCCC**TTTT**CC**EEEE**CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC**TTTTTTTTTTTT**
 AA: PVYRPEFITADEPWENSSAEWEGGALLSTELAVSSGSASTEKGELLDSAHIRCHLSKLR
 130 140 150 160 170 180

Conf: 999999887788999877654020562031124200788722465346875127999831
 Pred: **TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT****EE**CCCC**TTTT**CCCC**EEEE**CCCCCCCC**EEEEEEEE**
 AA: CVQWLKVSGLFVFLCSILFSLYPDQKFWQLLAVSPLESYSVNLSSHADSMMLLQVDLA
 190 200 210 220 230 240

Conf: 033304688887204788999843688765335554023157753378630477425089
 Pred: **EEE**CCCCCCCC**EEEEEEEE**CCCCCCCCCCCC**EEEEEEEE**CCCC**EEEE**CCC**EE**
 AA: GALVASGPSHLGKEEHVAVEVTQANAPGSRRRRPQQVTHNWTIFLNPSGGEHTVMSRTFE
 250 260 270 280 290 300

Conf: 974277168987200224771256654320575314789999999999998874023214
 Pred: **EEE**CC**EEEE**CCCCCCCC**EEEEEEEE**CCCC**TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT**CCCC**TT**
 AA: VLSREPVSINIRASLQQTQIVPLLMHQYLRASIEAQVTIAAVILAGVYVLIIFEIVHRT
 310 320 330 340 350 360

Conf: 89999999999999971699888899753681489999999999999845878999999
 Pred: **TTTTTTTTTTTTTTTT**CCCC**TTTT**CC**TTTTTTTTTTTTTTTT**CC**TTTTTTTT**
 AA: LAAMLGSLAALAAVIGDRPTLTQVVEWIDFETLALLFGMMILVAIFSETGFFDYCAVK
 370 380 390 400 410 420

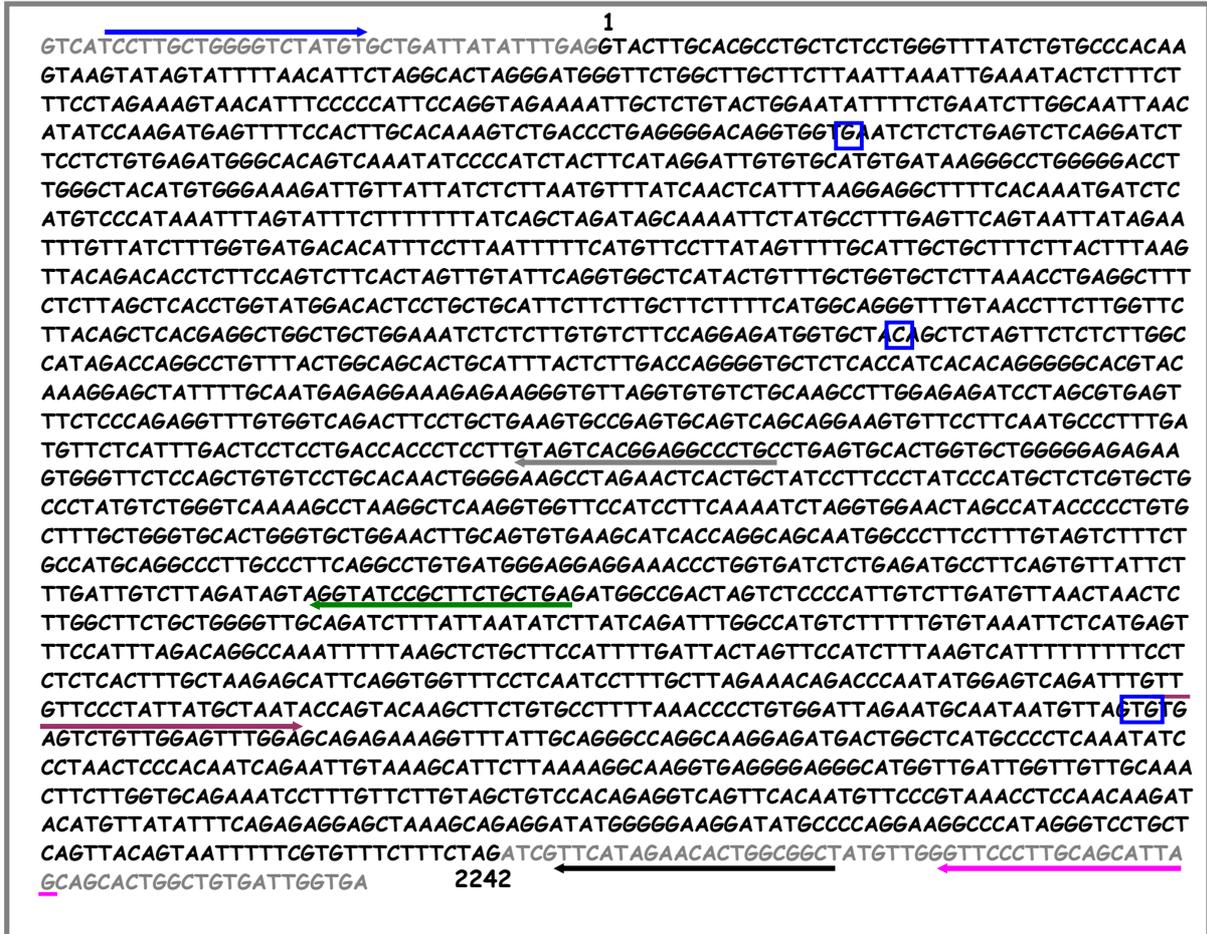
Conf: 98750796167788999999999988531678999999999999638961477789999
 Pred: **TTTT**CC**TT**CCC**TTTTTTTT**
 AA: AYQLSRGRVWAMIIMLCLIAAVLSAFLDNVTTALLFTPVTIRLCEVLNLDPRQVLI AEVI
 430 440 450 460 470 480

Conf: 97667676314765463322036413246304677888789999999999999998630
 Pred: **TTTTTTTT**CC**TTTT**CCCC**EEE**CCCC**TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT**
 AA: FTNIGGAATAIGDPPNVIIVSNQELRKMDLDFAGFTAHMFAVICFVLLFSFPLLRLLLYWN
 490 500 510 520 530 540

Conf: 13578884078888998765410032389874135789999887876666641257876
 Pred: CCCCC**TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT**CCCC**TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT**CCCC
 AA: RKLYNKEPSEIVELKHEIHVWRLTAQRISPASREETA VRGLLLEKVL SLERLLARRLHSF
 550 560 570 580 590 600



Secuencia obtenida para el intón 9 del gen *P*, localizando los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación y detección de polimorfismos.



En letra negra aparece representada la secuencia intrónica obtenida y las regiones exónicas adyacentes aparecen con color gris

- Pex9F
 - Pex10R
 - Pin9F
 - Pex10RII
 - Pin9R
 - Pin9RII
- Posiciones polimórficas

Secuencias de oligonucleótidos para el gen *Pink*

P1F: 5'-CTGTTTGGCATGATGATCTTAGTAG -3'

P1R: 5'-GGCAGCTCCTCCAATGTT -3'

P2F: 5'-CGGCGGCCACAGCAGGTC -3'

P2R: 5'-GGCCAGCGTCTCAAAATCAA -3'

P3F: 5'-AACCTCGATCCAAGACAAGT -3'

P3R: 5'-AAGATGAATGCCAGGGACAA -3'

P4F: 5'-AATATCCAGGAGCTACAGAAAAAG -3'

P4R: 5'-TGCCTCCATCAGAACAAAGA -3'

P5F: 5'-GCCTGTTTGCCTTTGTGGT -3'

P5R: 5'-ATAGACCCAGCAAGGATG -3'

P6F: 5'-GAGTAGAATGGGCGACCCTTCTGT -3'

P6R: 5'-AAGCCCAGCCTGAAAAATTCCATG -3'

P7F: 5'-GAAAGGGTCACGGTGCATACCTGT -3'

P7R: 5'-CAGCCAACAACCTGCCAGAACTTTC -3'

Pex4F: 5'-GTCACGGTGCATACCTGTT -3'

Pex4R: 5'-AGCTCCCCCTTCTCTGTGG -3'

Pex13F: 5'-CCCGGGGAAGAGTGTGG -3'

Pex13R: 5'-GGAGTGAAGAGGAGTGCCGTGGTA -3'

Pex16F: 5'-AGATCCACGTCTGGCGCTTACTG -3'

Pex16R: 5'-AGGCGCTCCAGTGACAGCACCTT -3'

Pex18F: 5'-CACAGGATATCAGACAGGACT -3'

Pex18R: 5'-AAGATGAATGCCAGGGACAA -3'

Pex23F: 5'-TCCTGTTGCTCCTGAACTTAA -3'

Pex23R: 5'-AGGGCCAGGGCGTACAT -3'

Pex9F: 5'-ATCCTTGCTGGGGTCTATGT -3'

Pex10R: 5' -AGCCGCCAGTGTTCATGA -3'

Pin9F: 5' -TAAACCTCCAACAAGATACA -3'

Pin9R: 5' -CTCAGCAGAAGCGGATACC -3'

Pin9RII: 5' -GCAGGGCCTCCGTGACTACAAG -3'

Pex10RII: 5' -GCTAATGCTGCAAGGGAACC -3'

P-5' RACE R/Pe5' R: 5' -TCCCACTCAGCTGAGGCTGTTCTCCCAAG -3'

Pe5' F: 5' -GTGAGAAGAGTGGCAACAGAAACA -3'

P-3' RACE F: 5' -TGCAGGAATTGCAGAGCAGCATGGA -3'

P-3' RACE 2F: 5' -TGCAAGATAGCCAAGATTCTAAA -3'

Pe3' F: 5' -ATGGATATGGATTCTCTTT -3'

Pe3' R: 5' -CATTTGTGTCTTTTCTAC -3'

PCR-Cf: 5' -GTGCCTTTTAAACCCCTGTGGATTAGAATGCAATAATGTTAGC -3'

PCR-Tf: 5' -GTGCCTTTTAAACCCCTGTGGATTAGAATGCAATAATGTTACT-5'

PCR-r: 5' -ACTCCCCTCCCGTACCAACTAA -3'

ÍNDICE DE FIGURAS

I-2A-01D A1D H-03240

	Página
Figura 1	Jabalí.....2
Figura 2	Large Black.....3
Figura 3	Tamworth.....3
Figura 4	Pietrain.....4
Figura 5	Hampshire.....5
Figura 6	Berkshire.....5
Figura 7	Landrace.....6
Figura 8	Mangalitza.....6
Figura 9	Esquema del proceso de biosíntesis de los principales pigmentos en mamíferos.....8
Figura 10	Patrones del color de la capa en algunas razas puras y sus cruces.....10
Figura 11	Mapas de ligamiento y citogenético del SSC6.....15
Figura 12	Mapa citogenético del SSC17.....20
Figura 13	Mapa citogenético del SSC15.....22
Figura 14	Nº alelos esperado de las estirpes fundadoras en Torbiscal.....30
Figura 15	Nº alelos esperado con los que contribuye cada fundador en cada uno de los cohortes establecidos para la línea Guadyervas.....31
Figura 16	Cerdo ibérico con capa negra (Guadyervas).....32
Figura 17	Cerdo ibérico con capa colorada (Torbiscal).....32
Figura 18	Cerdo ibérico con capa retinta (Torbiscal).....32
Figura 19	Cerdo con capa manchada (Manchado de Jabugo).....32
Figura 20	Esquema de formación de las razas porcinas actuales.....41
Figura 21	Patrón electroforético resultado de las extracciones de ARN de muestras de piel.....45
Figura 22	Panel de células híbridas somáticas.....53
Figura 23	Método FISH.....53
Figura 24	Construcción de un mapa de ligamiento a partir de una familia grande con genealogía conocida.....54

	Página
Figura 25	Criterio para la determinación de los haplotipos del gen <i>MC1R</i>65
Figura 26	Patrón electroforético del RFLP <i>BstU</i> I para los SNPs localizados en las posiciones 1554 y 1556 del gen <i>MC1R</i>66
Figura 27	Patrón electroforético del RFLP <i>Nsp</i> I para el SNP localizado en la posición 1110 del gen <i>MC1R</i>67
Figura 28	Patrón electroforético del RFLP <i>BspH</i> I para el SNP localizado en posición 1197 del gen <i>MC1R</i>68
Figura 29	Electroferogramas obtenidos para la inserción –CC – en posición 896 del gen <i>MC1R</i>69
Figura 30	Patrón electroforético para el SSCP en posición 668 del gen <i>MC1R</i>72
Figura 31	Predicción de dominios (SMART) para la proteína MC1R.....74
Figura 32	Patrón electroforético para el RFLP <i>Aci</i> I del SNP localizado en posición 41 del tercer exón del gen <i>Agouti</i>83
Figura 33	Electroferogramas obtenidos para la inserción –C – en el nucleótido 67 del primer intrón del gen <i>Agouti</i>86
Figura 34	Esquema de secuenciación del intrón 9 del gen <i>P</i>95
Figura 35	Alineamiento comparativo de la secuencia nucleotídica del ADNc del gen <i>P</i> de cerdo con las secuencias en la especie humana y ratón.....97
Figura 36	Predicción de dominios (SMART) para la proteína P porcina.....98
Figura 37	Alineamiento comparado de la secuencia aminoacídica de la proteína P porcina con las secuencias de la especie humana y ratón.....98
Figura 38	Patrón electroforético para el SSCP localizado en posición 510 del exón 4 del gen <i>P</i>104
Figura 39	Cromatogramas obtenidos de la secuenciación del fragmento que contiene el SNP en posición 511 del exón 4 del gen <i>P</i>106
Figura 40	Patrón electroforético para el RFLP <i>Dpn</i> II para el SNP localizado en posición 1208 del exón 10 del gen <i>P</i>108

	Página
Figura 41	Patrón electroforético para el RFLP <i>BstU</i> I para el SNP localizado en posición 1858 del exón 16 del gen <i>P</i>111
Figura 42	Patrón electroforético para el RFLP <i>Tsp45</i> I para el SNP localizado en posición 2040 del exón 18 del gen <i>P</i>113
Figura 43	Patrón electroforético para el RFLP <i>Aci</i> I para el SNP localizado en posición 2462 del exón 23 del gen <i>P</i>115
Figura 44	Patrón electroforético para el RFLP <i>Tfi</i> I para el SNP localizado en posición 293 del intrón 9 del gen <i>P</i>118
Figura 45	Cromatogramas obtenidos de la secuenciación del fragmento que contiene el SNP en posición 856 del intrón 9 del gen <i>P</i>120
Figura 46	Patrón electroforético para la PCR alelo- específica para el SNP localizado en posición 1920 del intrón 9 del gen <i>P</i>121
Figura 47	Patrón electroforético de la PCR diseñada para el IMpR.....127
Figura 48	Mapa físico del SSC15, localización física del gen <i>P</i>127
Figura 49	Mapa de ligamiento disponible para el cromosoma SSC15 porcino....128
Figura 50	Mapa genético promedio para ambos sexos del SSC15, localización genética del gen <i>P</i>129
Figura 51	Mapa comparativo del cromosoma 15 humano.....130
Figura 52	Mapa comparativo del cromosoma 15 porcino.....130
Figura 53	Mapa comparativo del cromosoma Hsap 15 con el cromosoma Sscr 15, estableciendo la nueva región de homología (por la presencia de gen <i>P</i>) entre humano y cerdo.....131
Figura 54	Gráficos resultado del genotipado de los 199 animales de la línea Torbiscal para los cuatro polimorfismos analizados.....133
Figura 55	Esquema del proceso de biosíntesis de pigmentos, relación entre los genes <i>MC1R</i> y <i>Pink</i>141

	Página
Figura 56	Patrón electroforético para el RFLP <i>BstU</i> I, utilizado para la discriminación del alelo <i>MC1R*4</i> , característico de la raza Duroc, en muestras de jamón curado.....144
Figura 57	Patrón electroforético para el RFLP <i>Aci</i> I, utilizado para la discriminación de la mutación característica de la raza Duroc, en muestras de jamón curado.....145
Figura 58	Electroferogramas de animales Duroc e Ibéricos mostrando un marcador diagnóstico AFLP.....146
Figura 59	Electroferogramas de los genotipos de animales Duroc e Ibéricos para el alelo marcador del microsatélite <i>sw413</i>146
Figura 60	Mapa de ligamiento del SSC6 con siete microsatélites.....152
Figura 61	Representación gráfica del contenido informativo aportado por los marcadores a lo largo del SSC6 porcino.....155
Figura 62	Nuevo mapa de ligamiento promedio de ambos sexos para el SSC6, incorporando el marcador <i>MC1R</i>155
Figura 63	Mapas de ligamiento publicados para el SSC6.....156
Figura 64	Representación gráfica de los valores de F para los cinco caracteres analizados a lo largo del SSC6.....159
Figura 65	Representación gráfica de los valores estadísticos para los caracteres ácido palmitoleico y ácido esteárico a lo largo del cromosoma 6 para el test de QTL con efectos pleiotrópicos frente al modelo sin QTL.....163
Figura 66	Esquema de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos.....166

	Página
Tabla 1	Alelos descritos por análisis de segregación para el locus <i>Extensión</i>14
Tabla 2	Diferenciación de los alelos determinantes del color para el locus <i>Extensión</i>15
Tabla 3	Mutaciones detectadas en el análisis de la secuencia de 758 pb del exón del gen <i>MC1R</i>17
Tabla 4	Alelos descritos para el locus <i>Extensión</i> y sus correspondientes en el gen <i>MC1R</i> en distintas razas porcinas analizadas.....17
Tabla 5	Nueva mutación descrita para el alelo <i>MC1R</i> *5 comparada con los alelos <i>MC1R</i> *1 y <i>MC1R</i> *2.....18
Tabla 6	Posiciones polimórficas detectadas para el gen <i>Agouti</i>20
Tabla 7	Descripción de los alelos del locus <i>KIT</i> según el nº de copias del gen y mutaciones.....24
Tabla 8	Información genealógica: fundadores, cohortes y reproductores que contribuyen a la formación de la línea Torbiscal.....29
Tabla 9	Información genealógica: fundadores, cohortes y reproductores que contribuyen a la formación de la línea Guadyerbas.....30
Tabla 10	Funciones de mapeo mas usadas.....54
Tabla 11	Condiciones de amplificación de cinco fragmentos amplificados del gen <i>MC1R</i>57
Tabla 12	Polimorfismos y haplotipos detectados para el gen <i>MC1R</i> en los 26 animales analizados.....58
Tabla 13	Características de las reacciones de digestión para el genotipado por PCR-RFLP de lo polimorfismos del gen <i>MC1R</i>63
Tabla 14	Resultado del genotipado de los haplotipos del gen <i>MC1R</i> en poblaciones de cerdo.....70
Tabla 15	Frecuencias de los haplotipos del gen <i>MC1R</i> detectados en poblaciones de cerdo.....70

	Página
Tabla 16	Resultado del genotipado del polimorfismo localizado en la posición 668 del gen <i>MC1R</i>73
Tabla 17	Condiciones de amplificación de los cuatro fragmentos amplificados para el gen <i>Agouti</i>80
Tabla 18	Posiciones polimórficas detectadas en la secuencia nucleotídica analizada del gen <i>Agouti</i>80
Tabla 19	Animales genotipados por PCR-RFLP para el gen <i>Agouti</i>82
Tabla 20	Resultado del genotipado del polimorfismo localizado en el nucleótido 41 del tercer exón del gen <i>Agouti</i>84
Tabla 21	Frecuencia alélica del polimorfismo localizado en el nucleótido 41 del tercer exón del gen <i>Agouti</i>84
Tabla 22	Resultado del genotipado de la inserción –C – en el nucleótido 67 del primer intrón del gen <i>Agouti</i>86
Tabla 23	T ^{as} anillamiento específicas para cada pareja de oligonucleótidos que permiten amplificar el ADNc del gen <i>P</i>90
Tabla 24	T ^{as} anillamiento y tamaños de los fragmentos amplificados específicos para cada pareja de oligonucleótidos que permiten amplificar los extremos del ADNc del gen <i>P</i>93
Tabla 25	Posiciones nucleotídicas polimórficas (SNPs) en el ADNc del gen <i>P</i> en las poblaciones y razas porcinas analizadas.....94
Tabla 26	T ^{as} anillamiento de los fragmentos amplificados específicas para cada pareja de oligonucleótidos que permiten amplificar todo el intrón 9 del gen <i>P</i>96
Tabla 27	Posiciones polimórficas detectadas en la secuencia nucleotídica del intrón 9 del gen <i>P</i>96
Tabla 28	T ^{as} anillamiento de los fragmentos amplificados específicas para cada pareja de oligonucleótidos que contiene la posición polimórfica a genotipar en el ADNc del gen <i>P</i>100

	Página
Tabla 29	Enzima de restricción y condiciones de digestión para los RFLPs genotipados en el ADNc del gen <i>P</i>101
Tabla 30	Animales genotipados para cada uno de los polimorfismos del gen <i>P</i> analizados por PCR-RFLP.....101
Tabla 31	Condiciones de amplificación de las parejas de oligonucleótidos para la PCR alelo- específica del intrón 9 del gen <i>P</i>103
Tabla 32	Animales secuenciados para confirmar los SNPs de las posiciones 511 del ADNc y 856 del intrón 9 del gen <i>P</i>103
Tabla 33	Resultado del genotipado del SNP en posición 510 del exón 4 del gen <i>P</i>105
Tabla 34	Frecuencia alélica para el SNP localizado en posición 510 del exón 4 del gen <i>P</i>105
Tabla 35	Resultado del genotipado para el SNP localizado en posición 511 del exón 4 del gen <i>P</i>107
Tabla 36	Frecuencia alélica para el SNP localizado en posición 511 del exón 4 del gen <i>P</i>107
Tabla 37	Resultado del genotipado del SNP en posición 1208 del exón 10 del gen <i>P</i>109
Tabla 38	Resultado del genotipado del SNP en posición 1858 del exón 16 del gen <i>P</i>112
Tabla 39	Frecuencias alélicas para el SNP localizado en posición 1858 del exón 16 del gen <i>P</i>112
Tabla 40	Resultado del genotipado para el SNP localizado en posición 2040 del exón 18 del gen <i>P</i>114
Tabla 41	Resultado del genotipado del SNP localizado en posición 2462 del exón 23 del gen <i>P</i>116

	Página
Tabla 42	Frecuencias alélicas para el SNP localizado en posición 2462 del exón 23 del gen <i>P</i>116
Tabla 43	Haplotipos constituidos por la combinación de los 2 SNPs del ADNc que aparecen segregando en los animales de la raza Ibérica.....117
Tabla 44	Resultado del genotipado del SNP localizado en posición 293 del intrón 9 del gen <i>P</i>119
Tabla 45	Frecuencias alélicas para el SNP localizado en posición 293 del intrón 9 del gen <i>P</i>119
Tabla 46	Resultado del genotipado del SNP localizado en posición 859 del intrón 9 del gen <i>P</i>120
Tabla 47	Resultado del genotipado del SNP localizado en posición 1920 del intrón 9 del gen <i>P</i>122
Tabla 48	Características de las medidas tomadas o calculadas de la cantidad de color medida por espectrometría de reflectancia.....135
Tabla 49	Resultados del análisis de asociación de los polimorfismos de los genes <i>MC1R</i> y <i>Pink</i> sobre el parámetro L.....136
Tabla 50	Resultados del efecto estimado de cada uno de los genotipos del polimorfismo localizado en la posición 1920 del intrón 9 del gen <i>P</i> sobre el parámetro L.....137
Tabla 51	Resultados del análisis de asociación de la interacción de los polimorfismos de los genes <i>MC1R</i> y <i>Pink</i> sobre el parámetro L.....139
Tabla 52	Cálculo de la probabilidad de exclusión conjunta del origen ibérico puro utilizando diversos marcadores diagnóstico.....147
Tabla 53	Información de los marcadores utilizados para la construcción del mapa de ligamiento del cromosoma 6 en el cruce experimental IB x LR.....154
Tabla 54	Registros fenotípicos de la F ₂ para los caracteres analizados.....157
Tabla 55	Resultados del análisis de QTL , modelo univariante, en el cromosoma 6 porcino, para el cruce IB x LR.....159

Tabla 56	Valores estadísticos de los modelos de análisis de detección de QTL de pleiotropía, ligamiento y ligamiento frente a pleiotropía en el cromosoma 6 porcino, para el cruce lb x L.....	162
Tabla 57	Valores de los límites de significación para cada pareja de caracteres, calculados mediante el método "Bootstrap".....	162
Tabla 58	Genes propuestos y/o caracterizados para determinar el color de la piel en distintas especies animales.....	176