VARIABILIDAD NUCLEOTÍDICA LONGITUDINAL EN UNA REGIÓN CANDIDATA PARA QTL DEL CROMOSOMA 4 PORCINO

Ojeda, A.[1], Ramos, S.[1,2], Marletta, D.[3], Folch, J.M.[1] y Pérez-Enciso, M.[1, 4]
[1] Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra.
[2] Centre de recerca en agrogenòmica, 08193 Bellaterra
[3] D.A.C.P.A, Sez. di Scienze delle Produzioni Animali, 95123 Catania, Italia
[4] Institut Català de Recerca i Estudis Avançats, C/ Lluis Companys 23, 08010, Barcelona.
E-mail: ana.ojeda@uab.es

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de animales domésticos nos permiten identificar la huella de la selección y de la domesticación mediante el estudio de la variabilidad genética a lo largo del genoma. Las regiones que contienen genes candidatos poseen un interés adicional por sus implicaciones socio económicas. El locus FAT1 del cromosoma 4 porcino es, sin duda, una de las regiones más interesantes debido a su importante efecto en el depósito de grasa dorsal y crecimiento. Previamente, hemos estudiado los genes *FABP4* (Ojeda *et al*., 2006) y *FABP5* (Ojeda *et al*., 2008). Los resultados obtenidos para ambos fueron muy diferentes, a pesar de su proximidad física (~ 180 kb) y funcional. El nivel de polimorfismo detectado para el gen *FABP4* fue seis veces superior al del gen *FABP5*: π = 1,2 % vs. 0,19 %, respectivamente. Además, ambos genes presentaron una estructura haplotípica diferente, la raza más polimórfica para el gen *FABP4* (Ibérico) fue la menos variable para el FABP5, mientras que en Duroc observamos lo contrario. El objetivo del presente trabajo fue ampliar el estudio a una región de unas 2 Mb centrada en estos dos genes, en la que secuenciamos 13 regiones de unas 500 pb no codificantes espaciadas uniformemente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal

Se han secuenciado 32 cerdos que incluyen poblaciones asiáticas (razas Vietnamita, Fengjing, Minzhu, Meishan, Licha Black and Luchuan) y europeas (Ibéricos de la estirpe Retinto y Guadyerbas, Duroc, Large White, Landrace, Hampshire, Berkshire, Pietrain, raza sintética española y Siciliana). De las razas Ibérico (IB), Duroc (DU), Siciliana (SI) y Landrace (LR) se secuenciaron cinco individuos por raza excepto para LR, que se secuenciaron cuatro. Para el resto de poblaciones se secuenció un único individuo. Como *outgroup* se ha utilizado un Babirusa (*Babyrousa babyrussa*) del zoo de Madrid.

Identificación de polimorfismos

A partir de la secuencia pública del BAC porcino del cromosoma 4 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scrofa/) se localizaron las posiciones de los genes *FABP4* y *FABP*5, así como la de otros genes en una región de 2 Mb centrada en los FABPs. Se identificaron tres genes más, ZBTB, IMPA1 y ZNF. Además, se seleccionaron ocho regiones no anotadas. En total, se amplificaron y secuenciaron 13 regiones de aproximadamente 500 pb (que en el caso de los genes corresponden al intrón 1) separadas entre ellas unos 100-200 kb. Las condiciones de las PCR fueron 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs, 500 nM de cada cebador, 50 ng ADN genómico y 0.6 U AmpliTaq Gold (Applied Biosystem) en un volumen final de 25 μl. El perfil térmico consistía en 95 ºC durante 10 min, seguido de 35 ciclos de 94 ºC 0,5 min, 63 ºC 1 min y 72 ºC 1,5 min, y una extensión final de 72 ºC durante 15min. Los fragmentos amplificados fueron purificados y posteriormente secuenciados mediante *BigDye Terminator* v3.1 *Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* en un secuenciador ABI PRISM 3730 (*Applied Biosystems*). El análisis de las secuencias e identificación de polimorfismos se realizó mediante el programa *SeqScape* v2.5 (*Applied Biosystems*).

Análisis estadístico y genético

A partir de las secuencias se reconstruyeron las fases mediante el programa *Phase* v2.1.1 (Li and Stephens 2003) usando las opciones por defecto, excepto que el programa corrió 5

veces y la última interacción fue 10 veces más larga, tal y como sugieren los autores. El índice de diversidad nucleotídica (π) y otros estadísticos fueron estimados con DnaSP v4.10 (Rozas *et al*. 2003). Además, se ha estudiado también la estructura poblacional mediante el programa Structure (Pritchard JK *et al.* 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han identificado un total de 177 posiciones polimórficas, que incluyen 12 *singletons*. A efectos de los análisis, se hicieron seis grupos: las cuatro poblaciones europeas con más de dos animales secuenciados (DU, IB, LR, SI), los animales asiáticos (ASI) y un último grupo europeo (EUR1) donde se incluyeron los individuos únicos por raza con origen europeo y un individuo de cada población DU, IB, LR y SI, en este último grupo sólo hemos incluido un haplotipo de cada animal.

La Figura 1. muestra un esquema de la región secuenciada y la variabilidad encontrada para cada una de las poblaciones (π). Globalmente, la variabilidad fue mucho mayor en Asia, sobre todo en algunas regiones (1 y 9). Sin embargo, es interesante constatar que la región del FABP4 (región 6) fue mucho más variable en Ibérico o Duroc que en Landrace o Large White, razas mucho más magras.

Mediante *Structure* (Figura2), se ha observado que cuando k = 4 (el número óptimo de clusters), se forma un cluster (verde) que contiene individuos de todas las poblaciones pero sobre todo de la Siciliana, Landrace y Duroc, mientras que Duroc y, curiosamente, Ibérico, parecen las más 'mezcladas'. La población asiática presenta tres de los cuatro posibles clusters.

En resumen, podemos concluir que la variabilidad observada en el gen *FABP4* efectivamente es superior a la del gen *FABP5* y no presenta un patrón específico respecto a las razas más seleccionadas, en el presente trabajo LR es de las menos variables junto con SI, que es una raza más local. Respecto a la variabilidad de toda la región, se observa que las razas asiáticas son más polimórficas. Al estudiar la estructura poblacional se observa una cierta heterogeneidad dentro de las poblaciones excepto en el caso de LR y SI que pertenecen al mismo cluster y tienen poca presencia de otros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFÍCAS

• Li, N. & M. Stephens. 2003. *Genetics* 165, 2213-33. • Ojeda *et al*. 2006. *Genetics* 174(4), 2119-27 • Ojeda *et al*. 2008. *Animal Genetics* 39(5):468-73. • Pritchard JK *et al. Genetics* 155: 945-959. • Rozas *et a*l. 2003. *Bioinformatics 19,* 2496-2497.

Agradecimientos: Agradecemos a las diversas personas e instituciones que nos han cedido muestras para este estudio. Trabajo financiado por los proyectos AGL2007-65563-C02-01/GAN del MEC. Ana Ojeda disfruta de una beca FPI del MEC.

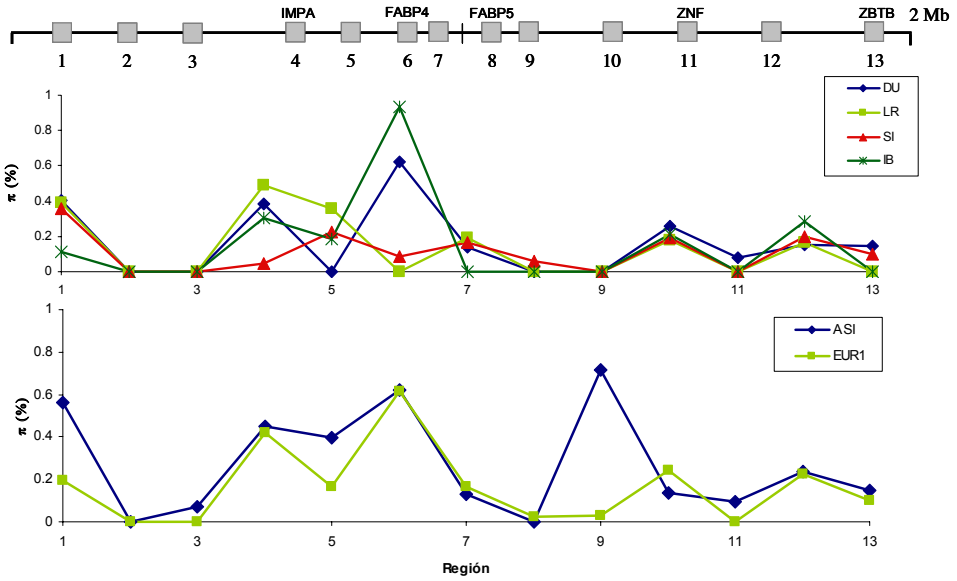


Figura 1. *Esquema de la región secuenciada y variabilidad en cada una de las poblaciones.*

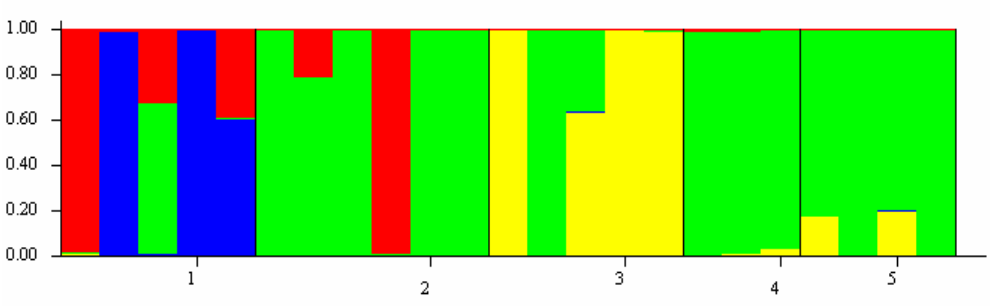


Figura 2. *Estructura de cinco poblaciones: 1, Animales asiáticos; 2, Duroc; 3, Ibérico; 4, Siciliana; 5, Landrace. Las líneas negras verticales separan cada una de las poblaciones.*

NUCLEOTIDE VARIABILITY ALONG A REGION CONTAINING A STRONG QUANTITATIVE TRAIT LOCUS EFFECT IN THE PIG

ABSTRACT: Domestic animal species offer extremely valuable resources to understand the effects of strong directional selection in structured populations. Porcine chromosome 4 (SSC4) harbors a quantitative trait locus (QTL) with an important effect in fatness and growth but whose ultimate causative mutation - or mutations - are yet unknown. Previous studies from our group support that the fatty acid binding protein (FABP) cluster are relevant positional candidate genes.In a previous work, we studied *FABP4* and *FABP5* genes and we showed that *FABP4* had nucleotide variability indices six-fold higher than *FABP5*. Besides, haplotype structures of *FABP5* and *FABP4* were dramatically different, and the Hudson-Kreitman-Aguadé test was highly significant. Here we report a longitudinal analysis of nucleotide variability along a region of ~ 2 Mb in SSC4 that includes the complete *FABP4* and *FABP5* gene together with ~ 550 bp segments in genes *IMPA1*, *ZNF*, *ZBTB10* and eight non coding regions.

Keywords: *Quantitative trait locus FAT1, fatty acid binding protein, nucleotide diversity.*