

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 490 440**

21 Número de solicitud: 201330290

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**01.03.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**03.09.2014**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (100.0%)  
Campus Plz. San Francisco (Edificio  
Interfacultades) C/ Pedro Cerbuna, 12  
50009 Zaragoza ES**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ BUESA, Pascual;  
BURGOS SERRANO, Carmen;  
CARRODEGUAS VILLAR, José Alberto y  
VARONA AGUADO, Luis**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **Método para la selección de suidos con mejor calidad de la carne basado en un SNP en el gen que codifica la PEPCK citosólica**

57 Resumen:

Método para la selección de suidos con mejor calidad de la carne basado en un SNP en el gen que codifica la PEPCK citosólica.

La presente invención se relaciona con un método para seleccionar un suido que presenta un fenotipo con mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de referencia, y/o con al menos un 30% más de mioglobina en músculo que un valor de referencia, y/o un fenotipo cuya carne es al menos un 19% menos exudativa que un valor de referencia, que comprende: (a) detectar en una muestra biológica procedente de dicho suido un polimorfismo A/C en el gen que codifica la proteína PEPCK citosólica, y (b) seleccionar aquel suido que presente el alelo A en homocigosis. Asimismo, la invención también se relaciona con cebadores, sondas y kit para llevar a cabo dicho método.

ES 2 490 440 A1

**MÉTODO PARA LA SELECCIÓN DE SUIDOS CON MEJOR CALIDAD DE LA CARNE BASADO EN UN SNP EN EL GEN QUE CODIFICA LA PEPCK CITOSÓLICA**

**DESCRIPCIÓN**

5

La presente invención se refiere a la selección de suidos con mayor contenido de grasa intramuscular a la vez que menor contenido de tocino dorsal, y/o con al menos un 30% más de mioglobina en el músculo, y/o con una carne que es al menos un 19% menos exudativa, mediante la detección del polimorfismo A/C en la posición 2456 del gen que  
10 codifica la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) citosólica. Por lo tanto, la invención pertenece al campo técnico de la selección genética animal, en particular, al campo de la ganadería y de la industria alimentaria.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

15

La selección genética en el ganado porcino en las últimas décadas ha estado dirigida a reducir el contenido graso de la canal y, especialmente, la deposición de grasa de cobertura (tejido adiposo subcutáneo). Esto ha sido así en primer lugar por la presión de los consumidores por carnes más bajas en grasas debido a motivos estéticos y, en menor  
20 medida, por la relación entre altos consumos de grasas animales y ciertas enfermedades. También ha jugado un papel muy relevante el hecho de que los genotipos magros son más eficientes en la conversión del pienso consumido en peso ganado por el animal, es decir, tienen menores índices de conversión. Este último factor, el índice de conversión, es la clave del éxito económico de la producción porcina porque la alimentación del  
25 ganado supone alrededor del 75% del costo de producción de un cerdo. La disminución del espesor del tocino dorsal ha sido muy considerable como consecuencia de la selección genética. Sin embargo, la reducción del espesor del tocino dorsal ha ido pareja con la reducción del contenido de grasa intramuscular. Esta última es muy relevante para la calidad de la carne fresca y, especialmente, de los productos curados. De hecho,  
30 buena parte de la producción porcina adolece del defecto de contar con muy bajos contenidos de grasa intramuscular. Hasta ahora, se pensaba que el aumento del contenido de grasa intramuscular iba siempre acompañado del aumento del espesor de tocino dorsal, lo que por el mayor costo energético que tiene la deposición de tejido adiposo en relación a la deposición de tejido muscular, implicaba indefectiblemente un  
35 aumento del índice de conversión, y por lo tanto, un aumento sustancial de los costos de

producción. Hay que tener en cuenta, que el sector porcino es un sector con una alta cifra de negocio pero con un margen de beneficio, cuando lo hay, muy estrecho, por lo que disminuir los costos de producción en este sector es muy relevante.

- 5 El procedimiento para seleccionar animales con un mayor o menor contenido de grasa intramuscular o para disminuir el espesor del tocino dorsal es la selección genética clásica. La correlación genética positiva existente entre ambos caracteres, dificulta la selección genética conjunta de ambos. La utilización de técnicas de selección basadas en marcadores genéticos puede ayudar a solventar este problema, siempre y cuando se  
10 encuentren marcadores indicadores de este fenotipo.

Burgos *et al.*, 2012 (*Meat Science*. 90: 309-313) describen el efecto de la selección de cerdos con mayor contenido de grasa intramuscular para la producción de jamón curado en base a un genotipo de cerdo que se caracteriza por la presencia de un polimorfismo  
15 A/G en la posición 3072 del intrón 3 del gen que codifica el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF2). En esta publicación se demuestra que la presencia del alelo A o G en los cerdos modifica el contenido relativo de grasa subcutánea, intermuscular e intramuscular en la canal y la carne, siendo el alelo A el mas favorable, en general, porque disminuye el contenido de grasa subcutánea notablemente y aumenta  
20 ligeramente el de grasa intramuscular. Otros estudios llevados a cabo sobre este polimorfismo concreto revelan que la expresión del alelo A estimula el crecimiento muscular a expensas del tocino dorsal, favoreciendo la canal magra en el cerdo y el menor contenido de grasa dorsal. Todas estas características hacen deseable este genotipo para la producción.

25

Por otro lado, Nechtelberger D. *et al.* (2001. *J Anim Sci*. 79: 2798-2804) describen la asociación de las variantes genéticas de la proteína de unión a ácidos grasos (FABP), en corazón y en adipocitos (H-FABP y A-FABP, respectivamente), con el contenido de grasa intramuscular. En dicha publicación, se llevaron a cabo estudios en tres distintas  
30 poblaciones de cerdos austriacos (Piétrain, Large White y Landrace) y se descubrió que dichas variantes genéticas presentan un polimorfismo en el locus Mspl. No obstante, concluyeron que estos marcadores genéticos no son recomendables para la selección de poblaciones austriacas de cerdo en cuanto a su crecimiento y características comerciales cárnicas.

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar nuevos marcadores alternativos a los ya descritos para seleccionar suidos que presenten mayor contenido de grasa intramuscular pero un menor contenido del tocino dorsal, favoreciendo la canal magra en el cerdo, aumentando el rendimiento y bajando el coste de producción.

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han identificado un polimorfismo que modula, aumentándolo, el contenido de grasa intramuscular en suidos alrededor de un 25% (en el lomo) y disminuye, alrededor de un 11% el espesor del tocino dorsal, pudiendo emplear dicho polimorfismo como un marcador genético para seleccionar suidos con mayor contenido de grasa intramuscular a la vez que menor contenido de tocino dorsal, reduciendo el índice de transformación y aumentando la eficiencia del proceso de cría del ganado. Mejora además la calidad de la carne fresca por disminuir su exudación (entre el 24 y el 19% menos) y aumenta su contenido en hierro (alrededor del 30% más). La carne que presenta estas características es de mayor calidad tanto para la obtención de productos frescos (por su menor porcentaje de exudación) como para la obtención de productos curados (por su mayor contenido de grasa intramuscular).

Con el fin de identificar polimorfismos asociados al fenotipo deseado (niveles más elevados de grasa intramuscular y menores espesores de tocino dorsal), los inventores secuenciaron las regiones promotora y codificante del gen PEPCK en cerdos de la raza Pietrain y de la raza Ibérica. La elección de estas dos razas se debe al hecho de que ambas muestran fenotipos extremos para los caracteres de interés: la raza Pietrain presenta contenidos muy bajos de grasa intramuscular y, asimismo, espesores muy bajos de tocino dorsal. La raza Ibérica presenta altos contenidos de grasa intramuscular y espesores muy grandes de tocino dorsal.

En los trabajos de secuenciación se detectó que los animales Pietrain presentaban un SNP que suponía un cambio de aminoácido (de metionina a leucina). Dicho SNP está localizado en la posición 2456 del gen que codifica la PEPCK (SEQ ID NO: 1). Un test estadístico (Test de Chi-Cuadrado) mostró que la frecuencia alélica de esta mutación era

significativamente diferente en ambas razas. La secuenciación del gen de la PEPCK en nueve cerdos procedentes del cruce de cerdos de la raza Duroc con cerdos de la raza Landrace x Large White, mostró que en dichos cerdos había variabilidad para el polimorfismo detectado en la raza Pietrain. A continuación, mediante secuenciación y análisis por RT-PCR se determinó el genotipo de una población de 202 de estos animales para dicho polimorfismo, y se llevaron a cabo estudios del efecto del SNP sobre el contenido de grasa intramuscular y sobre el espesor del contenido de tocino dorsal que mostraron que un animal homocigoto AA, tiene alrededor del 25% más de grasa intramuscular y, simultáneamente, alrededor de un 11% menos de tocino dorsal que un animal homocigoto CC. Este estudio mostró asimismo que los animales AA rinden una carne de mejor calidad caracterizada por menores porcentajes de exudación (entre el 24 y el 19% menos) y mayor contenido de hierro (30% más).

Por lo tanto, en base a este descubrimiento, se ha desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán explicados en detalle a continuación.

#### *Método de selección del suido de la invención*

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para seleccionar un suido que presenta un fenotipo con mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de referencia, y/o un suido que presenta un fenotipo con al menos un 30% más de mioglobina en músculo que un valor de referencia, y/o un suido que presenta un fenotipo cuya carne es al menos un 19% menos exudativa que un valor de referencia, de aquí en adelante “método de selección de la invención”, que comprende:

- a) detectar en una muestra biológica procedente de dicho suido un polimorfismo A/C en el gen que codifica la proteína PEPCK citosólica, y
- b) seleccionar aquel suido que presente el alelo A en homocigosis.

En la presente invención, se entiende por “suido” a un miembro de la familia *Suidae*, mamíferos artiodáctilos en la que se incluyen los cerdos domésticos, los jabalíes y sus parientes más cercanos, hasta 16 especies, todas ellas distribuidas originariamente en Eurasia y África. Se trata de ungulados no rumiantes de alimentación omnívora y características primitivas. Ejemplos de suidos incluyen, sin limitar a, cerdos y jabalís.

Por lo tanto, en una realización particular, el suido es un cerdo doméstico o un jabalí.

Se entiende por “cerdo doméstico” (*Sus scrofa domestica*) una especie de mamífero artiodáctilo de la familia *Suidae*. Es un animal doméstico usado en la alimentación humana por algunas culturas, en especial las occidentales.

Se entiende por “jabalí” a un mamífero artiodáctilo de la familia de los suidos, de nombre científico *Sus scrofa*, presente en Europa, aunque hay también subespecies en América, África y Asia. Se distingue del cerdo doméstico por tener la cabeza más aguda, la jeta más prolongada, las orejas siempre tiesas, el pelaje muy tupido, fuerte, de color gris uniforme, y los colmillos grandes y salientes de la boca.

El método de la invención va dirigido a seleccionar un suido que presenta un fenotipo con mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de referencia, y/o que presenta un fenotipo con al menos un 30% más de mioglobina en músculo que un valor de referencia, y/o que presenta un fenotipo cuya carne es al menos un 19% menos exudativa que un valor de referencia.

En la presente invención se entiende por “grasa intramuscular” al conjunto de la grasa localizada entre los fascículos musculares, la grasa contenida dentro de las fibras musculares y la grasa que forma parte de las membranas celulares.

Se define “tocino dorsal”, “grasa dorsal” o “grasa subcutánea” al depósito de tejido adiposo situado inmediatamente debajo de la epidermis cuyo espesor está determinado, entre otras, por causas genéticas. Se trata de uno de los parámetros de mayor importancia para estimar el rendimiento de la canal, entendiendo la canal como el conjunto de tejidos y órganos extraído del animal sacrificado una vez privado este de vísceras y que será procesado en el matadero (músculo, grasa y huesos).

30

En la presente invención, el término “mioglobina” o “hemoglobina muscular” se define como la hemoproteína muscular, estructuralmente y funcionalmente muy parecida a la hemoglobina, relativamente pequeña, constituida por una cadena polipeptídica de 153 residuos aminoacídicos que contiene un grupo hemo con un átomo de hierro, y cuya

función es la de almacenar y transportar oxígeno. Las mayores concentraciones de mioglobina se encuentran en el músculo esquelético, especialmente en las fibras rojas cuyo metabolismo energético se basa más en la oxidación de grasas que en la glicolisis, y en el músculo cardíaco, donde se requieren grandes cantidades de O<sub>2</sub> para satisfacer la  
5 demanda energética de las contracciones.

En la presente invención se entiende que la carne es “exudativa” cuando la carne pierde, especialmente en las superficies de corte, líquido acuoso derivado de cambios en las miofibrillas, un fenómeno que está favorecido por la desnaturalización proteica y por  
10 daños en las membranas celulares. Como sabe el experto en la materia, la exudación excesiva da lugar a pérdida de peso, con la consiguiente pérdida económica directa, redundando en un peor aspecto de la carne envasada con el consiguiente rechazo de los consumidores, y está estrechamente relacionada con la pérdida de jugosidad y con el aumento de la dureza de la carne, lo que en su conjunto resulta en carnes de baja  
15 calidad.

En la presente invención, se entiende por “valor de referencia” a la media de los valores obtenidos como resultado de medir la característica fenotípica que se está seleccionando en la población de suidos.

20 Así, en la presente invención se entiende que un suido presenta un fenotipo con mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de referencia, cuando el contenido de grasa intramuscular y el contenido de tocino dorsal de dicho suido son, respectivamente, mayor y menor que el contenido de grasa  
25 intramuscular y el contenido de tocino dorsal de la media del resto de suidos presentes en la población.

De forma análoga, en la presente invención se entiende que un suido presenta un fenotipo con al menos un 30% más de mioglobina en músculo que un valor de referencia,  
30 cuando el contenido de mioglobina en músculo de dicho suido es un 30% mayor que la cantidad media de mioglobina en músculo presente en el resto de suidos presentes en la población.

En la presente invención se entiende que un suido presenta un fenotipo cuya carne es al menos un 19% menos exudativa que un valor de referencia, cuando la carne de dicho suido es un 19% menos exudativa que media de exudación de la carne presente en el resto de suidos que forman parte de la población.

5

El experto en la materia es conocedor de las técnicas empleadas para medir estas características fenotípicas en los suidos. En los Ejemplos ilustrativos de la invención se describen algunas de dichas técnicas.

- 10 En una primera etapa [etapa (a)], el método de selección de la invención comprende detectar en una muestra biológica procedente de dicho suido un polimorfismo A/C en el gen que codifica la proteína PEPCK citosólica. Para llevar a cabo la primera etapa, es necesario la obtención de una muestra biológica, lo cual puede llevarse a cabo por cualquiera de los métodos descritos en el estado de la técnica, siendo práctica de rutina
- 15 "muestra biológica" cualquier materia que contenga ADN. Ejemplos de muestras biológicas de las que se puede obtener ADN incluyen, sin limitarse a, fluidos biológicos (sangre, saliva, orina, espermatozoides, etc); epidermis, pelo, heces, una muestra de tejido, etc. La obtención de la muestra biológica debe realizarse en las condiciones y con el material
- 20 adecuado, tales como torundas, pinzas, etc. y debe almacenarse independientemente en frascos o bolsas plásticas separadas y estériles, sin ningún tipo de conservante, y debidamente rotulados, evitando la contaminación por material biológico foráneo.

- Una vez que se ha obtenido la muestra biológica del suido, ésta debe ser procesada para
- 25 obtener el ácido nucleico, que puede ser ADN o ARN. La extracción del ADN puede ser llevada a cabo usando cualquier método conocido por los expertos en la materia (Sambrock et al., 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3) que incluyen, sin limitarse a, centrifugaciones en gradientes de densidad, extracción en dos fases usando fenol acuoso o cloroformo con
- 30 etanol, cromatografía en columna, métodos basados en la capacidad del ADN para unirse en superficies de cristal y/o silicatos, como preparaciones de tierra de diatomeas o lechos de cristal, empleando kits comerciales, por ejemplo, los kits "Q-Biogene fast DNA kit" o el "QIAamp(R) DNA Blood Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Alemania) el "G-Spin IIp" (Intron Biotechnology, Corea) o el "Fast Prep System Bio 101" (Qbiogene, Madrid, España).



En el caso de que el ácido nucleico que se quiere extraer de la muestra sea ARN, existen kit comerciales exclusivamente diseñados para este propósito que contienen los componentes adecuados para extraer en perfectas condiciones el ARN: altas  
5 concentraciones de sales caotrópicas en el tampón de lisis para inactivar las ARNasas, membranas de sílica que favorecen la adsorción del ARN, DNasas que eliminan el ADN para alcanzar un aislado de ARN de gran pureza, etc. Un kit comercial que reúne las características antes citadas es, por ejemplo, y sin limitarse a, Nucleospin™ RNA.

10 Tras aislar el ácido nucleico (ADN o ARN) de la muestra biológica procedente del suido, el método de selección de la invención comprende detectar el polimorfismo A/C en el gen que codifica la proteína PEPCK, para seleccionar aquellos animales homocigotos para el alelo A.

15 La proteína “fosfoenolpiruvato carboxiquinasa” (PEPCK) es una enzima de la familia de las liasas que participa en diversas rutas metabólicas entre las que se encuentra la gliceroneogénesis porque aporta formas activadas del glicerol para la síntesis de triglicéridos. Cataliza la reacción de conversión del oxalacetato en fosfoenolpiruvato y dióxido de carbono consumiendo GTP, que se transforma en GDP. La fosfoenolpiruvato  
20 carboxiquinasa se encuentra en dos isoformas, PEPCK1 o PEPCK-C (citosólica) y PEPCK2 o PEPCK-M (mitocondrial). Estas isoformas tienen un 63% de similitud en sus secuencias; se desconoce la función precisa del isoenzima mitocondrial.

La proteína fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica está codificada por el gen PEPCK  
25 cuya secuencia de nucleótidos se muestra en la SEQ ID NO: 1 (número de acceso a la base de datos del NCBI: FJ668384.1 GI:238863889). No obstante, en una realización particular, el gen que codifica la proteína PEPCK citosólica comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 70, 80, 90, 95, 98, 99 ó 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

30

En la presente invención, el término “polimorfismo” se refiere a un “polimorfismo de nucleótido simple” o “SNP” y se define como la variación de un sólo nucleótido entre genomas de individuos de la misma especie.

En una realización particular, el polimorfismo A/C está localizado en la posición 2456 de la SEQ ID NO: 1. Dicho polimorfismo A/C da lugar a un cambio de metionina por leucina en la proteína PEPCK (SEQ ID NO: 2), localizando la mutación en el aminoácido 139 de dicha proteína. La obtención del ADN complementario (ADNc) a partir de dicha proteína,  
5 localiza el polimorfismo en la base 415 de la SEQ ID NO: 3.

La detección del polimorfismo de la invención puede llevarse a cabo por cualquiera de las técnicas descritas en el estado de la técnica. Ejemplos de estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, secuenciación, pirosecuenciación, análisis de hibridación de  
10 transferencia puntiforme de oligonucleótido específico del alelo (ASO), ampliación del cebador nucleotídico, análisis del polimorfismo de configuración monocatenario (SSCP) por PCR, análisis del polimorfismo con longitud del fragmento de restricción (RFLP) por PCR, PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR) y matriz de masas utilizando un espectrómetro de masas. Estos procedimientos se considerarán con más detalle a  
15 continuación.

Se entiende por “análisis de hibridación de transferencia puntiforme de oligonucleótido específico del alelo (ASO)”, al procedimiento para detectar polimorfismos en genes específicos, que puede realizarse sometiendo el fragmento de ADN a hibridar con sondas  
20 oligonucleotídicas específicas para un alelo de un fragmento de gen ampliado por PCR, utilizando cebadores directos y cebadores inversos diseñados para meter un SNP diana, para análisis de hibridación de transferencia puntiforme.

Por “ampliación del cebador mononucleotídico” se entiende la producción de suficientes  
25 copias múltiples del mismo para permitir la manipulación relativamente fácil del segmento. Manipulación se refiere tanto a manipulación física como química, es decir, la capacidad de desplazar cantidades en masa del segmento y conducir reacciones químicas con el segmento que generen productos detectables.

30 Se entiende por “análisis del polimorfismo de configuración monocatenario (SSCP) por PCR” a la técnica de rastreo de mutaciones usada en el diagnóstico molecular basada en la migración electroforética del ADN.

Por “análisis del polimorfismo con longitud del fragmento de restricción (RFLP) por PCR, procedimiento invasivo” se entiende el análisis de secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción (también llamadas endonucleasas de restricción) y que varían entre individuos. Los RFLP son  
5 marcadores genéticos del ADN y se pueden encontrar en regiones que codifican proteínas o exones, en los intrones o en el ADN que separa un gen de otro.

Se entiende por “PCR cuantitativa en tiempo real” (qPCR o Q-PCR) o “PCR en tiempo real” (real time PCR; RT-qPCR o RT-Q-PCR) una variante de la reacción en cadena de la  
10 polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN).

Se entiende por “matriz de masas utilizando un espectrómetro de masas” al resultado obtenido de la técnica experimental que permite la medición de iones derivados de  
15 moléculas. El espectrómetro de masas permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ).

Por lo tanto, en una realización particular, la detección del polimorfismo se lleva a cabo  
20 mediante un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en secuenciación directa, análisis de hibridación de transferencia puntiforme de oligonucleótido específico del alelo (ASO), ampliación del cebador mononucleotídico, análisis del polimorfismo de configuración monocatenario (SSCP) por PCR, análisis del polimorfismo con longitud del fragmento de restricción (RFLP) por PCR, PCR cuantitativa en tiempo real y matriz de  
25 masas utilizando un espectrómetro de masas.

En caso de que la técnica elegida para detectar el polimorfismo requiera la amplificación del ADN, será necesario el empleo de cebadores que sean capaces de amplificar la región de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 en la que se encuentra el  
30 polimorfismo A/C. En una realización preferida, dicha región comprende los 30 nucleótidos adyacentes a cada lado del nucleótido 2456 de la SEQ ID NO: 1. El diseño de dichos cebadores puede realizarse por cualquiera de los procedimientos estándar del estado de la técnica, y ampliamente conocidos por el experto en la materia. En una realización particular, los cebadores empleados en el método de selección de la

invención comprenden una secuencia de nucleótidos con al menos una identidad del 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100% con la SEQ ID NO: 1. En otra realización todavía más particular, los cebadores comprenden la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7.

5

Asimismo, el empleo de sondas para detectar polimorfismos también es práctica de rutina para el experto en la materia. En una realización particular, el método de selección de la invención contempla el empleo de al menos una sonda de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos con, al menos, una identidad del 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100% con la SEQ ID NO: 1. El significado del término "identidad" es explicado más adelante en la presente descripción. En otra realización todavía más particular, la sonda comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9. Como sabe el experto en la materia, se puede determinar la presencia del polimorfismo A/C mediante PCR en tiempo real diseñando dos sondas diferentes capaces de discriminar los dos alelos. La PCR en tiempo real es un método capaz de cuantificar el ADN en cada ciclo de PCR en forma de fluorescencia. Esta fluorescencia aparece por la modificación que sufren las sondas en cada ciclo de amplificación. La discriminación alélica se produce cuando utilizamos dos sondas marcadas con distinto fluorocromo y que son específicas para cada alelo. Al final del proceso, las curvas de fluorescencia para las dos sondas nos indicarán el genotipo.

En general, el marcaje de las sondas se basa en la utilización de quenchers (pigmento quencher o extinguidor no fluorescente -NFQ- que incrementa la eficacia de detección y señal al no emitir fluorescencia) y sondas marcadas con un amplio rango de fluoróforos (pigmento reportero) con diferentes espectros de excitación y emisión. Ejemplos ilustrativos pero no limitativos de marcadores fluorescentes que pueden ser usados en el contexto de la presente invención incluyen: FAM, VIC, HEX, TET, CY3, CY5.5, JOE, 6-ROX, cascade Blue, fluoresceína, Texas red, rodamina, rodamina green, rodamina red, rodamina 6G, 6-TAMRA, 5-TMR1A, Alexa 430, Alexa 488, Alexa 594, Bodipy R6G, etc. En la presente invención se entiende por quencher a la molécula que acepta energía de un fluoróforo y la disipa en forma de calor o fluorescencia. Ejemplos de quenchers son, sin limitarse a, Methyl Red, ElleQuencher, Dabcyl, Dabsyl, TAMRA, etc.

Ejemplos de sondas que llevan este tipo de marcaje son, por ejemplo, sondas TaqMan,

balizas moleculares (sondas del tipo Molecular Beacon), sondas Scorpions, sondas Amplifluor, sondas Eclipse, etc.

5 El estudio del efecto de este polimorfismo sobre el contenido de grasa intramuscular y el espesor de tocino dorsal, sobre la mioglobina en músculo y/o el grado de exudación de la carne, muestra que los animales homocigotos para el alelo A presentan un mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal, al menos un 30% más de mioglobina en músculo y/o una carne al menos un 19% menos exudativa en comparación con un animal homocigoto para el alelo C o heterocigoto (AC).

10

Por lo tanto, una vez detectado el polimorfismo A/C tal como se ha explicado anteriormente, la etapa b) del método de selección de la invención comprende seleccionar aquel suido que presente el alelo A en homocigosis.

15 Por “homocigoto” u “homocigosis” se entiende que los dos alelos de una célula u organismo diploide en un lugar dado son idénticos, es decir, que tienen el mismo nucleótido para el cambio de nucleótidos en la misma posición en sus secuencias. Por “heterocigoto” se entiende el caso de un individuo diploide con alelos diferentes, es decir que tienen distinto nucleótido en una misma posición de sus secuencias.

20

Así, seleccionando un suido con el alelo A en homocigosis, se obtiene un suido que presenta un fenotipo con mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de referencia, y/o un fenotipo con al menos un 30% más de mioglobina en músculo que un valor de referencia, y/o un fenotipo cuya carne es al  
25 menos un 19% menos exudativa que un valor de referencia. Por lo tanto, la carne obtenida de dicho suido es de mayor calidad que la de un suido que no presente dicho polimorfismo.

En una realización particular, el fenotipo del suido seleccionado presenta, al menos, entre  
30 un 19 y un 25% más de grasa intramuscular y, al menos, entre un 9 y un 15% menos de tocino dorsal que un valor de referencia.

En otra realización más particular, el fenotipo del suido seleccionado presenta, al menos, un 20 % más de grasa intramuscular y, al menos, un 11% menos de tocino dorsal que un valor de referencia.

- 5 En otra realización particular, el fenotipo del suido seleccionado, presenta una carne al menos entre un 19 y un 24% menos exudativa que un valor de referencia.

*Secuencia de la invención, cebadores, sondas y sus usos*

- 10 Los autores de la presente invención han descubierto que la presencia del polimorfismo A/C en el gen que codifica la proteína PEPCK citosólica en suidos está asociado con un mayor contenido de grasa intramuscular y un menor contenido de tocino dorsal (en particular, entre un 19% y un 25% más de grasa intramuscular y entre un 9 y un 15% menos de tocino dorsal), con un 30% más de mioglobina en músculo y/o con una carne  
15 menos exudativa (en particular, entre un 19 y un 24% menos exudativa). Preferiblemente, dicho polimorfismo está localizado en la posición 2456 del gen PEPCK (SEQ ID NO: 1).

- Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con una secuencia de nucleótidos, de aquí en adelante “secuencia de nucleótidos de la invención”, que  
20 comprende (i) una secuencia de nucleótidos con al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1 y (ii) el polimorfismo A/C en la posición equivalente al nucleótido 2456 de dicha secuencia SEQ ID NO: 1 mediante el alineamiento óptimo de ambas secuencias.

- En la presente invención se entiende por “identidad” o “identidad de secuencia” al grado  
25 de similitud entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenido mediante el alineamiento de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado de identidad expresado en tanto por ciento. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento  
30 de secuencias conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST [Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10]. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, and TBLASTX, BLASTP and TBLASTN, son de dominio público en la página web de The National Center for Biotechnology Information (NCBI).

El experto en la materia entiende que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína son mutaciones evolutivamente neutras que  
5 no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad. Dichas variantes caen dentro del ámbito de la presente invención. Están incluidas también dentro del ámbito de la invención aquellas variantes de la proteína PEPCK citosólica (SEQ ID NO: 2) [codificada por el gen de la PEPCK citosólica (SEQ ID NO: 1)] que presenten inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más aminoácidos respecto a dicha SEQ ID NO: 2, y  
10 conserven, además, las mismas funciones que dicha proteína SEQ ID NO: 2.

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 80, 90, 95, 98, 99 o 100 % de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.

15

La puesta en práctica de la presente invención requiere la detección del polimorfismo A/C en el gen que codifica la proteína PEPCK citosólica. Tal como se ha explicado anteriormente, dicha detección puede llevarse a cabo por múltiples técnicas ampliamente conocidas por el experto en la materia, algunas de las cuales conllevan el empleo de  
20 oligonucleótidos que actúan como cebadores para poder amplificar la región del gen en la que se encuentra el polimorfismo. Con esta finalidad, los inventores de la presente invención han diseñado unos oligonucleótidos que actúan como cebadores útiles para amplificar la región del gen que codifica la PEPCK citosólica en la que se encuentra el polimorfismo A/C.

25

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un oligonucleótido, de aquí en adelante, "oligonucleótido de la invención", que comprende la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.

30

Otro aspecto de la invención es una pareja de cebadores, de aquí en adelante denominados como "cebadores de la invención", que son específicos para amplificar la región de la SEQ ID NO: 1 que comprende el polimorfismo A/C en la posición 2456 de dicha secuencia, es decir, son capaces de amplificar la secuencia SEQ ID NO: 1.

Preferiblemente, dicha región comprende los 30 nucleótidos adyacentes a cada lado del nucleótido 2456 de la SEQ ID NO: 1.

5 En la presente invención se entiende por “cebador” a aquel oligonucleótido que es capaz de enlazarse de forma contigua a una secuencia diana y servir de punto de inicio para la síntesis de ADN cuando es colocado bajo condiciones en las que se inicia la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico.

10 En una realización particular del aspecto inventivo anterior, los cebadores comprenden una secuencia de nucleótidos con al menos una identidad del 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100% con la SEQ ID NO: 1.

15 En otra realización más particular, al menos uno de los cebadores de la pareja comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7, preferiblemente, la pareja de cebadores está formada por las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, o las secuencias SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con una sonda de ácido nucleico, de aquí en adelante, “sonda de la invención”, que comprende una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con la SEQ ID NO: 1 en la región que comprende el polimorfismo A/C en la posición 2456, es decir, es complementaria a la secuencia SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, dicha región comprende los 30 nucleótidos adyacentes a cada lado del nucleótido 2456 de la SEQ ID NO: 1.

25 En una realización particular, la sonda comprende una secuencia de nucleótidos con al menos una identidad del 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100% con la secuencia SEQ ID NO: 1 que, en otra realización todavía más particular, comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9.

30 Se entiende por “sonda” a un fragmento de ADN de pequeño tamaño, normalmente entre 15 y 100 bases, usado como herramienta para detectar la presencia de ADN de secuencia complementaria idéntica o similar. La sonda se une a la secuencia diana monocatenaria mediante un mecanismo de hibridación que forma una estructura



bicatenaria, una de las hebras pertenece a la sonda y la otra a la secuencia diana. Como se ha explicado previamente en el anterior aspecto inventivo, la sonda puede ir marcada en sus extremos para que sea detectada. Ejemplos de marcadores y tipos de sondas que pueden emplearse en el contexto de la presente invención han sido mencionadas  
5 anteriormente.

El experto en la materia entiende que los oligonucleótidos, los cebadores y las sondas descritas en la presente invención pueden emplearse para detectar el polimorfismo A/C en el gen que codifica la proteína PEPCK citosólica. Así, en otro aspecto, la invención se  
10 relaciona con el uso de un oligonucleótido de la invención, la sonda de la invención y/o la pareja de cebadores de la invención para detectar el polimorfismo A/C en el gen que codifica la PEPCK citosólica. En una realización particular, el gen que codifica la proteína PEPCK citosólica comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1. En otra realización  
15 particular, el polimorfismo A/C está localizado en el nucleótido 2456 de la secuencia SEQ ID NO: 1.

El experto en la materia es conocedor de cómo pueden usarse el oligonucleótido, los cebadores y la sonda de la invención para detectar el polimorfismo A/C en la posición  
20 2456 del gen que codifica la PEPCK citosólica en el genoma de individuo, en particular, un suido. Ejemplos de las técnicas que se pueden emplear para detectar dicho polimorfismo han sido descritas previamente en el método de la invención, cuyo uso es práctica de rutina para el experto en la materia. Ejemplo de estas técnicas es la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativa (RT-PCR).

25 Asimismo, la detección de dicho polimorfismo permite seleccionar un suido cuyo fenotipo presenta una carne con mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal, y/o con al menos un 30% más de mioglobina en músculo y/o al menos un 19% menos exudativa que un valor referencia.

30 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la secuencia de nucleótidos de la invención, del oligonucleótido, de la sonda y/o de la pareja de cebadores de la invención para seleccionar un suido que presenta un fenotipo con mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de

referencia, y/o un suido que presenta un fenotipo con al menos un 30% más de mioglobina en músculo que un valor de referencia, y/o un suido que presenta un fenotipo cuya carne es al menos un 19% menos exudativa (en particular, entre el 19 y el 24 %) que un valor de referencia. En otra realización particular, el fenotipo del suido presenta, al menos, entre un 19 y un 25% más de grasa muscular y, al menos, entre un 9 y un 15% menos de tocino dorsal que un valor de referencia. En otra realización todavía más particular, el fenotipo del suido presenta, al menos, un 20% más de grasa intramuscular y, al menos, un 11% menos de tocino dorsal que un valor de referencia.

10 El término “valor de referencia” ha sido definido previamente en el método de la invención y es aplicable al presente aspecto inventivo.

Por otro lado, es conocido que el material genético está presente en todas las células de un individuo, excepto en los glóbulos rojos maduros de los mamíferos, y por lo tanto, también estará presente en la carne que procede de dicho individuo, en particular, un suido. Por lo tanto, la presente invención permite no solo seleccionar suidos con las características fenotípicas previamente mencionadas en la presente descripción, si no también seleccionar productos cárnicos procedentes de dicho suido que, como consecuencia, también comprenderán en su material genético el polimorfismo A/C en la posición 2456 del gen que codifica la PEPCK. Así, analizando el ADN de un producto cárnico, es posible seleccionar el producto cárnico que presenta mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal, al menos un 30% más de mioglobina en músculo, y/o que presente al menos un 19% menos exudación que otros productos cárnicos. Se selecciona así un producto cárnico con mayor calidad que otros productos cárnicos que no presentan dichas características.

Por lo tanto, en otro aspecto la presente invención se relaciona con el uso de la secuencia de nucleótidos de la invención, del oligonucleótido, de la sonda y/o de la pareja de cebadores de la invención para seleccionar un producto cárnico que presenta un mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de referencia, un 30% más de mioglobina que un valor de referencia y/o al menos un 19% menos exudación que un valor de referencia.

Se entiende por “producto cárnico” o “carne” al alimento de origen animal, compuesto principalmente por tejido muscular, que se consume como alimento. Desde el punto de vista nutricional la carne es una fuente habitual de proteínas, grasas y minerales en la dieta humana. La mayor parte del consumo de carne de los seres humanos proviene de mamíferos. Se consume sobre todo carne de animales ungulados, domesticados para proveer alimento.

En el contexto del presente aspecto inventivo, se entiende por “valor de referencia” a la media de los valores obtenidos como resultado de medir la característica fenotípica que se está seleccionando en la población/conjunto de productos cárnicos.

Así, en la presente invención se entiende que un producto cárnico presenta un mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de referencia, cuando el contenido de grasa intramuscular y el contenido de tocino dorsal de dicho producto cárnico es, respectivamente, mayor y menor que el contenido de grasa intramuscular y el contenido de tocino dorsal de la media del resto de productos cárnicos que forman parte de la población.

De forma análoga, en la presente invención se entiende que un producto cárnico presenta al menos un 30% más de mioglobina en músculo que un valor de referencia, cuando el contenido de mioglobina en músculo de dicho producto cárnico es un 30% mayor que la cantidad media de mioglobina en músculo presente en el resto de productos cárnicos que forman parte de la población.

Igualmente, se entiende que un producto cárnico presenta al menos un 19% menos exudación que un valor de referencia, cuando dicho producto cárnico presenta un 19% menos exudación que la media del resto de productos cárnicos que forman parte de la población. El significado del término exudación ha sido definido previamente.

En una realización particular, el producto cárnico presenta, al menos, entre un 19 y un 25% más de grasa intramuscular y, al menos, entre un 9% y un 15% menos de tocino dorsal que un valor de referencia. En otra realización todavía más particular, el producto cárnico presenta, al menos, un 20% más de grasa intramuscular y, al menos, un 11% menos de tocino dorsal que un valor de referencia. En otra realización particular, el

producto cárnico presenta, al menos, entre un 19% y un 24% menos exudación que un valor de referencia.

*Kit de la invención y sus usos*

5

La puesta en práctica de la presente invención requiere disponer de los materiales y reactivos adecuados para detectar el polimorfismo A/C en el gen que codifica la PEPCK citosólica, y poder así seleccionar un suido con mayor contenido de grasa muscular y menor contenido de tocino dorsal, y/o mayor contenido de hierro en el músculo y/o menor exudación de la carne que un valor de referencia, tal como se ha explicado a lo largo de la presente descripción. Todos los materiales necesarios para ello pueden encontrarse formando parte de un kit, aunque también pueden encontrarse en el estado de la técnica individualmente.

10

15 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante "kit de la invención", que comprende el oligonucleótido, la sonda y/o la pareja de cebadores descritos en los aspectos inventivos anteriores junto a sus correspondientes realizaciones particulares.

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit de la invención para detectar el polimorfismo A/C en el gen que codifica la proteína PEPCK citosólica. En una realización particular, el gen que codifica la proteína PEPCK citosólica comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 1. En otra realización todavía más particular, el polimorfismo A/C está  
25 localizado en el nucleótido 2456 de la secuencia SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit de la invención para seleccionar un suido que presenta un fenotipo con mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de referencia, y/o un suido  
30 que presenta un fenotipo con al menos un 30% más de mioglobina en músculo que un valor de referencia, y/o un suido que presenta un fenotipo cuya carne presenta al menos un 19% menos exudación que un valor de referencia.

Los términos empleados en el presente aspecto inventivo han sido definidos y explicados previamente en aspectos inventivos anteriores.

5 En una realización particular, el fenotipo del suido presenta, al menos, entre un 19 y un 25% más de grasa intramuscular y, al menos, entre un 9% y un 15% menos de tocino dorsal que un valor de referencia.

10 En otra realización todavía más particular, el fenotipo del suido presenta, al menos, un 20% más de grasa intramuscular y, al menos, un 11% menos de tocino dorsal que un valor de referencia.

En otra realización particular, el fenotipo del suido presenta una carne con, al menos, entre un 19 y un 24% menos exudación que un valor de referencia.

15 En otro aspecto, la invención se corresponde con el uso del kit para seleccionar un producto cárnico que presenta un mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de referencia, un 30% más de mioglobina que un valor de referencia y/o al menos un 19% menos exudación que un valor de referencia. El significado del término "valor de referencia" ha sido definido previamente.

20

En una realización particular, el producto cárnico presenta, al menos, entre un 19 y un 25 % más de grasa muscular y, al menos, entre un 9 y un 15% menos de tocino dorsal que un valor de referencia. En otra realización todavía más particular, el producto cárnico presenta, al menos, un 20% más de grasa intramuscular y, al menos, un 11% menos de tocino dorsal que un valor de referencia. En una realización particular, el producto cárnico presenta, al menos, entre un 19 y un 24% menos exudación que un valor de referencia.

25

Los detalles de estos aspectos inventivos han sido explicados previamente en aspectos inventivos anteriores y son aplicables al kit de la invención y sus usos.

30

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones las palabras "comprende", "presenta" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la

invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Figura 1. Estructura del gen de la PEPCK citosólica. Posición de los cebadores usados en la secuenciación de su región codificante.

Figura 2. Secuencias y alineamientos de los 27 animales estudiados. Se marca con una  
10 fecha y sombreado el polimorfismo A/C. "Sec. Ref": cDNA de la PEPCK (SEQ ID NO: 3). A = adenina; C = citosina; M = animal heterocigoto que tiene un alelo con A y otro alelo con C.

Figura 3. Amplificación por PCR de un fragmento de 896 bases que contiene la mutación  
15 A2456C. Las cruces representan amplificaciones fallidas a partir de DNA genómico; triángulos, rombos y cuadrados representan amplificaciones a partir de fragmentos previamente amplificados por PCR como se muestra en la figura 3: los triángulos son amplificaciones de animales homocigotos CC, los cuadrados son amplificaciones de animales heterocigotos y los rombos son muestras de animales homocigotos AA. Los  
20 círculos corresponden a amplificaciones control (añadiendo agua en vez de DNA).

Figura 4. Amplificación mediante PCR de la región del gen de la PEPCK citosólica porcina que contiene el nucleótido 2456. Las calles 1 y 5 contienen marcadores de peso molecular; las calles 2-4 y 6-8 contienen muestras de 6 animales diferentes.

25

#### EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo ilustrativo, y no pretenden ser limitativos del ámbito de protección de la presente invención.

30

#### **Ejemplo 1. Búsqueda de genes candidatos para caracteres de infiltración grasa**

##### **1. Material y métodos**

*1.1 Animales y muestras*

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de distintas fuentes: músculo en el caso de los cerdos Ibéricos, semen en el caso de los cerdos Pietrain y una porción del extremo de la cola en el caso de los animales del cruce Duroc x Landrace-Large White.

5

*1.2 Extracción y cuantificación del DNA genómico*

El DNA de estas muestras se extrajo con el kit Real Pure para la extracción de DNA genómico (Durviz, Paterna, Valencia) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de DNA de estos extractos se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, Estados Unidos).

10

*1.3 Secuenciación de la región codificante de PEPCK*

El análisis de la secuencia de bases de la región codificante se llevó a cabo por secuenciación de 5 fragmentos del gen de PEPCK amplificados por PCR: PEPCK1F/2R, PEPCK2F/3R, PEPCK3F/4R, PEPCK4F/5R y PEPCK5F/8R. Las secuencias de estos cebadores aparecen en la Tabla 1.

15

Primer (SEQ ID NO )	Tamaño (bp)	Secuencia
PEPCK1F (SEQ ID NO: 10)	1026	5'- GCGACCTTGGCATCCACACCCCTTA -3'
PEPCK2R (SEQ ID NO: 11)		5'- TTAAAGCTCGCTGAGGCCACGGG -3'
PEPCK2F (SEQ ID NO: 4)	896	5'- GTGTTGTCCAAGGGGGATCAGGAGGA -3'
PEPCK3R (SEQ ID NO: 5)		5'- CCCCTGCCTCGCACATTTAGGAT -3'
PEPCK3F (SEQ ID NO: 12)	961	5'- GCACCCTCCTAGGCCAAAGCATTG -3'
PEPCK4R (SEQ ID NO: 13)		5'- ACAGCCAGAGAGAAGACGCCCTGA -3'
PEPCK4F (SEQ ID NO: 14)	790	5'- GGGCATCAAGCTCACTTCCTGGAA -3'

PEPCK5R (SEQ ID NO: 15)		5'- ACACACAGAGAAGAAAGGGCAGCG -3'
PEPCK5F (SEQ ID NO: 16)	789	5'- TCCCCGCATCCCTCTGTACGTGTA -3'
PEPCK8R (SEQ ID NO: 17)		5'- CCAGAGACCCTGTGCCTGCGTGTC -3'

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación de los 5 fragmentos de la región codificante del gen de la PEPCK citosólica porcina. El tamaño que se indica es el del producto amplificado. (F: Forward o cebador directo; R: Reverse o cebador reverso)

5

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Biometra UNO-Thermoblock (Göttingen, Alemania) utilizando la polimerasa de alta fidelidad AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) y las parejas de cebadores indicados en la Tabla 1. En la Figura 1 se muestra una representación gráfica de las posiciones en las que hibridan estos cebadores en el gen en relación a la posición de los exones.

10

Cada reacción de PCR incluyó 1 unidad de AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity, 5 µl del buffer II 10x, 0,5 µl del correspondiente primer forward (20 pmol/µl), 0,5 µl del correspondiente primer reverse (20 pmol/µl), 3,8 µl de DMSO (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos), 2 µl de DNA genómico (100 ng/µl) y la cantidad de agua miliQ necesaria para ajustar el volumen total de reacción a 50 µl. El programa de temperaturas empleado para estas amplificaciones incluye una etapa de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación durante 30 segundos a 55°C en el caso de los fragmentos PEPCK1F/2R, PEPCK2F/3R, PEPCK33/4R, 53°C en el caso del fragmento PEPCK4F/R5 y 55°C en el caso del fragmento PEPCK5F/8R, y extensión a 68°C durante 1 minuto 30 segundos, 1 minuto 15 segundos, 1 minuto 15 segundos, 1 minuto y 1 minuto para los fragmentos PEPCK1F/2R, PEPCK2F/3R, PEPCK3F/4R, PEPCK 4F/5R y PEPCK5F/8R, respectivamente, y una etapa final de extensión a 68°C durante 10 minutos. Para comprobar que el tamaño del fragmento amplificado por PCR era el correcto, se cargaron 5 µl del producto de PCR en un gel de agarosa al 2% (Biotools, Madrid, España) y se realizó una electroforesis a 100 voltios durante 35 minutos. El patrón de pesos

20

25



moleculares empleado en estas electroforesis fue el 100 bp ladder (Biotools, Madrid, España).

A continuación se purificó el producto de cada una de estas 5 PCR con el kit NucleoSpin<sup>R</sup> Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El producto purificado se eluyó con 25 µl del buffer de elución del kit y se midió la concentración de DNA en esta disolución utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, Estados Unidos). Cada uno de los 5 fragmentos de PCR purificados se envió a secuenciar a Sistemas Genómicos (Paterna, Valencia, España) tanto con el cebador directo empleado para su amplificación como con el cebador reverso.

Para obtener la secuencia de bases completa de cada uno de los 5 fragmentos del gen de PEPCK amplificados por PCR se realizó un ensamblaje de las secuencias obtenidas para cada uno de ellos con sus respectivos cebadores directo y reverso utilizando el paquete informático Vector NTI.

Finalmente se construyó el cDNA de PEPCK de cada una de estas muestras uniendo en el orden apropiado las secuencias de todos los exones. Para localizar el principio y el final de cada uno de dichos exones se tomó como referencia la secuencia del cDNA de PEPCK citosólica de cerdo (SEQ ID NO: 3).

#### *1.4 Alineamiento de secuencias de cDNA*

Los alineamientos de los cDNA de PEPCK de los 9 cerdos ibéricos puros, los 9 cerdos Pietrain y los 9 animales del cruce Duroc x Landrace-Large White se realizó con el programa ClustalW.

## **2. Resultados y discusión**

La alineación de las secuencias de cDNA de PEPCK de los 27 animales analizados se muestra en la Figura 2.

De todos los SNPs detectados sólo A2456C reúne las dos condiciones de provocar un cambio de aminoácido y segregar de manera diferente en las razas Pietrain e Ibérica.

A través de un test de Chi-cuadrado se detectó que la mutación A2456C aparecía en una proporción significativamente mayor ( $p=0,0033$ ) en animales Pietrain que en animales de la raza Ibérica. En esta última el alelo 2456A parece fijado. La mutación A2456C da lugar a un cambio de aminoácido en la proteína (una metionina es sustituida por una leucina) en la posición 139 de la cadena polipeptídica.

La existencia de variabilidad en animales Duroc x Landrace/Large White (véase el Ejemplo 4) para A2456C, junto con el hecho de que en estos animales no aparezca ninguna mutación adicional en el gen de la PEPCK asociada a A2456C permite utilizar la población Duroc x Landrace/Large White para intentar encontrar asociaciones entre A2456C y caracteres fenotípicos de interés y/o relacionados con el contenido graso.

### 3. Conclusión

La mutación A2456C en el gen de la PEPCK citosólica porcina [NCBI, número de acceso: FJ668384, (versión FJ668384.1 GI:238863889), SEQ ID NO: 1)] es potencialmente causal de efectos fenotípicos en la carne y en la canal porcina.

### **EJEMPLO 2. Estudio de asociación entre A2456C de PEPCK y caracteres fenotípicos de interés (infiltración grasa y otros)**

20

#### **Introducción**

Con objeto de estudiar si la mutación A2456C está asociada a cambios en caracteres de interés, sobre todo de infiltración grasa y de calidad de la carne, se analizó un grupo de 202 animales del cruce Duroc x Landrace/Large White cuyas características fenotípicas están recogidas en la Tabla 2 (la Tabla 2 se muestra más adelante).

25

Para el genotipado de estos animales se puso a punto un sistema basado en la amplificación de un fragmento de 896 nucleótidos que contiene la mutación A2456C y en la cuantificación, a partir de este fragmento y mediante RT-PCR, del contenido relativo de los dos posibles alelos. Se decidió esta estrategia porque el SNP no hace aparecer ningún nuevo sitio de restricción que permitiera un análisis mediante la técnica de PCR-RFLP.

30

#### **1. Material y métodos**

### 1.1 Animales

El grupo de animales caracterizado estaba formado por un total de 202 cerdos de ambos sexos (los machos fueron castrados) de un cruce Duroc x Landrace-Large White. Estos animales fueron criados en una granja experimental, alimentados "*ad libitum*" con una dieta estándar y sacrificados a 114,5 +/- 10,98 kg.

### 1.2 Determinación del genotipo de PEPCK

El DNA genómico de cada uno de estos animales se extrajo a partir de una muestra del extremo terminal de su cola, tomada a los pocos días de su nacimiento, utilizando el kit Real Pure para la extracción de DNA genómico (Durviz, Paterna, Valencia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La determinación del genotipo de PEPCK citosólica 2456 A>C se llevó a cabo por secuenciación de un fragmento de PCR amplificado con la pareja de cebadores PEPCK2F/3R y purificado posteriormente tal y como se indica en el Ejemplo 1, y/o por PCR en tiempo real.

#### 1.2.1 Determinación del genotipo de PEPCK por secuenciación

Las amplificación se realizó en un termociclador Biometra UNO-Thermoblock (Göttingen, Alemania) utilizando la polimerasa de alta fidelidad AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) y los cebadores PEPCK2F y PEPCK3R [PEPCK2F:5'GTGTTGTCCAAGGGGGATCAGGAGGA-3'(SEQ ID NO: 4) y PEPCK3R: 5'- CCCCTGCCTCGCACATTTAGGAT-3' (SEQ ID NO: 5)]. Cada reacción de PCR incluyó 1 unidad de AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity, 5 µl del buffer II 10x, 0,5 µl de una disolución de PEPCKF2 20 pmol/ µl, 0,5 µl de una disolución de PEPCKR3 20 pmol/ µl, 3,8 µl de DMSO (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos), 2 µl de DNA genómico (100 ng/ µl) y la cantidad de agua miliQ necesaria para ajustar el volumen total de reacción a 50 µl. El programa de temperaturas empleado incluye una etapa de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación durante 30 segundos a 55°C y extensión a 68°C durante 1 minuto 15 segundos, y una etapa final de extensión a 68°C durante 10 minutos.

A continuación se purificó el producto de la PCR con el kit NucleoSpin<sup>R</sup> Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto purificado se eluyó con 25 µl del buffer de elución del kit y se envió a secuenciar a Sistemas Genómicos (Paterna, Valencia, España) con el cebador PEPCKF2, 5 identificándose posteriormente en el cromatograma obtenido el nucleótido, o nucleótidos, presente en la posición en la que se encuentra la mutación.

### 1.2.2 Determinación del genotipo de PEPCK por PCR en tiempo real

El diseño de las sondas y de los cebadores utilizados en este ensayo se llevó a cabo por 10 el método Assay by Design de Applied Biosystems. Las reacciones se efectuaron en un termociclador ABI-PRISM 7000 (Amersham Biosciences, Estados Unidos) y cada ensayo incluyó 12,5 µl de Taqman Universal Master Mix, 0,6 µl de 40x Assay Mix, 5 µl de una disolución de ADN genómico 2 ng/µl ó de una disolución de 10 ng/µl del fragmento de PCR amplificado con la pareja de cebadores PEPCKF2/3R y posteriormente purificado y 15 6,875 µl de agua MiliQ.

Los cebadores utilizados fueron los siguientes SSPEPCKE4-F (5' CGCTGCCCCCTGCT 3' (SEQ ID NO: 6)) y SSPEPCKE4-R (5' CCCATGCTGAACGGGATGA 3' (SEQ ID NO: 7)) y las sondas SSPEPCKE4-V (5' AGGTCGCACGATGTAT 3' (SEQ ID NO: 8)), 20 marcada con el fluorocromo VIC, y SSPEPCKE4-M (5' AGGTCGCACGCTGTAT 3' (SEQ ID NO: 9)), marcada con el fluorocromo FAM (resaltado en negrita y cursiva se muestra el nucleótido específico para detectar cada alelo del polimorfismo). El programa de temperaturas empleado incluye una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos seguida de 50 ciclos de 15 segundos a 92°C y 1 minuto a 61°C.

25

En cada serie de ensayos por PCR a tiempo real se introdujeron dos blancos sin ADN, pero con el resto de los componentes de la mezcla, y tres controles de cada uno de los tres genotipos posibles.

## 30 1.3. Caracterización fenotípica

### 1.3.1 Procesado y conformación de la canal

Los animales fueron sacrificados en un matadero local cercano a su lugar de cría, tras aturdirlos con CO<sub>2</sub>. Se dejó enfriar la canal durante 6-8 horas. Se midió con un calibre el

espesor de tocino dorsal a nivel de la quinta vértebra lumbar. La mitad derecha de la canal se dividió en 10 partes: jamón, lomo, solomillo, paleta, cabezada, panceta, tocino, costillas, papada y recortes, que se pesaron de forma individualizada. Los jamones, a su vez, fueron diseccionados en otras tres partes: hueso, tejido adiposo subcutáneo con piel y masa muscular (incluyendo los depósitos de grasa intermuscular), que también fueron pesadas de forma individual.

### 1.3.2 Determinación del contenido graso

#### 10 1.3.2.1 Preparación de las muestras

Para la determinación del contenido de grasa intramuscular en el *Biceps femoris* (*B. femoris*), *Psoas major* (*Ps. major*) y *Longissimus dorsi* (L-dorsi) se tomó una muestra de entre 30 y 60 gramos del correspondiente músculo totalmente desprovisto de tejido adiposo y se homogeneizó con una picadora casera.

15

Para la determinación del contenido graso medio en el jamón, se homogeneizó el jamón deshuesado sin piel y sin tejido adiposo con una picadora o "cutter" (Mainca CM-41, Barcelona, España).

#### 20 1.3.2.2 Análisis del contenido graso

Se realizó una extracción de los lípidos de una muestra de 10 gramos de los homogeneizados anteriores por el método de Bligh y Dyer (1959) modificado por Hanson and Olley (1963). Se tomó una alícuota de 5 ml de la fase clorofórmica y se secó bajo corriente de nitrógeno. El contenido graso se calculó de forma gravimétrica.

25 El análisis del contenido graso en las muestras de grasa subcutánea (del jamón, en la región en la que se realiza el corte en "V") se realizó de manera análoga a partir de una muestra de 0,5 g.

### 1.3.3 Calidad de la carne

30 Se realizaron cuatro medidas de calidad de la carne:

1.3.3.1  $pH_{45}$ : pH en el *Longissimus dorsi* a nivel de la segunda vértebra lumbar a los 45 minutos postmortem. Esta medida, al igual que la siguiente, se realizaron con un pHmetro portátil Oakton PC300 (Vernon Hills, Illinois, EEUU) equipado con un electrodo de

punción Foodtrode (Hamilton, Bonaduz, Suiza).

1.3.3.2  $pH_{24}$ : pH en el *Longissimus dorsi* a nivel de la segunda vértebra lumbar a las 24 horas postmortem

5

1.3.3.3 *Exudación*: La exudación se determinó calculando la pérdida de peso que experimenta un filete de lomo de unos 70 g desprovisto de la capa de grasa subcutánea al cabo de 2, 4 y 7 días. Para la realización de esta medida y de la siguiente, se cortaron 8 filetes de lomo de la región comprendida entre la segunda vértebra lumbar y la duodécima vértebra torácica. Los cuatro más cercanos a L2 se destinaron a esta medida y los cuatro siguientes a la determinación de las pérdidas por cocción.

1.3.3.4 *Pérdidas por cocción*: La exudación se determinó calculando la pérdida de peso experimentada por un filete de lomo de unos 70 g desprovisto de la capa de grasa subcutánea cortado tras ser sometido a un tratamiento térmico de 75°C durante 20 minutos.

## 2. Resultados y discusión

20 El resultado de la puesta a punto del método de RT-PCR:

1) La RT-PCR no funcionó con ADN genómico (Figura 3 muestras marcadas con "x"). No hay incremento de fluorescencia en las muestras de DNA genómico, muy probablemente porque las sondas fluorescentes hibridan con otras zonas del genoma.

25

2) Una PCR llevada a cabo a partir de DNA genómico permitió amplificar un fragmento de 896 nucleótidos que contiene a A2456C (Figura 4).

3) La RT-PCR que falló sobre ADN genómico sí que funciona sobre el fragmento amplificado en el punto 2 (véanse las muestras marcadas con rombos, cuadrados o triángulos en la Figura 3)

30

Los resultados del genotipado obtenidos mediante secuenciación fueron coincidentes en el 100% de los casos con los obtenidos mediante RT-PCR.

La distribución alélica encontrada en los 202 animales aparece en la tabla 4 del Ejemplo 4 donde se aprecia que los tres posibles genotipos están representados en la población y que la frecuencia de ambos alelos permite llevar a cabo un estudio de asociación con los  
5 caracteres fenotípicos de interés.

Estudio de asociación entre A2465C y caracteres de interés

Se realizó un análisis Bayesiano para estudiar la asociación entre las distintas configuraciones genéticas de A2465C y la variabilidad fenotípica en los caracteres de  
10 interés.

El modelo de análisis fue:

$$y_{ijkl} = \mu + S_i + L_j + b_g G_k + b_a A_k + u_k + e_{ijk}$$

15

Donde  $y_{ijk}$  es el registro fenotípico del carácter de interés,  $\mu$  es la media general,  $S_i$  es el efecto sexo (2 niveles),  $L_j$  es el efecto lote (cuatro niveles),  $G_k$  es el número de alelos A del individuo k (0, 1 ó 2),  $A_k$  es la edad del individuo k al sacrificio,  $u_k$  es el valor genético poligénico para el individuo k,  $e_{ijk}$  es el residuo y  $b_g$  y  $b_a$  son las covariables con el número  
20 de alelos A y con la edad, respectivamente. Se asumieron distribuciones a-priori uniformes para los efectos sistemáticos y componentes de varianza y normal multivariante para los efectos poligénicos:

$$\mathbf{u} \sim N(0, \mathbf{A}\sigma_a^2)$$

25 Donde  $\mathbf{A}$  es la matriz de parentesco numerador (Wright, 1922) y  $\sigma_a^2$  es la varianza aditiva poligénica. Para la construcción de la matriz de parentesco numerador se utilizó una genealogía de 243 individuos. El análisis se efectuó mediante un muestreo de Gibbs (Gelfand y Smith, 1990, J. Amer. Statist. Assoc. 85, 398-409) a través de una cadena  
30 única de 125.000 interacciones después de descartar las primeras 25.000.

30

La inferencia acerca de la asociación entre la configuración genética para A2465C y los caracteres de interés se centra en la distribución posterior para el parámetro  $b_g$  que representa el efecto de sustitución. Los resultados de media posterior y desviación típica

posterior así como la probabilidad posterior por encima de cero se presentan en la Tabla 2.

5 Tabla 2. Valores medios de parámetros de conformación de la canal y de composición y calidad de la carne y efectos de la sustitución A2465C sobre estos.

Parámetro	Valor medio (desviación estándar)	Efecto de la sustitución (desviación estándar posterior)	<sup>1</sup> P
Espesor de tocino dorsal	19,90 (5,73)	1,078 (0,5475)	0,0244
Rendimiento de la canal	78,05 (3,22)	0,587 (0,3560)	0,0496
Rendimiento tras el oreo	76,35 (3,14)	0,813 (0,3590)	0,0117
Rendimiento partes nobles	43,35 (4,98)	-0,2490 (0,2020)	0,8912
% Lomo	5,73 (0,67)	-0,048 (0,077)	0,7334
% Solomillo	0,77 (0,10)	0,0124 (0,0108)	0,1254
% Jamón	25,86 (1,26)	-0,1484 (0,1281)	0,8767
% Paleta	15,19 (0,80)	-0,1228 (0,0844)	0,9271
% Panceta	6,62 (1,22)	-0,0065 (0,1223)	0,5210
% Tocino	12,23 (1,85)	0,2591 (0,2029)	0,1008
% Tocino en el pernil	19,22 (3,58)	0,3959 (0,3806)	0,1491
% Músculo en el pernil	64,93 (3,48)	-0,5000 (0,3616)	0,0833
% Hueso en el pernil	15,85 (1,97)	0,0638 (0,2176)	0,3846
pH <sub>45</sub>	6,35 (0,03)	0,0061 (0,0293)	0,4175
pH <sub>24</sub>	5,64 (0,02)	-0,0242 (0,0186)	0,9034
% Exudación a los 2 días	4,30 (1,89)	0,5077 (0,2127)	0,0085
% Exudación a los 4 días	6,51 (2,37)	0,7809 (0,2832)	0,0029
% Exudación a los 7 días	8,12 (2,47)	0,7692 (0,3130)	0,0070



% Pérdidas por cocción	33,90 (2,85)	-0,0344 (0,0211)	0,9485
% <sup>2</sup> GIM lomo	2,66 (0,95)	-0,2620 (0,0949)	0,9971
% <sup>2</sup> GIM solomillo	1,96 (0,44)	-0,1187 (0,0524)	0,9883
% <sup>2</sup> GIM B. femoral	2,95 (0,86)	-0,0191 (0,0986)	0,5768
% grasa total en el tejido adiposo	77,80 (5,90)	0,1943 (0,5800)	0,3688
% grasa total en el pernil	8,35 (1,54)	-0,0674 (0,1465)	0,6773

<sup>1</sup>P = Probabilidad Bayesiana posterior por encima de cero

<sup>2</sup>GIM = Grasa intramuscular

Los caracteres de la Tabla 2 son de tres tipos: 1) de conformación, incluyendo los rendimientos de la canal (espesor de tocino dorsal, % partes nobles, % de diversas piezas, conformación del pernil, área del lomo); 2) de calidad de la carne (pH<sub>45</sub>, pH<sub>24</sub>, exudación, pérdidas por cocción); y 3) de contenido graso (grasa intramuscular en el L-dorsi (lomo), Ps. Major (solomillo), B. femoralis); contenido graso en tejido adiposo subcutáneo; contenido total de grasa en el pernil una vez retirado el tejido adiposo subcutáneo).

En un análisis Bayesiano adquieren especial relevancia aquellos caracteres que, no sólo tienen valores de probabilidad Bayesiana posterior por encima de cero cercanos a 0 o a 1 sino que además tienen una relación directa entre ellos. Por ejemplo, en la Tabla 3 se advierte que los tres caracteres de exudación tienen probabilidad Bayesiana posterior muy cercana a 0 lo que indica que el efecto encontrado (que oscila entre 1,015 y 1,54 puntos porcentuales más de exudación a los 2 y a los 7 días, respectivamente) es un efecto real y no un artefacto. Dado que el porcentaje medio de exudación en la población estudiada es del 4,30% y del 8,12% a los 2 y a los 7 días, respectivamente, un homocigoto AA presenta una carne entre un 19 y 24% menos exudativa que un homocigoto CC. Este fenómeno bien podría estar relacionado con los valores de pH<sub>24</sub> de la carne para los que también se ha encontrado una probabilidad Bayesiana posterior bastante alta (0,9034). Es bien sabido que valores altos de pH<sub>24</sub> dan lugar a menores valores de exudación. Esta conexión entre los resultados de los valores de exudación y de pH<sub>24</sub> le añaden aún más coherencia al conjunto de resultados de la Tabla 3.

El valor de espesor de tocino dorsal también tiene un valor de probabilidad Bayesiana posterior por encima de cero destacable (0,0224). El efecto atribuible a cada alelo A sobre este carácter sería de 1.078 mm lo que supone que un individuo homocigoto AA tiene 2.16 mm menos de espesor de tocino dorsal que un individuo homocigoto CC. Dado que el valor medio de este carácter en la población es de 19,90 mm, un individuo homocigoto AA tiene un espesor de tocino dorsal un 10,9% menor que un individuo homocigoto CC. Por otro lado, hay dos valores de contenido graso, el contenido de grasa intramuscular en el L-dorsi y en el B. femoralis que muestran valores de la probabilidad Bayesiana posterior muy cercanos a 1. Esto es especialmente así en el valor de grasa intramuscular en el L-dorsi ( $P = 0,9971$ ). El signo diferente de la estimación del efecto de sustitución respecto al caso del espesor de tocino dorsal indica que los individuos con alelos A tienen un contenido de grasa intramuscular mayor que los individuos con alelos C. El cálculo de la diferencia estimada entre un individuo homocigoto AA y un individuo homocigoto CC sería:  $0,262 \times 2 = 0,524$  puntos porcentuales, que, teniendo en cuenta que el valor medio de este carácter en la población estudiada es de 2,66%, supone un 19,6% más de grasa intramuscular en el L-dorsi en un homocigoto AA.

### 3. Conclusiones

El alelo A de PEPCK está asociado simultáneamente a menores valores de tocino dorsal y mayores valores de contenido de grasa intramuscular. Asimismo está asociado a carnes con menor porcentaje de exudación y valores de  $pH_{24}$  más altos. La selección de individuos homocigotos AA permite por lo tanto mejorar la calidad de la carne, porque esta exuda menos y tiene más grasa intramuscular, y mejora la conformación de la canal porque presenta menos espesor de tocino dorsal.

### **EJEMPLO 3. Contenido en mioglobina y color**

#### **Introducción**

Una característica muy importante de la carne y de los productos cárnicos es el color. El color es la primera cualidad de la carne que perciben los consumidores y por ello es clave para la decisión de compra por parte de aquellos. Uno de los mecanismos más importantes que modulan el color de la carne es el contenido de su principal pigmento, la mioglobina. La mioglobina es un pigmento intracelular que contiene un grupo hemo con

un átomo de hierro. Para evaluar la influencia de A2456C en PEPCK sobre el contenido de mioglobina y el color se decidió analizar ambos en una población de 60 animales muy homogénea en el peso (90,7 +/- 4,9 kg).

## 5 1. Materiales y métodos

El contenido de mioglobina y de hierro hemínico en el músculo Bíceps femoral fue cuantificado utilizando el método de Hornsey (1956, Journal of the Sciences of Food and Agriculture 7, 534-541) modificado por Gorospe y col (1986, Alimentaria, 25-32). La medida instrumental del color se llevó a cabo con un colorímetro triestímulo Minolta Chromameter CR-200 con iluminante D65. Las mediciones, por triplicado, se hicieron en el espacio de color CIELAB sobre el músculo Bíceps femoral. El color se expresa mediante las coordenadas de cromaticidad L\*, o índice de luminosidad, a\*, índice rojo-verde, y b\*, índice amarillo-azul.

15

## 2. Resultados y discusión

Tabla 3. Valores medios de parámetros relacionados con el color y efectos de la sustitución A2465C sobre dichos parámetros.

Parámetro	Valor medio (desviación estándar)	Efecto de la sustitución (desviación estándar posterior)	<sup>1</sup> P
L*	45,4 (2,10)	-0,512 (0,519)	0,838
a*	14,9 (1,39)	-0,822 (0,335)	0,993
b*	6,5 (0,90)	-0,036 (0,024)	0,563
Mioglobina (mg/g)	1,84 (0,37)	-0,068 (0,090)	0,998
Hierro (ppm)	0,16 (0,03)	-0,022 (0,008)	0,997

20 <sup>1</sup>P: Probabilidad Bayesiana posterior por encima de cero.

Como muestra la Tabla 3, encontramos probabilidades Bayesianas posteriores muy altas para dos caracteres muy relacionados, la coordenada “b” de color o índice de rojo-verde, y el contenido de mioglobina. La magnitud del efecto de un alelo para este último parámetro sería de 0,2723 mg/g lo que haría que un animal homocigoto AA tuviera 0,54 mg/g más de mioglobina que un animal CC lo que, dado que el contenido de mioglobina medio de este grupo de animales es de 1,84 mg/g, supone que los homocigotos AA

25

tienen un 30% más de mioglobina que los homocigotos CC. Esa diferencia en el contenido de mioglobina es, al menos en parte, responsable de la diferencia de color detectada en el valor b.

### 5 3. Conclusiones

La carne de animales AA contiene un 30% más de mioglobina y de hierro hemínico que la de los animales CC. El análisis instrumental del color revela además que la carne de los animales AA es más roja. Ambas características son comúnmente percibidas como favorables por los consumidores lo que convierte en muy interesante la selección de cerdos AA.

### EJEMPLO 4. Frecuencias alélicas de los alelos A y C de PEPCK

#### 15 Introducción

El porcentaje de mejora de un determinado carácter en una población mediante la selección de animales portadores de alelos que modulan dicho carácter en un determinado sentido depende, además de la magnitud del efecto asociada a un determinado alelo, de la proporción inicial de animales en dicha población que ya sean portadores de los alelos favorables. Por lo tanto, el porcentaje potencial de mejora de una población será tanto mayor cuanto menor sea, antes del inicio del proceso de mejora mediante la selección de animales portadores de un alelo determinado, la frecuencia de dicho alelo. Para investigar cual es la frecuencia alélica actual de los alelos 2465A y 2465C de PEPCK, y poder estimar así las posibilidades de mejora, se genotipó una serie de animales de distintas razas y cruces utilizando el método descrito en el Ejemplo 2.

#### 1. Material y métodos

##### 1.1 Animales

30 Los cruces y razas porcinas que fueron genotipados aparecen en la Tabla 4. También se genotipó a un total de 13 jabalíes.

Tabla 4. Genotipos de PEPCK de los animales analizados; frecuencias alélicas (p) del alelo A

	AA	AC	CC	p (alelo A)
Jabalí	10	3	0	0,88
Ibérico	18	8	0	0,85
Duroc línea 1	18	8	1	0,81
Duroc línea 2	17	42	16	0,51
Duroc x Landrace-Large White	73	114	15	0,64
Pietrain x Large White	12	68	53	0,35
Pietrain	2	26	21	0,31

### 1.2 Extracción de DNA

La extracción del DNA genómico a partir de músculo, pelo, cola o semen se realizó con el kit Real Pure para la extracción de DNA genómico (Durviz, Paterna, Valencia), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### 1.3 Determinación del genotipo de PEPCK por PCR en tiempo real

La determinación del genotipo de PEPCK citosólica en la posición 2456 se llevó a cabo también mediante PCR en tiempo real. El diseño de las sondas y de los cebadores utilizados en este ensayo se llevó a cabo por el método Assay by Design de Applied Biosystems. Las reacciones se efectuaron en un termociclador ABI-PRISM 7000 (Amersham Biosciences, Estados Unidos) y cada ensayo incluyó 12,5 µl de Taqman Universal Master Mix, 0,6 µl de 40x Assay Mix, 5 µl de una disolución de 10 ng/µl del fragmento de PCR amplificado con la pareja de cebadores PEPCKF2/3R y posteriormente purificado y 6,875 µl de agua MiliQ.

Los cebadores utilizados fueron los siguientes SSPEPCKE4-F (5' CGCTGCCCCCTGCT 3' (SEQ ID NO: 6)) y SSPEPCKE4-R (5' CCCATGCTGAACGGGATGA 3' (SEQ ID NO: 7)) y las sondas SSPEPCKE4-V (5' AGGTCGCACGATGTAT 3' (SEQ ID NO: 8)), marcada con el fluorocromo VIC, y SSPEPCKE4-M (5' AGGTCGCACGCTGTAT 3' (SEQ ID NO: 9)), marcada con el fluorocromo FAM (resaltado en negrita y cursiva se muestra el nucleótido específico para detectar cada alelo del polimorfismo). El programa de temperaturas empleado incluye una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos seguida de 50 ciclos de 15 segundos a 92°C y 1 minuto a 61°C.

25

En cada serie de ensayos por PCR a tiempo real se introdujeron dos blancos sin ADN

pero con el resto de los componentes de la mezcla.

## **2. Resultados y discusión**

El genotipo de los animales de las diferentes razas y cruces y la frecuencia del alelo A en  
5 estos animales aparecen en la Tabla 4.

Los resultados de la Tabla 4 muestran que, sobre todo en razas o cruces modernos, las  
posibilidades de mejora son considerables porque el porcentaje de alelos favorables (el  
alelo A) oscila entre el 81 % en una línea de la raza Duroc y el 31% en la raza Pietrain.

10 Incluso en la raza Ibérica se encontró que la frecuencia del alelo A no es del 100% sino  
algo inferior (el 85%) lo que significa que en esta raza hay cierto espacio para la  
selección.

## **3. Conclusiones**

15 La mutación A2456C puede ser un instrumento muy útil de mejora en poblaciones  
porcinas muy diversas.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar un suido que presenta un fenotipo con mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de referencia,  
5 y/o un suido que presenta un fenotipo con al menos un 30% más de mioglobina en músculo que un valor de referencia, y/o un suido que presenta un fenotipo cuya carne es al menos un 19% menos exudativa que un valor de referencia, que comprende:
  - 10 a) Detectar en una muestra biológica procedente de dicho suido un polimorfismo A/C en la posición 2456 de la secuencia SEQ ID NO: 1 que codifica la proteína PEPCK citosólica, y
  - b) Seleccionar aquel suido que presente el alelo A en homocigosis.
  
2. Método según la reivindicación 1, en el que la detección del polimorfismo se lleva a  
15 cabo mediante un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en secuenciación directa, análisis de hibridación de transferencia puntiforme de oligonucleótido específico del alelo (ASO), ampliación del cebador mononucleotídico, análisis del polimorfismo de configuración monocatenario (SSCP) por PCR, análisis del polimorfismo con longitud del fragmento de restricción (RFLP) por PCR, PCR cuantitativa en tiempo real y matriz de masas utilizando un espectrómetro de masas.
  
- 20 3. Método según la reivindicación 2, en el que la detección del polimorfismo se lleva a cabo mediante la amplificación del gen PEPCK empleando cebadores que comprenden la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7.
  
- 25 4. Método según la reivindicación 2 ó 3, en el que la detección del polimorfismo se lleva a cabo mediante la sonda de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9.
  
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el suido es un cerdo doméstico o un jabalí.
  
6. Una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína PEPCK citosólica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos con al menos un 70 % de identidad con

la SEQ ID NO: 1 y (ii) el polimorfismo A/C en la posición equivalente al nucleótido 2456 de dicha secuencia SEQ ID NO: 1 mediante el óptimo alineamiento de ambas secuencias.

- 5 7. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 6, que comprende al menos una secuencia de nucleótidos con un 80, 90, 95, 98, 99 o 100 % de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1.
8. Una sonda de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID  
10 NO: 8 o SEQ ID NO: 9.
9. Un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO:  
15 7.
10. Una pareja de cebadores específicos para amplificar la región de la SEQ ID NO: 1 que comprende el polimorfismo A/C en la posición 2456 de dicha secuencia SEQ ID NO: 1, en la que al menos uno de los cebadores comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7,  
20 preferiblemente, la pareja de cebadores está formada por las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, o las secuencias SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.
11. El uso de una sonda según la reivindicación 8, de un oligonucleótido según la reivindicación 9, y/o de una pareja de cebadores según la reivindicación 10, para  
25 detectar el polimorfismo A/C en la posición 2456 de la secuencia SEQ ID NO: 1 que codifica la proteína PEPCK citosólica.
12. Uso según la reivindicación 11, en el que el gen que codifica la proteína PEPCK citosólica comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 70, 80, 90, 95,  
30 98, 99 o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.
13. El uso de una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 6, de una sonda según la reivindicación 8, de un oligonucleótido según la reivindicación 9, y/o de una pareja de cebadores según la reivindicación 10, para seleccionar un suido que



5 presenta un fenotipo con mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de referencia, y/o un suido que presenta un fenotipo con al menos un 30% más de mioglobina en músculo que un valor de referencia y/o un suido que presenta un fenotipo cuya carne es al menos un 19% menos exudativa que un valor de referencia.

14. Uso según la reivindicación 13, en el que el fenotipo del suido presenta, al menos, entre un 19 y un 25% más de grasa intramuscular y, al menos, entre un 9 y un 15% menos de tocino dorsal que un valor de referencia.

10

15. Uso según la reivindicación 14, en el que el fenotipo del suido presenta, al menos, un 20 % más de grasa intramuscular y, al menos, un 11% menos de tocino dorsal que un valor de referencia.

15 16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el fenotipo del suido presenta una carne con, al menos, entre un 19 y un 24% menos exudación que un valor de referencia.

20 17. El uso de una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 6, de una sonda según la reivindicación 8, de un oligonucleótido según la reivindicación 9, y/o de una pareja de cebadores según la reivindicación 10, para seleccionar un producto cárnico que presenta un mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de referencia, un 30% más de mioglobina que un valor de referencia y/o al menos un 19% menos exudación que un valor de referencia.

25

18. Uso según la reivindicación 17, en el que el producto cárnico presenta, al menos, entre un 19 y un 25% más de grasa intramuscular y, al menos, entre un 9 y un 15% menos de tocino dorsal que un valor de referencia.

30 19. Uso según la reivindicación 18, en el que el producto cárnico presenta, al menos, un 20% más de grasa intramuscular y, al menos, un 11% menos de tocino dorsal que un valor de referencia.

20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que el producto cárnico

presenta, al menos, entre un 19 y un 24% menos exudación que un valor de referencia.

21. Un kit que comprende una sonda según la reivindicación 8, un oligonucleótido según la reivindicación 9, y/o una pareja de cebadores según la reivindicación 10.

22. Uso de un kit según la reivindicación 21, para detectar el polimorfismo A/C en la posición 2456 de la secuencia SEQ ID NO: 1 que codifica la proteína PEPCK citosólica.

10

23. Uso según la reivindicación 22, en el que el gen que codifica la proteína PEPCK citosólica comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

24. El uso de un kit según la reivindicación 21, para seleccionar un suido que presenta un fenotipo con mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de referencia, y/o un suido que presenta un fenotipo con al menos un 30% más de mioglobina en músculo que un valor de referencia y/o un suido que presenta un fenotipo cuya carne es al menos un 19% menos exudativa que un valor de referencia.

20

25. Uso según la reivindicación 24, en el que el fenotipo del suido presenta, al menos, entre un 19 y un 25% más de grasa intramuscular y, al menos, entre un 9 y un 15% menos de tocino dorsal que un valor de referencia.

25

26. Uso según la reivindicación 25, en el que el fenotipo del suido presenta, al menos, un 20% más de grasa intramuscular y, al menos, un 11% menos de tocino dorsal que un valor de referencia.

27. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en el que el fenotipo de suido presenta una carne con, al menos, entre un 19 y un 24% menos exudación que un valor de referencia.

30

28. Uso de un kit según la reivindicación 21, para seleccionar un producto cárnico que

presenta un mayor contenido de grasa intramuscular y menor contenido de tocino dorsal que un valor de referencia, un 30% más de mioglobina que un valor de referencia, y/o al menos un 19% menos exudación que un valor de referencia.

- 5 29. Uso según la reivindicación 28, en el que el producto cárnico presenta, al menos, entre un 19 y un 25% más de grasa intramuscular y, al menos, entre un 9 y un 15% menos de tocino dorsal que un valor de referencia.
- 10 30. Uso según la reivindicación 29, en el que el producto cárnico presenta, al menos, un 20 % más de grasa intramuscular y, al menos, un 11% menos de tocino dorsal que un valor de referencia.
- 15 31. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, en el que el producto cárnico presenta, al menos, entre un 19 y un 24% menos exudación que un valor de referencia.

FIG.1

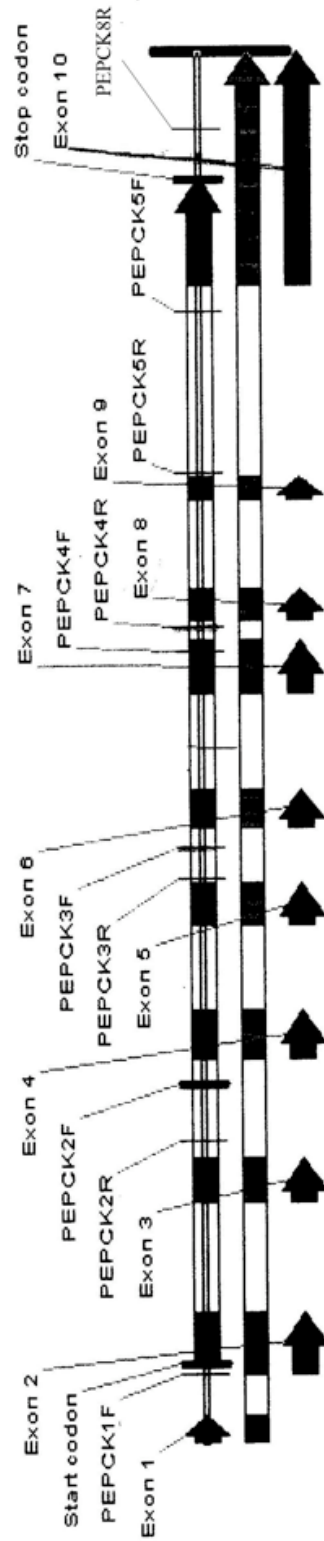


FIG. 2

359 ↓ 418

Sec.ref. 10 (Pi4) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
11 (Pi29) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGCTGT  
12 (Pi38) AGGACTTYGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGMTGT  
13 (Pi41) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
14 (Pi107) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
15 (Pi222) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGCTGT  
16 (Pi226) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGMTGT  
17 (Pi227) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGMTGT  
18 (Pi307) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGMTGT  
1 (iber1) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
2 (iber2) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
3 (iber3) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
4 (iber4) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
5 (iber5) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
6 (iber6) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
7 (iber7) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
8 (iber8) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
9 (iber9) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
19 (2j) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGCTGT  
20 (11j) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
21 (34j) AGGACTTYGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
22 (42j) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGMTGT  
23 (43j) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
24 (56j) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGMTGT  
25 (60j) AGGACTTCGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGMTGT  
26 (63j) AGGACTTYGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGMTGT  
27 (64j) AGGACTTYGAGAAAGCCTTCAATGCCCGTTTTCCGGGGTGCATGAAGGGTCGCACGATGT  
\*\*\*\*\*

419 478

Sec.ref. 10 (Pi4) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
11 (Pi29) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
12 (Pi38) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
13 (Pi41) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
14 (Pi107) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
15 (Pi222) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
16 (Pi226) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
17 (Pi227) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
18 (Pi307) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
1 (iber1) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
2 (iber2) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
3 (iber3) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
4 (iber4) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
5 (iber5) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
6 (iber6) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
7 (iber7) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
8 (iber8) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
9 (iber9) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
19 (2j) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
20 (11j) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
21 (34j) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
22 (42j) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
23 (43j) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
24 (56j) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
25 (60j) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
26 (63j) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
27 (64j) ATGTCATCCCGTT CAGCATGGGGCCCCTGGGCTCGCCCCTGTCCAAGATTGGCATCGAGC  
\*\*\*\*\*

FIG. 3

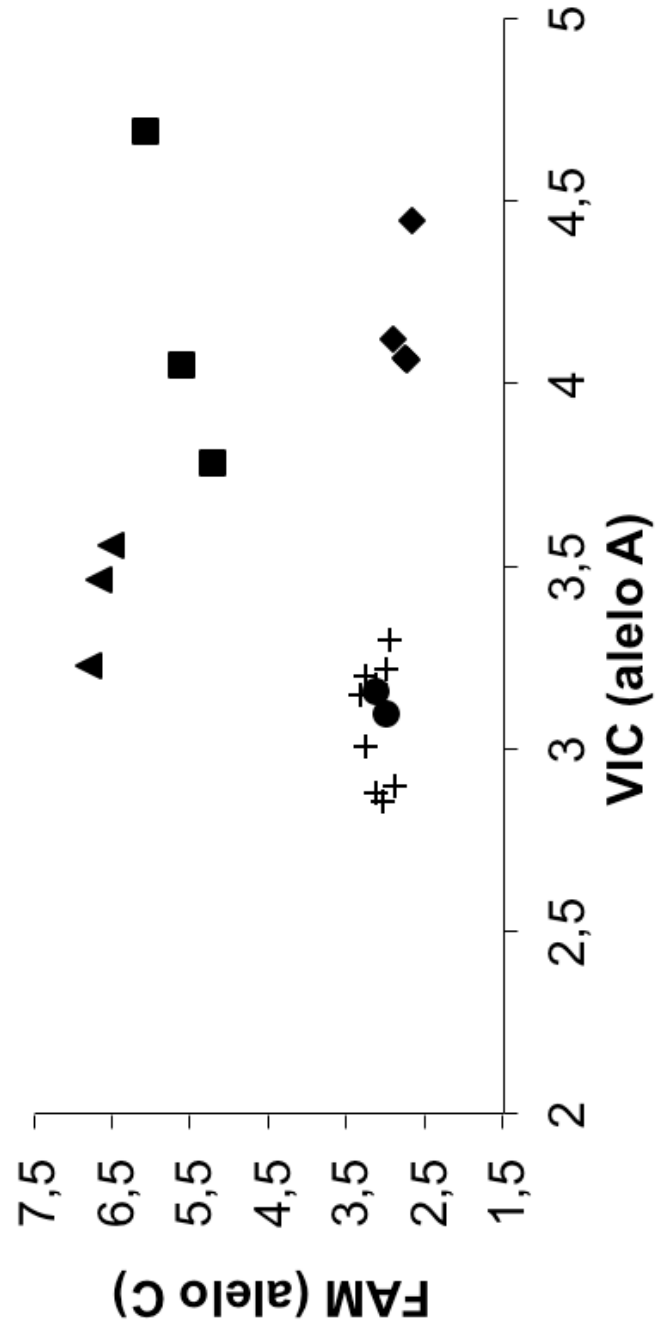
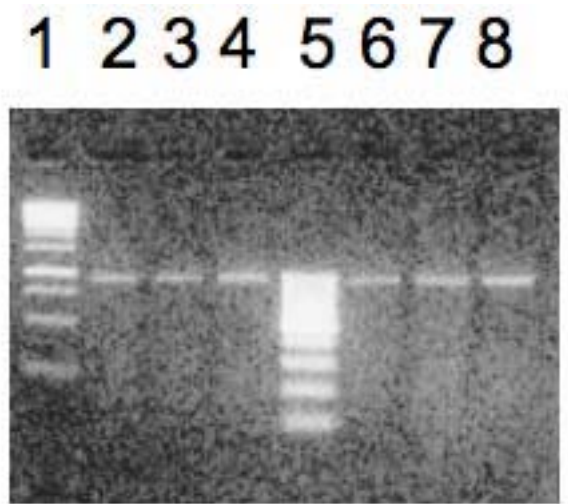


FIG. 4



# ES 2 490 440 A1

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Zaragoza  
 <120> MÉTODO PARA LA SELECCIÓN DE SUIDOS CON MEJOR CALIDAD DE LA CARNE  
 BASADO EN UN SNP EN EL GEN QUE CODIFICA LA PEPCK CITOSÓLICA  
 <130> ES1519.104  
 <160> 17  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 6966  
 <212> DNA  
 <213> Sus scrofa  
  
 <220>  
 <221> variation  
 <222> (2456)..(2456)  
 <223> /replace = "c"  
  
 <400> 1  
 cccctctacc acccaccagc ctgggagctg ggagtagcca ctgggcctcc tgggcctcag 60  
 tgtccttgtc tgttcagga ggtgggggag tggggagcca ttcgtggact ccaactgcaga 120  
 gggcgacagg aagttagttagt caaagcactc agaacaatgc tcggcgtttg ttcattcctc 180  
 tcccactgtg tgcggggaac catgcacaca gcacgaacaa aagagagaga aatccttacc 240  
 ctgagggagc tgatgttttg ggtaggggca gggggtaggc agtggacact caataaggtt 300  
 aatcacctct aattaggtca gacctttgcc aagaagccac atgctttctt gaattcaggg 360  
 tcgttcttcc catgggcctt tgactgtggg gtgacagctc accatcgtgg ttgtggccag 420  
 ccagcgcca tctgtacaca agacgtgctg cccaaaccgc caatctcccc cccctcccgc 480  
 ccccgctggg gcgccatcct acctgcctgt cgatgggagg gccgtgagct atgcatcagc 540  
 agtggactgg ttcaaagtct agtcaatctg aggttgcgta acggttggct gtggccgatc 600  
 ccagggccgg aggccgcca gcactcatta acgaccatca atgattacc cggggggttt 660  
 attgtggtga gccggtccaa agcgtaacgg accgtggcca tgatccaaag accggccctg 720  
 acgtcagaga cgagcctccc ggggggtggct gagggcccgg gcctttctcc tccccagaat 780  
 ttaaagctgg gaggttctgc ccccaaacac ccagcagggc ctccccactg ggaacgcgcg 840  
 ctgaccagcg ggacgagcct gcaaagcgac cttgggtct cggatccgac cttccttgac 900  
 catccaagga gagaaaacgt aggtaaagct gcttcatttc cttttctaac aaagggcaga 960  
 gtaaacagga actgggtttt gtcttccttc cagctgtgac tgtgtggtga cgtggagccc 1020  
 acacagagtg cgtggcgtct acccgagggg gcccgaggtg ccggttctgg ttcaggaagc 1080  
 ctgtgctttc ttgttgacag cgaccttggc atccacaccc cttagctcgg ccctgcagga 1140  
 tgcctcctca gctctcaaac ggcctcaacc actcggccaa agtcgtccgg ggcaccctgg 1200  
 acagcctgcc ccaggccgtg cgggatttcg tggagagcag cgccaagctg tgccagcctg 1260  
 accaaatcca catctgcat ggctccgagg aggagaacca gcagctgctg agccacatgg 1320



ES 2 490 440 A1

aggaagaggg tgtcatcaag aggctgaaga agtatgacaa ctggtgagtc ccgccccggc 1380  
 ccccggtggtg gcttccctgt ccccagcgag cgagctgcag gtgggaagag gtggaagagg 1440  
 ggctgtgtgg ttcgcaggct cttgaaaaac ttaaccaaag agtcagaaac gcatagtctt 1500  
 aattttatga tattggcaga gcagcccaag gtctcagga gagggcgcggt gcaggccctc 1560  
 tttgcattta gatccttgat caaaaccaag gtcagaccat ccctgtcctc gacgactcgc 1620  
 ccctagtcta tgaaaggctc cccgaccgag tgccagtcgg cgtggctgtg tccacacgga 1680  
 cggaccatca tctgtgagcc cggcacctgc cagggtgtggg aagaacgtgc taatgagtaa 1740  
 acgggtccca tccggaagga tggggggctc agggcatggg gggtagcagc acagccctct 1800  
 cccgtcccaa cctgggtgtt tttgattttt gcagctgggt ggctctcaca gaccccaggg 1860  
 acgtggccag aattgaaagc aagacggtca tcattactca ggagcaaagg gatgcggtgc 1920  
 ccatccccag aagcggcctc agccagctgg gtcgctggat gtccccggag gacttcgaga 1980  
 aagccttcaa tgcccggttt ccgggggtgca tgaaggggtga gtgaaacctt tacctgattg 2040  
 ggtgaaatat cagcгааact tttctcatcg atctggcctc atggtagtgtg taatagaacc 2100  
 tcccgtggcc tcagcgagct ttaaattccg tgtgtgaaat gggccgtgta ttgacactgc 2160  
 ccagcgcagt gtggctggat agactgactt gcgtggccat ggaaacagtt tccacgcacg 2220  
 cagcgcgaag acagcttga gggaccagc tgcgcgttg tgaaaagtct ttcatttggg 2280  
 ggctctgttc actctccagt gggctcctcc aaatcgggga ggggtgccag cggcaaaggg 2340  
 gcgtgttgtc caagggggat caggaggagg gtcgccgggg acaccggggg tggcggctgg 2400  
 ggagtccggg gtgaccctc acccgctgcc ccctgctgcc cccgcaggtc gcacgatgta 2460  
 tgtatcccg ttcagatgg gggccctggg ctgcgccctg tccaagattg gcatcgagct 2520  
 gacggactcg ccctacgtgg tggccagcat gcgcatcatg acgcggatgg gctcggccgt 2580  
 cctggacgcg ctgggggagg gcgagttcat caagggcctc cactccgtgg ggtgccccct 2640  
 gcctttgaaa agtaagcagg tgcatttcca aatcgacagc tggagttggg aaaaaaggcg 2700  
 tttccgttgt tgcccagtgg aaacgcatct gactaggaac catgaggttg tgggttcgat 2760  
 ccctggcctc gctcagtggg ttaaggatcc ggcgttgccg tgagctgtgg tgcaggttgc 2820  
 agatgcagct cggatcctgt gttgctgtgg ctgtggtgta ggccagcagc tacagctcca 2880  
 attagacccc tagcctggga acctccacct gctgcagttg tggccctaaa aagcaaaaaa 2940  
 aaaagaaaaa aaaagatagc ttcagctttg aaccaggtg gatgctaata tggggcgtgt 3000  
 cctcctgtgc agagcccttg gttaacaact gggcctgtaa cccagagctg acgctcattg 3060  
 cccacctgcc cgaccgccga gaaatcatct ccttcgggag cgggtacggc gggaaactcac 3120  
 tccttgggaa gaagtgcttt gccctgagga tggccagccg gctggccaag gaggaggggt 3180  
 ggctggcaga gcacatgctg gtaagatgca ggaaatccta aatgtgagcag gcagggggcg 3240  
 ggggaggcag ggaggaggcg tgtaccccc tctactacagt tcctaccagg caagagcctg 3300  
 tgggctccca ggacagatgt agaaactcca cccgtacttc tgagtggctc ccgggcaccc 3360

ES 2 490 440 A1

tcctaggcca	aagcattgac	ctccgggaca	gaagggagcc	gagagcttaa	ggagaagtct	3420
tgtctccaac	agatcctggg	cgtaaccaac	cccgagggcc	agaagaaata	ctttgccgca	3480
gctttcccca	gcgctgctg	gaagaccaac	ctggctatga	tgaacccac	gctcccgggc	3540
tggaaagtgg	agtgcgtggg	ggacgacatc	gcctggatga	aattcgacca	acaaggtgac	3600
cctttgaggc	tcccgtgctg	atgattcgaa	ttggctcgca	gtgaggtttt	ggctttcacg	3660
cgtccagggt	gtcgggggtg	ggcttcttcc	agttcttgcc	aaagtgtgga	catccgcatt	3720
ctgccagcct	tctttaacct	cctggccagt	ctgggtggaa	atggggccct	gtatgggtgt	3780
tcgtttacac	agtaaatgga	ttaaaacctt	gtgggtggac	agtggtgagg	aagaaagagt	3840
ctacatgact	aataatgctc	ggacgagaaa	ggagacgtag	actcgaggga	ggagggaaaa	3900
aatgaaagat	ttgagaatct	gggacagaaa	ctagcgtggc	cggaacggag	attattcgtc	3960
atgccttgcc	tgggacttac	ctccaccggc	cggtttgaaa	ctctccaggt	aattttacggg	4020
ccatcaacc	agagaacggg	ttttttggcg	ttgctcccgg	aacctctgtg	aagacaaacc	4080
ccaatgccat	caaaaccatc	caaagcaaca	ccatcttcac	caacgtggcc	gagaccagcg	4140
acggggggcgt	ttactgggaa	ggcatcgacc	agccgctggc	cccgggcac	aagctcactt	4200
cctggaaggg	cacagagtgg	gaccccaagg	atggtaaggc	ccccgggag	gcccgggtgcc	4260
cccacctaca	ggcctgtgtg	tcggcagctg	ctcagggcgt	cttctctctg	gctgtttgtag	4320
gggaaccttg	cgctacccc	aactcgcggt	tctgcacccc	tgccagccag	tgccccatca	4380
tcgaccctgc	ctgggaggcc	ccggaaggcg	tgcccattga	gggcatcatc	ttcggagggc	4440
gccgccctgc	tggtgaggct	cccctgccct	cgggctgggt	gctcggggta	tcgctagccg	4500
agtggggggg	ggagcgtggt	cctctttcct	gtgacttgtc	ggaggggtgcc	agggatccag	4560
agcttccctc	cccaagccac	aggggaagaa	gcaggcccca	gcgcagaacc	ccgtctctgg	4620
ctgcccagca	cccctggctc	ctgggatgct	gtacccgcct	tgacttcagc	ctcccgtgtg	4680
aacttcgacg	tggccgatg	tgcccttcgc	tctggggagg	cagaatcagc	cctgttagac	4740
agactctgct	ctgccgtctc	tccatgtctg	agatgccgcc	ccgagggctc	tgggcatcga	4800
ggccgttaag	gaacacttct	ttcctactaa	aggcgtccct	ctgggtgtacg	aggctctcag	4860
ctggcagcac	ggcgtgttcg	tgggggcggc	catgaggtcc	gaggccaccg	cggctgcgga	4920
gcacaagggg	gagtctccaa	ggagggcagc	gctgcccttt	cttctctgtg	tgtctctctg	4980
tttctgtatg	tctctctctg	tttctgtctc	tgtgtgtcgc	tctttctctc	gatatatgtc	5040
tctctgtgtc	tttatctctg	tctgcctgtc	tctttccatc	tctgtgtgtc	tctctctatg	5100
tgtctttcta	tctctgcctc	tctctgtttc	tctgtctttc	ctctgtctct	gtgtgtctac	5160
atgtctctcc	gcgtctctcc	atctctgtct	ctgatgtctc	tctgtctccc	tgtgtctctt	5220
tatctctctc	tgtctctcca	tgtctgtctc	tgtcttgctg	tctctgtgtc	tctctgtgtc	5280
tgtgtctctg	tcctctctct	gtctctgtgt	ttccccatgt	ctctctgtct	gtctctatct	5340
ctcttccctg	agtctctgtc	tctgtgtcta	tctctgtttc	tctatctctc	tcttgctgct	5400

ES 2 490 440 A1

tttgtctctg tgtctctctg tgtctgtctc tctgttctct ctctgtctct gggctcctcct 5460  
 atgtctctgc atctctctgt ccctgtcctt ccccgatatct ctctgtctct ctgtccctgt 5520  
 gtctctctgt ctctgtgctc ctcgcatctc tgtctctctg tacctgtgtc tctctgtccc 5580  
 tgtccttccc cgcattctctc tgtctctctg gccgtgtgtc cctctgtctc tgtccgtccc 5640  
 cgcattccctc tgtactgtga gggaggcaga gaaagtcacg gggcacgtca gcggaagtg 5700  
 gcgtgcccgg cgtcccgtgg ggcatccctc accagccgag cctcctgtct gcaggcaaag 5760  
 tgattatgca cgacccttc gccatgcggc cgttcttcgg ctacaacttc ggcaaatacc 5820  
 tggcccactg gctcagcatg gccagcacc cggcgccaa gctgcccag atcttccacg 5880  
 tcaactgggt ccggaaggac aaggacggca ggttcctctg gccgggcttc ggcgagaact 5940  
 gccgggtgct ggcgtgatg ttcgaccgag tccagggaa gggcgccgcc aggctcacgc 6000  
 ccattcggcta cgtccccgag gaggccgcc tggacctgag gggcctggag gccatccgag 6060  
 tgagcgagct cttccaggtc tccaaggagt tctgggagga ggaggcggac gagatccaca 6120  
 agtacctgga ggagcaggtg aacgcagacc tgccctacga aatccagagc gaggtcctgg 6180  
 ccctgaagca gagaatcagc cagatgtgac ggggccagag ccaccccgcc caccgcccc 6240  
 ctgccctccg gacggcggag cccagagagg gtgcttcccg acctcccacc gcctgcagca 6300  
 ccgcaatgag cacagcccac gttttctgat aagacccag agtagggcta gtaacaatga 6360  
 ggtcaggaag tgagatctca gcacgactcc agccttcacg atccggcacg atggttcagc 6420  
 ctagggacac gcaggcacag ggtctctggt tttgcccttc tgctgtagca gggagccaga 6480  
 atgcccagac tgcttgagct gtatatacgc gtatgtgtca gtgtgtgtgt ccgcagacgg 6540  
 tcgtctgca cgtatttaac acctttgaa aaatcttggg cgagattact gctagttggt 6600  
 gctagaaagt catgtggctt tgtcattaac acgtgtgttt aaattatatt tatatactgt 6660  
 ggttccctgc cttacataa tttccacgat tccccctctc acttcttaga aaaaaatca 6720  
 caaaataaag ttttatagaa aagttggctt tgttgacttg gcgtttctta cttttttatt 6780  
 tttttgtctt tttgccattt cttgggctgc tcccacagca tatggagggt cccaggctag 6840  
 gggttgagtc agagctgtag ccaccggcct acgccagagc cacagcaacg tgggatgcga 6900  
 gccgcatctg caacctatac cacaactcac ggcaatgctg gatcctaac ccatggagcg 6960  
 aggcca 6966

<210> 2  
 <211> 622  
 <212> PRT  
 <213> Sus scrofa

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (139)..(139)  
 <223> /replace= Leu

<400> 2

ES 2 490 440 A1

Met Pro Pro Gln Leu Ser Asn Gly Leu Asn His Ser Ala Lys Val Val  
1 5 10 15

Arg Gly Thr Leu Asp Ser Leu Pro Gln Ala Val Arg Asp Phe Val Glu  
20 25 30

Ser Ser Ala Lys Leu Cys Gln Pro Asp Gln Ile His Ile Cys Asp Gly  
35 40 45

Ser Glu Glu Glu Asn Gln Gln Leu Leu Ser His Met Glu Glu Glu Gly  
50 55 60

Val Ile Lys Arg Leu Lys Lys Tyr Asp Asn Cys Trp Leu Ala Leu Thr  
65 70 75 80

Asp Pro Arg Asp Val Ala Arg Ile Glu Ser Lys Thr Val Ile Ile Thr  
85 90 95

Gln Glu Gln Arg Asp Ala Val Pro Ile Pro Arg Ser Gly Leu Ser Gln  
100 105 110

Leu Gly Arg Trp Met Ser Pro Glu Asp Phe Glu Lys Ala Phe Asn Ala  
115 120 125

Arg Phe Pro Gly Cys Met Lys Gly Arg Thr Met Tyr Val Ile Pro Phe  
130 135 140

Ser Met Gly Pro Leu Gly Ser Pro Leu Ser Lys Ile Gly Ile Glu Leu  
145 150 155 160

Thr Asp Ser Pro Tyr Val Val Ala Ser Met Arg Ile Met Thr Arg Met  
165 170 175

Gly Ser Ala Val Leu Asp Ala Leu Gly Ala Gly Glu Phe Ile Lys Gly  
180 185 190

Leu His Ser Val Gly Cys Pro Leu Pro Leu Lys Lys Pro Leu Val Asn  
195 200 205

Asn Trp Ala Cys Asn Pro Glu Leu Thr Leu Ile Ala His Leu Pro Asp  
210 215 220

Arg Arg Glu Ile Ile Ser Phe Gly Ser Gly Tyr Gly Gly Asn Ser Leu  
225 230 235 240

Leu Gly Lys Lys Cys Phe Ala Leu Arg Met Ala Ser Arg Leu Ala Lys  
245 250 255

Glu Glu Gly Trp Leu Ala Glu His Met Leu Ile Leu Gly Val Thr Asn  
260 265 270

ES 2 490 440 A1

Pro Glu Gly Gln Lys Lys Tyr Phe Ala Ala Ala Phe Pro Ser Ala Cys  
 275 280 285

Gly Lys Thr Asn Leu Ala Met Met Asn Pro Thr Leu Pro Gly Trp Lys  
 290 295 300

Val Glu Cys Val Gly Asp Asp Ile Ala Trp Met Lys Phe Asp Gln Gln  
 305 310 315 320

Gly Asn Leu Arg Ala Ile Asn Pro Glu Asn Gly Phe Phe Gly Val Ala  
 325 330 335

Pro Gly Thr Ser Val Lys Thr Asn Pro Asn Ala Ile Lys Thr Ile Gln  
 340 345 350

Ser Asn Thr Ile Phe Thr Asn Val Ala Glu Thr Ser Asp Gly Gly Val  
 355 360 365

Tyr Trp Glu Gly Ile Asp Gln Pro Leu Ala Pro Gly Ile Lys Leu Thr  
 370 375 380

Ser Trp Lys Gly Thr Glu Trp Asp Pro Lys Asp Gly Glu Pro Cys Ala  
 385 390 395 400

His Pro Asn Ser Arg Phe Cys Thr Pro Ala Ser Gln Cys Pro Ile Ile  
 405 410 415

Asp Pro Ala Trp Glu Ala Pro Glu Gly Val Pro Ile Glu Gly Ile Ile  
 420 425 430

Phe Gly Gly Arg Arg Pro Ala Gly Val Pro Leu Val Tyr Glu Ala Leu  
 435 440 445

Ser Trp Gln His Gly Val Phe Val Gly Ala Ala Met Arg Ser Glu Ala  
 450 455 460

Thr Ala Ala Ala Glu His Lys Gly Lys Val Ile Met His Asp Pro Phe  
 465 470 475 480

Ala Met Arg Pro Phe Phe Gly Tyr Asn Phe Gly Lys Tyr Leu Ala His  
 485 490 495

Trp Leu Ser Met Ala Gln His Pro Ala Ala Lys Leu Pro Lys Ile Phe  
 500 505 510

His Val Asn Trp Phe Arg Lys Asp Lys Asp Gly Arg Phe Leu Trp Pro  
 515 520 525

Gly Phe Gly Glu Asn Cys Arg Val Leu Ala Trp Met Phe Asp Arg Val  
 530 535 540

ES 2 490 440 A1

Gln Gly Lys Gly Gly Ala Arg Leu Thr Pro Ile Gly Tyr Val Pro Glu  
545 550 555 560

Glu Ala Ala Leu Asp Leu Arg Gly Leu Glu Ala Ile Arg Val Ser Glu  
565 570 575

Leu Phe Gln Val Ser Lys Glu Phe Trp Glu Glu Glu Ala Asp Glu Ile  
580 585 590

His Lys Tyr Leu Glu Glu Gln Val Asn Ala Asp Leu Pro Tyr Glu Ile  
595 600 605

Gln Ser Glu Val Leu Ala Leu Lys Gln Arg Ile Ser Gln Met  
610 615 620

<210> 3  
<211> 1869  
<212> DNA  
<213> Sus scrofa

<220>  
<221> variation  
<222> (415)..(415)  
<223> /replace= "c"

<400> 3  
atgcctctc agctctcaaa cggcctcaac cactcggcca aagtcgtccg gggcaccctg 60  
gacagcctgc cccaggccgt gcgggatttc gtggagagca gcgccaagct gtgccagcct 120  
gaccaaattc acatctgcga tggctccgag gaggagaacc agcagctgct gagccacatg 180  
gaggaagagg gtgtcatcaa gaggtgaag aagtatgaca actgctgggt ggctctcaca 240  
gaccccaggg acgtggccag aattgaaagc aagacggtca tcattactca ggagcaaagg 300  
gatgcggtgc ccatccccag aagcggcctc agccagctgg gtcgctggat gtccccggag 360  
gacttcgaga aagccttcaa tgcccggttt ccgggggtgca tgaagggtcg cacgatgtat 420  
gtcatcccgt tcagcatggg gcccctgggc tcgcccctgt ccaagattgg catcgagctg 480  
acggactcgc cctacgtggt ggccagcatg cgcacatga cgcggatggg ctcggccctc 540  
ctggacgagc tgggggaggc cgagttcatc aagggcctcc actccgtggg gtgccccctg 600  
cctttgaaaa agcccttggg taacaactgg gcctgtaacc cagagctgac gctcattgcc 660  
cacctgcccg accgcccaga aatcatctcc ttcgggagcg ggtacggcgg gaactcactc 720  
cttgggaaga agtgctttgc cctgaggatg gccagccggc tggccaagga ggaggggtgg 780  
ctggcagagc acatgctgat cctgggcgta accaaccctg agggccagaa gaaatacttt 840  
gccgcagctt tccccagcgc ctgcccgaag accaacctgg ctatgatgaa cccacgctc 900  
ccgggctgga aagtggagtg cgtgggggac gacatgcctt ggatgaaatt cgaccaacaa 960  
ggtaatttac gggccatcaa cccagagaac gggttttttg gcgttgctcc cggaacctct 1020  
gtgaagacaa accccaatgc catcaaaacc atccaaagca acaccatctt caccaacgtg 1080

ES 2 490 440 A1

gccgagacca gcgacggggg cgtttactgg gaaggcatcg accagccgct ggccccgggc 1140  
atcaagctca cttcctggaa gggcacagag tgggacccca aggatgggga accttgcgct 1200  
caccccaact cgcggttctg cacccctgcc agccagtgcc ccatcatcga ccctgcctgg 1260  
gaggccccgg aaggcgtgcc cattgagggc atcatcttcg gagggcgccg ccctgctggc 1320  
gtccctctgg tgtacgaggc tctcagctgg cagcacggcg tgttcgtggg ggcggccatg 1380  
aggtccgagg ccaccgaggc tgcggagcac aagggcaaag tgattatgca cgacccttc 1440  
gcatgcggc cgttcttcgg ctacaacttc ggcaaatacc tggcccactg gctcagcatg 1500  
gcccagcacc cggcggccaa gctgcccagg atcttccacg tcaactgggt ccggaaggac 1560  
aaggacggca ggttcctctg gccgggcttc ggcgagaact gccgggtgct ggcgtggatg 1620  
ttcgaccgcy tccaggggaa gggcggcgcc aggctcacgc ccatcggcta cgtccccgag 1680  
gaggccgccc tggacctgcy gggcctggag gccatccgcy tgagcgagct cttccaggtc 1740  
tccaaggagt tctgggagga ggaggcggac gagatccaca agtacctgga ggagcaggtg 1800  
aacgcagacc tgcctacga aatccagagc gaggtcctgg ccctgaagca gagaatcagc 1860  
cagatgtga 1869

<210> 4  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Cebador directo PEPCK2F

<400> 4 26  
gtgtgtcca aggggatca ggagga

<210> 5  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Cebador reverso PEPCK3R

<400> 5 24  
ccccctgcct cgcacattta ggat

<210> 6  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Cebador directo SSPEPCKE4-F

<400> 6 14  
cgctgcccc tgct

<210> 7  
<211> 19

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador reverso SSPEPCKE4-R  
  
 <400> 7  
 cccatgctga acgggatga 19

<210> 8  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> sonda de ácido nucleico SSPEPCKE4-V  
  
 <400> 8  
 aggtcgcacg atgtat 16

<210> 9  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> sonda de ácido nucleico SSPEPCKE4-M  
  
 <400> 9  
 aggtcgcacg ctgtat 16

<210> 10  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo PEPCK1F  
  
 <400> 10  
 gcgaccttgg catccacacc cctta 25

<210> 11  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador reverso PEPCK2R  
  
 <400> 11  
 tttaaagctc gctgaggcca cggg 24

<210> 12  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo PEPCK3F  
  
 <400> 12  
 gcaccctcct aggccaaagc attg 24



<210> 13  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador reverso PEPCK4R  
  
 <400> 13  
 acagccagag agaagacgcc ctga 24

<210> 14  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo PEPCK4F  
  
 <400> 14  
 gggcatcaag ctcacttcct ggaa 24

<210> 15  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador reverso PEPCK5R  
  
 <400> 15  
 acacacagag aagaaagggc agcg 24

<210> 16  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo PEPCK5F  
  
 <400> 16  
 tccccgcatc cctctgtacg tgta 24

<210> 17  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Cebador reverso PEPCK8R  
  
 <400> 17  
 ccagagaccc tgtgcctgcg tgtc 24



- ②① N.º solicitud: 201330290  
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.03.2013  
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)  
**C12N15/11** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BASE DE DATOS EMBL-EBI. 10-JUN-2009 (10.06.2009). Recuperado de EBI, N° ACCESO: FJ668384.	6-12,21-23
Y		1-5,13-20,24-31
Y	WANG WEI et al. Candidate gene expression affects intramuscular fat content and fatty acid composition in pigs. Journal of Applied Genetics FEB 2013 (02.2013) VOL: 54 No: 1 Págs: 113-118 ISSN 1234-1983 (print) ISSN 2190-3883 (electronic) Doi: doi:10.1007/s13353-012-0131-z	1-5,13-20,24-31
A	WO 2014049191 A1 (UNI DE LLEIDA) 03.04.2014, reivindicaciones 11-19.	1-31

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
09.06.2014

Examinador  
J. Manso Tomico

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BUSQUEDA SECUENCIA EBI-EMBL, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.06.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-5, 13-20, 24-31	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 6-12, 21-23	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-31	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BASE DE DATOS EMBL-EBI. 10-JUN-2009 (10.06.2009). Recuperado de EBI, Nº ACCESO: FJ668384.	
D02	WANG WEI et al. Candidate gene expression affects intramuscular fat content and fatty acid composition in pigs. Journal of Applied Genetics FEB 2013 (02.2013) VOL: 54 No: 1 Págs: 113-118 ISSN 1234-1983 (print) ISSN 2190-3883 (electronic) Doi: doi:10.1007/s13353-012-0131-z	31.01.2013
D03	WO 2014049191 A1 (UNI DE LLEIDA)	03.04.2014

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud divulga un método para seleccionar suidos con un fenotipo determinado en relación al contenido en grasa intramuscular basado en la detección de un SNP del gen PEPCK, oligos, sondas y cebadores para la detección del SNP y los usos del método y los productos anteriores.

Las reivindicaciones 1-5 caracterizan el método por comprender la detección de un polimorfismo de cambio de base única (SNP) en la posición 2456 del gen PEPCK (SEQ.ID.Nº1), y la selección del alelo A en homocigosis.

Las reivindicaciones 6 y 7 reivindican la SEQ.ID.Nº1 o secuencias idénticas hasta un 80% de identidad y que contengan el SNP en la posición 2456. Las reivindicaciones 8-10 caracterizan sondas y cebadores para amplificar la región del gen que contiene ese polimorfismo. Las reivindicaciones 11, 12 se refieren al uso de los oligos anteriores para la detección del SNP.

Las reivindicaciones 13-20 caracterizan el uso de las secuencias génicas anteriores para seleccionar un suido con un fenotipo determinado, o para seleccionar un producto cárnico determinado.

Las reivindicaciones 21-31 caracterizan un kit que comprende oligos y cebadores para detectar la SEQ.ID.Nº1 conteniendo el SNP, y el uso de ese kit para seleccionar un suido con el fenotipo requerido, o un producto cárnico con las características requeridas.

D01 divulga una batería de genes cuya expresión estaría relacionada con el contenido de grasa intramuscular y el contenido de ácidos grasos en la composición de la carne de cerdo. Este estudio concluye encuentra que la expresión de PEPCK está significativamente relacionada con el contenido de grasa intramuscular de la carne de cerdo sugiriendo que este gen interviene en el aumento de la deposición de lípidos y que puede influir en la calidad de la carne.

D02 divulga la secuencia con nº de acceso FJ668384 correspondiente al gen PEPCK con una identidad del 100% sobre la secuencia SEQ.ID.Nº1, y que también divulga la variación de la posición 2456 de dicha secuencia.

D03 divulga un método para predecir el grado de instauración de ácidos grasos en un sujeto o un derivado del mismo, que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto o de dicho derivado cárnico el nucleótido en la posición polimórfica 2281 en el gen SCD .

A la luz de D02 las reivindicaciones 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 21, 22, 23 carecerían de novedad y actividad inventiva tal y como se menciona en los arts. 6, 8 de la ley 11/1986.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga un método de selección de suidos con el fenotipo que muestra la invención, ni el uso de oligos, sondas y cebadores para la selección de un suido con el fenotipo de la invención, por lo que las reivindicaciones 1-5, 13-20,24-31 serían nuevas tal y como se menciona en el art. 6 de ley 11/1986.

Tomando en consideración D01 como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la invención de las reivindicaciones 1-5, 13-20,24-31, la diferencia entre ambos sería la detección del SNP 2456 en la secuencia SEQ.ID.Nº1 y la selección de un suido que presenta el alelo A en homocigosis. El efecto técnico producto de esa diferencia sería la relación de ese alelo en homocigosis con el contenido aumentado en grasa dorsal y disminuido en tocino dorsal respecto a un valor de referencia en los suidos objeto de estudio.

El problema técnico planteado sería la provisión de un método basado en la detección del SNP de la posición 2456 del gen PEPCK para la selección de suidos con un alto contenido en grasa dorsal y un bajo contenido en tocino dorsal. Sin embargo, dado que el experto en la materia sabe que individuos de distintas poblaciones pueden no tener la misma mutación en la misma posición, la presente invención no asegura resolver el problema técnico en su totalidad, es decir, para cualquier suido independientemente de la raza que sea, ya que la presente invención toma como población de estudio 202 animales de la raza Pietrain y de la raza ibérica. Así pues, el efecto técnico obtenido no supone una solución al problema técnico tal y como está planteado. Tomando en consideración que D01 divulga la relación entre la expresión de PEPCK en cerdos y el contenido aumentado de IMF (índice de grasa intramuscular), y dado que el SNP estudiado es conocido, la provisión de un método para seleccionar suidos basado en el estudio de un SNP conocido dentro de un gen cuya expresión ya se sabe que está relacionada con el incremento de la grasa intramuscular, y los usos de las reivindicaciones 1-5, 13-20,24-31 serían obvias para el experto en la materia y carecerían de actividad inventiva, tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986 .