

ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA MUSCULAR DE CERDOS IBÉRICOS PROCEDENTES DE UN CRUCE DIALÉLICO COMPLETO RETINTO × TORBISCAL

Pena¹, R.N., Ibáñez-Escriche^{2,3}, N., Magallón⁴, E., Gonzalez⁵, E., Tejada⁵, J.F. y Noguera², J.L.

¹Departament de Ciència Animal, Universitat de Lleida-Agrotecnio Center, Lleida. ²IRTA, Genètica i Millora Animal, Lleida. ³The Roslin Institute, Edinburgh University, UK. ⁴INGA FOOD S.A. C/ Balears SN, Casetas, Zaragoza. ⁵Tecnología de los Alimentos, Universidad de Extremadura. romi.pena@ca.udl.cat

INTRODUCCIÓN

La deposición de altos niveles de grasa intramuscular, particularmente rica en ácido oleico, es característica del cerdo ibérico. Estos dos parámetros, que definen en gran parte la alta calidad de sus productos curados (López-Bote, 1998), presentan gran variabilidad entre las estirpes que componen la población de cerdo ibérico (Juárez et al., 2009; Ibáñez-Escriche et al., 2016a). En un experimento previo se realizó un cruce dialélico completo entre las estirpes Retinto, Entrepelado y Torbiscal, reconocidas en el libro genealógico de la raza gestionado por la Asociación Española de Cerdo Ibérico (AECERIBER). Con este material, se realizó un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) que permitió identificar varias regiones genómicas asociadas al contenido de ácido oleico y de ácidos grasos monoinsaturados en músculo (Ibáñez-Escriche et al., 2016b), algunas de ellas específicas de una estirpe. El objetivo del presente trabajo es complementar estos resultados con información de expresión diferencial de genes en tejido muscular, analizada por secuenciación masiva del transcriptoma, y utilizar estos datos para describir nuevas mutaciones específicas del cerdo ibérico y/o de cada estirpe.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental. Los animales usados en este estudio proceden del experimento dialélico completo (3 × 3) de la empresa Inga Food S.A. Para este estudio se utilizarán únicamente dos de las estirpes de ibérico (Retinto: RR y Torbiscal: TT) y sus cruces recíprocos. Durante el experimento, los animales fueron criados en condiciones intensivas comerciales. Los animales fueron engordados “ad libitum” y sacrificados en un matadero comercial con una edad media de 340 días (~160 kg), momento en el que se obtuvo una muestra del músculo *longissimus thoracis* (LT). En este tejido se determinó el % de grasa intramuscular (GIM) y el % de ácidos grasos Saturados (SFA), Monoinsaturados (MUFA) y Poliinsaturados (PUFA) (Ibáñez-Escriche et al., 2016a).

Secuenciación del transcriptoma. Se extrajo ARN total mediante el *kit RiboPure* (Ambion, LifeTechnologies) de un subgrupo de 28 muestras de LT, correspondiente a 7 cerdos de cada tipo de cruce (RR, TT, RT y TR). Se comprobó la calidad del ARN mediante electroforesis en un 2100 *Bioanalyzer* (Agilent) y se secuenció por una aproximación de RNA-seq en una plataforma *Illumina HiSeq 2500* con lecturas pareadas de una longitud de 100 pb. Se utilizó el programa *fastqc* para analizar la calidad de las lecturas, que fueron posteriormente alineadas usando el genoma de referencia porcino (*Sscrofa10.2*) con la herramienta *Tophat2 v2.1.0*. El ensamblaje e identificación de nuevos genes o isoformas fue realizada mediante inferencia bayesiana con *Cufflinks v2.2.1*.

Análisis de expresión diferencial. El proceso de cuantificación génica fue realizado por el método *cufflinks*. Para el estudio de expresión diferencial, se utilizó el algoritmo propuesto por *cuffdiff* utilizando una distribución binomial negativa para la determinación de la significación estadística. Se consideró gen e isoforma diferencialmente expresado (DE) aquel que presenta un valor de tasa de cambio (*Fold Change*) inferior a -2 o superior a 2 y con un valor de p-value ajustado mediante FDR de 0,05.

Validación por PCR cuantitativa. El ARN total se convirtió a ADNc utilizando el *kit SuperScript IV* (LifeTechnologies). Los niveles de expresión génica los genes diana y 2 genes de referencia (*RPL32* y *B2M*), fueron medidos por PCR cuantitativa con las condiciones descritas en Pena et al. (2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la secuenciación, se obtuvieron una media de 47 millones de lecturas pareadas por muestra, el 91,5% de los cuales eran localizables en el genoma de referencia. Una vez ensamblados los transcritos, se realizó un estudio de expresión diferencial entre animales de distintos cruces. En general se detectaron pocos genes (rango 14-45) diferencialmente expresados (DE) a una FDR de 0,05 (Tabla 1). El rango de la tasa de cambio de los genes DE era de 2 a 27,8. En su conjunto, había 110 transcritos DE, 47 de los cuales aparecían en más de una comparación. Es más, algunos genes DE se localizaban en regiones genómicas asociadas con el contenido de MUFA, ácido oleico y ácido palmítico detectadas, con este material animal, en un trabajo de asociación genómica (GWAS) anterior (Ibañez-Escriche et al., 2016b) (Tabla 2). Estos genes se convierten en genes candidatos tanto posicionales como funcionales para explicar el efecto de estos QTL. De entre ellos es destacable el gen *EGR1*, cuya expresión diferencial se detectó en 4 de las 6 comparaciones que coinciden en las combinaciones en las que el padre de un cruce era Torbiscal y el padre del comparado era Retinto. Estos datos sugieren que la expresión de este gen está marcada por el origen parental del gen. Por PCR cuantitativa se han validado los resultados de expresión obtenidos por secuenciación (Figura 1). Actualmente estamos secuenciando la región promotora y dos intensificadores (*enhancers*) putativos asociados con la trans-activación de este gen, donde hemos identificado mutaciones que afectan sitios putativos de unión a factores de transcripción como C/EBP β , C/EBP δ , FOS y RXR α .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Ibañez-Escriche, N., et al. 2016a. J. Anim. Sci. 94: 28-37. • Ibañez-Escriche, N., et al. 2016b. XVII Reunión Mejora Genética • Juárez, M., et al. 2009. Meat Sci. 81: 573–579. • López-Bote, C.J. 1998. Meat Sci. 49: 17-27. • Pena, R.N., et al. 2013. Anim. Genet. 44: 648-60.

Tabla 1. Número de genes diferencialmente expresados (DE) en el músculo longissimus thoracis entre cerdos procedentes de un cruce dialélico Retinto (R) por Torbiscal (T).

Comparación	N. genes DE
RR-RT	21
RR-TR	19
TR-RT	41
TT-RR	35
TT-RT	45
TT-TR	14

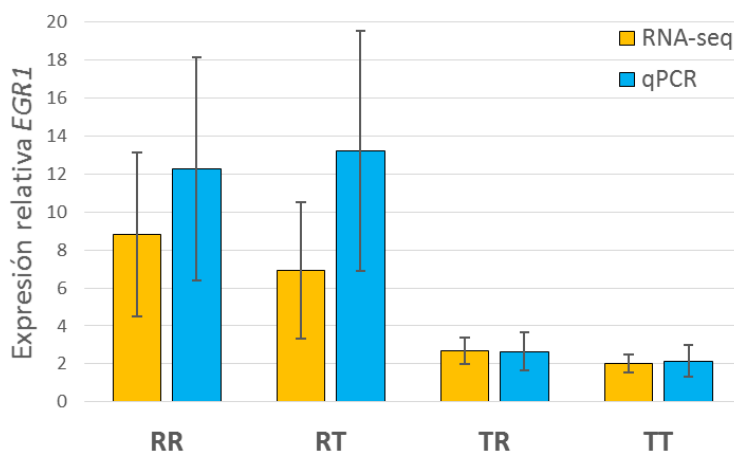


Figura 1. Comparación de la expresión del gen *EGR1* (unidades relativas) en músculo longissimus thoracis de cerdos de distintos cruces de estirpes ibéricas Retinto y Torbiscal.

Tabla 2. Genes diferencialmente expresados que se localizan en regiones genómicas (GWAS) detectadas en un trabajo anterior (Ibáñez-Escriche et al., 2016b). FC – Tasa de cambio de la expresión diferencial

Comparación Acrónimo (Gen)		SSC(Mb)	FC	GWAS	Caracteres GWAS
RR-RT	<i>RGS5</i> (regulator of G-protein signaling 5)	1(126)	-6,53	1(113-117)	Oleico, MUFA/SFA
TT-RT	<i>PLIN5</i> (lipid storage droplet protein 5)	2(747)	-2,22	2(74-76)	Palmítico, MUFA, MUFA/SFA
TT-RR			-4,36		
TT-RT	<i>EGR1</i> (early growth response 1)	2(146)	-3,37	2(140)	Oleico
TR-RT			-2,59		
TR-RR			-3,34		
TT-RT	<i>GLRX</i> (Glutaredoxin-1)	2(146)	-2,57	2(103-105)	Oleico, MUFA, MUFA/SFA
TT-RT	<i>XLOC_027260</i>	3(116)	-2,09	3(115-117)	MUFA/SFA
TT-RR	<i>PPP1R11</i>	7(25)	3,03	7(29)	Oleico, MUFA, MUFA/SFA
TT-TR	<i>XLOC_005316</i>	10(16)	-4,06	10(15-22)	Palmítico, MUFA/SFA
TT-RT			-2,76		
TT-TR	<i>MYH10</i> (myosin, heavy chain 10, non-muscle)	12(56)	-2,80	12(57-58)	Palmítico
TT-RT					
TT-TR	<i>PLEKHH2</i> (pleckstrin homology, MyTH4 and FERM domain containing H2)	12(56)	-2,44	12(57-58)	Palmítico
TT-RR	<i>MAN2B2</i> (mannosidase alpha class 2B member 2)	16(81)	-4,18	16(78-79)	Palmítico
RR-TR					

Agradecimientos: Financiado por INIA (RTA 2012-0054-C02-01) y el CDTI (IDI-20140447). Los autores expresan su agradecimiento a la empresa Inga Food S. A. y a sus veterinarios participantes en el experimento: M. Ramos, M.J. García, L. Muñoz y P. Díaz, así como al Dr. Luis Varona de la Universidad de Zaragoza.

MUSCLE TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF IBERIAN PIGS OBTAINED BY A RETINTO x TORBISCAL COMPLETE DIALLELIC CROSS

ABSTRACT: The deposition of intramuscular fat and the content of oleic fatty acid present great variability among the strains that make up the Iberian pig population. In a previous experiment a complete diallelic cross generated using Retinto, Entrepelado and Torbiscal strains and a genome association study (GWAS) was carried out to identify several genomic regions associated with the content of oleic acid and of monounsaturated fatty acids in muscle. In the present work we have complemented these results with muscle transcriptome data of 28 animals of Retinto and Torbiscal crosses. A mean of 47 million reads were obtained per each sample, 91.5% of which could be mapped to the reference genome. Overall, there was a reduce number of genes differentially expressed between crosses, with an expression fold change ranging from 2 to 27.8. Some of the differentially expressed genes co-localized with GWAS regions. Among these genes, the expression of *EGR1* exhibited a parent-of-origin effect, with enhanced expression in Retinto-sired pigs when compared to Torbiscal-sired animals. We are now analysing the promoter and two putative *EGR1* enhancers in order to describe strain or Iberian-specific mutations responsible for this effect.

Keywords: intramuscular fat, Iberian pig, RNA-seq, oleic acid