ANÁLISIS DE DOS QTL EPISTÁTICOS EN EL CROMOSOMA 12 PORCINO PARA EL CARÁCTER TAMAÑO DE CAMADA

Fernández-Rodríguez, A.[1], Rodríguez, M.C., Noguera, J.L., Balcells, I., Óvilo, C. y Fernández, A.I.
[1]Dpto.Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid. E-mail: Amanda@inia.es

INTRODUCCIÓN

Varios estudios de detección de QTL para los caracteres número de lechones nacidos totales (NT) y nacidos vivos (NV) han mostrado resultados significativos en regiones cromosómicas de SSC 7, 12, 14, 17 y SSC 7, 11, 16 y 18, respectivamente (Tribout et al., 2008). Además, varios genes candidato relacionados con este tipo de caracteres han sido analizados hasta el momento, como son el receptor de *estrógenos 1 (ESR1*) y la *proteína de unión al retinol (RBP4),* en los que se han detectado polimorfismos asociados con el carácter NV (Tribout et al., 2008).

En un estudio llevado a cabo en un cruce experimental tipo F_2 Ibérico x Meishan, se ha mostrado la complejidad de estos caracteres detectando varios QTL y múltiples interacciones epistáticas entre ellos en los cromosomas porcinos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 y 18 (Noguera et al., 2009). Entre los resultados más relevantes, se han detectado dos QTL epistáticos en el cromosoma 12 para NV y NT. El objetivo de este trabajo ha sido confirmar estos dos QTL epistáticos mediante la incorporación de nuevos marcadores y analizar dos genes previamente seleccionados como candidatos posicionales y biológicos (*SLC9A3R1* y *NOS2a)* (Fernández et al., 2007).

MATERIAL Y MÉTODOS

El material animal utilizado en este trabajo corresponde al mismo cruce experimental F_2 Ibérico x Meishan (Rodríguez et al., 2006). El registro de caracteres reproductivos se realizó en 255 cerdas de la F_2, obteniendo un total de 865 partos con registros para NV y 881 para NT, datos recopilados durante cuatro partos sucesivos. En el quinto parto las cerdas fueron sacrificadas a los 30 días de gestación y se tomaron muestras de tejido ovárico.

Se genotiparon 12 marcadores en todo el cruce: 7 microsatélites (*SW2490, SW2494, SW1307, SW874, SW1956, S0106* y *SWR1021*) usados previamente por Noguera y col. (2009), 3 nuevos microsatélites (SWR1802, S0090 y SW1962), y dos marcadores PCR-RFLP (*GH* (*Hha I*) y *FASN (Msp I))* (Rodríguez et al., 2006). El mapa de ligamiento se construyó utilizando el programa CRI-MAP versión 2.4 (Green et al., 1990).

La caracterización de los genes *SLC9A3R1* y *NOS2a* se ha abordado a partir de ARNm. Las muestras de ovario almacenadas a -80ºC se procesaron con el kit RiboPure ™ para la extracción de ARN total. La síntesis de ADNc se llevó a cabo mediante retrotranscripción inversa (Superscript™ II Reverse Transcriptase). Se caracterizaron 1970 pb del ADNc *SLC9A3R1* porcino y 3948pb del *NOS2a*, incluyendo las regiones 3´ y 5´ UTR, y se realizó una búsqueda de polimorfismos mediante secuenciación.

Análisis estadísticos: Se realizó un análisis de detección de QTL para los caracteres NV y NT, incluyendo como efectos fijos el año-estación, el ordinal de parto, el efecto poligénico aleatorio y el efecto ambiental permanente, además de los efectos aditivo y dominante del QTL. Para analizar la epistasia se incluyeron los efectos de la interacción. Los umbrales de significación cromosómicos se calcularon al 0.1, 1 y 5%. El estudio de asociación de ambos genes candidato con los caracteres de prolificidad se realizó mediante un modelo animal estándar y un test de asociación asistida por marcadores (MAAT). En ambos se incluyó el efecto de sustitución alélica de cada SNP, y los efectos fijos anteriormente nombrados. Además, en el MAAT se incluyeron los efectos aditivo y dominante del QTL. Por último se testó la interacción entre los polimorfismos de mayor significación. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa QxPak v.3 (Pérez-Enciso y Misztal, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El mapa de ligamiento obtenido resultó: FASN- 0.9 - SW2490 - 10.4 - SW2494 - 29.4 - GH - 3.4 - SW1307 - 16.7 - SW874 - 8.5 - SWR1802 - 3.1 - S0090 - 2.0 - SW1956 - 5.0 - SW1962 - 8.8 - S0106 - 15.5 - SWR1021, concordante con mapas públicos disponibles.

La detección de QTL con estos 12 marcadores reveló la presencia de dos QTL sugestivos en SSC12 para NV y NT que se tornaron significativos cuando se testó la interacción epistática (QTL1 a 15cM y QTL2 a 97cM), siendo aditivo x aditivo la interacción más significativa ($p<0.0005$ para NV y $p<0.0006$ para NT). Estos resultados confirman lo detectado previamente por Noguera et al. (2009) pero con un mayor poder estadístico y significación debido a la incorporación de 5 nuevos marcadores.

En un trabajo previo se seleccionaron por su posición, el gen *SLC9A3R1* (7.4cM) para el QTL1 y el *NOS2a* (94.2) para el QTL2, de entre una propuesta inicial de cinco genes candidato posicionales y biológicos. *SLC9A3R1* interviene en la respuesta primaria a estrógenos (Tracy et al., 2002), mientras que *NOS2a* codifica para una óxido nítrico sintasa inducible que está implicada en la regresión de los tejidos reproductivos en mamíferos (Yong et al., 2004). Mutaciones en ambos genes han sido relacionadas con disminución del tamaño de camada en ratones (Senolikar et al., 2002; Burnett et al., 2002). Además se ha descrito una interacción entre las proteínas codificadas por ambos genes necesaria para la correcta localización celular del *NOS2a* (Glynne et al., 2002).

En el presente trabajo llevamos a cabo la caracterización completa del ADNc de ambos genes. Por comparación de secuencias entre 10 individuos de la F_2 detectamos un total de 9 polimorfismos en *SLC9A3R1* y 14 en *NOS2a*. Para seleccionar los polimorfismos más interesantes a genotipar analizamos su importancia biológica. Un total de 6 polimorfismos fueron genotipados: 3 SNPs (c.662A>G, c.1791A>C, c.2192C>T) y una duplicación c.3556_3571 dup CTGTATTTACCTGAC en *NOS2a* y 2 SNPs en *SLC9A3R1* (c.839A>G y c.1359A>G). El SNP c.2192C>T y la duplicación cosegregaron en el cruce.

Los resultados significativos del modelo animal estándar para los dos genes con los caracteres NV y NT figuran en la Tabla 1. Para NV, los 3 polimorfismos de *NOS2a* tuvieron efectos aditivos significativos sobre el carácter, mientras que para *SLC9A3R1* sólo el SNP c.1359A>G mostró efectos significativos. En el caso del carácter NT sólo los SNPs *SLC9A3R1* c.1359A>G y *NOS2a* c.2192C>T, presentaron efectos significativos.

Con el objetivo de reducir el riesgo de falsos positivos que se produce en cruces F_2, debido al desequilibrio de ligamiento, se llevó a cabo un MAAT en el que se incluyeron los efectos del QTL y del gen candidato (Tabla 2). Para ello, se ha seleccionado de cada gen el polimorfismo que mostró mayor significación estadística con el modelo animal estándar: *SLC9A3R1* c.1359A>G y *NOS2a* c.2192C>T. En primer lugar se incluyó el efecto de los QTL1 y 2 en el modelo para testar el efecto de los polimorfismos. Los resultados fueron similares a los del modelo animal, excepto para *SLC9A3R1* c.1359A>G donde el efecto sobre NV no fue significativo ($p=0.051$). Posteriormente se incluyeron los efectos de los dos SNPs en el modelo, con el fin de testar cada uno de los QTL para los dos caracteres. Cuando *SLC9A3R1* c.1359A>G fue incluido, el QTL1 para NT desapareció. En el caso del carácter NV, la significación del QTL1 disminuyó de forma menos acusada, en concordancia con el resultado anterior. En el caso de *NOS2a*, cuando se incluyó el efecto del SNP c.2192C>T en el modelo, la significación del QTL2 para ambos caracteres desapareció completamente. Dado que ambos QTL son significativos únicamente cuando se contempla epistasia en el modelo, se analizó la interacción entre ambos SNPs, sin ser ésta significativa. Estos resultados nos indican que el efecto de la interacción de los dos polimorfismos no es subyacente al efecto epistático de los QTL.

La duplicación de 15pb del 3´UTR de *NOS2a* que cosegrega con el SNP c.2192C>T parece constituir parte de una diana para microRNA, además esta región del gen incluye varios elementos ricos en AU (AREs), regiones que intervienen en la regulación postranscripcional mediante la unión de ribonucleoproteínas nucleares. Estas potenciales explicaciones de causalidad junto con los resultados aportados por el MAAT parecen mostrar a *NOS2a* c.3556_3571 dup CTGTATTTACCTGAC como una probable mutación causal, aunque análisis funcionales de esta mutación serían necesarios para confirmar esta causalidad.

Tabla 1. *Resultados significativos del análisis de asociación con el modelo animal estándar.*

		NV			NT		
Gen	**SNP**	**p Nominal**	**a (SE)**	**d (SE)**	**p Nominal**	**a (SE)**	**d (SE)**
SLC9A3R1	c.1359A>G	0,042	0,55 (0,22)	0,45 (0,28)	0,031	0,58 (0,23)	0,47 (0,29)
	c.662A>G	0,022	0,56 (0,24)	-	-	-	-
NOS2a	c.1791A>C	0,041	- 0,37 (0,18)	-	-	-	-
	c.2192C>T*	0,016	- 0,43 (0,18)	-	0,018	- 0,42 (0,18)	-

Tabla 2*. Resultados del MAAT con los polimorfismos de mayor significación.*

			QTL			SNP		
Gen	**SNP**	**Carácter**	**cM**	**P nominal**	**QTLa (SE)**	**P nominal**	**a (SE)**	**d (SE)**
SLC9A3R1	c.1359A>G	**NV**	78	0,056	0,36 (0,19)	0,051	0,53 (0,22)	0,44 (0,28)
		NT	78	0,047	0,38 (0,19)	0,035	0,57 (0,23)	0,46 (0,29)
NOS2a	c.2192C>T*	**NV**	14	0.016	0.45 (0.18)	0.012	-0.31 (0.18)	-
		NT	0	0.044	0.37 (0.19)	0.023	-0.41 (0.18)	-

** Formando haplotipo con la duplicación de 15pb del NOS2a 3´UTR.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Burnett, T.G., Tash, J.S. & Hunt, J.S., Reprod. 2002. 124:49-57. • Ediger, T.R., Park, S. & Katzenellenbogen B.S. 2002. Mol Endocrinol 16:1828-1839. • Fernández, A., Fernández, A.I., Rodríguez, C., Tomas, A., Estellé, J., Noguera, J.L. & Óvilo, C. 2007. ITEA Vol 28, II • Glynne, P., Darling, K., Picot, J. & Evans, T. 2002. J. of Biol Chem 36:33132-33138. •Green, P.I., Falls, K. & Crooks, S. 1990. Washington University. • Noguera, J.L., Rodríguez, M.C., Varona, L., Tomás, A., Muñoz, G., Ramírez, O., Barragán, C., Arqué, M., Bidanel, J.P., Amills, M., Óvilo, C. & Sánchez, A. 2009 (enviado a Genetics). • Pérez-Enciso, M. & Misztal, I. 2004. Bioinformatics, 20:2792-8. • Rodríguez, M.C., Tomas, A., Alves, E., Ramirez, O., Arqué, M., Muñoz, G., Barragán, C., Varona, L., Silió, L., Amills, M. & Noguera, J.L. 2006. Anim Genet 36, 490-496. • Tao, Y., Fu, Z., Zhang, M., Xia, G., Yang, J. & Xie, H. 2004. Mol Cell Endocrinol 222:93-103. • Tribout, T., Lannuccelli, N., Druet, T., Gilbert, H., Riquet, J., Gueblez, R., Mercat, M.J., Bidanel, J.P., Milan, D. & Le Roy, P. 2008. Genet. Sel. Evol. 40:61-78. • Shenolikar, S., Voltz, J.W., Minkoff, C.M., Wade, J.B. & Weinman, E.J. 2002. Proc Natl Acad Sci USA 99:11470-5

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto AGL2004-08368. Amanda Fernandez-Rodríguez disfruta de una beca INIA.

DETECTION AND ANALYSIS OF TWO EPISTATIC QUANTITATIVE TRAIT LOCI ON SSC12 AFFECTING LITTER SIZE IN PIGS

ABSTRACT: The aim of the present study was to confirm the previously detected epistatic QTL on SSC12 for total number of piglets born (TNB) and number of piglets born alive (NBA) in a Meishan x Iberian F_2 intercross. A chromosome scan with 12 markers allowed us to confirm the two epistatic QTL (QTL1 at 15cM and QTL2 at 97cM). Besides, *SLC9A3R1 and NOS2a* were analysed as biological and positional candidate genes underlying these QTL. Both cDNAs were characterized and 23 polymorphisms were identified in the F_2. Five polymorphisms were tested: two in *SLC9A3R1* for QTL1 and four in *NOS2a* for QTL2. Only *SLC9A3R1*c.1359A>G reported significant effects on TNB and NBA, while the three SNPs of *NOS2a* showed significant additive effects on both traits. Marker assisted association test performed with the most significant SNPs (*SLC9A3R1* c.1359A>G and *NOS2a* c.2192C>T) reported significant results for both SNPs; however the interaction between them was not significant. Despite of the negative result of the interaction, statistical and biological evidences show *NOS2a* c.3556_3571dupCTGTATTTACCTGAC, cosegregating with c.2192C>T, as a likely causal mutation of the epistatic effect.

Keywords: *epistatic effect, litter size, SLC9A3R1, NOS2a*