ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN GENÓMICO PARA CRECIMIENTO INDIVIDUAL Y EFICIENCIA ALIMENTARIA COLECTIVA EN CONEJOS BAJO DOS REGÍMENES DE ALIMENTACIÓN

Sánchez[1], J.P., Legarra[2], A., Velasco[1], M., Piles[1], M., Rafel[1], O., González[1], O. y Ballester[1], M.
[1]Institute of Agriculture and Food Research and Technology (IRTA), 08140, Spain. [2]INRA, Castanet-Tolosan, 31326, Francia.
juanpablo.sanchez@irta.es

INTRODUCCIÓN

En especies de producción intensiva, como es el caso del conejo, el control de la eficiencia alimentaria es clave para garantizar la rentabilidad de la producción dado que los gastos de alimentación suponen hasta un 70% del total. Por eso, caracteres como el índice de conversión de alimentos (**ICA**), siempre han sido objetivo de selección en las líneas terminales. La consideración del ICA como criterio de selección requiere la medición del consumo individual. Dada la difícil obtención de estas medidas, se tiende a actuar sobre el ICA de forma indirecta seleccionando por crecimiento, negativamente correlacionado con ICA (Piles et al., 2004); aproximación que puede no ser óptima. La secuenciación del genoma del conejo (Carneiro et al., 2014) ha permitido el desarrollo de un panel de SNPs para esta especie, que se puede usar para explorar qué regiones genómicas controlan los caracteres de interés. En nuestro caso, el interés radica en el crecimiento de animales alimentados a voluntad (**ADGv**), su consumo (**FIv**), su índice de conversión (**FCRv**) y el consumo de pienso residual (**RFIv**); los tres últimos como medias de jaula. Igualmente se explorará la asociación genómica entre los SNPs del panel y el crecimiento de animales sometidos a restricción alimentaria (**ADGr**). Este último carácter puede entenderse como una medida de eficiencia (Nguyen y McPhee, 2005) y se corresponde con un manejo habitual en las granjas comerciales para controlar patologías digestivas (Gidenne et al., 2012).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se registró el crecimiento individual post-destete (28d-56d) de 1.454 animales de la línea Caldes producidos en 5 lotes, encuadrados en un experimento más extenso que se describe en Piles et al. (2017), y distribuidos en 198 jaulas (6-8 animales cada una) de las cuales 99 fueron alimentadas a voluntad (V) y el resto sometidas a una restricción (R) del 75% respecto al consumo a voluntad. Se registró el consumo medio diario en las jaulas alimentadas a voluntad. Al final del cebo se muestrearon entre 1 y 4 animales de aproximadamente un tercio de las jaulas de los 5 lotes considerados. En el momento del sacrificio, se tomó una muestra de hígado de la que se extrajo ADN genómico usando un kit comercial (NucleoSpin Tissue (250prep); Macherey-Nagel) para su posterior genotipado con el chip de SNPs desarrollado por Affymetrix (200K Affymetrix Axiom Orcun SNP Array). Se retuvieron los animales con un porcentaje de genotipos satisfactorio superior al 90%, y se descartaron los SNPs no anotados en autosomas, con un porcentaje de genotipado correcto inferior al 5% y con una frecuencia alélica inferior al 5%. El análisis incluyó los genotipos (114.604 SNPs) de 438 gazapos con datos fenotípicos (206 R y 230 V) y de las madres de algunos de ellos (53).

El análisis de asociación se llevó a cabo mediante 3 procedimientos diferentes. i) **GWAS-reg**, implementado con QXPAK (Pérez-Enciso y Misztal, 2011), testa la regresión (Test de ratio de verosimilitudes con 1 g.l.: LRT_1) del conteo alélico de cada posición sobre los dos caracteres de crecimiento, para ello se empleó un modelo mixto que incluyó los efectos de jaula, camada y valor aditivo, además del efecto del lote. ii) **GWAS-LDLA**, asume un modelo de QTL aleatorio, en el que para cada posición se testó (LRT_1) la varianza explicada por los haplotipos de 5 SNPs (reconstruidos con HiddePHASE (Druet y Georges, 2010) a nivel cromosómico). Los haplotipos se agrupan en base a la probabilidad de identidad por descendencia; de aquí que en este método se combine desequilibrio de ligamiento y ligamiento (LDLA) (Druet et al., 2008), este método solo se aplicó a ADGr y ADGv. iii) **GWAS-bi,** consiste en testar (LRT_1) la correlación genética que se estima entre el carácter de interés y el conteo alélico en cada posición SNP. El genotipo se explica con un modelo aleatorio que únicamente incluye, además de la media, el efecto genético aditivo (Legarra y Vitezica, 2015), correlacionado con

el del carácter a estudiar. Para los caracteres individuales el modelo que se ajusta es igual que el modelo nulo considerado en GWAS-reg. Para los caracteres de grupo se emplea un modelo que considera el promedio de los valores genéticos de los animales en la jaula (Biscarini et al., 2008). Este método sólo se aplicó a 14.710 posiciones que representaban bloques haplotípicos definidos con Plink (Chang et al., 2015).

Dentro de carácter y método se hizo una corrección por test múltiples a dos niveles distintos, genómico y cromosómico, recalculándose los p-valores de los test para que generasen una tasa de falsos positivos inferior al 5% (paquete qvalue de R) http://github.com/jdstorey/qvalue). A partir de la lista de SNPs/Bloques que se declararon como estadísticamente asociados con los caracteres de interés se hizo un estudio de anotación de las regiones usando Biomart (http://www.biomart.org). Las regiones definidas inicialmente se ampliaron en 1 Mb por ambos extremos para tratar de incluir regiones que pudieran estar en desequilibrio de ligamiento con los marcadores asociados con los caracteres. Posteriormente se emplearon Mouse Genome Database (http://www.informatics.jax.org/), Genecards (http://www.genecards.org/) y Cluego (Bidea et al., 2009) para obtener información funcional de los genes candidatos que mapeaban en esas regiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El único método que generó asociaciones estadísticamente significativas a nivel genómico fue el GWAS-LDLA. Con este método se identificaron 43 SNPs asociados a ADGv, distribuidos en 10 de los 19 cromosomas autosómicos y representando 18 regiones genómicas diferentes. El análisis a nivel cromosómico reveló asociación para 88 SNPs, distribuidos en 25 regiones de los cromosomas 2, 3, 5, 6, 7, 9, 12, 14, 15, 18 y 19. El método GWAS-reg mostró asociación entre ADGv y 56 SNPs de los cromosomas 3 (1 región), 5 (2 regiones) y 21 (1 región). Este mismo método mostró también asociaciones significativas entre 50 SNPs del cromosoma 13 y ADGr, estos SNPs definen una única región de aproximadamente 2 Mb. El procedimiento GWAS-bi también dio lugar a asociaciones significativas para ADGv en las mismas regiones que las declaradas anteriormente para los cromosomas 3 y 5, además de en otra región del cromosoma 16. Para ADGr también se declararon asociados 6 bloques de una región de aproximadamente 10 Mb en el cromosoma 9.

El único procedimiento que permitió explorar las asociaciones para los 3 caracteres medidos a nivel de jaula fue GWAS-bi. Para el caso del consumo (FIv) se observó un único bloque en el cromosoma 5 significativamente asociado. El consumo de pienso residual (RFIv) se mostró asociado con 4 bloques de SNPs, 3 en el cromosoma 8 y 1 en el cromosoma 21. Este último está cerca de una región también asociada con ADGv. El FCR no mostró asociación con ninguna región cromosómica.

En la tabla 1 se indican, por método y carácter, las regiones en las que el estudio de anotación reveló algún gen candidato con funciones relacionadas con los caracteres analizados. En total se determinaron 29 genes; 4 para ADGr, 2 para FIv y 23 para ADGv. De estos últimos, 4 fueron los anotados también para RFIv. Estos 4 genes (*ATXN2, ACAD10, TRAFD1, PTPN11*) son particularmente relevantes por su posible efecto pleiotrópico. Otros que merecen atención con respecto a ADGv son *NDUFAF6*, que codifica para una proteína mitocondrial de la cadena respiratoria; y *FTO*, asociado previamente a caracteres de crecimiento y calidad de la carne en conejos (Zhang et al., 2013). Para ADGr, *FEZF2 y PTPRG* pudieran ejercer su efecto a través de modificaciones o alteraciones de la conducta alimentaria; y *RC3H1* codifica para un represor transcripcional implicado en procesos inflamatorios. En relación a FIv, *CEBPA* está implicado en la homeostasis energética y *KCTD15* se ha relacionado con una disminución en la ingesta.

Como conclusión podemos señalar que se han detectado un buen número de regiones genómicas y genes candidatos implicados en el crecimiento, el consumo y la eficiencia alimentaria del conejo de carne. Aun así, se hace necesario un estudio más profundo de las mismas, en particular evaluando los efectos y las frecuencias de los polimorfismos declarados como significativamente asociados con los caracteres estudiados.

***Tabla 1**. Regiones cromosómicas que incluyen genes candidatos asociados a los distintos caracteres de interés.*

MÉTODO	CARÁCTER	Chr.	INI_reg[1] (Mb)	FIN_reg[1] (Mb)	-log$_{10}$(qvalue) [2]	N. sig.[3] SNPs/Bloq.	GENES CANDIDATOS
GWAS-bi	ADGr	9	29,66	38,72	2,40	6	***FEZF2, PTPRG***
GWAS-bi	ADGv	3	102,28	109,23	1,59	2	***NDUFAF6 ****
GWAS-bi	ADGv	5	34,36	34,36	1,79	1	***DYNLRB2***
GWAS-bi	FIv	5	3,85	3,88	1,37	1	***CEBPA, KCTD15***
GWAS-bi	RFIv	21	7,60	7,61	1,89	1	***ATXN2, ACAD10, TRAFD1, PTPN11***
GWAS-LDLA	ADGv	2	31,78	31,84	1,51	5	***ATP8A1***
GWAS-LDLA	ADGv	3	5,59	5,59	1,54	1	***SRFBP1***
GWAS-LDLA	ADGv	3	109,33	109,36	1,54	3	***NDUFAF6 ****
GWAS-LDLA	ADGv	3	138,76	138,76	1,39	1	***ANXA13***
GWAS-LDLA	ADGv	5	13,12	14,50	1,33	15	***BBS2***
GWAS-LDLA	ADGv	5	33,97	34,59	1,33	11	***DYNLRB2***
GWAS-LDLA	ADGv	6	14,10	14,10	3,39	1	***SCNN1G***
GWAS-LDLA	ADGv	7	126,63	126,63	2,17	1	***ITGAV***
GWAS-LDLA	ADGv	9	58,06	58,06	3,28	1	***PIGF***
GWAS-LDLA	ADGv	12	104,53	112,24	1,42	18	***ATP5IF1, GPRC6A, RFX6***
GWAS-LDLA	ADGv	12	129,56	129,56	1,41	1	***ARFGEF3***
GWAS-LDLA	ADGv	18	64,01	64,04	3,65	3	***PNLIP, PNLIPRP1, PNLIPRP2, SLC18A***
GWAS-LDLA	ADGv	21	8,66	8,69	1,51	2	***ATXN2, ACAD10, TRAFD1, PTPN11***
GWAS-reg	ADGr	13	0,40	2,09	1,35	50	***RC3H1, TNFSF18***
GWAS-reg	ADGv	3	102,22	113,46	1,35	27	***NDUFAF6***
GWAS-reg	ADGv	5	9,07	9,07	1,38	1	***FTO, AKTIP***
GWAS-reg	ADGv	21	7,17	8,46	1,33	26	***ATXN2, ACAD10, TRAFD1, PTPN11***

[1]La región anotada se extiende 1Mb con respecto a las posiciones indicadas. 2 qvalue mínimo dentro de la región, [3] Número de SNPs o Bloques declarados como significativamente asociados con el carácter en la región. *El gen NDUFAF6 cae a menos de 1/2 Kb de los límites de las regiones definidas al anotar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Bindea, G. et al. 2009. Bioinformatics 25(8):1091-1093. • Biscarini, F. *et al*. 2008. J. Anim. Sci. 86: 2845-2852. • Carneiro, M. *et al*. 2014. Science 345: 1074–1079. • Chang, C.C. *et al.* 2015. Gigascience 4: 7. • Druet, T. *et al*. 2008. Genetics 178 : 2227–223. • Druet, T. & Georges, M. 2010. Genetics 184(3): 789–798. • Gidenne, T. *et al.* 2012. Animal 6(9): 1407-1419. • Legarra, A. & Vitezica, Z. 2015. Genet. Sel. Evol. 47: 89. • Nguyen, N. & McPhee, C. 2005. Genet. Sel. Evol. 37(3): 199 - 213. • Pérez-Enciso, M. & Misztal, I. 2011. BMC Bioinformatics 12: 202. • Piles, M. et al. 2004. J. Anim. Sci. 82(3): 654-660 • Piles, M. et al. 2017. Genet. Sel. Evol. 49-58 • Zhang, G. et al. 2013. Gene 527: 553–557.

Agradecimientos: Trabajo financiado por RTA2011-00064-00-00 y Feed-a-Gene: Proyecto financiado por el programa H2020 de Unión Europea con referencia EU 633531.

GENOME WIDE ASSOCIATION STUDY OF INDIVIDUAL GROWTH AND CAGE FEED EFFICIENCY IN RABBITS UNDER TWO FEEDING REGIMENS

ABSTRACT: Our objective was to identify rabbit genomic regions associated with growth (ADGv), feed intake (FIv), feed conversion ratio (FCRv) and residual feed intake (RFIv) recorded under full feeding, as well as with growth under restricted feeding (ADGr). To achieve this aim, 114,604 SNPs were evaluated in 438 rabbits. Three different models for testing the associations were used. The one returning the largest number of significant associations combines LD and linkage information, this provided significance at genome-wide level. The other two approaches only returned significant associations at chromosome level. Overall, at this level, ADGv resulted associated with 25 regions, ADGr with two, FIv with one and RFIv with two regions. Among the 29 candidate genes identified within these regions, four could have a pleiotropic effect among ADGv and RFIv. *FTO* was also previously associated with growth in rabbits, and some genes associated with ADGr could be linked to feeding behavior.

Keywords*:* GWAS, Rabbit, Growth, Feed Efficiency