

Estudio de asociación para detectar efectos genéticos directos y asociativos en poblaciones heterogéneas: el caso del “picaje de plumas” en gallinas ponedoras

Filippo Biscarini^{1,2}, Henk Bovenhuis², Jan van der Poel², Bas Rodenburg²,
Annemieke Jungerius³ y Johan van Arendonk²

¹Departamento de Bioinformática, Parque Tecnológico Padano (PTP), Lodi, Italia.

²ABGC, Universidad de Wageningen, Holanda.

³Hendrix Genetics, Boxmeer, Holanda.

Resumen

En este trabajo se presentan los resultados de un estudio de asociación con genoma completo para el comportamiento de picaje de plumas en una población heterogénea de nueve líneas de gallinas ponedoras. El análisis simultáneo de múltiples líneas de gallinas permite utilizar el desequilibrio de ligamiento (LD) conservado en toda la población, lo que hace posible detectar marcadores asociados al fenotipo de manera consistente en varias líneas. Además, al extenderse el LD en poblaciones heterogéneas por una distancia menor que en las líneas individuales, los marcadores detectados con este modelo se hallan más cerca de la mutación de interés, permitiendo el mapeo fino de genes candidatos. Se evitaron posibles asociaciones espurias debidas a la estratificación de poblaciones al incluir en el modelo el efecto de la línea y la matriz de relaciones de parentesco. Al ser las gallinas ponedoras animales que se suelen criar en grupos (jaulas, corrales), se estimaron tanto los efectos genéticos directos (del genotipo individual) como los asociativos (de los genotipos de las demás gallinas de la jaula) sobre el fenotipo individual. El carácter analizado fue la condición del plumaje (“feather score”, FS) que es una medida de las lesiones producidas por el picaje de plumas. Finalmente, se detectaron 11 asociaciones marcador-fenotipo en el modelo de efectos genéticos directos (interpretables como la susceptibilidad de recibir picotazos), y 81 asociaciones en el modelo de efectos genéticos asociativos (interpretables como la propensión a picotear). El gen del receptor de la serotonina (HTR2C) en el cromosoma 4 resultó asociado a la condición del plumaje en los dos modelos, confirmando –como se había observado en estudios previos– que el sistema serotoninérgico está implicado en la modulación del comportamiento de picaje de plumas en gallinas ponedoras.

Palabras Clave: gallinas ponedoras, GWAS, poblaciones heterogéneas, efectos asociativos

Introducción

Gracias al creciente número de marcadores genéticos disponibles (principalmente los llamados polimorfismos de un solo nucleótido, SNPs), se han multiplicado en los últimos años los estudios de asociación pangenómicos (GWAS, genome-wide association studies) entre genotipos y fenotipos de una gran variedad de caracteres tanto productivos como funcionales en distintas especies de animales domésticos. Dichos estudios de asociación se han llevado a cabo tradicionalmente en poblaciones homogéneas, utilizando el desequilibrio de ligamiento (LD) entre individuos genéticamente parecidos, y evitando a la vez asociaciones espurias debidas a la estratificación de poblaciones o a la inconsistencia de la fase de asociación marcador-

fenotipo en individuos filogenéticamente lejanos. Recientemente se ha explorado la posibilidad de dar un paso más allá y extender los estudios de asociación al análisis de poblaciones heterogéneas (Biscarini et al., 2010a y b). En concreto, se ha modelado la estratificación de poblaciones al incluir la información de la población de origen en el modelo, y considerando el efecto de la interacción entre población y genotipo del marcador. De esta manera se pueden detectar QTLs comunes al conjunto de poblaciones, y con una resolución mayor que en las clásicas asociaciones dentro de poblaciones homogéneas, a raíz del menor LD conservado en poblaciones heterogéneas. Por ejemplo, Biscarini et al. (2010a) calcularon una distancia media de 1 cM entre los SNPs detectados y los correspondientes QTLs asociados en una población heterogénea de gallinas ponedoras.

Tradicionalmente los estudios de asociación se han enfocado esencialmente en los efectos genéticos aditivos, pasando por alto otro tipo de efectos como los de dominancia o interacción. En el caso concreto de especies animales que se crían en grupos (p.ej. cerdos, gallinas, conejos, peces etc.), además de esos efectos genéticos directos, los efectos asociativos debidos a la interacción con los demás miembros del grupo son relevantes en la determinación del fenotipo individual (Bijma et al., 2007a y b). Ya se han dado pasos para incorporar este último tipo de efectos en estudios de asociación (Biscarini et al., 2010b).

El presente artículo trata de revisar las extensiones del modelo estándar de asociación marcadores-fenotipos. Para ello se tomó como ejemplo un carácter marcadamente influenciado por las interacciones sociales como es el comportamiento de picaje de plumas en gallinas ponedoras. En el estudio se utilizó una población heterogénea de nueve líneas genéticas de ponedoras de las razas White Leghorn y Rhode Island Red. Se analizó el carácter “feather score” (FS, clasificación -en puntos de 0 a 5- de la condición del plumaje) una medida indirecta del picaje de plumas que, además de tener buena correlación con este trastorno del comportamiento, se considera más conveniente -en términos de tiempo y dinero- que la observación directa (Bilčík y Keeling, 1999). Se estimó el efecto directo (interpretable como la susceptibilidad de recibir picotazos), así como el efecto asociativo (interpretable como la propensión a picotear). En el presente artículo nos centraremos en los aspectos metodológicos de los estudios de asociación en poblaciones heterogéneas. Los resultados específicos de la aplicación al picaje de plumas en ponedoras se mencionarán brevemente.

Material y Métodos

Población experimental, fenotipos y genotipos

En el presente estudio se empleó una población de 662 gallinas ponedoras pertenecientes a 9 líneas genéticas distintas, 5 de raza White Leghorn (plumaje blanco) y 4 de raza Rhode Island Red (plumaje marrón). Las gallinas se alojaron en jaulas cada una con 4 animales de la misma línea elegidos al azar (pudiendo estar emparentados), y manteniendo los picos intactos. Se analizó la condición del plumaje (“feather score”, FS) evaluada en cuello, dorso y abdomen a 51 y 69 semanas de edad, con una escala de clasificación de entre 0 (plumaje perfecto) y 5 (lesiones graves). Las regiones consideradas se escogieron por ser las más afectadas por el picaje, siendo además improbable que presentaran lesiones debidas a la abrasión con las paredes de la jaula.

Las 662 gallinas se genotiparon para 1536 SNPs distribuidos por 24 de los 39 cromosomas que constituyen el genoma de *Gallus gallus*. Los SNPs se escogieron por su cercanía a genes candidatos y QTLs relacionados con el sistema inmunitario o el comportamiento según estudios previos. Se excluyeron los SNPs con una frecuencia del alelo menor (MAF) < 5%, lo que dejó 1022 marcadores disponibles para el estudio de asociación.

Análisis de datos

Se estimaron el efecto genético directo del genotipo individual a cada SNP y el efecto genético asociativo de los genotipos de los demás miembros de la jaula sobre la condición individual del plumaje. En ambos casos, se empleó un procedimiento en dos etapas: inicialmente se llevó a cabo un estudio de asociación sin considerar las relaciones de parentesco entre animales; posteriormente, los SNPs potencialmente interesantes se analizaron en un modelo mixto incluyendo la matriz de relaciones aditivas. Adaptando el método de Saccone et al. (2008), nos fijamos en los SNPs que tenían un efecto significativo entre líneas y al mismo tiempo no presentaban interacción entre el genotipo del SNP y la línea genética. El modelo estadístico utilizado para escanear cada una de las posiciones del genoma fue el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + SNP_i + line_j + (line \times SNP)_{ij} + e_{ijk}, \quad [1]$$

donde y_{ijk} es la clasificación en puntos de las lesiones al plumaje (feather score), SNP_i es el efecto del genotipo, $line_j$ es el efecto de la línea (nueve clases), $(line \times SNP)_{ij}$ es la interacción entre línea y genotipo y e_{ijk} son los residuos.

De los SNPs que cumplían con las dos condiciones (significación de la asociación y ausencia de interacción), aquellos con un “false discovery rate” (FDR, Benjamini y Hochberg, 1995) < 0.15 se seleccionaron para la segunda fase del análisis, en que al modelo [1] se añadió el efecto poligénico (efecto animal aleatorio con varianza $A\sigma_a^2$, donde A es la matriz de relaciones aditivas derivada de la genealogía). Se utilizaron valores de heredabilidad de FS previamente estimados para fijar el cociente entre varianza residual y varianza genética en las ecuaciones del modelo mixto.

El efecto asociativo se refiere al efecto del genotipo -a cada locus- de los demás miembros del grupo sobre la condición del plumaje individual. Se estimó la regresión del FS individual sobre la frecuencia alélica de cada SNP en los miembros de la jaula, con el modelo que aparece a continuación. Nótese que el genotipo del individuo cuyo FS se evalúa no está incluido en el análisis.

$$y_{ijk} = \mu + \beta_1 p_k + line_j + \beta_{kj} (line \times p)_{kj} + e_{ijk}, \quad [2]$$

y_{ijk} y $line_j$ son como en [1], p_k es la frecuencia alélica de los demás miembros del grupo (salvo el animal i), $(line \times p)_{kj}$ es la interacción entre la línea y la frecuencia alélica del SNP, y e_{ijk} son los residuos, pesados por el número de “compañeros” de y_{ijk} en la jaula.

También en este caso se seleccionaron los SNPs con un FDR < 0.15 para analizarlos con un modelo mixto que incluyó las relaciones de parentesco. La estructura de varianza fue la misma que en el caso de los efectos directos.

Para todos los análisis estadísticos descritos se usó el entorno de programación libre R, salvo para estimar los efectos poligénicos en los modelos mixtos, los cuales se

estimaron por máxima verosimilitud restringida (REML) con ASREML (Gilmour et al., 2006).

Resultados y Discusión

Metodología

En este artículo se ha presentado un estudio de asociación marcador-fenotipo en poblaciones heterogéneas realizado mediante un enfoque novedoso. El método se basa en el análisis simultáneo de múltiples poblaciones, fijándose no sólo en la significación del efecto del marcador, sino también en la ausencia de interacción entre éste y las subpoblaciones incluidas en el análisis, con el fin de asegurar la consistencia de la asociación en la población completa. La figura 1 ilustra este concepto, tomando como ejemplo una región del cromosoma 1. El histograma de abajo representa el análisis con las nueve líneas de ponedoras, mientras que los histogramas de arriba muestran los resultados para las líneas de raza White Leghorn y Rhode Island Red respectivamente. Las ponedoras blancas y marrones constituyen dos grupos filogenéticos distintos (Biscarini et al., 2010a), lo que implica que el LD está mejor conservado dentro de ellos que entre ellos (Andreescu et al., 2007). Cuando se analizaron las dos razas por separado, se detectaron muchos SNPs asociados con el fenotipo (FS en cuello y dorso): 3 en White Leghorn y 8 en Rhode Island Red. Esto refleja el mayor nivel de LD en las dos sub-poblaciones en las que han tenido lugar menos eventos de recombinación y más SNPs resultan asociados al QTL. Cuando se combinaron las dos subpoblaciones para analizarlas juntas la mayoría de las señales de asociación se perdieron, debido o bien a menor significación o bien a la interacción con la subpoblación, observándose un solo SNP asociado al fenotipo de manera consistente en la población entera. Debido al menor LD en poblaciones heterogéneas, los SNPs detectados con este método se hallan probablemente muy cerca del QTL asociado (figura 2).

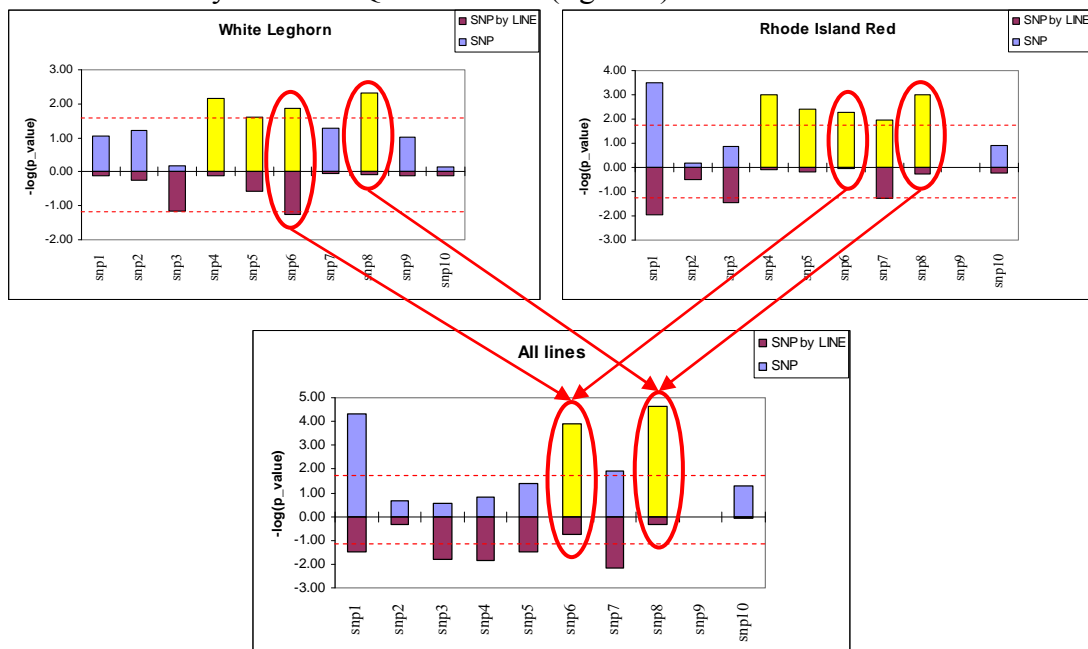


Figura 1: refinamiento del mapeo de QTLs pasando del análisis en poblaciones separadas (arriba) al análisis conjunto de la población heterogénea (abajo). Por encima del eje horizontal están los efectos de los marcadores; debajo de éste los efectos de la interacción marcador-población

En poblaciones heterogéneas -como las nueve líneas de ponedoras analizadas en este estudio- se puede incurrir, a causa de la estratificación de poblaciones, en falsos positivos, es decir asociaciones marcador-fenotipo espurias que en realidad reflejan diferencias de frecuencias alélicas entre poblaciones, o una fuerte estructura familiar. La posibilidad de incurrir en estos falsos positivos se controló incluyendo el efecto de la línea y la matriz de relaciones de parentesco en el modelo de análisis.

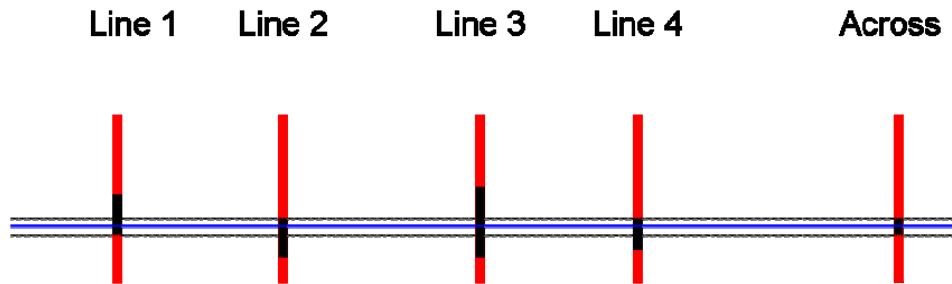


Figura 2: debido al menor LD (barra negra) conservado entre líneas (across), los marcadores asociados al fenotipo en el análisis de poblaciones heterogéneas están más cerca de la mutación (línea azul).

Efectos asociativos

En el comportamiento de picaje de plumas en gallinas ponedoras las interacciones sociales juegan un papel relevante (Ellen et al., 2008). Para esta clase de caracteres los efectos asociativos contribuyen de manera sustancial a la variabilidad heredable total, y pueden llegar a ser hasta mayores en magnitud que los efectos genéticos directos (Bijma et al., 2007a y b; Ellen et al., 2008). En efecto, en el presente estudio se detectaron muchos más SNPs asociados con el picaje de plumas en el análisis de los efectos asociativos que en el de efectos directos (57 vs 11), aunque esto se debe en parte a que la heredabilidad de la actitud a picotear es más alta que la de recibir picotazos.

La existencia de interacciones sociales plantea también el problema de la composición de los grupos. Grupos de parientes próximos tienden a llevarse mejor, pero por otro lado plantean retos estadísticos. El picaje de plumas y el canibalismo en gallinas ponedoras son más leves en jaulas de hermanos plenos (Bijma et al., 2007a y b), pero con estos datos los efectos asociativos no se pueden estimar (Bijma et al., 2007a y b) y la estimación de los componentes de la varianza es más difícil (Biscarini et al., 2008).

Marcadores asociados y manejo genético del picaje de plumas

En este estudio se han detectado numerosos SNPs asociados al picaje de plumas, tanto en lo que concierne a los efectos genéticos directos como a los asociativos. En particular, cabe destacar el rol del receptor de la serotonina (HTR2C), cuyo gen está asociado a la propensión a picotear (efecto asociativo) y a la susceptibilidad a recibir picotazos (efecto directo). Se ha demostrado previamente que el sistema serotoninérgico está implicado en la determinación del comportamiento de picaje de plumas en gallinas ponedoras (p.ej. Bolhuis et al., 2009): una menor concentración de serotonina en el cerebro o en los vasos y nervios periféricos está relacionada con una mayor predisposición a que se manifieste el picaje. Bolhuis et al. demostraron también que la selección por mortalidad reducida conlleva cambios en el sistema serotoninérgico ya en la segunda generación. Además se ha demostrado que el comportamiento de picaje en gallinas es heredable (Kijaer et al., 2001). Estos resultados, juntos a los obtenidos por

Biscarini et al. (2010b), podrían utilizarse para seleccionar gallinas más sociables, que manifiesten una menor tendencia a picotear, lo que adquiere especial relevancia por la reciente aplicación de la directiva europea 74/1999 que plantea el cese de la práctica del recorte del pico y el alojamiento de gallinas en grupos más grandes.

Conclusiones

Se ha presentado una nueva manera para modelar poblaciones heterogéneas en estudios de asociación pangenómicos entre marcadores y fenotipos. Al incluir el efecto de cada subpoblación y la matriz de relaciones de parentesco en el modelo, se pueden detectar los marcadores asociados al fenotipo de manera consistente en toda la población. El menor LD conservado en la población heterogénea respecto a las subpoblaciones, permite detectar marcadores más próximos al QTL o al gen candidato. Además este método, en el caso de poblaciones pequeñas, hace posible aumentar el tamaño muestral, incrementando el poder estadístico del análisis. Los polimorfismos característicos de cada subpoblación no serán directamente detectados con este método; sin embargo, una comparación entre los resultados del análisis en la población heterogénea y en las subpoblaciones permite detectarlos – tal vez con mayor precisión. Esta extensión del modelo estándar para estudios de asociación, además de hacer posible que se analicen más poblaciones simultáneamente, puede ser de inspiración en el desarrollo de métodos para selección genómica multi-raza.

Referencias bibliográficas

1. Andreescu, C., S. Avendano, S.R. Brown, A. Hassen, S.J. Lamont y J.C.M. Dekkers. Linkage disequilibrium in related breeding lines of chickens. *Genetics* 177:2161-2169 (2007)
2. Benjamini, Y. Y Hochberg. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B* 57:289-300 (1995)
3. Bijma, P., W.M. Muir y J.A.M. van Arendonk. Multilevel selection 1: quantitative genetics of inheritance and response to selection. *Genetics* 175:277-288 (2007a)
4. Bijma, P., W.M. Muir, E.D. Ellen, J.B. Wolf y J.A.M. van Arendonk. Multilevel selection 2: estimating the genetic parameters determining inheritance and response to selection. *Genetics* 175:289-299 (2007b)
5. Bilčík, B., y L.J. Keeling. Changes in feather condition in relation to feather pecking and aggressive behaviour in laying hens. *Br. Poult. Sci.* 40:444-451 (1999)
6. Biscarini, F., H. Bovenhuis y J.A.M. van Arendonk. Estimation of variance components and prediction of breeding values using pooled data. *J. Anim. Sci.* 86:2845-2852 (2008)
7. Biscarini, F., H. Bovenhuis, J.A.M. van Arendonk, H.K. Parmentier, A.P. Jungerius y J.J van der Poel. Across-line SNP association study of innate and adaptive immune response in laying hens. *Anim. Genet.* 41:26-38 (2010a)
8. Biscarini, F., H. Bovenhuis, J.A.M. van Arendonk, H.K. Parmentier, A.P. Jungerius y J.J van der Poel. Across-line SNP association study for direct and associative effects on feather damage in laying hens. *Behav. Genet.* 40:715-727 (2010b)
9. Bolhuis, J.E., E.D. Ellen, C.G. van Reenen, J. De Groot, J. Ten Napel, R.E. Koopmanschap, G. De Vries Reilingh, K.A. Uitdehaag, B. Kemp y T.B. Rodenburg. Effects of genetic group selection against mortality on behaviour and peripheral

- serotonin in domestic laying hens with trimmed and intact beaks. *Physiol. Behav.* 97:470-475 (2009)
10. Ellen, E.D., J. Visscher, J.A.M. van Arendonk y P. Bijma. Survival of laying hens: genetic parameters for direct and associative effects in three purebred layer lines. *Poult. Sci.* 87: 233-239 (2008)
 11. Gilmour, A.R., B.J. Gogel, B.R. Cullis y R. Thompson. ASReml user guide release 2.0 VSN International Ltd, Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK (2006)
 12. Kijaer, J., P. Sørensen y G. Su. Divergent selection on feather pecking behaviour in laying hens (*Gallus gallus domesticus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 71:229-239 (2001)
 13. Saccone, N.L., S.F. Saccone, A.M. Goate, R.A. Gruzca, A.L. Hinrichs, J.P. Rice y L.J. Bierut. In search of causal variants: refining disease association signals using cross-population contrasts. *BMC genet.* 9:58 (2008)