

ESTUDIO DE ASOCIACIÓN GENÓMICO DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN CONEJO

Sosa-Madrid, B.S.^{1*}, Ibañez-Escriche, N.¹, Navarro, P.², Blasco, A.¹, Haley, C.S.², Fontanesi, L.³, Pena, R.N.⁴ y Hernández, P.¹

¹Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de València, 46022 València, España.

²MRC Human Genetics Unit, MRC Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, EH4 2XU, United Kingdom.

³Department of Agricultural and Food Sciences, Division of Animal Sciences, University of Bologna, 40127 Bologna, Italia.

⁴Departament de Ciència Animal, Universitat de Lleida–Agrotecnio Centre, Lleida, España.
*bosomad@posgrado.upv.es

INTRODUCCIÓN

La grasa intramuscular (GIM) es uno de los principales caracteres de calidad de carne incluidos en los programas de mejora genética (bovino, porcino y ovino) para satisfacer la demanda de los consumidores (Hocquette et al., 2010). Los resultados de experimentos genómicos demuestran que los mecanismos de control de la GIM son complejos. Los polimorfismos encontrados asociados a la GIM están raramente segregando en poblaciones comerciales (Pena et al., 2016; Strucken et al., 2017). No obstante, algunos polimorfismos han sido utilizados en el esquema de selección de la raza Japanese Black en bovino (Gotoh et al., 2014; Sukegawa et al., 2014). En conejo, un experimento de selección divergente por GIM mostró una respuesta alrededor de 3.1 desviaciones estándares en la novena generación. El objetivo de este estudio fue detectar SNPs y regiones genómicas asociadas a la GIM utilizando conejos procedentes de este experimento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Datos fenotípicos: Los animales de este estudio provienen de dos poblaciones seleccionadas divergentemente por GIM: 240 de la línea alta y 237 de la línea baja. Los animales descienden de reproductores de la novena generación (116 hembras y 21 machos) y por término medio se tomaron cuatro hermanos completos por hembra. Los animales se sacrificaron tras un ayuno de cuatro horas. El procedimiento experimental para la obtención de los datos de GIM se describe en Martínez-Álvaro et al. (2016). La GIM se expresó en gramos de GIM por cada 100 gramos del músculo *Longissimus thoracis et lumborum*.

Datos genómicos: Las muestras de ADN se obtuvieron a partir de muestras del músculo *obliquus abdominis* tomadas en el momento del sacrificio. La plataforma de SNPs para el genotipado fue Affymetrix Axiom OrcunSNP Array (Affymetrix, Inc. Santa Clara, CA, USA) con aproximadamente 200k SNPs. El control de calidad fue realizado utilizando el programa Axiom Analysis Suite v. 3.0.1.4. Los SNPs con MAF \geq 3%, "Call Rate" \geq 95% y una posición conocida en el mapa genómico del conejo fueron incluidos en el estudio. Para el análisis se descartaron aquellas muestras con genotipos faltantes $>$ 3%. Después del control de calidad, un total de 94,971 SNPs se utilizaron en el análisis. De estos SNPs se imputaron con el software BEAGLE v4.0 (Browning and Browning, 2016) aquellos que tenían valores ausentes.

Estudio de Asociación del Genoma Completo (GWAS): El análisis estadístico se realizó utilizando tres enfoques diferentes para el GWAS. Todos los enfoques incluyeron los efectos sistemáticos: mes (cinco niveles), sexo (dos niveles) y orden de parto (tres niveles). El procedimiento para cada enfoque fue el siguiente:

- (a) Una regresión por cada marcador (SMR) ajustando los datos por el parentesco genómico: La matriz genómica se construyó para corregir los datos por la estructura familiar y se calculó un parámetro de inflación lambda (λ) para evaluar la corrección de la estratificación de población y ajustar los p-valores en caso de inflación. Los p-valores fueron computados a través de un test de asociación basado en la estructura familiar (FASTA) (Chen and Abecasis, 2007).
- (b) Al modelo SMR del enfoque anterior se añadió un efecto aleatorio camada. El efecto camada se incluyó dada su relevancia en análisis cuantitativos previos para GIM

(Martínez-Álvaro et al., 2016). Se utilizó el software DISSECT para la estimación de los parámetros (Canela-Xandri et al., 2015). Se utilizó un umbral de $1E^{-4}$ para determinar la significación de los SNPs en los enfoques (a) y (b) (Lander and Kruglyak, 1995).

- (c) Regresión múltiple de marcadores (MMR) evaluando cada marcador y ventanas no-solapadas de una megabase. El modelo está basado en un método de Bayes B, con un π de 0.9988. Este parámetro (π) es el porcentaje de SNPs con efecto cero en el modelo por cada iteración. Además de los efectos sistemáticos previamente mencionados, el modelo incluyó el efecto línea para ajustar los datos por la estratificación de la población. El umbral de relevancia fue un factor de Bayes (BF) de 20 para el análisis por SNP (Kass and Raftery, 1995) y de 1% de la varianza genética (VG) para las ventanas. También se incluyeron aquellas ventanas consecutivas que explicaban más del 0.5% de la varianza y que compartían un bloque de desequilibrio de ligamiento. Para este análisis se utilizó el software GenSel v.4.90 (Garrick and Fernando, 2013).

Las regiones consideradas para los análisis funcionales fueron las ventanas asociadas y las regiones comprendidas entre +/- 500 kb de los SNPs que sobrepasaron el umbral. La identificación de los genes en estas regiones cromosómicas fue realizada con "UCSC Genome Browser" (Rosenbloom et al., 2015) y BIOMART (Aken et al., 2016). El análisis de las anotaciones funcionales de estos genes se realizó con las bases de datos almacenadas en "Enrichr" (Kuleshov et al., 2016) y "DAVID v.6.8" (Jiao et al., 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El valor del parámetro λ fue de 1.054, calculado con el método FASTA. Este valor está por encima de 1.05 (un valor límite aceptable) (Price et al., 2010). Por tanto, los p-valores para los enfoques a y b fueron ajustados por este parámetro. Las regiones genómicas asociadas con la GIM coinciden en todos los enfoques en los cromosomas del conejo (OCU) 8 y 13 (Tabla 1). Sin embargo, para otras regiones sólo se detectaron asociaciones en dos de los métodos, en OCU 1 (b-c), 12 (a-b) y 14 (a-b). En el OCU 13, cuatro SNPs presentaron p-valores significativos para los enfoques (a) y (b), así como un relevante BF para el enfoque por MMR. Las dos ventanas que contienen estos SNPs explican el 1.3% de la VG. En el OCU 8, dos ventanas explican el 6.7% de VG y contienen 18 SNPs asociados en al menos dos métodos. Las anotaciones funcionales para la región asociada del OCU 13 muestran cuatro genes (dos no-codificantes y dos codificantes). El gen ENSOCUG00000027270 (84.56 Mb), presente en la región asociada del OCU 13, es conocido con el nombre de EWSR1 ("Ewing sarcoma breakpoint region 1") en humano y ratón. Este gen ortólogo regula la transcripción del BMP7 ("Bone Morphogenetic protein 7") que promueve el desarrollo de los adipocitos marrones (Wang and Seale, 2016). Empero, en conejo no se conoce hasta la fecha vinculación descrita de este gen con el metabolismo de lípidos o la GIM. En el OCU 8, el gen APOLD1 presenta funciones relacionadas con la unión, transporte y localización de lípidos y PLBD1 presenta funciones vinculadas a la actividad hidrolasa del éster carboxílico. Sin embargo, un grupo de genes encontrados en el OCU 1 tienen mayor vinculación con rutas metabólicas de lípidos (p. ej. MTMR2, STARD10, ENDOD1 y ARAP1). Los resultados de esta investigación difieren de otros estudios de genes candidatos en conejo, en los cuales se encontró asociación de la GIM (y otros caracteres de calidad de carne) con SNPs localizados en los genes FTO (OCU 5) (Zhang et al., 2013), CAST (OCU 11) (Wang et al., 2016), FABP4 (OCU 3) (Migdał et al., 2018) y MYPN (OCU 18) (Wang et al., 2017).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aken, B. L., et al., 2016. Database 2016: baw093.
- Browning, B. L., y Browning, S. R. 2016. Am. J. Hum. Genet. 98: 116–126.
- Canela-Xandri, O., et al. 2015. Nat. Commun. 6: 1-6.
- Chen, W.-M. y Abecasis, G. R. 2007. Am. J. Hum. Genet. 81: 913–926.
- Garrick, D. J. y Fernando, R. L. 2013. pp. 275–298
- Gotoh, T., et al., 2014. Anim. Front. 4:46–54.
- Hocquette, J. F., et al., 2010. Animal 4: 303–319.
- Jiao, X., et al., 2012. Bioinformatics 28: 1805–1806.
- Kass, R. E. y Raftery A. E. 1995. J. Am. Stat. Assoc. 90: 773–795.
- Kuleshov, M. V., et al., 2016. Nucleic Acids Res. 44: W90–W97
- Lander, E. y Kruglyak L.

1995. *Nat. Genet.* 11: 241–247 • Martínez-Álvaro, M., *et al.*, 2016. *J. Anim. Sci.* 94: 4993 • Migdał, Ł., *et al.*, 2018. *Livest. Sci.* 210: 21–24. • Pena, R. N., *et al.*, 2016. *Int. J. Mol. Sci.* 17. • Price, A., *et al.*, 2010. *Nat. Rev. Genet.* 11: 459–463 • Rosenbloom, K. R., *et al.*, 2015. *Nucleic Acids Res.* 43: D670–D681. • Strucken, E. M., *et al.*, 2017. *J. Anim.* 1: 69–76. • Sukegawa, S., *et al.*, 2014. *Anim. Sci. J.* 85: 193–197. • Wang, J., *et al.*, 2016. *Anim. Sci. Pap. Reports* 34: 269–278. • Wang, J., *et al.*, 2017. *Ital. J. Anim. Sci.* 16: 400–404 • Wang, W., y Seale, P. 2016. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17: 691–702 • Webb, E. C., y O'Neill, H. A. 2008. *Meat Sci.* 80: 28–36. • Zhang, G., *et al.*, 2013. *Gene* 527: 553–557.

Agradecimientos: B. Samuel Sosa Madrid agradece su beca FPI al Ministerio de Economía y Competitividad de España (BES-2015-074194).

Tabla 1. Polimorfismos relevantes (SNPs) asociados a la grasa intramuscular (GIM) en conejo.

Marcador	Cr ¹	Posición (Mb ²)	SMR ³	SMR – W ⁴	BF ⁵	Nº Ventana (%VG ⁶)
Affx-151803947	1	121.28	4.36E-04	3.62E-05	16.90	118 (1.98%)
Affx-151900210	8	25.22	7.16E-05	4.75E-05	42.24	841 (5.47%)
Affx-151808634	8	25.86	4.15E-05	6.83E-05	23.98	841 (5.47%)
Affx-151824236	8	26.11	6.66E-03	8.00E-05	21.08	842 (1.24%)
Affx-151959973	12	7.20	7.72E-05	3.48E-05	8.41	1167 (0.27%)
Affx-151801561	13	84.53	4.02E-05	6.43E-06	25.12	1380 (0.75%)
Affx-151846540	13	84.73	1.08E-05	6.38E-06	25.74	1380 (0.75%)
Affx-151790364	13	84.75	1.06E-05	6.43E-06	24.24	1380 (0.75%)
Affx-151939801	13	85.31	2.15E-04	2.58E-06	44.27	1381 (0.54%)

Las celdas sombreadas en gris indican que el valor individualmente no supera el umbral para el enfoque. ¹ Cromosoma. ² Megabase; ³ P-valor del enfoque regresión simple por marcador; ⁴ P-valor del enfoque regresión simple por marcador con efecto aleatorio camada. ⁵ Factor de Bayes.

⁶ Varianza genética explicada por la ventana.

GENOME WIDE ASSOCIATION STUDY FROM INTRAMUSCULAR FAT IN RABBITS

ABSTRACT: A divergent selection experiment for intramuscular fat (IMF) in *Longissimus thoracis et lumborum* muscle in rabbits was carried out, achieving a selection response for IMF about 3.1 standard deviations. The objective of this study was to identify polymorphisms and genomic regions associated with IMF using animals from this experiment. Samples from 477 rabbits of the high and low IMF lines were genotyped using the Affymetrix Axiom OrcunSNP Array (~200K). Data analyses used three different approaches: (a) single marker regressions accounting for relatedness, (b) as before, but including a random litter size effect, and (c) a multi-marker method assessing the effect of every SNP and the percentage of genetic variance explained by 1-Mb windows. All methods identified genomic regions associated with IMF on chromosomes 8 and 13 and two of the methods identified regions on chromosomes 1, 12 and 14. A region of 1.95 Mb on chromosome 8 accounted for 6.7% of the genetic variance for IMF. Functional annotations of some genes within the associated genomic regions are related to control of brown adipocytes development, carboxylic ester hydrolase activity and lipid transport, binding and localization.

Keywords: *intramuscular fat, genomic, meat quality, rabbits, divergent selection.*