

DETERMINISMO GENÉTICO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DEL CONEJO

Velasco-Galilea¹, M., Piles¹, M., Viñas², M., Rafel¹, O., González-Rodríguez¹, O., Guivernau², M. y Sánchez¹, J.P.

¹Genética y Mejora Animal, IRTA, Torre Marimón, Caldes de Montbui, 08140 Barcelona, España. ²GIRO, IRTA, Torre Marimón, Caldes de Montbui, 08140 Barcelona, España.

maria.velasco@irta.cat

INTRODUCCIÓN

Es bien conocido que las comunidades bacterianas que habitan el tracto gastrointestinal del conejo juegan un papel muy importante en su metabolismo, nutrición, velocidad de crecimiento y estado del sistema inmune. La microbiota intestinal de los conejos es muy homogénea entre individuos adultos (Combes et al., 2011) pero se ha demostrado que diversos factores ambientales pueden provocar cambios en su composición y/o diversidad (Michelland et al., 2011). Varios estudios en humanos (Goodrich et al. 2014; Goodrich et al. 2016) y cerdos (Lu et al., 2018) han analizado el papel que los efectos genéticos del hospedador pudieran tener sobre la microbiota intestinal, reportando la existencia de heredabilidades moderadas para ciertos taxones e índices de diversidad microbianos. El objetivo de este trabajo es testar la hipótesis de que diferentes índices de riqueza y diversidad microbianos, así como la abundancia relativa a nivel de filo, estén sujetos a un control genético por parte del hospedador.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental. La mayoría de los animales empleados en este estudio proceden de un experimento desarrollado entre 2012 y 2015 con el objetivo de estimar el efecto de la interacción entre el genotipo y el régimen alimentario sobre caracteres de crecimiento, eficiencia alimentaria, características de la canal y el estado sanitario de los animales. Para ello, 7.864 animales de la línea Caldes (Gómez et al., 2002) fueron criados bajo las mismas condiciones de manejo y alimentados con la misma dieta estándar de pellet suplementada con antibióticos (oxitetraciclina, valnemulina y neomicina) pero bajo diferentes regímenes alimentarios: *ad libitum* (AL) o bajo una restricción (R) que supuso el 75% de la ingesta de alimento AL. Para el estudio que aquí se presenta, se seleccionaron 357 gazapos de 4 de los lotes experimentales, de los cuales 189 fueron alimentados AL y 168 bajo R. Una vez finalizado el experimento, se realizó una pequeña réplica del mismo en 2016 en una nueva granja experimental que incluyó importantes mejoras de las condiciones ambientales. De esta nueva réplica, se escogieron 94 gazapos de los cuales 24 recibieron una dieta estándar sin antibióticos (la mitad de ellos se alimentaron bajo R y el resto AL) y los otros 70 gazapos recibieron la misma dieta, pero suplementada con antibióticos (la mitad de ellos se alimentaron bajo R y el resto AL). En los subsiguientes análisis los datos de las dos réplicas indicadas se analizaron de manera conjunta. Después del sacrificio de los 451 animales (66 días de edad), se recogieron muestras cecales que fueron almacenadas a -80 °C hasta el momento de la extracción del ADN total.

Extracción de ADN, generación de librerías y secuenciación. La extracción del ADN de las muestras se realizó con un kit comercial *bead-beating* (ZR Soil Microbe ADN Miniprep™-ZymoResearch, Freiburg, Alemania). Se comprobó con un NanoDrop ND-1000 (NanoDrop products; Wilmington, USA) que todos los extractos tuviesen una pureza e integridad adecuadas para evitar posibles problemas de inhibición en los posteriores pasos de amplificación y secuenciación. De cada extracto se amplificó un fragmento de 411 pb correspondiente a las regiones hipervariables V4-V5 del gen 16S rRNA utilizando el par de cebadores descrito por Parada et al. (2015) y siguiendo las instrucciones del kit multiplex Nextera® XT (Illumina, Inc., San Diego CA, USA). Las librerías se secuenciaron en paralelo en una plataforma Illumina MiSeq 2x250 en el Servicio de Genómica y Bioinformática de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Procesado bioinformático de secuencias. Los contigs resultantes de la unión de las lecturas crudas en ambos sentidos se procesaron con el software QIIME (Caporaso et al., 2010) descartando aquellos de baja calidad (quality score < 19) y las quimeras generadas en la etapa de amplificación. Los contigs filtrados que compartían un 97% de similitud se clusterizaron en OTUs (Operational Taxonomic Units) con el script de QIIME *pick_open_reference_otus.py* que, a través del algoritmo UCLUST (Edgar, 2010), agrupó las

secuencias contra la base de datos de referencia Greengenes (gg_13_5_otus) y realizó una clusterización *de novo* de aquellas secuencias que no mapearon con la base de datos. La tabla de OTUs generada se filtró a nivel de: 1) muestra, descartando aquellas con menos de 5.000 contigs finales y 2) OTU, descartando aquellos con una proporción inferior al 0,01% respecto del total de todas las muestras. Finalmente, los conteos de cada OTU dentro de cada muestra se normalizaron utilizando el método Cumulative Sum Scaling (CSS) (Paulson et al., 2013) generando una tabla final de 963 OTUs para 451 muestras. La asignación taxonómica de cada OTU se obtuvo con el asignador taxonómico de consenso UCLUST mapeando las secuencias representativas contra la base de datos Greengenes.

Análisis estadístico. Los caracteres representativos de la microbiota intestinal del conejo que se estudiaron en el presente estudio se obtuvieron de diferentes maneras. En primer lugar, a partir de la tabla final de OTUs y de su asignación taxonómica, se generó una tabla que incluyó la abundancia relativa de los diferentes filos encontrados para cada muestra. Por otro lado, se calcularon los índices de diversidad alfa (número total de OTUs observados, Chao1, Shannon e inverso de Simpson) para cada una de las muestras a partir de la tabla de OTUs rarificada a 5.000 contigs. Finalmente se retuvieron los dos primeros componentes principales calculados a partir de la tabla de abundancias relativas de los diferentes filos previamente generada. Tras estandarizar a media 0 y varianza 1 los 14 caracteres considerados, se ajustaron por un lado un modelo lineal que no incluyó el efecto genético aditivo y otro que sí lo hizo (modelo animal). Ambos modelos contaron con los mismos efectos sistemáticos: lote (5 niveles), tamaño del animal al destete (2 niveles) y la combinación entre la granja donde se crió el animal, si recibió o no antibiótico en el pienso y el régimen alimentario (6 niveles). En los dos modelos se incluyeron los efectos de camada (199 niveles) y de jaula (194 niveles). Las distribuciones marginales posteriores de los parámetros de ambos modelos se estimaron mediante muestreo de Gibbs, implementado en el programa gibbs2f90 (Misztal et al., 2002), considerando distribuciones *a priori* planas de los parámetros. Para testar la hipótesis objetivo de nuestro estudio se emplearon los criterios de elección de modelos DIC (Spiegelhalter et al., 2002) y el Factor de Bayes (FB) (Sorensen y Gianola, 2007) calculado como el cociente de las densidades marginales de los datos dadas las hipótesis de cada uno de los modelos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización taxonómica de las muestras cecales de los 451 gazapos reveló la existencia de 8 filos bacterianos, predominando *Firmicutes* (75,9%), *Tenericutes* (7,1%) y *Bacteroidetes* (6,7%). Los resultados del análisis descriptivo para cada filo e índices de riqueza (número total de OTUs observados) y diversidad (Shannon e inverso de Simpson) se muestran en la Tabla 1. Según las indicaciones de Jeffreys (1984), un FB con valor superior a 3.16 indicaría un nivel de evidencia sustancial a favor del modelo animal. Con arreglo a este criterio todos los caracteres, salvo la abundancia relativa de los filos *Bacteroidetes* y *Cyanobacteria*, mostrarían cierto determinismo genético. Por otro lado, diferencias superiores a 7 unidades (Spiegelhalter et al., 2002) entre el DIC calculado para el modelo no genético y el calculado para el modelo animal favorecerían la hipótesis soportada por el último. De acuerdo a este último criterio, y contrariamente a lo declarado por el FB, el primer componente principal (CP1) y la abundancia relativa de los filos *Verrucomicrobia*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* no estarían bajo un control genético por parte del hospedador. Sin embargo, ambos criterios declararon al modelo animal como favorable para la abundancia relativa de los filos *Euryarcheota*, *Proteobacteria* y *Tenericutes*; los 4 índices de diversidad alfa calculados y el segundo componente principal (CP2). Las estimas puntuales de heredabilidad de estos 8 caracteres, excepto la abundancia relativa del filo *Tenericutes*, mostraron valores superiores a 0,1. En todos ellos, la probabilidad de que el valor de heredabilidad sea igual o mayor a 0,1 osciló entre 0,42 y 0,67 lo que supone una baja evidencia a favor del modelo animal. De modo que, con arreglo al criterio basado en la distribución marginal de la heredabilidad, no podría asumirse un determinismo genético para estos caracteres. En concordancia con las estimas de heredabilidad moderadas obtenidas para los índices de riqueza microbiana fecal en cerdas (Lu et al., 2018), en nuestro estudio los índices número total de OTUs observados y Chao1 fueron los caracteres que mostraron mayor evidencia de determinismo genético con unas estimas de heredabilidad superiores a 0,15. Sin embargo, la

variación de la distribución marginal posterior de las estimas de heredabilidad de estos caracteres, y de los restantes analizados, fue muy grande. En la Figura 1 se pueden observar en detalle estas distribuciones para la abundancia relativa del filo *Actinobacteria* y para el índice número total de OTUs observados. Ambas distribuciones presentan una importante asimetría responsable del gran error asociado a las estimas de heredabilidad (Tabla 2). Dicha asimetría podría ser consecuencia de la falta de normalidad en los caracteres estudiados (Tabla 1), mientras que los modelos de análisis empleados asumen normalidad. De la misma manera, la asimetría de las distribuciones posteriores evidencia una insuficiencia en la cantidad de datos utilizados para obtener una estima satisfactoria de todos los parámetros incluidos en los modelos planteados. Estos mismos argumentos explicarían también las discrepancias entre los dos criterios considerados para testar la hipótesis que supone el objetivo de este estudio. Un resultado relevante, aunque no genético, es que el porcentaje de varianza fenotípica explicado por el efecto de jaula supone un 3-7% en todos los caracteres; a excepción de la abundancia relativa del filo *Tenericutes* para el cual el efecto de jaula explicaría un 12% de su varianza fenotípica. En general el efecto de camada fue mayor que el de jaula y similar al aditivo; además siempre se redujo al considerar el modelo animal frente al modelo no genético (resultados no mostrados en las tablas) en el que el efecto de camada, que representaría grupos diferentes de parientes, recogería parte de la variación genética existente.

En conclusión, los criterios de elección de modelos empleados para testar la hipótesis que supone el objetivo de este estudio ponen de manifiesto la existencia de un cierto control genético del hospedador sobre la abundancia relativa de algunos filos e índices de riqueza de las comunidades microbianas cecales del conejo. No obstante, un mayor número de animales parece ser necesario para estimar el componente genético de los caracteres considerados con una mayor precisión, además de posiblemente dar lugar a una mayor coherencia entre los distintos criterios de elección de modelos considerados. Finalmente, mencionar que los diferentes estudios realizados por Goodrich et al. (2014, 2016) en humanos apuntan a que miembros bacterianos del filo *Bacteroidetes*, en general, no serían heredables mientras que los taxones con un mayor determinismo genético pertenecerían a los filos *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Euryarchaeota*. En futuros análisis se abordará el estudio del determinismo genético de la microbiota intestinal del conejo a un mayor nivel de profundidad taxonómica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Caporaso et al. 2010. Nature Methods 7(5): 335-336.
- Combes et al. 2011. FEMS Microbiol. Ecol. 77: 680-689.
- Goodrich et al. 2014. Cell 159(4): 789-799.
- Goodrich et al. 2016. Cell Host Microbe 19(5): 731-743.
- Gómez et al. 2002. Rabbit Res. Med. Count. 38: 189-198.
- Jeffreys, H. 1984. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Lu et al. 2018. Microbiome 6(1): 4.
- Edgar et al. 2011. Bioinformatics 27(16): 2194-2200.
- Michelland et al. 2011. Animal 5(11): 1761-1768.
- Misztal, I. 2002. In : Proc 7th World Cong. on Gen. Appl. to Lives. Prod., Montpellier, France.
- Parada et al. 2015. Environ. Microbiol. 18: 1403-1414.
- Paulson et al. 2013. Nature Methods 10(12): 1200-1202.
- Sorensen, D. & Gianola, D. 2007. Springer Sci. & Business Med.
- Spiegelhalter, D.J. 2002. J. Roy. Statist. Sco. Series B 64(4): 583-639.

Agradecimientos: El diseño experimental de este trabajo fue financiado por el proyecto INIA RTA2011-00064-00-00. Este estudio forma parte del proyecto Feed-a-Gene que recibe financiación del programa H2020 nº 633531. M. Velasco-Galilea es beneficiaria de una beca FPI-INIA asociada al proyecto de investigación RTA2014-00015-C2-01. Se agradece la colaboración del personal de granja de cunicultura del IRTA, Torre Marimón.

Tabla 1. Estadísticos descriptivos de los caracteres analizados.

Carácter	Media	Desv. Est.	Rango	Coef. Asim.	Curtosis	P Shapiro test
<i>Euryarcheota</i>	0,002	0,003	0,020	1,725	8,385	2,20E-16
<i>Actinobacteria</i>	0,015	0,006	0,051	2,028	11,209	2,20E-16
<i>Bacteroidetes</i>	0,067	0,028	0,210	2,642	13,442	2,20E-16
<i>Cyanobacteria</i>	0,009	0,005	0,031	0,942	4,264	2,69E-11
<i>Firmicutes</i>	0,759	0,040	0,252	-1,328	5,169	2,20E-16
<i>Proteobacteria</i>	0,016	0,008	0,050	1,439	7,049	2,20E-16
<i>Tenericutes</i>	0,071	0,015	0,100	-1,473	7,053	2,20E-16
<i>Verrucomicrobia</i>	0,016	0,006	0,043	1,653	8,401	2,20E-16
OTUs observados	469,384	82,403	469,000	-2,401	9,102	2,20E-16
Chao1	565,021	102,015	606,914	-2,270	8,633	2,20E-16
Shannon	5,031	0,324	2,235	-2,406	10,262	2,20E-16
Inv. de Simpson	69,729	20,683	110,787	-0,263	2,910	0,012
CP1	3,30E-16	2,025	14,365	2,946	13,653	2,20E-16
CP2	-1,85E-16	1,197	6,636	0,761	2,747	2,74E-14

Tabla 2. Estimaciones de parámetros, media (desviación típica) de las marginales posteriores, y criterios de elección de modelos.

Carácter	h ²	P(h ² ≥0,1)	j ²	c ²	DIC _{na} - DIC _a	FB _(a/na)
<i>Euryarcheota</i>	0,13 (0,08)	0,55	0,03 (0,03)	0,10 (0,06)	10,90	1267,75
<i>Actinobacteria</i>	0,10 (0,08)	0,41	0,03 (0,03)	0,09 (0,05)	6,95	20,91
<i>Bacteroidetes</i>	0,09 (0,08)	0,36	0,03 (0,03)	0,15 (0,07)	6,09	1,26
<i>Cyanobacteria</i>	0,11 (0,08)	0,47	0,05 (0,04)	0,11 (0,06)	9,62	3,06
<i>Firmicutes</i>	0,09 (0,08)	0,38	0,02 (0,02)	0,05 (0,04)	6,28	8,29
<i>Proteobacteria</i>	0,11 (0,10)	0,42	0,06 (0,04)	0,15 (0,07)	11,97	11,76
<i>Tenericutes</i>	0,08 (0,07)	0,32	0,12 (0,06)	0,04 (0,04)	7,92	11,42
<i>Verrucomicrobia</i>	0,08 (0,07)	0,29	0,04 (0,03)	0,11 (0,05)	3,72	280,06
OTUs observados	0,17 (0,13)	0,63	0,07 (0,04)	0,19 (0,08)	30,71	62630,02
Chao1	0,18 (0,13)	0,67	0,07 (0,04)	0,18 (0,08)	35,17	25719,38
Shannon	0,11 (0,09)	0,47	0,04 (0,03)	0,10 (0,06)	10,30	1319,49
Inv. de Simpson	0,11 (0,08)	0,45	0,05 (0,03)	0,04 (0,03)	9,07	78,26
CP1	0,09 (0,08)	0,35	0,04 (0,03)	0,13 (0,06)	5,94	22,76
CP2	0,11 (0,08)	0,48	0,04 (0,03)	0,14 (0,07)	9,87	1458,26

h²: heredabilidad; P(h²≥0,1): probabilidad de que el valor h² sea mayor o igual que 0,1; j²: porcentaje de varianza fenotípica total explicado por el efecto de la jaula; c²: porcentaje de varianza fenotípica total explicado por el efecto de la camada; DIC: criterio de información de devianza; FB: Factor de Bayes.

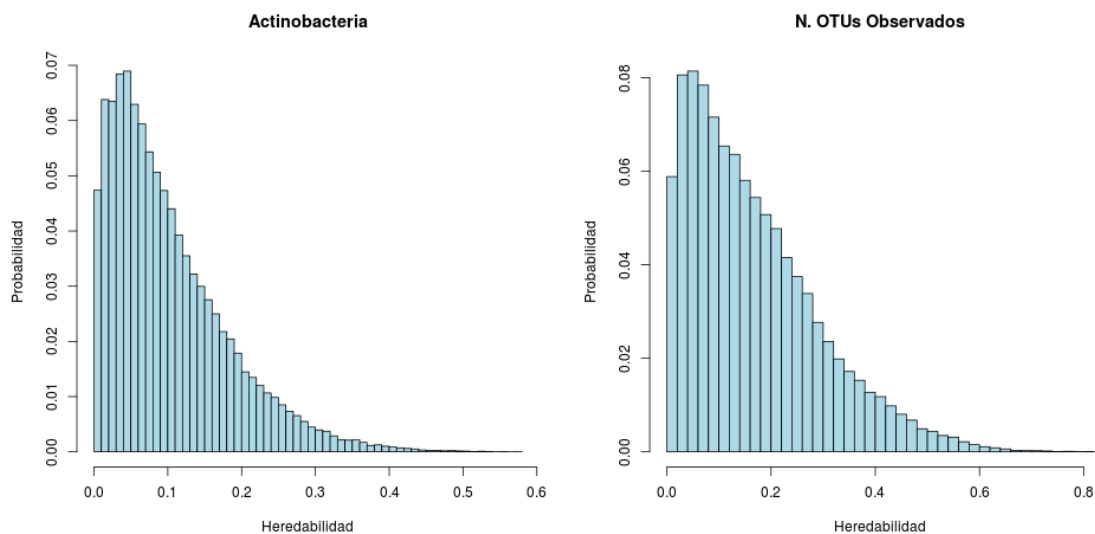


Figura 1. Distribuciones marginales posteriores de la heredabilidad para la abundancia relativa de Actinobacteria y para el índice número total de OTUs observados.

GENETIC DETERMINISM OF RABBITS' GUT MICROBIOTA

ABSTRACT: Aiming to study the existence of a genetic determinism of rabbits' gut microbiota, a 16S rDNA-based assessment through a MiSeq platform was conducted. Cecal samples, collected from 451 rabbits bred in two experimental farms and fed with the same diet supplemented or not with antibiotics but under different intake levels, were assessed. A total of 963 OTUs among samples without singletons were detected from final filtered contigs using QIIME software. Taxonomic assignment, based on Greengenes database gg_13_5_otus, revealed that cecal microbiota was dominated by phyla *Firmicutes* (75.9%), *Tenericutes* (7.1%) and *Bacteroidetes* (6.7%). Bayes Factor (BF) and DIC were used as model choice criteria to test the existence of a hosts' genetic determinism on the relative abundances of 8 phyla, on 4 microbial alpha-diversity indexes computed at 5,000 contigs and on the two first principal components (PCs) based on the relative abundance phyla table. Both criteria pointed out the existence of a certain host's control on the relative abundance of phyla *Euryarcheota*, *Proteobacteria* and *Tenericutes*; all alpha-diversity indexes and on PC2. Heritability estimates of these traits were low-moderate but all had a high associated error. A larger number of animals seems necessary to accurately estimate the genetic component of these microbiota indicators traits.

Keywords: cecal microbiota, alpha diversity, rabbit, heritability.