

VALIDACIÓN DE REGIONES QTLs Y GENES CANDIDATOS EN TRES RETROCRUCES EXPERIMENTALES CON FONDO GENÉTICO IBÉRICO

Martínez-Montes¹, A.M., Muñoz^{1,2}, M., Fernández¹, A., Noguera³, J.L., Folch⁴, J.M. y Fernández^{1,5}, A.I.

¹INIA, Departamento de Mejora Genética Animal, 28040 Madrid. ²Centro de I+D en Cerdo Ibérico, 06300, Zafrá (Badajoz). ³IRTA, Genética i Millora Animal, 25198, Lleida. ⁴CRAG, Plant and Animal Genomics, 08193, Bellaterra (Barcelona). ⁵Hospital Universitario Gregorio Marañón, Servicio Cardiología, 28009, Madrid.
mariamm@inia.es

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios previos han identificado QTLs afectando a diferentes caracteres productivos en diversas razas porcinas tales como Landrace, en la que se identificaron QTLs que afectaban a caracteres de crecimiento (Jung et al., 2014), en Pietrain, en la cual se observaron QTLs para ganancia media diaria, canal o porcentaje de grasa intramuscular (Stratz et al., 2014) o en Duroc, en la cual se identificaron QTLs para peso y longitud de canal y longitud de lomo (Uemoto et al., 2008). Sin embargo, pocos QTLs han sido validados en diferentes fondos genéticos, como por ejemplo para caracteres de deposición grasa en Pietrain, Duroc y Large White (Fowler et al., 2013) o para caracteres de composición corporal en Duroc, Iberian, Large Black, Hampshire, Pietrain y Schwäbisch-Hällisch (Rothammer, 2014). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de QTLs identificados, hasta la fecha son pocas las mutaciones detectadas subyacentes a estos QTLs, en parte debido a la inconsistencia de dichos QTLs en diferentes fondos genéticos.

El objetivo del presente trabajo consistió en la detección de regiones QTLs usando diferentes fondos genéticos. Para ello, se realizaron análisis de asociación de genomas completos (GWAS) para caracteres relacionados con crecimiento, deposición grasa y calidad de carne usando los datos de genotipado de individuos pertenecientes a tres diferentes retrocruces; Ibérico x Landrace (IBxLD), Ibérico x Duroc (IBxDU) e Ibérico x Pietrain (IBxPI) en tres análisis independientes y en un análisis conjunto con los datos de los tres cruces. Asimismo, se identificaron potenciales genes candidatos localizados en las regiones QTLs detectadas

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y datos fenotípicos. En el presente estudio se utilizaron datos de tres diferentes retrocruces: F1 (Ibérico x Landrace) x Landrace (IBxLD), F1 (Ibérico x Duroc) x Duroc (IBxDU) y F1 (Ibérico x Pietrain) x Pietrain (IBxPI), con registros de peso del animal a 150 días (BW150), espesor de grasa dorsal a 75 kg (BFT75), peso de piezas nobles: jamones (HW), paletas (SW) y lomos (LW) y porcentaje de grasa intramuscular (IMF). Estas medidas fenotípicas fueron tomadas en 102 animales del retrocruce IBxLD, 135 animales pertenecientes al retrocruce IBxDU y 142 del retrocruce IBxPI.

Datos genotípicos. Los animales fueron genotipados utilizando dos diferentes plataformas comerciales de genotipado masivo. Los individuos de los retrocruces IBxLD y IBxPI fueron genotipados con la plataforma PorcineSNP60 BeadChip (Illumina, Inc.) y los datos fueron filtrados usando el software GenomeStudio. Los individuos pertenecientes al retrocruce IBxDU fueron genotipados con la plataforma Axiom® Porcine Genotyping Array (Affymetrix, Inc.) y el filtrado de los genotipos fue llevado a cabo con el software Axiom™ Analysis Suite 2.0. Asimismo, para el análisis individual de cada retrocruce se realizó un filtrado adicional usando el paquete GenABEL en R (Karssen et al., 2016) y se seleccionaron aquellos polimorfismos con una frecuencia alélica mínima (MAF) mayor a 0,05. Para poder realizar una comparación de resultados entre plataformas, se seleccionaron aquellos SNPs comunes a ambas utilizando el programa SNPchimp v.3 (Nicolazzi et al., 2015).

GWAS. Se realizó un estudio de asociación a nivel de genoma (GWAs) con el siguiente

modelo: $y_{ijk} = S_i + B_j + bx_k + \sum \lambda_{ik} a_l + u_k + e_{ijk}$, donde y_{ijk} es el registro

fenotípico correspondiente al individuo k th, S_i y B_j son los efectos fijos sexo y lote de sacrificio y b es el coeficiente de regresión del peso final antes de sacrificio, a_l es el efecto

aditivo del SNP, λ_{lk} , el indicador relacionado con el número de copias del alelo l (0, 1 or 2), u_k es el efecto infinitesimal del individuo k y e_{ijk} el residuo. Para realizar los análisis se utilizó el paquete GenABEL de R. El umbral de significación fue estimado usando QQ-plot. Las regiones QTLs fueron determinadas por tener dos o más SNPs significativos con una distancia máxima de 3Mb. Además, regiones identificadas a una distancia máxima de 15Mb fueron consideradas como la misma. El contenido génico de estos QTLs se determinó utilizando la herramienta Biomart y la funcionalidad de los mismos fue analizada utilizando las bases de datos VarElect (Stelzer et al., 2016) y STRING (Szklarczyk et al., 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después del filtrado y de la selección de SNPs comunes entre ambas plataformas y poblaciones se utilizaron: 38.684 SNPs en el análisis del retrocruce IBxDU, 39.279 SNPs en el análisis IBxLD y 38.891 SNPs en el análisis del retrocruce IBxPI. EN el análisis conjunto de los tres retrocruces se emplearon 40.929 SNPs. Un total de 147 regiones asociadas a los caracteres de interés fueron identificadas en el análisis conjunto, 139 regiones en el retrocruce IBxLD, 110 en el IBxDU y 53 regiones en el IBxPI.

La comparación entre los resultados de cuatro análisis GWAS permitió identificar regiones comunes en todos los análisis, regiones sólo identificadas en el análisis conjunto y regiones identificadas específicamente en cada uno de los retrocruces. Se identificaron un total de 16 regiones comunes en los cromosomas 1, 2, 3, 6, 9, 13, 15 y 16, para todos los caracteres excepto BFT75. Además, 29 regiones fueron detectadas específicamente para el retrocruce IBxLD para todos los caracteres analizados; 12 en el retrocruce IBxDU asociadas con BW150, BFT75, HW y SW, 6 regiones en el retrocruce IBxPI asociadas con BW150, LW y IMF. Por último, 10 regiones fueron identificadas en el análisis conjunto, localizadas en los cromosomas 1, 4, 13, 15 y 18 y asociadas con BW150, HW, SW y IMF, no identificadas en los análisis individuales, lo que indica que el GWAS incluyendo los datos y genotipos de todos los retrocruces incrementa la potencia del análisis.

Utilizando las herramientas STRING database y VarElect tool de GeneCards se identificaron genes candidatos con funciones relacionadas con los caracteres de interés (Tabla 1). Cabe añadir, que como criterio para la selección, se utilizaron resultados de un estudio paralelo realizado en este mismo material de genes diferencialmente expresados en animales de alto y bajo crecimiento (Muñoz et al., 2017 (en producción)). Se identificaron 21 genes candidato en las regiones comunes a todos los análisis, 4 en las regiones del análisis conjunto, 48 en las regiones el retrocruce IBxLD, 14 en el IBxDU y 18 en el IBxPI. Los genes identificados en el retrocruce IBxLD tienen funciones relacionadas principalmente con el metabolismo de ácidos grasos, desarrollo muscular y desarrollo de adipocitos, los identificados en el retrocruce IBxDU están principalmente relacionados con el desarrollo muscular y respuesta a insulina y los detectados en el retrocruce IBxPi, están principalmente relacionados con la síntesis de ácidos grasos y respuesta a carbohidratos. Dado el fondo genético común de los tres retrocruces es ibérico, es esperable que los efectos comunes detectados estén relacionados con las características propias de la raza Ibérica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fowler, K. E. et al. 2013. BMC Genomics 14(1): 784.
- Jung, E. et al 2014 Animal Genetics 45(3): 442-444.
- Stratz, P. et al. 2014 Animal Genetics 45(3): 350-356.
- Uemoto, Y. et al. 2008. Journal of Animal Science 86(11): 2833-2839.
- Rothhammer et al. 2014. Genet, Sel, Evolution. 46(1), 68
- Karssen, L. C. et al. 2016. F1000Research 5.
- Nicolazzi et al. 2014. BMC Genomics 15(1): 123.
- Stelzer, G., et al. 2016. BMC Genomics 17(2): 444.
- Szklarczyk, D. et al. 2014. Nucleic Acids Research: gku1003.

Agradecimientos: Este trabajo está financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) proyecto: AGL2014-56369-C2. El material animal fue generado en el marco del proyecto INIA CPE03-010-C3 con la colaboración de investigadores del INIA, IRTA y UAB

Tabla 1. Caracteres en los que se han detectado regiones significativas en cada análisis y genes candidatos localizados en las mismas

Análisis	Carácter	Genes candidatos
IBxLD	BW150	<i>KL</i>
	BFT75	<i>WNT1, IGFBP6, SP1, KRAS, IAPP, LRP6, TNFRSF1A, ADIPOR2, VDR, KRT8, LYZ, MFAP5, FGF23, WNK1, ANO6, DICER1, VRK1, SUCLA2</i>
	HW	<i>SFTPD, SH2D4B</i>
	SW	<i>HTRA1, AMACR, PRLR, AGXT2, EGFLAM</i>
IBxDU	LW	<i>MUSK, PTGS1, ENG, CRAT, ASS1, ABL1, ADAMTS13, ACTB, GTF2IRD1, PHKG1, MYLPF, ATP2A1, PCOLCE, EIF2AK2, HADHB, HADHA, POMC, ACP1, PEX2, JPH1, EDN1, DSP</i>
	BW150	<i>SCN1B</i>
	BFT75	<i>SMAD2, SMAD7, MYO5B, SMAD4, FAT1</i>
	HW	<i>FGF3, FGF4, FGF19, IL2</i>
IBxPI	SW	<i>HK2, ACTG2, DYSF, LRAT</i>
	BW150	<i>C1QL3</i>
	LW	<i>NPTX1, GALR2</i>
Comunes	IMF	<i>ELOVL7, ANO3, LYN, SNAI2, PRKDC, SELE, SELL, SELP, KARS, FA2H, TAT, HP, IBSP, ITGB1, CXCR4</i>
	BW150	<i>NKX2-5, CCNT2, DAB2, EGFLAM</i>
	HW	<i>MYOD1, KCNJ11, CAST, ERAP1, PAM, IL4R, PGM1, ANGPTL3, MLH1, SCN5A, SCN10A, DCLK3, GSK3B, UPK1B, CENPH, DUSP1</i>
Conjunto	SW	<i>GHRHR</i>
	HW	<i>CNR1</i>
	IMF	<i>CAV1, PPP1R3A, ING3</i>

BW150: peso del animal a 150 días; BFT75: espesor de grasa dorsal a 75 kg, HW: peso de jamones, SW: peso de paleta; LW peso de lomos; IMF: porcentaje de grasa intramuscular

QTL AND CANDIDATE GENE DETECTION USING GWAS IN THREE EXPERIMENTAL IBERIAN BACKCROSSES

Although numerous QTLs have been identified in different porcine breeds, there are not so many studies which validate the same QTL regions in several breeds. The objective of the current study was to detect QTLs on six traits related with growth, fatness and meat quality using genotyping data of individuals from three different backcrosses: Iberian x Duroc (IBxDU), Iberian x Landrace (IBxLD) and Iberian x Pietrain (IBxPI). Animals of IBxLD and IBxPI were genotyped with PorcineSNP60 BeadChip and those from IBxDU backcross with Axiom® Porcine Genotyping Array. Common SNPs were selected and individual GWAS for each backcross and one GWAS using the genotyping data of the three backcrosses (combined analysis) were carried out. 16 common regions and 21 candidate genes were identified in the four analyses while 10 additional regions and 4 genes were detected only in the combined analysis. In addition, 29 regions and 48 genes were specifically detected for IBxLD backcross, 12 regions and 14 genes for IBxDU backcross and 6 regions and 18 genes for IBxPI. Combined analysis increases the power of GWAS and lead to detect additional regions and SNPs.

Keywords: GWAS, backcrosses, candidate genes.