

6 **DETERMINISMO GENÉTICO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DEL CONEJO**

7 Velasco-Galilea<sup>1</sup>, M., Piles<sup>1</sup>, M., Viñas<sup>2</sup>, M., Rafel<sup>1</sup>, O., González-Rodríguez<sup>1</sup>, O., Guivernau<sup>2</sup>,  
8 M. y Sánchez<sup>1</sup>, J.P.

9 <sup>1</sup>Genética y Mejora Animal, IRTA, Torre Marimón, Caldes de Montbui, 08140 Barcelona,  
10 España. <sup>2</sup>GIRO, IRTA, Torre Marimón, Caldes de Montbui, 08140 Barcelona, España.

11 maria.velasco@irta.cat  
12

13 **INTRODUCCIÓN**

14 Es bien conocido que las comunidades bacterianas que habitan el tracto gastrointestinal del  
15 conejo juegan un papel muy importante en su metabolismo, nutrición, velocidad de  
16 crecimiento y estado del sistema inmune. La microbiota intestinal de los conejos es muy  
17 homogénea entre individuos adultos (Combes et al., 2011) pero se ha demostrado que  
18 diversos factores ambientales pueden provocar cambios en su composición y/o diversidad  
19 (Michelland et al., 2011). Varios estudios en humanos (Goodrich et al. 2014; Goodrich et al.  
20 2016) y cerdos (Lu et al., 2018) han analizado el papel que los efectos genéticos del  
21 hospedador pudieran tener sobre la microbiota intestinal, reportando la existencia de  
22 heredabilidades moderadas para ciertos taxones e índices de diversidad microbianos. El  
23 objetivo de este trabajo es testar la hipótesis de que diferentes índices de riqueza y  
24 diversidad microbianos, así como la abundancia relativa a nivel de filo, estén sujetos a un  
25 control genético por parte del hospedador.  
26

27 **MATERIAL Y MÉTODOS**

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

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

58 **Procesado bioinformático de secuencias.** Los contigs resultantes de la unión de las  
59 lecturas crudas en ambos sentidos se procesaron con el software QIIME (Caporaso et al.,  
60 2010) descartando aquellos de baja calidad (quality score < 19) y las quimeras generadas  
61 en la etapa de amplificación. Los contigs filtrados que compartían un 97% de similitud se  
62 clusterizaron en OTUs (Operational Taxonomic Units) con el script de QIIME  
63 *pick\_open\_reference\_otus.py* que, a través del algoritmo UCLUST (Edgar, 2010), agrupó las  
64 secuencias contra la base de datos de referencia Greengenes (gg\_13\_5\_otus) y realizó una  
65 clusterización *de novo* de aquellas secuencias que no mapearon con la base de datos. La  
66 tabla de OTUs generada se filtró a nivel de: 1) muestra, descartando aquellas con menos de  
67 5.000 contigs finales y 2) OTU, descartando aquellos con una proporción inferior al 0,01%  
68 respecto del total de todas las muestras. Finalmente, los conteos de cada OTU dentro de  
69 cada muestra se normalizaron utilizando el método Cumulative Sum Scaling (CSS) (Paulson  
70 et al., 2013) generando una tabla final de 963 OTUs para 451 muestras. La asignación  
71 taxonómica de cada OTU se obtuvo con el asignador taxonómico de consenso UCLUST  
72 mapeando las secuencias representativas contra la base de datos Greengenes.

73 **Análisis estadístico.** Los caracteres representativos de la microbiota intestinal del conejo  
74 que se estudiaron en el presente estudio se obtuvieron de diferentes maneras. En primer  
75 lugar, a partir de la tabla final de OTUs y de su asignación taxonómica, se generó una tabla  
76 que incluyó la abundancia relativa de los diferentes filos encontrados para cada muestra.  
77 Por otro lado, se calcularon los índices de diversidad alfa (número total de OTUs  
78 observados, Chao1, Shannon e inverso de Simpson) para cada una de las muestras a partir  
79 de la tabla de OTUs rarificada a 5.000 contigs. Finalmente se retuvieron los dos primeros  
80 componentes principales calculados a partir de la tabla de abundancias relativas de los  
81 diferentes filos previamente generada. Tras estandarizar a media 0 y varianza 1 los 14  
82 caracteres considerados, se ajustaron por un lado un modelo lineal que no incluyó el efecto  
83 genético aditivo y otro que sí lo hizo (modelo animal). Ambos modelos contaron con los  
84 mismos efectos sistemáticos: lote (5 niveles), tamaño del animal al destete (2 niveles) y la  
85 combinación entre la granja donde se crió el animal, si recibió o no antibiótico en el pienso y  
86 el régimen alimentario (6 niveles). En los dos modelos se incluyeron los efectos de camada  
87 (199 niveles) y de jaula (194 niveles). Las distribuciones marginales posteriores de los  
88 parámetros de ambos modelos se estimaron mediante muestreo de Gibbs, implementado en  
89 el programa gibbs2f90 (Misztal et al., 2002), considerando distribuciones *a priori* planas de  
90 los parámetros. Para testar la hipótesis objetivo de nuestro estudio se emplearon los  
91 criterios de elección de modelos DIC (Spiegelhalter et al., 2002) y el Factor de Bayes (FB)  
92 (Sorensen y Gianola, 2007) calculado como el cociente de las densidades marginales de los  
93 datos dadas las hipótesis de cada uno de los modelos.

## 94 **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

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

115 baja evidencia a favor del modelo animal. De modo que, con arreglo al criterio basado en la  
116 distribución marginal de la heredabilidad, no podría asumirse un determinismo genético para  
117 estos caracteres. En concordancia con las estimas de heredabilidad moderadas obtenidas  
118 para los índices de riqueza microbiana fecal en cerdas (Lu et al., 2018), en nuestro estudio  
119 los índices número total de OTUs observados y Chao1 fueron los caracteres que mostraron  
120 mayor evidencia de determinismo genético con unas estimas de heredabilidad superiores a  
121 0,15. Sin embargo, la variación de la distribución marginal posterior de las estimas de  
122 heredabilidad de estos caracteres, y de los restantes analizados, fue muy grande. En la  
123 Figura 1 se pueden observar en detalle estas distribuciones para la abundancia relativa del  
124 filo *Actinobacteria* y para el índice número total de OTUs observados. Ambas distribuciones  
125 presentan una importante asimetría responsable del gran error asociado a las estimas de  
126 heredabilidad (Tabla 2). Dicha asimetría podría ser consecuencia de la falta de normalidad  
127 en los caracteres estudiados (Tabla 1), mientras que los modelos de análisis empleados  
128 asumen normalidad. De la misma manera, la asimetría de las distribuciones posteriores  
129 evidencia una insuficiencia en la cantidad de datos utilizados para obtener una estima  
130 satisfactoria de todos los parámetros incluidos en los modelos planteados. Estos mismos  
131 argumentos explicarían también las discrepancias entre los dos criterios considerados para  
132 testar la hipótesis que supone el objetivo de este estudio. Un resultado relevante, aunque no  
133 genético, es que el porcentaje de varianza fenotípica explicado por el efecto de jaula supone  
134 un 3-7% en todos los caracteres; a excepción de la abundancia relativa del filo *Tenericutes*  
135 para el cual el efecto de jaula explicaría un 12% de su varianza fenotípica. En general el  
136 efecto de camada fue mayor que el de jaula y similar al aditivo; además siempre se redujo al  
137 considerar el modelo animal frente al modelo no genético (resultados no mostrados en las  
138 tablas) en el que el efecto de camada, que representaría grupos diferentes de parientes,  
139 recogería parte de la variación genética existente.

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

153

154

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

155 • Caporaso et al. 2010. Nature Methods 7(5): 335-336. • Combes et al. 2011. FEMS  
156 Microbiol. Ecol. 77: 680-689. • Goodrich et al. 2014. Cell 159(4): 789-799. • Goodrich et al.  
157 2016. Cell Host Microbe 19(5): 731-743. • Gómez et al. 2002. Rabbit Res. Med. Count. 38:  
158 189-198. • Jeffreys, H. 1984. Clarendon Press, Oxford, UK. • Lu et al. 2018. Microbiome  
159 6(1): 4. • Edgar et al. 2011. Bioinformatics 27(16): 2194-2200. • Michelland et al. 2011.  
160 Animal 5(11): 1761-1768. • Misztal, I. 2002. In : Proc 7th World Cong. on Gen. Appl. to Lives.  
161 Prod., Montpellier, France. • Parada et al. 2015. Environ. Microbiol. 18: 1403-1414. •  
162 Paulson et al. 2013. Nature Methods 10(12): 1200-1202. • Sorensen, D. & Gianola, D. 2007.  
163 Springer Sci. & Business Med. • Spiegelhalter, D.J. 2002. J. Roy. Statist. Sco. Series B  
164 64(4): 583-639.

165

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



172  
173

**Tabla 1.** Estadísticos descriptivos de los caracteres analizados.

Carácter	Media	Desv. Est.	Rango	Coef.		
				Asimetría	Curtosis	P shapiro test
<i>Euryarcheota</i>	0.0021	0.0026	0.0199	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	0.21	2.642	13.442	2.20E-16
<i>Cyanobacteria</i>	0.0093	0.0049	0.0305	0.942	4.2637	2.69E-11
<i>Firmicutes</i>	0.759	0.04	0.252	-1.328	5.169	2.20E-16
<i>Proteobacteria</i>	0.016	0.008	0.05	1.439	7.049	2.20E-16
<i>Tenericutes</i>	0.071	0.015	0.1	-1.473	7.053	2.20E-16
<i>Verrucomicrobia</i>	0.016	0.006	0.043	1.653	8.401	2.20E-16
<b>Especies observadas</b>	469.384	82.403	469	-2.401	9.102	2.20E-16
<b>Chao1</b>	565.021	102.015	606.914	-2.27	8.633	2.20E-16
<b>Shannon</b>	5.031	0.324	2.235	-2.406	10.262	2.20E-16
<b>Inverso de Simpson</b>	69.729	20.683	110.787	-0.263	2.91	0.012

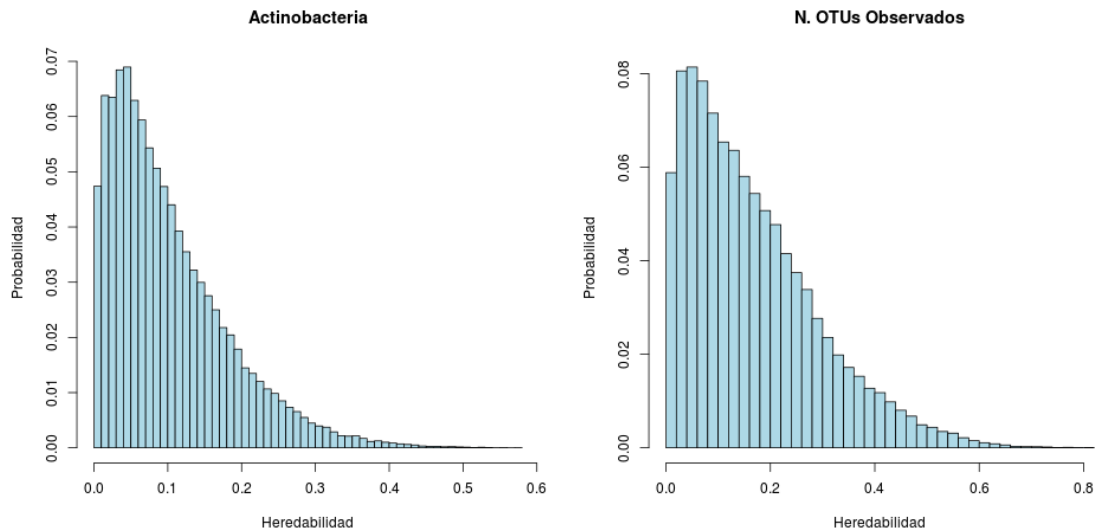
174  
175  
176  
177

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

Carácter	h <sup>2</sup>	P(h <sup>2</sup> ≥0,1)	j <sup>2</sup>	c <sup>2</sup>	DIC <sub>na</sub> - DIC <sub>a</sub>	FB <sub>(a/na)</sub>
<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
<b>OTUs observados</b>	0,17 (0,13)	0,63	0,07 (0,04)	0,19 (0,08)	30,71	62630,02
<b>Chao1</b>	0,18 (0,13)	0,67	0,07 (0,04)	0,18 (0,08)	35,17	25719,38
<b>Shannon</b>	0,11 (0,09)	0,47	0,04 (0,03)	0,10 (0,06)	10,30	1319,49
<b>Inv. de Simpson</b>	0,11 (0,08)	0,45	0,05 (0,03)	0,04 (0,03)	9,07	78,26
<b>CP1</b>	0,09 (0,08)	0,35	0,04 (0,03)	0,13 (0,06)	5,94	22,76
<b>CP2</b>	0,11 (0,08)	0,48	0,04 (0,03)	0,14 (0,07)	9,87	1458,26

178  
179  
180  
181  
182

h<sup>2</sup>: heredabilidad; P(h<sup>2</sup>≥0,1): probabilidad de que el valor h<sup>2</sup> sea mayor o igual que 0,1; j<sup>2</sup>: porcentaje de varianza fenotípica total explicado por el efecto de la jaula; c<sup>2</sup>: 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.