

Uso de herramientas de asignación de paternidad

Jorge Hugo Calvo Lacosta
jhcalvo@aragon.es



22 de junio de 2018, El Chantre- Teruel

RESUMEN

El desarrollo de un esquema de selección o conservación conlleva la necesidad de llevar a cabo un control de las genealogías de los animales implicados que permitirá la elección de los mejores reproductores para el carácter que se esté seleccionando y llevar a cabo los apareamientos que permitan mantener la máxima variabilidad posible. La falta de genealogías completas y los errores en la declaración de paternidades afectan a la precisión y fiabilidad de las valoraciones genéticas, y por lo tanto influyen en la eficiencia de los programas de selección. En ovino de carne la determinación de la genealogía puede ser muy limitada por las características de explotación o manejo (sistemas extensivos o semi-extensivos, uso escaso de la inseminación artificial, razas con bajo censo efectivo o en peligro de extinción, etc.). Actualmente, para la confirmación y asignación de las paternidades se están usando polimorfismos del ADN, principalmente marcadores microsatélites. Sin embargo, se están implementando paneles de SNPs a nivel internacional para llevar a cabo las asignaciones de paternidad, ya que son polimorfismos más estables, es más fácil de estandarizar entre laboratorios, y son muy versátiles a la hora de añadir polimorfismos funcionales (resistencia al scrapie, prolificidad, etc.). El genotipado de polimorfismos funcionales nos puede dirigir a la preselección de sementales más valiosos en función de sus genotipos para determinados genes de interés, además de verificar su genealogía. Por este motivo nos planteamos el desarrollo de un panel de SNPs para la asignación de paternidad basado en el descrito en Francia a partir de los datos de genotipado obtenidos con el chip “Ovine SNP50 Bead Array (50K)” en las razas Rasa Aragonesa, Navarra, Churra Tensina, Ansotana, Xisqueta, Roya Bilbilitana, Maellana, Ojinegra y Cartera. Se seleccionaron un total de 159 SNPs en equilibrio de Hardy-Weinberg, con una frecuencia del alelo menos común (MAF) superior a 0,3, un porcentaje de individuos genotipados por SNP superior al 97% en las 9 razas analizadas, y que presentasen herencia mendeliana. El MAF medio fue de 0,43, variando desde 0,41 (Churra Tensina) hasta 0,44 (Xisqueta y Navarra). La probabilidad de identidad (P_i) de que dos individuos elegidos al azar fueran idénticos para estos marcadores fue prácticamente 0. La probabilidad de exclusión de un solo progenitor (PE1), o los dos progenitores (PE2) fue prácticamente 1 en todas las poblaciones. No hubo diferencias de asignación entre el panel de SNPs y el panel de microsatélites. Las asignaciones de paternidad de los dúos y tríos mostraron algunas discrepancias entre las filiaciones informadas por las asociaciones y las encontrados por ADN. En total, 5 dúos fueron no compatibles. Estas discrepancias indican la utilidad de realizar test de paternidad en las ganaderías, ya que los errores de paternidad perjudican a los planes de selección y mejora genética así como a los programas de conservación.

Este panel de 159 SNPs se ha completado con 33 SNPs funcionales entre los que destacan los relacionados con la susceptibilidad al scrapie (*PrnP*), prolificidad (*BMP15*), estacionalidad reproductiva (*MTNR1A*), etc., para hacer un total de 192. Hay que destacar que el panel diseñado es un sistema abierto que permite sustituir los SNPs por otros que sean más informativos o que se relacionen con un fenotipo de interés.

Finalmente, se ha llevado a cabo una validación del panel a mayor escala mediante genotipado de los 192 SNPs del panel con tecnología KASP (LGC, Biotools, España) en 1800 animales pertenecientes a las razas Rasa Aragonesa, Navarra, Ansotana y Cartera.

Asignación de paternidad

1. Herramienta de apoyo a los esquemas de selección

- *Filiación*

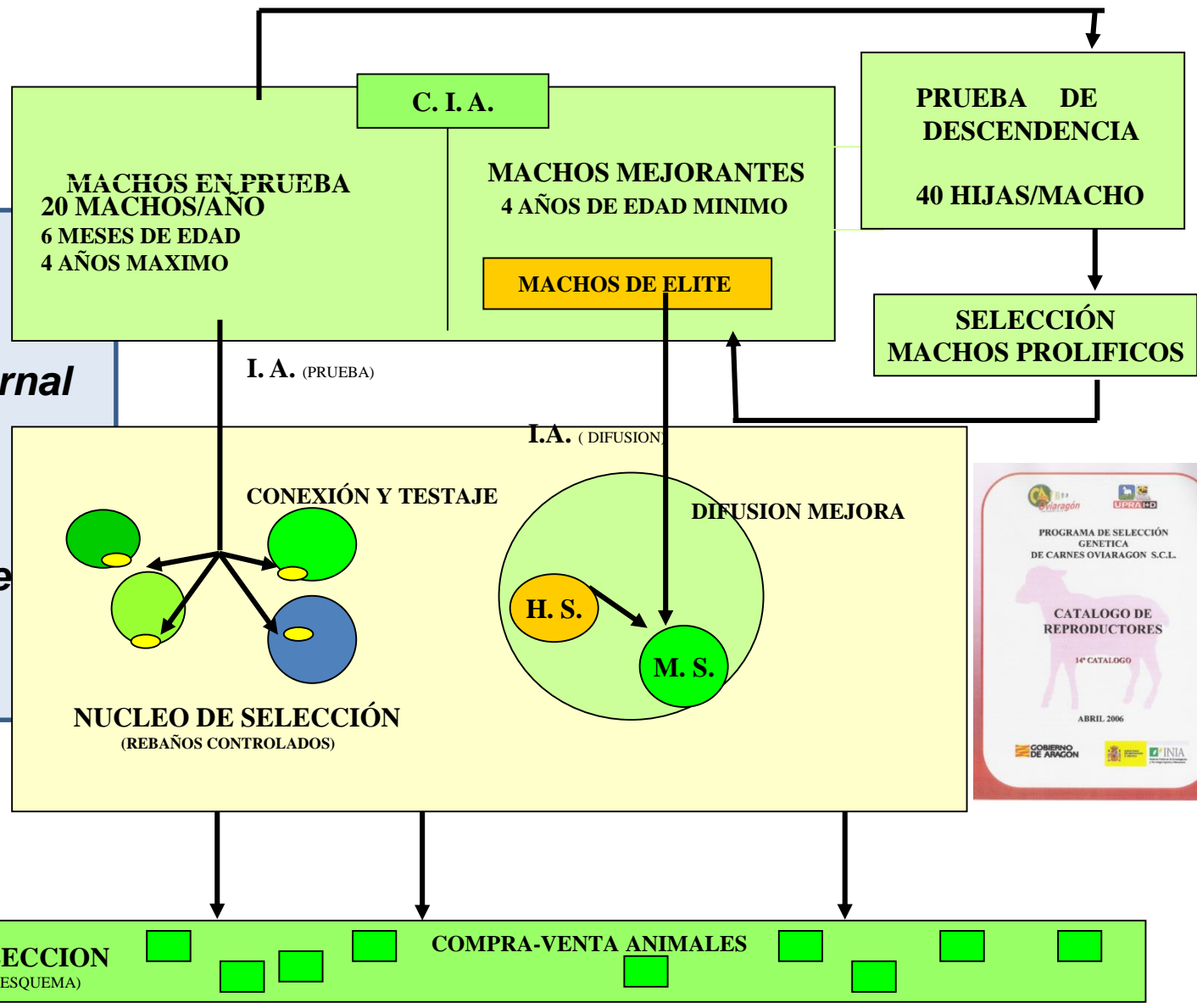
- *SAM: Selección asistida por marcadores: paneles de SNPs para paternidad y funcionales*



La mejora en prolificidad producida por la variante ROA (+0,32 corderos por parto) es viable dentro del sistema de producción de Raza Rasa Aragonesa basado en el pastoreo.

Ovino de carne

- A- Prolificidad
- B- Capacidad maternal
- C- Crecimientos
- D- Calidad de carne
- ...

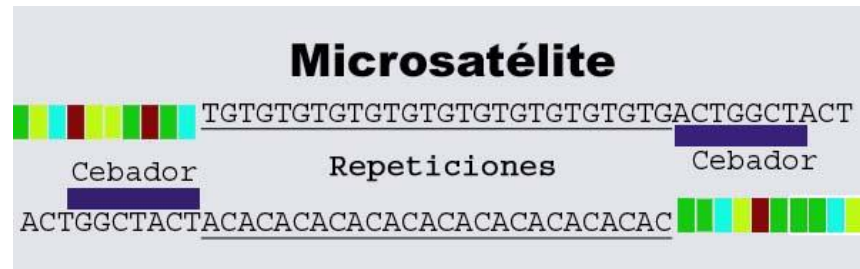


Asignación de paternidad

1. **Herramienta de apoyo a los esquemas de selección**
 - **Filiación:** # Precisión de valoraciones genéticas es imprescindible la existencia de genealogías.

7-15% de errores en las asignaciones → 1,5-2,5 % de pérdida de ganancia a la selección

Consanguinidad



Asignación de paternidad

Detección de animales portadores de enfermedades hereditarias

Otras aplicaciones de la filiación

epidermólisis bullosa



Gen candidato

Asignación de paternidad

LAMC2

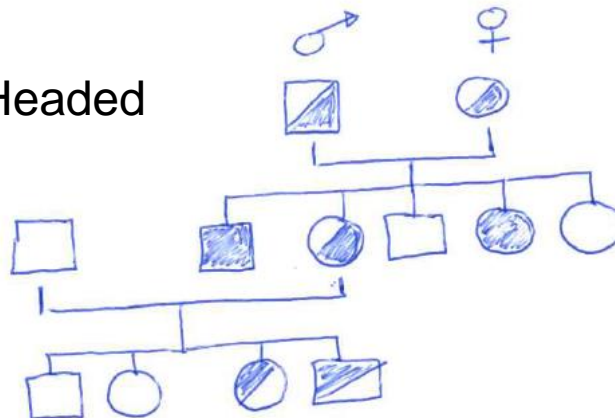
German Black Headed
Mutton sheep

LAMB3

ITGB4

Churra

Autosómico recesivo



Genotipado madres, hijos portadores en homocigosis y padres

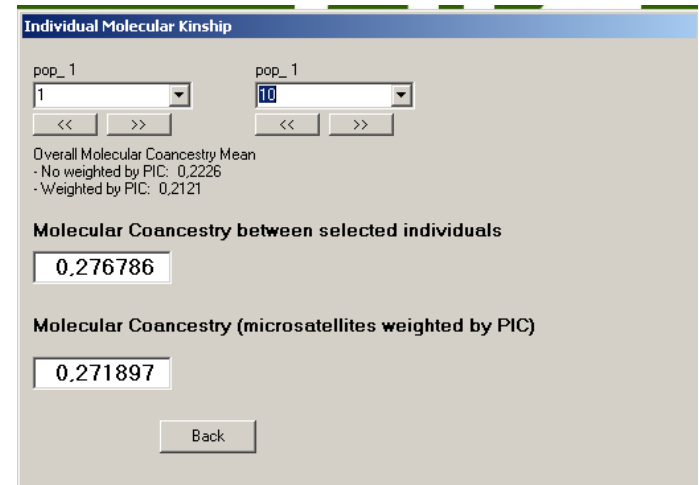
Asignación de paternidad

Conservación de razas en peligro de extinción.

- Microsatélites, SNPs, polimorfismos del ADN mitocondrial y cromosoma Y.
- Si existe información genealógica la información es complementaria.
- Diseño de cruzamientos que minimicen el incremento de la consanguinidad.



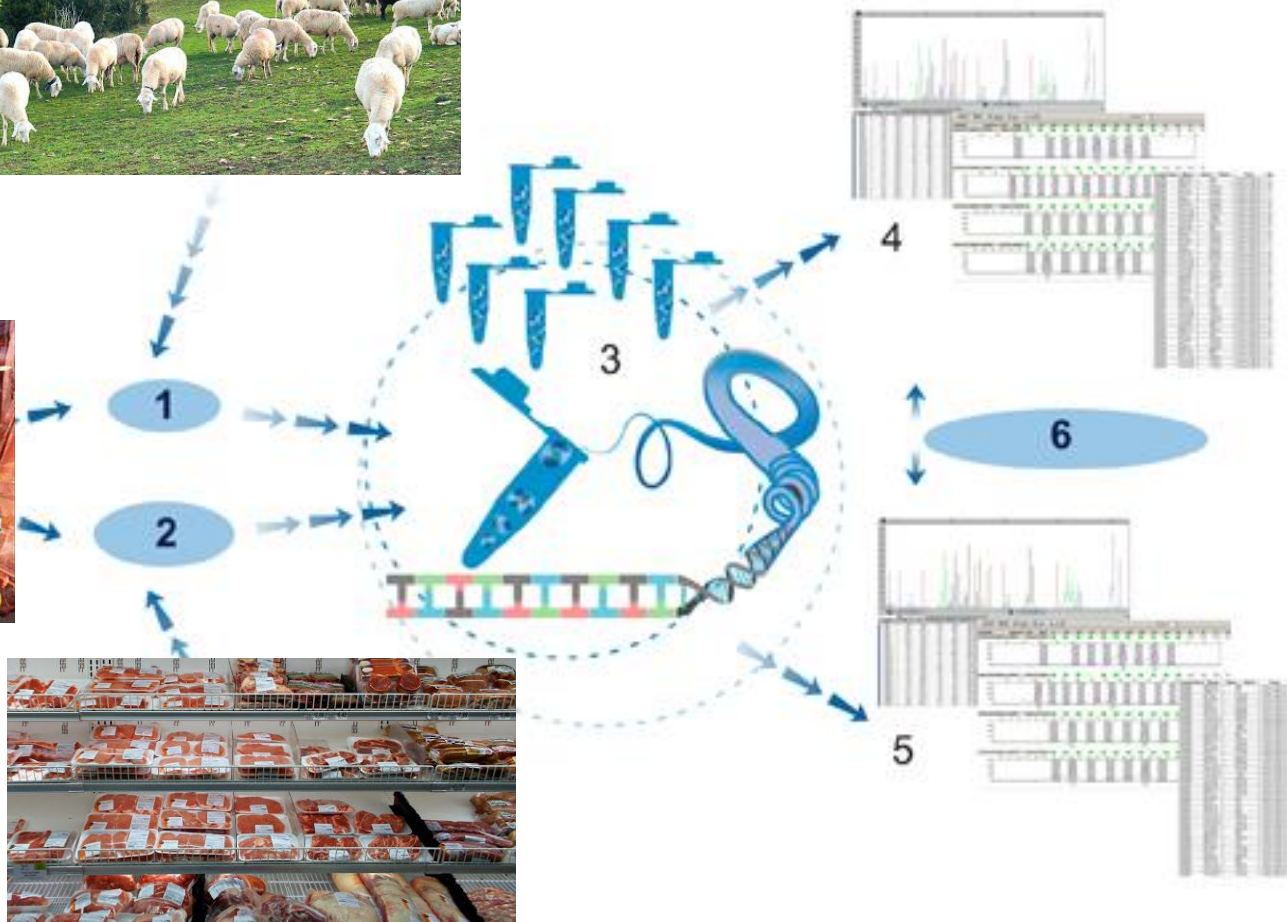
- Conservación *in situ* y *ex situ*.

A screenshot of a software interface titled "Individual Molecular Kinship". It features two dropdown menus for "pop_1" with values "1" and "10". Below the menus are navigation buttons "<<" and ">>". The interface displays "Overall Molecular Coancestry Mean" with sub-values: "- No weighted by PIC: 0,2226" and "- Weighted by PIC: 0,2121". It also shows "Molecular Coancestry between selected individuals" with a value of "0,276786" and "Molecular Coancestry (microsatellites weighted by PIC)" with a value of "0,271897". A "Back" button is located at the bottom.

(Molkin, Gutierrez et al. 2005)

Asignación de paternidad

Trazabilidad.



Panel de SNPs



Más versatilidad ya que permite incluir diferentes genotipados realizados por separado

FecX^R **Susceptibilidad**
Scrapie **lentivirus, mamitis**

Estacionalidad **Alelos recesivos**
reproductiva **Paternidad**

Panel de SNPs



Más versatilidad ya que permite incluir diferentes genotipados realizados por separado

FecX^R Susceptibilidad

SAM: Selección asistida por marcadores

reproductiva Paternidad

Selección asistida por marcadores (MAS).

¿Cómo?

- Pre-selección de reproductores:

scrapie



ARR/ARQ
ARR/ARR
ARR/AHQ

VRQ/ARQ
ARQ/ARQ
VRQ/VRQ

- Gene Content Multiple trait BLUP (Legarra and Vitezica, 2015)

Selección asistida por marcadores (MAS).

- Caracteres con heredabilidad baja.
- Fenotipo que sólo se mide en un sexo.
- Fenotipos de medición tardía.

Resistencia a enfermedades.

Fertilidad-reproducción.

Calidad de la carne.

Composición corporal.

Producción de leche , Crecimiento. -

+



Selección asistida por marcadores (MAS).

GENOTIPO PRNP	GRUPO DE RIESGO	ESTATUS <i>SCRAPIE</i>
ARR/ARR	R1	Ovinos genéticamente más resistentes a <i>scrapie</i>
ARR/AHQ	R3	Ovinos con escasa resistencia genética a <i>scrapie</i>
ARR/ARH	R3	
ARR/ARQ	R2	
AHQ/AHQ	R2	
AHQ/ARH	R4	
AHQ/ARQ	R4	
ARH/ARH	R3	
ARH/ARQ	R3	
ARQ/ARQ	R4(R5)	
ARR/VRQ	R4	Ovinos genéticamente susceptibles a <i>scrapie</i>
AHQ/VRQ	R5	Ovinos con elevada susceptibilidad genética a <i>scrapie</i>
ARH/VRQ	R5	
ARQ/VRQ	R4	
VRQ/VRQ	R5	

scrapie



Selección asistida por marcadores (MAS).



Table 1 Ovine *TMEM154* haplotypes and their associations with infection susceptibility and SRLV subgroups

Haplotype	Amino acid at position indicated										Allelic effect ^b	SRLV association		
	4 ^a	13	14	25	31	33	35	44	70	74	82	102		
1	R	A	L	T	E	D	K	T	N	I	E	I	Less-susceptible	Subgroup 1
2	R	A	L	T	E	D	E	T	I	I	E	I	Highly-susceptible	Subgroup 2
3	R	A	L	T	E	D	E	T	N	I	E	I	Highly-susceptible	Subgroup 2
4	A	P ^c	F ^c	P ^c	R ^c	T ^c	N ^c	W ^c	NA ^d	NA	NA	NA	Unknown	Unknown, can be infected by Subgroup 4 (this study)
6	R	A	L	T	E	D	E	T	N	I	Y	NA	Unknown	Unknown
9	R	A	L	T	E	N	E	T	N	I	E	I	Unknown	Unknown
10	R	A	H	T	E	D	K	T	N	I	E	I	Unknown	Unknown
11	R	A	L	I	E	D	E	T	N	I	E	I	Unknown	Unknown
12 ^e	R	A	L	T	E	D	E	T	N	F	E	I	Unknown	Unknown
13	R	V	L	T	E	N	E	T	N	I	E	I	Unknown	Unknown
14	R	A	L	T	E	D	E	T	N	I	E	T	Unknown	Unknown
15 ^e	R	A	L	T	Q	D	E	T	N	F	E	I	Unknown	Unknown

^aNumbers refer to amino acid positions in [GenBank:HM355886].

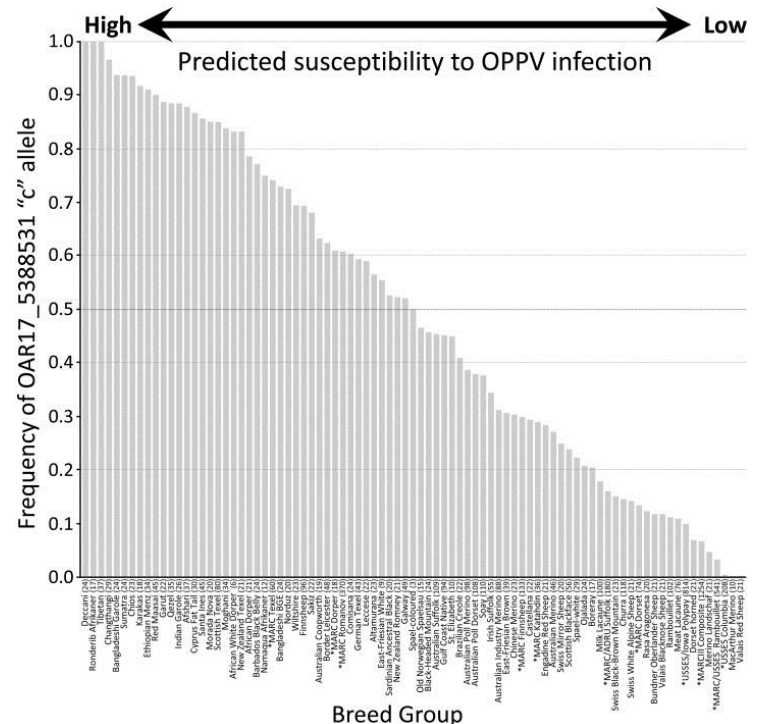
^bDoes not account for SRLV subgroups.

^cResult of frameshift mutation at amino acid position 4.

^dNot applicable due to preceding premature stop codon.

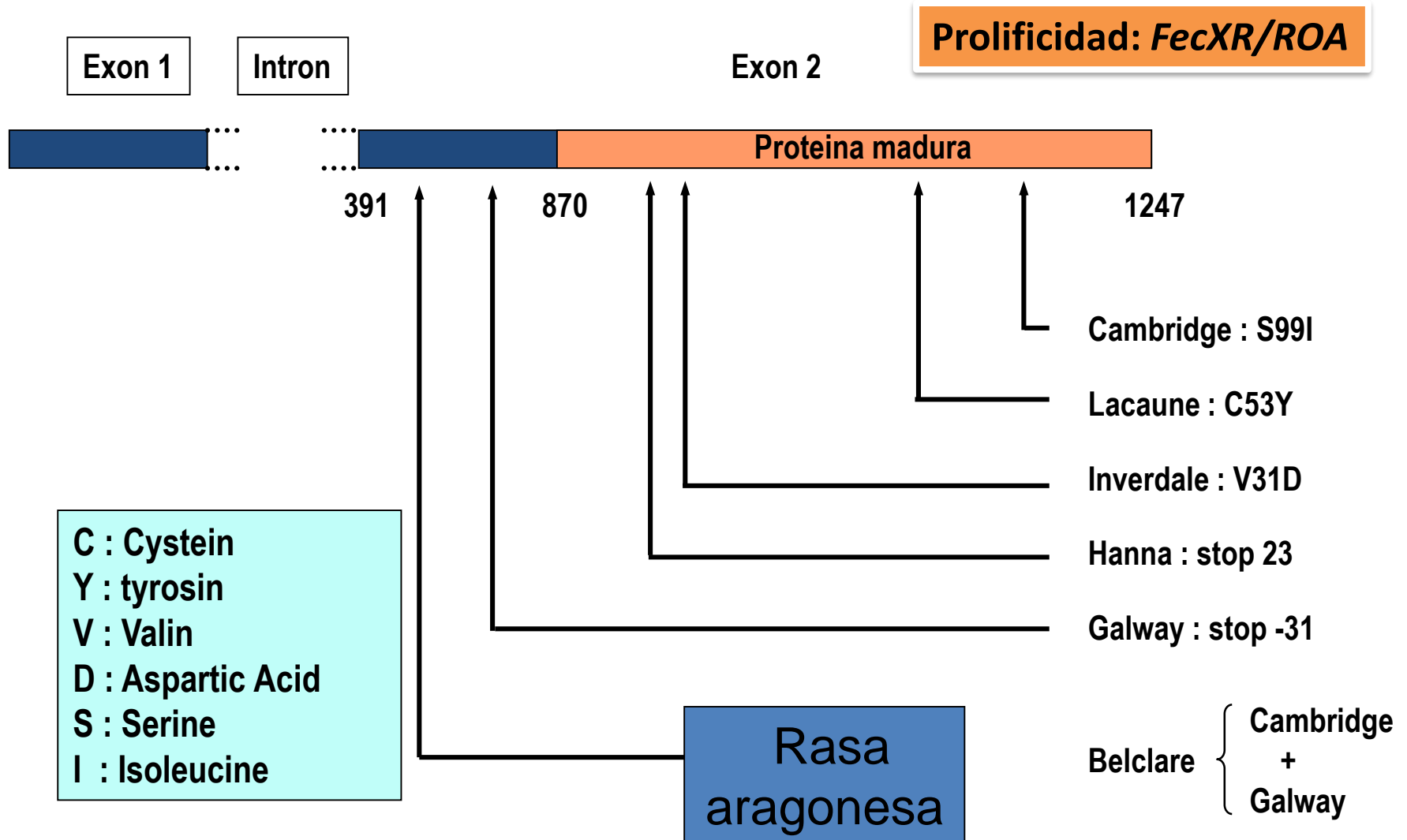
^eHaplotype observed in wild sheep.

Lentivirus *TMEM154*



Mamitis *SOCS2*

Selección asistida por marcadores (MAS).



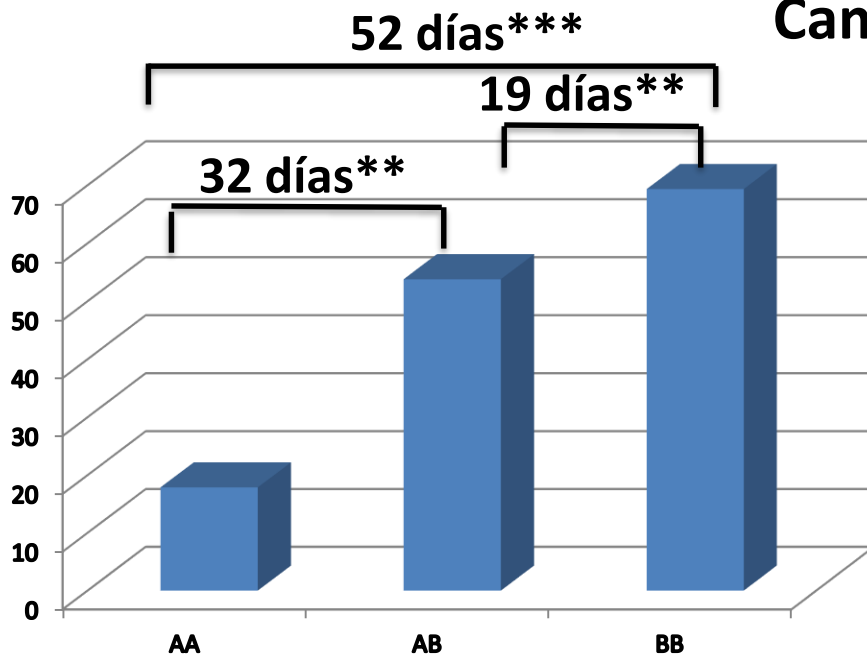
Selección asistida por marcadores (MAS).

Estacionalidad reproductiva: *MTNR1A/GDO*

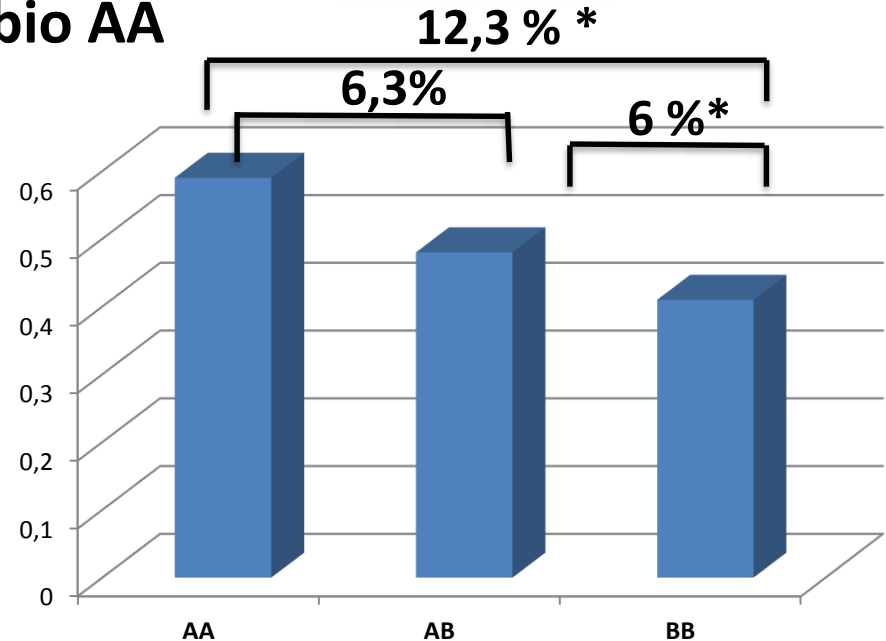
DTA

Cambio AA

% celos



$P < 0,0001$



$P = 0,0043$

*** $P < 0,001$

** $P < 0,01$

* $P < 0,05$

Polimorfismos asociados a una mayor actividad ovárica y sexual

Selección asistida por marcadores (MAS).

Hipertrofia muscular.

DLK1

MSTN

Callipyge



Grasa amarilla.

BCO2



Selección asistida por marcadores (MAS).

Enfermedades hereditarias

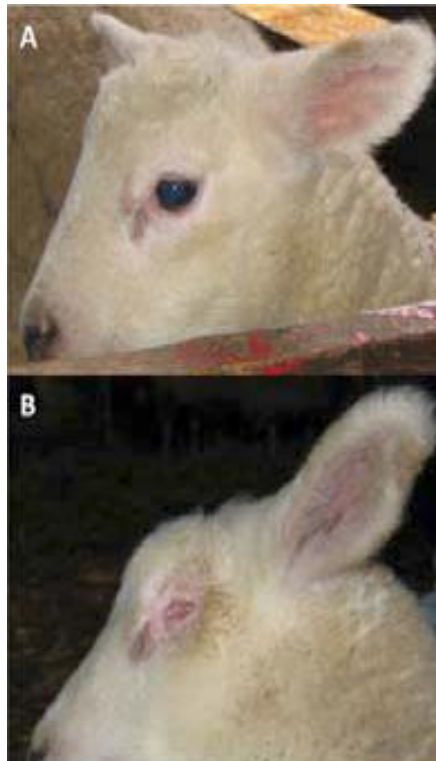
FGFR3 y *SLC13A1*

SPIDER CORDERO SÍNDROME (SLS) o
CONDRODISPLASIA HEREDITARIA

causa deformidades esqueléticas en los
corderos jóvenes:



PITX3



ITGB4 y *LAMC2*



DESARROLLO HERRAMIENTA DE ASIGNACIÓN DE PATERNIDAD MEDIANTE SNPs



TERINNOVI
TerInnOvi2017

FITE 2016-2017

Herramienta de asignación de paternidad mediante SNPs



Rasa Aragonesa (n=38)



Rasa Navarra (n=39)*



Xisqueta (n=41)



Churra Tensina (n=38)



Ovine SNP50BeadChip
(54,241 SNPs)



Ansotana (n=41)



Roya bilbilitana (n=24)*



Ojinegra (n=36)



Cartera (n=39)



Maellana (n=39)

Herramienta de asignación de paternidad mediante SNPs



Rasa Aragonesa (n=38)



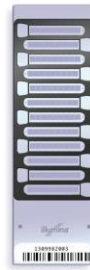
Rasa Navarra (n=39)*



Xisqueta (n=41)



Churra Tensina (n=38)



Ovine SNP50BeadChip
(54,241 SNPs)



Ansotana (n=41)



Roya bilbilitana (n=24)*



Ojinegra (n=36)



Cartera (n=39)



Maellana (n=39)

Herramienta de asignación de paternidad mediante SNPs

- Confirmación de ausencia *FecX^R*
- Confirmación de paternidad y maternidad con 19 microsatélites (ISAG-FAO: *CSRD247, FCB20, HSC, ILSTS005, ILSTS008, ILSTS11, INRA006, INRA063, INRA132, INRA172, INRA23, INRA49, MAF214, MAF65, McM42, OarAE129, OarCP49, SPS113, SPS115*):
 - 3 TRIOS
 - 11 DÚOS

- Panel francés de 249 SNPs



Ovine SNP50BeadChip
(54,241 SNPs)

Herramienta de asignación de paternidad mediante SNPs

Asignación usando CERVUS

- 249 SNPs
 - 3 TRIOS
 - 11 DÚOS
- 3 tríos OK.
- 5 dúos tuvieron fallos de asignación. Un dúo fallo de asignación de padre (siguiente de la lista). Algunos eran otros individuos de la lista pero otros ni siquiera estaban.

Panel de SNPs de asignación de paternidad

Panel abierto

192 SNPs

159 SNPs para la
asignación de
paternidad

KISS1R

GHR

PRNP/scrapie

MTNR1A/GDO

GDF9

FecX^R / ROA

TMEM154

LEPR

SOCS2

FST

33 SNPs funcionales

10,10 €

Validación mediante KASP

Primer envío

- Raza aragonesa
- Raza Navarra
- Anсотana
- Cartera

Abril 2018

Segundo envío

- Raza aragonesa
- Raza Navarra
- Anсотana
- Maellana
- Roya Bilbilitana

Noviembre 2018

N=3000

Futuro

- Genotipado y integración de la información de asignación de paternidad en los esquemas de selección.
- Estudio de la influencia de SNPs funcionales en caracteres de crecimiento y reproductivos.
- Uso en otras razas españolas: Latxa, Churra, Castellana, Ojalada, Gallega, Ripollesa, Canaria, Mallorquina, Segureña, Merina, Manchega, Assaf...



Ovine SNP50BeadChip
(54,241 SNPs)



UNION EUROPEA PROYECTO I+D+D PLATEA FITE: FONDO EUROPEO DE DESARROLLO REGIONAL

TERINNOVI



TERINNOVI