

Biología molecular aplicada a la mejora de las razas ovinas de Teruel

Jorge Hugo Calvo Lacosta
jhcalvo@aragon.es

5 de diciembre de 2018, CIBR-Teruel



UNION EUROPEA
Fondo Europeo de
Desarrollo Regional
Construyendo Europa desde Aragón



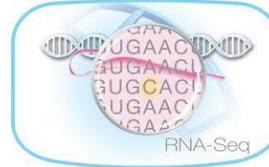
Innovación genómica

1. Herramienta de apoyo a los esquemas de selección

- *Filiación*

- *SAM: Selección asistida por marcadores*

2. Uso de herramientas genómicas en investigación orientada



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

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*



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

Ovino de carne

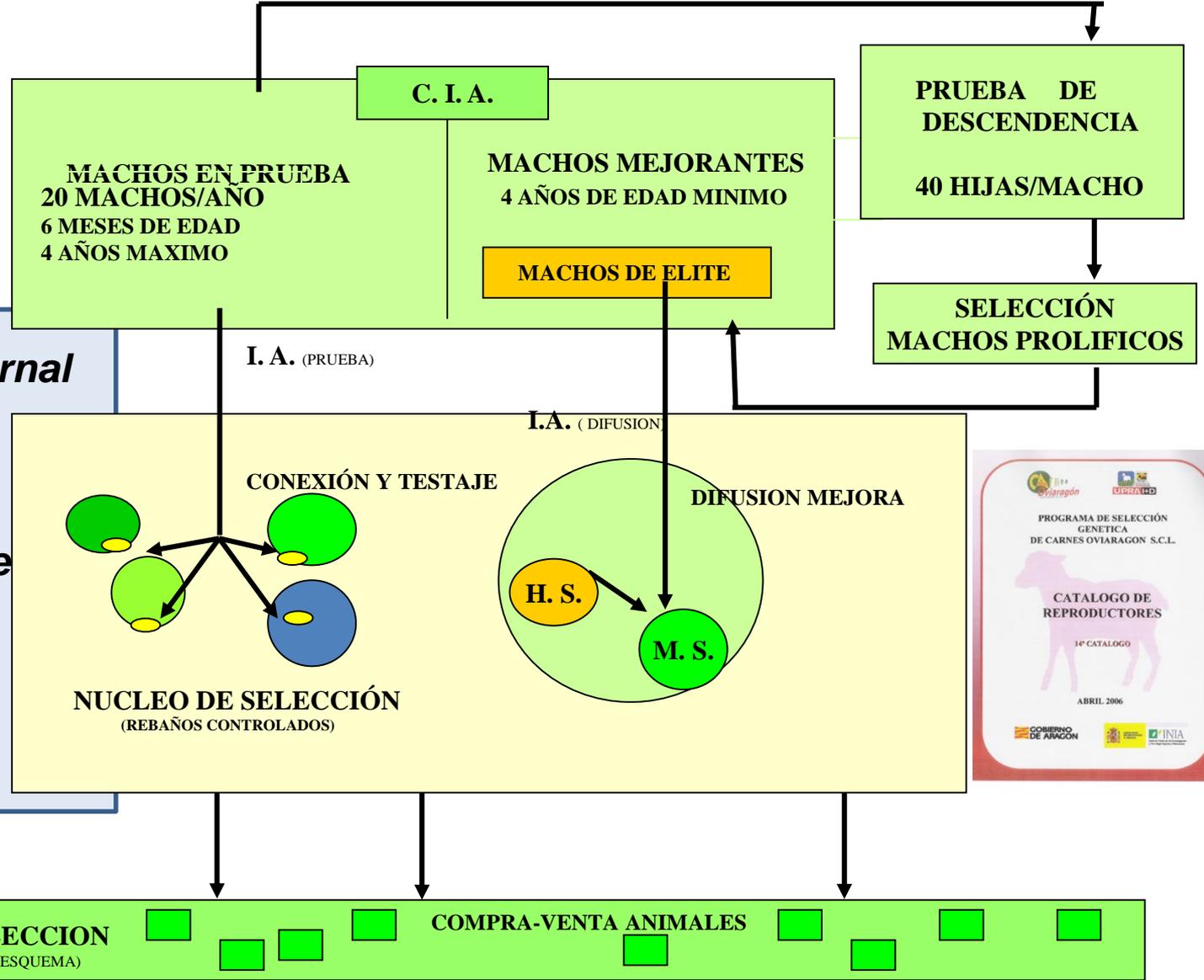
A- Prolificidad

B- Capacidad maternal

C- Crecimientos

D- Calidad de carne

...



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

Asignación de paternidad

Detección de animales portadores de enfermedades hereditarias

Otras aplicaciones de la filiación

epidermólisis bullosa



Gen candidato

LAMC2

German Black Headed Mutton sheep

LAMB3

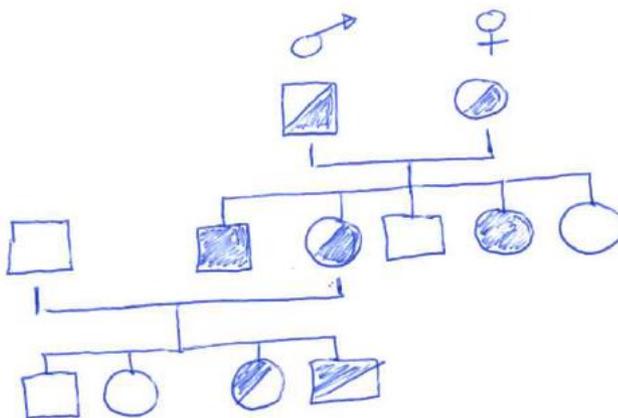
ITGB4

Churra

Autosómico recesivo

Asignación de paternidad

Genotipado madres, hijos portadores en homocigosis y padres



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

Asignación de paternidad

Estudio modo de herencia de enfermedades hereditarias

Otras aplicaciones de la filiación

Anquiloglosia



→ 16 corderos afectados

Genotipado padres e hijos

9 padres → Se descarta componente genético



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

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.



Individual Molecular Kinship

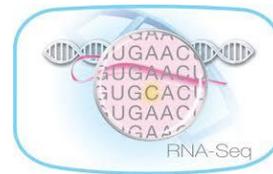
pop_1: 1 pop_1: 10

Overall Molecular Coancestry Mean
· No weighted by PIC: 0.2226
· Weighted by PIC: 0.2121

Molecular Coancestry between selected individuals
0.276786

Molecular Coancestry (microsatellites weighted by PIC)
0.271897

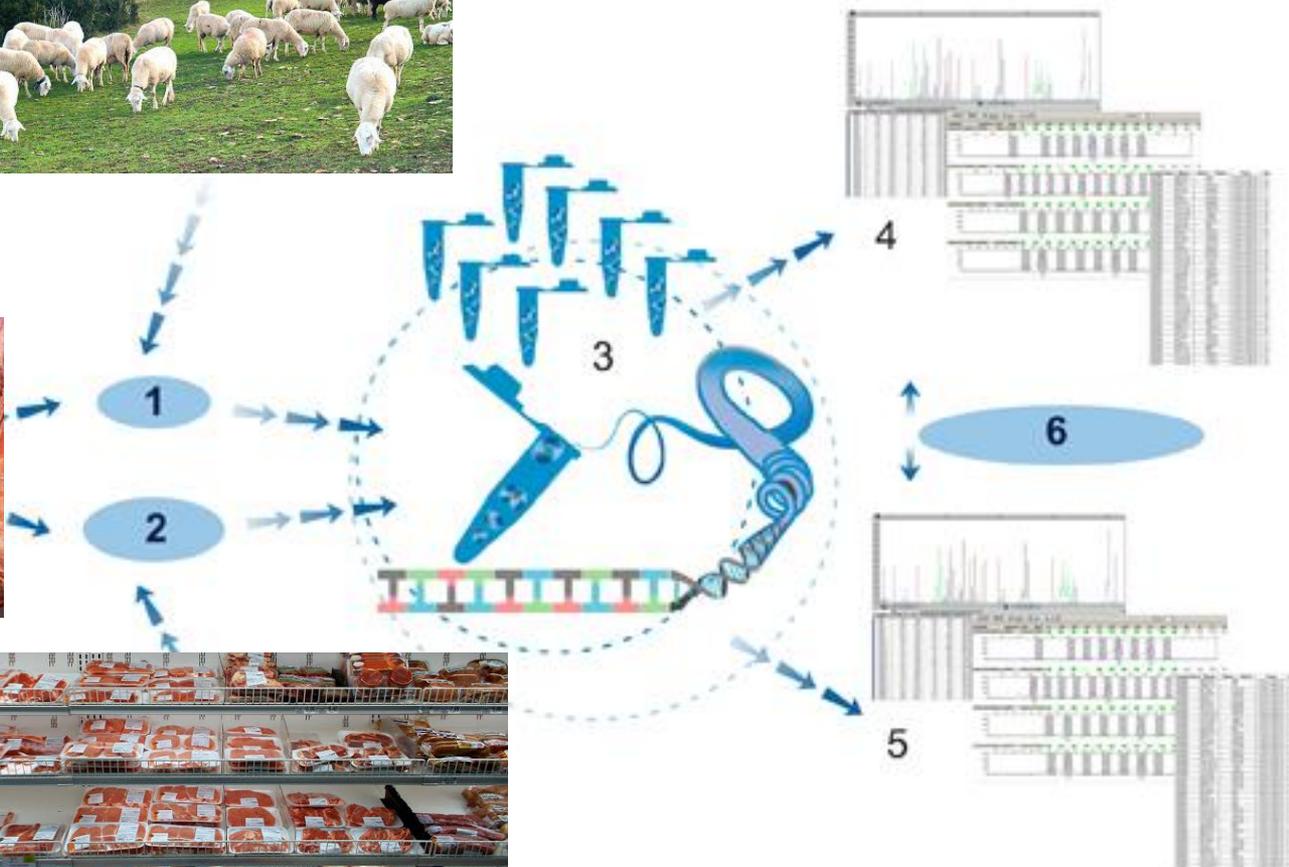
Back



Innovación técnica aplicada a la conservación y
(Molkin, Gutierrez et al. 2005)
de la raza de ovejas de Teruel

Asignación de paternidad

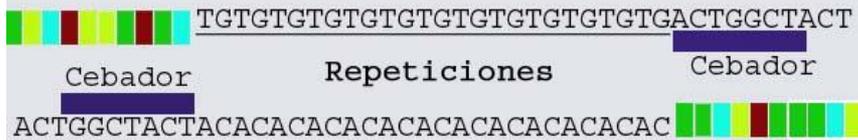
Trazabilidad.



ervación y
le Teruel

¿Qué herramientas de asignación de paternidad?

Microsatélite



Polimorfismo de Base Única

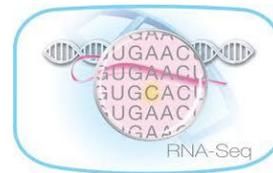


1	CSRD247	14	MAF65
2	FCB20	15	Mcm42
3	HSC	16	OarAE129
4	ILSTS005	17	OarCP49
5	ILSTS008	18	SPS113
6	ILSTS11	19	SPS115
7	INRA006	20	CD5
8	INRA063	21	ETH152 (D5S2)
9	INRA132	22	ILSTS087
10	INRA172	23	INRA005
11	INRA23	24	McM527
12	INRA49	25	OarFCB11
13	MAF214		

Panel de 25 Loci Microsatélites

- Más estables.
- Mejor cobertura de todo el genoma.
- Neutros o asociados a ETLs
- Automatización y estandarización.

4,5 SNPs /microsatélites (ovino)



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

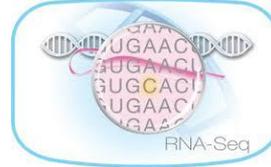
Panel de SNPs



Más versatilidad ya que permite incluir diferentes genotipados realizados por separado

FecX^R
Scrapie
Estacionalidad reproductiva
Susceptibilidad lentivirus, mamitis
Alelos recesivos
Paternidad

TERINNOVI



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

Panel de SNPs



Más versatilidad ya que permite incluir diferentes genotipados realizados por separado

FecX^R Susceptibilidad

SAM: Selección asistida por marcadores

reproductiva

Paternidad



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

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)



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

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. -



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

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 genéticamente resistentes a <i>scrapie</i> pero que deben ser manejados con cautela en programas de mejora genética
ARR/ARH	R3	
ARR/ARQ	R2	Ovinos con escasa resistencia genética a <i>scrapie</i>
AHQ/AHQ	R2	
AHQ/ARH	R4	
AHQ/ARQ	R4	
ARH/ARH	R3	
ARH/ARQ	R3	
ARQ/ARQ	R4(R5)	Ovinos genéticamente susceptibles a <i>scrapie</i>
ARR/VRQ	R4	
AHQ/VRQ	R5	
ARH/VRQ	R5	
ARQ/VRQ	R4	
VRQ/VRQ	R5	Ovinos con elevada susceptibilidad genética a <i>scrapie</i>

scrapie



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

Selección asistida por marcadores (MAS).

Visna/maedi: Formas de presentación clínica



Lentivirus *TMEM154*

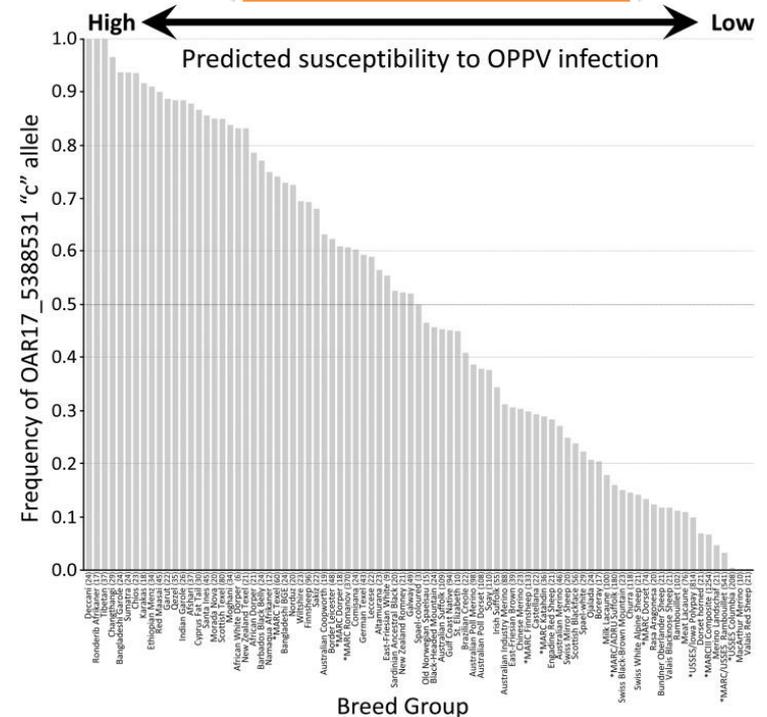


Table 1 Ovine *TMEM154* haplotypes and their associations with infection susceptibility and SRLV subgroups

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.

Mamitis *SOCS2*



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

Selección asistida por marcadores (MAS).

Prolificidad: *FecXR/ROA*

Exon 1

Intron

Exon 2



391 870 1247

Cambridge : S99I

Lacaune : C53Y

Inverdale : V31D

Hanna : stop 23

Galway : stop -31

C : Cystein
 Y : tyrosin
 V : Valin
 D : Aspartic Acid
 S : Serine
 I : Isoleucine

Rasa aragonesa

Belclare { Cambridge + Galway



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

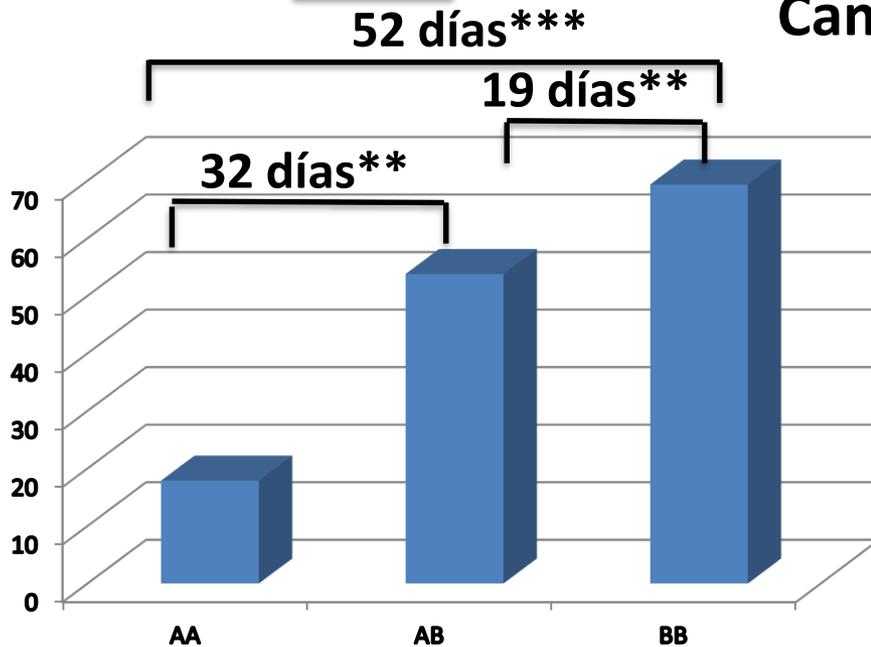
Selección asistida por marcadores (MAS).

Estacionalidad reproductiva: *MTNR1A/GDO*

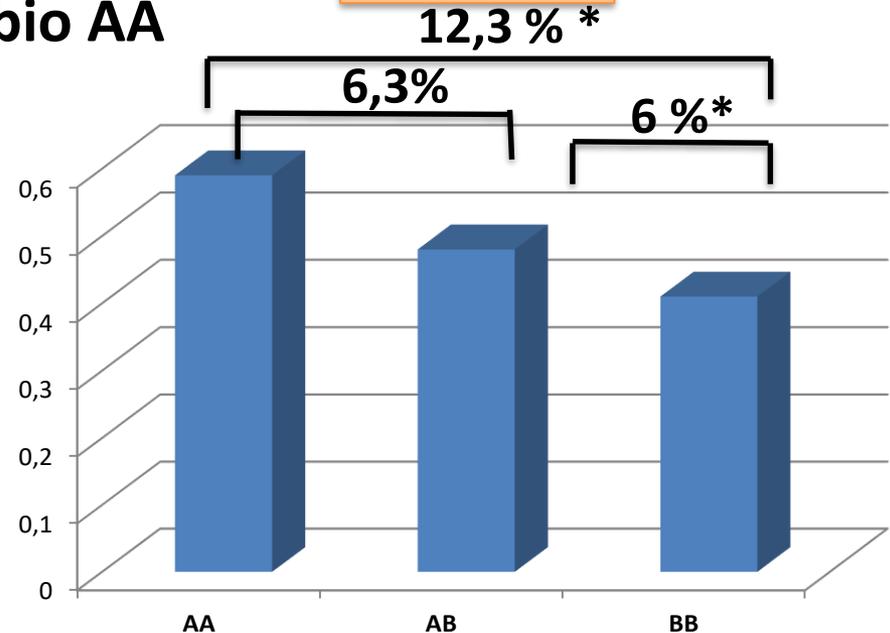
DTA

Cambio AA

% celos



$P < 0,0001$



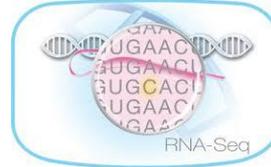
$P = 0,0043$

*** $P < 0,001$

** $P < 0,01$

* $P < 0,05$

Polimorfismos asociados a una mayor actividad ovárica y sexual



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

Selección asistida por marcadores (MAS).

Hipertrofia muscular.

DLK1

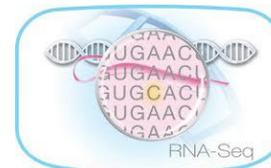
MSTN

Callipyge



Grasa amarilla.

BCO2



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

Selección asistida por marcadores (MAS).

Enfermedades hereditarias

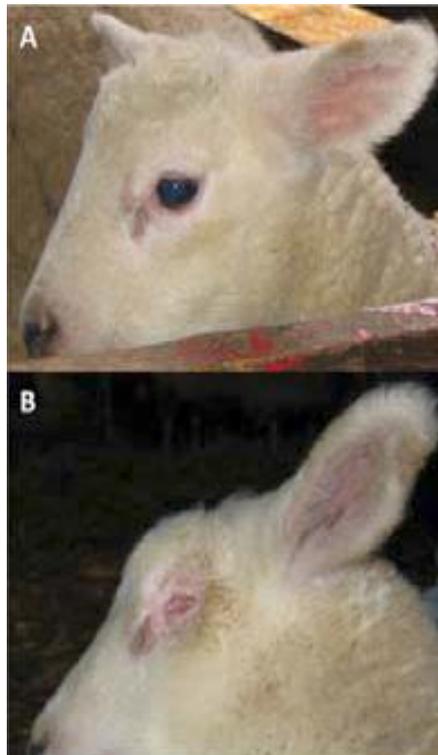
FGFR3 y SLC13A1

SPIDER CORDERO SÍNDROME (SLS) o
CONDRODISPLASIA HEREDITARIA

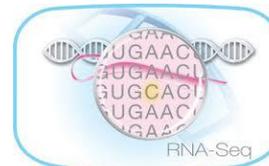
causa deformidades esqueléticas en los
corderos jóvenes:



PITX3



ITGB4 y LAMC2



Innovación técnica aplicada a la conservación y
mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

DESARROLLO HERRAMIENTA DE ASIGNACIÓN DE PATERNIDAD MEDIANTE SNPs



TERINNOVI
TerInnOvi2017

FITE 2016-2017



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel



UNION EUROPEA PROYECTO I+D+D PLATEA FITE:
Fondo Europeo de Desarrollo Regional

TERINNOVI



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)



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

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)*



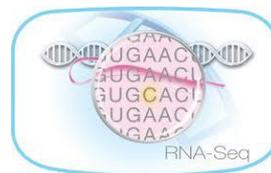
Ojinegra (n=36)



Cartera (n=39)



Maellana (n=39)



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

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)**



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

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.



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

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 €



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

Validación mediante KASP

Primer envío

- Raza aragonesa
- Raza Navarra
- Ansoтана
- Cartera

Abril 2018

Segundo envío

- Raza aragonesa
- Raza Navarra
- Ojinegra *
- Roya Bilbilitana

Noviembre 2018

N=4000



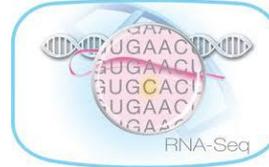
Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

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)



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

Innovación genómica

2. *Uso de herramientas genómicas en investigación orientada*



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

Innovación genómica

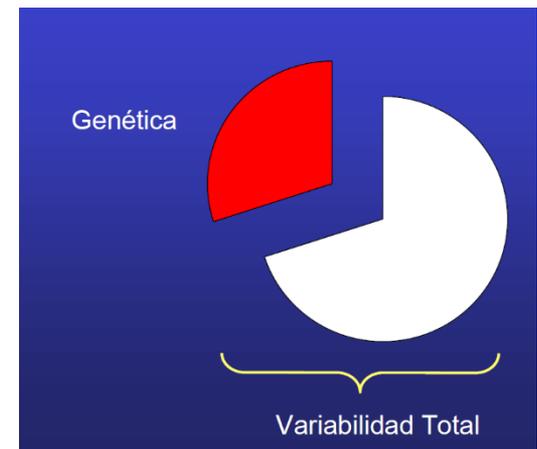
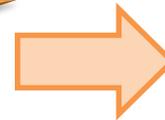


¿Prolificidad,
estacionalidad
reproductiva,
precocidad
sexual...?

- ¿es heredable el carácter?



Datos



- Big data

Innovación genómica

Estudio modo de herencia de enfermedades hereditarias

Otras aplicaciones de la filiación

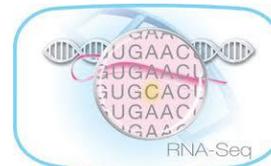
Anquiloglosia



→ 16 corderos afectados

Genotipado padres e hijos

9 padres → Se descarta componente genético

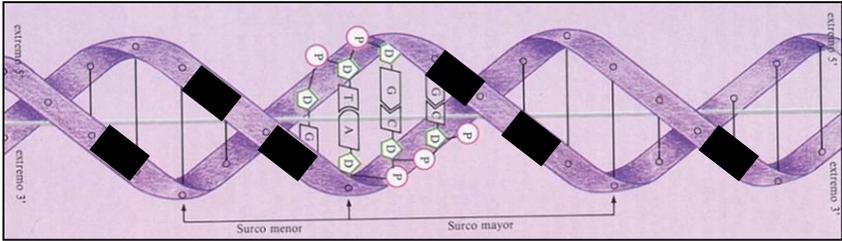


Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

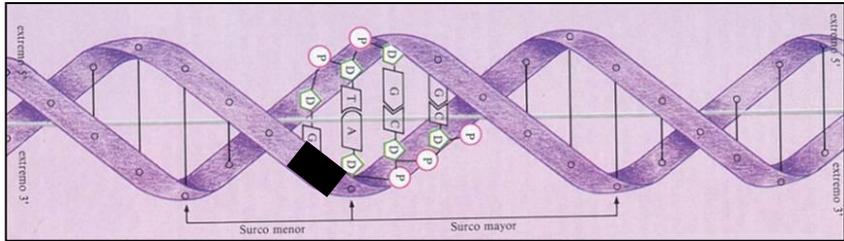
Innovación genómica

Carácter poligénico

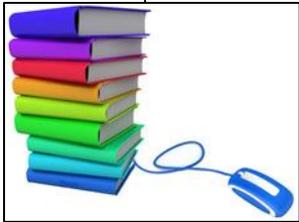


Tamaño

Gen mayor



Prolificidad



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

Innovación genómica

gen mayor

15,
GDF9,
Lacaune,
otros....?



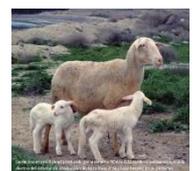
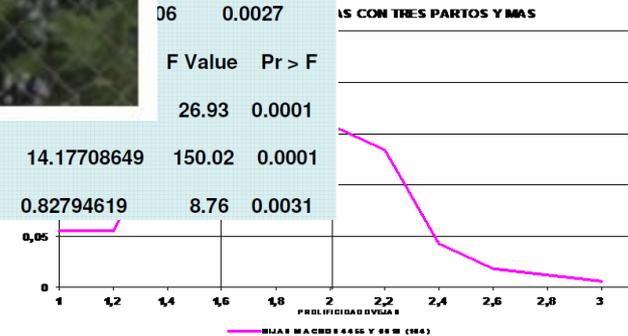
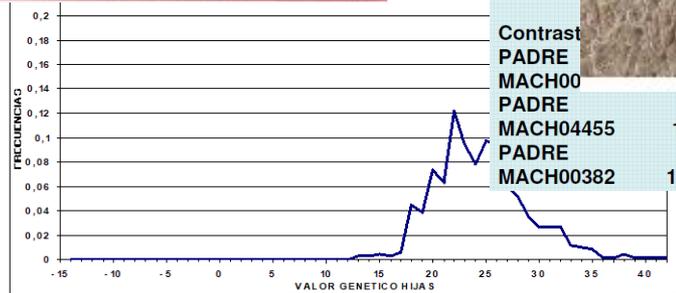

(5)									
TIPOS DE PARTO									
S ⁽⁶⁾	D ⁽⁷⁾	T ⁽⁸⁾	C ⁽⁹⁾	Q ⁽¹⁰⁾	N...		ERT. ⁽¹³⁾ PROL. ⁽¹⁴⁾		
							x100	x100	
3	653	709	123	7	0	1492	2468	2.495	1.654
0	236	230	34	5	1	506	823	2.811	1.626
5	125	118	16	0	0	259	409	2.443	1.579
5	48	66	11	0	0	125	213	3.472	1.704
7	58	42	8	1	0	109	170	2.319	1.560
5	8	0	0	0	0	8	8	1.333	1.000

•Análisis a 1.5, y

Source
REB
PADRE
LPPUM

Contrast
PADRE
MACH00
PADRE
MACH04455
PADRE
MACH00382

				F Value	Pr > F
MACH04455	1	14.17708649	14.17708649	150.02	0.0001
MACH00382	1	0.82794619	0.82794619	8.76	0.0031



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

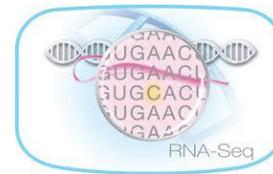
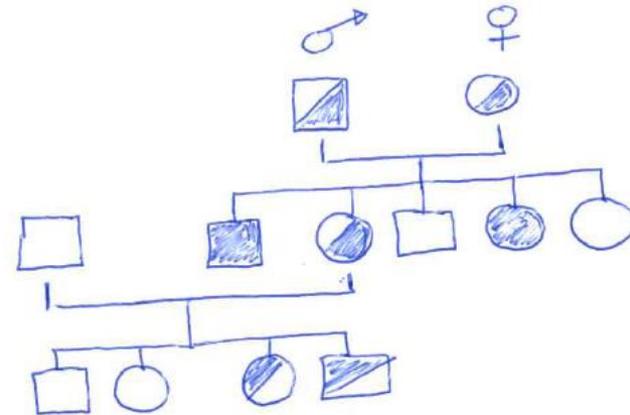
gen mayor

Innovación genómica

Detección de genes portadores de enfermedades hereditarias

epidermólisis bullosa

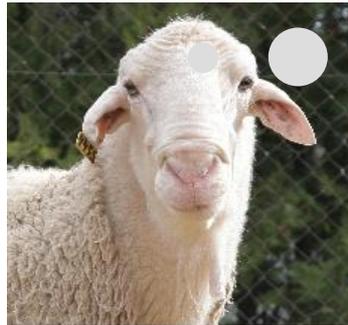
Autosómico recesivo



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

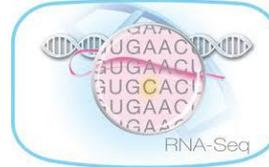
5 de diciembre de 2018

Innovación genómica



¿Prolificidad,
estacionalidad
reproductiva,
precocidad
sexual...?

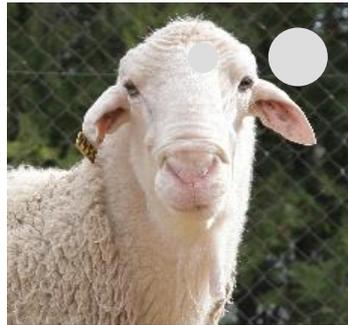
- **Genes candidatos**
- **Genotipado masivo de alta densidad**



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

Innovación genómica



¿Prolificidad,
estacionalidad
reproductiva,
precocidad
sexual...?

- **Genes candidatos**
- Genotipado masivo de alta densidad



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

Innovación *genómica*

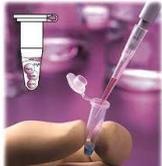
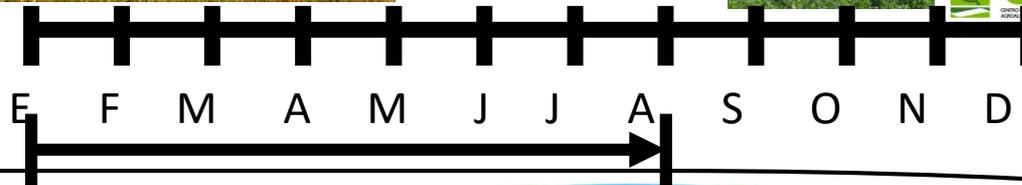
Selección asistida por marcadores (MAS).

Estacionalidad reproductiva

2011: 222 ovejas
2012: 303 ovejas



- CC y Peso/ 3 semanas.
- Medida de progesterona en plasma/ semanal.
- Detección de celos mediante machos vasectomizados



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

Innovación *genómica*

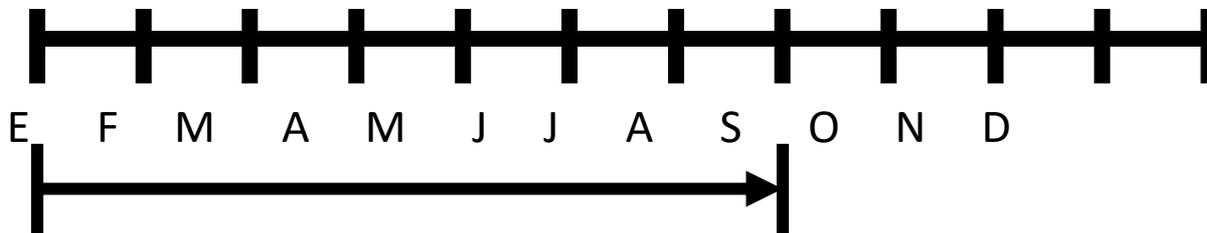
Selección asistida por marcadores (MAS).

Estacionalidad reproductiva

Dos fenotipos

Actividad ovárica: DTA: Días totales de anestro

Actividad sexual: % de meses cíclicos



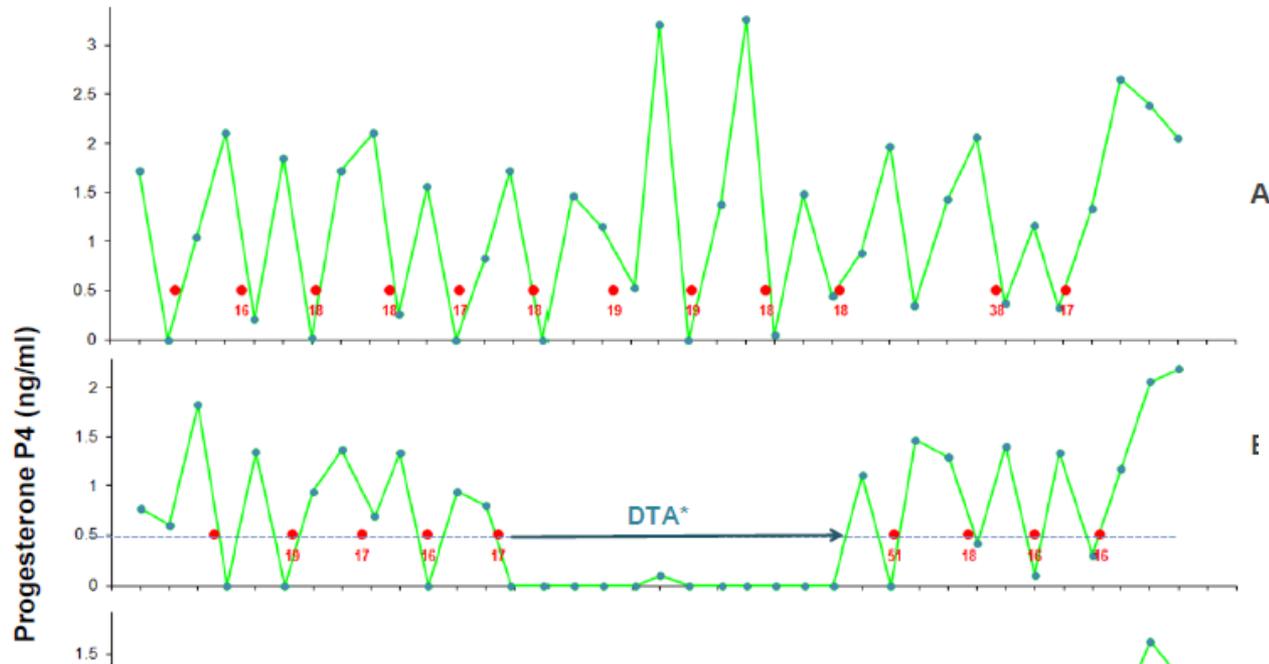
Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

Innovación genómica

Selección asistida por marcadores (MAS).

Estacionalidad reproductiva



**Actividad ovárica:
DTA: Días totales
de anestro**

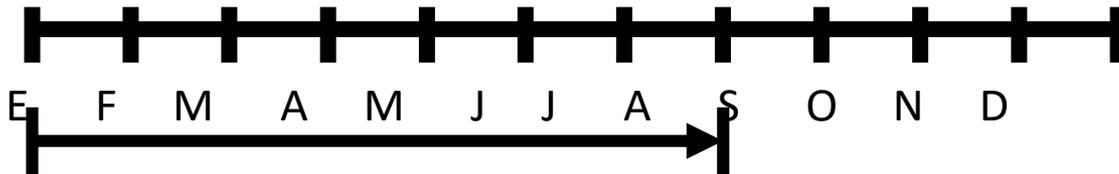


Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

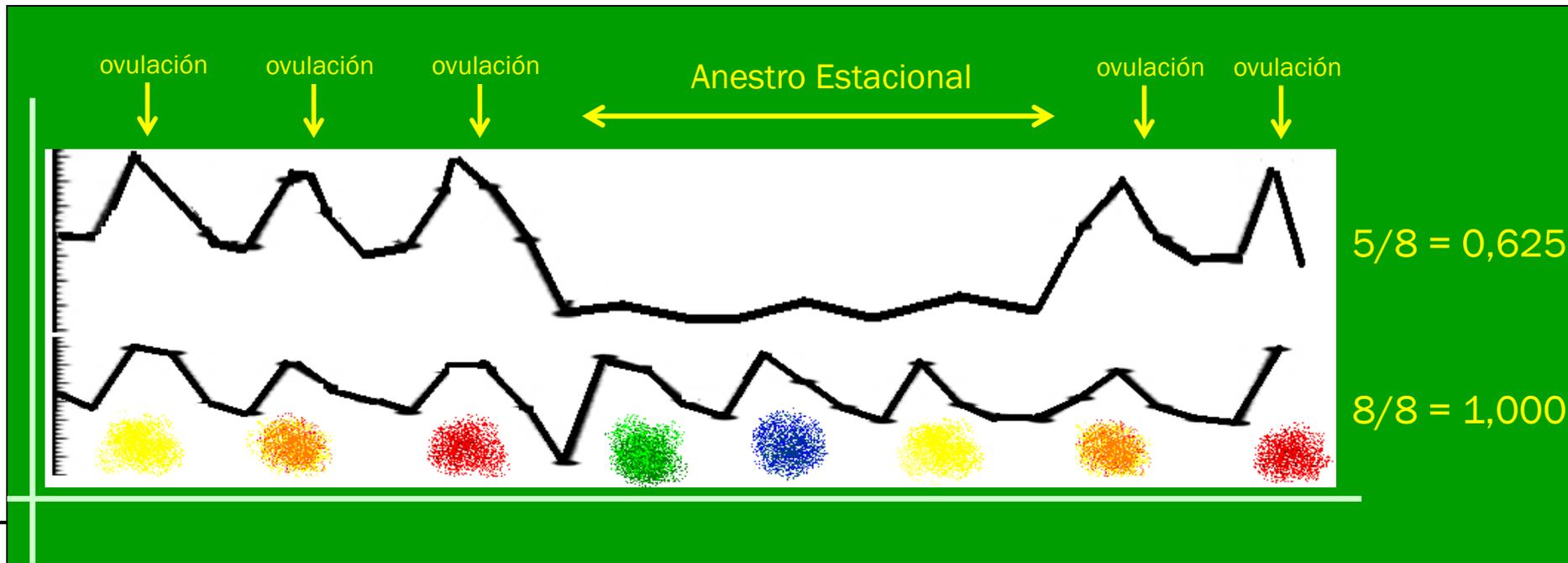
Innovación genómica

Selección asistida por marcadores (MAS).

Estacionalidad reproductiva



Actividad sexual: % de meses cíclicos



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

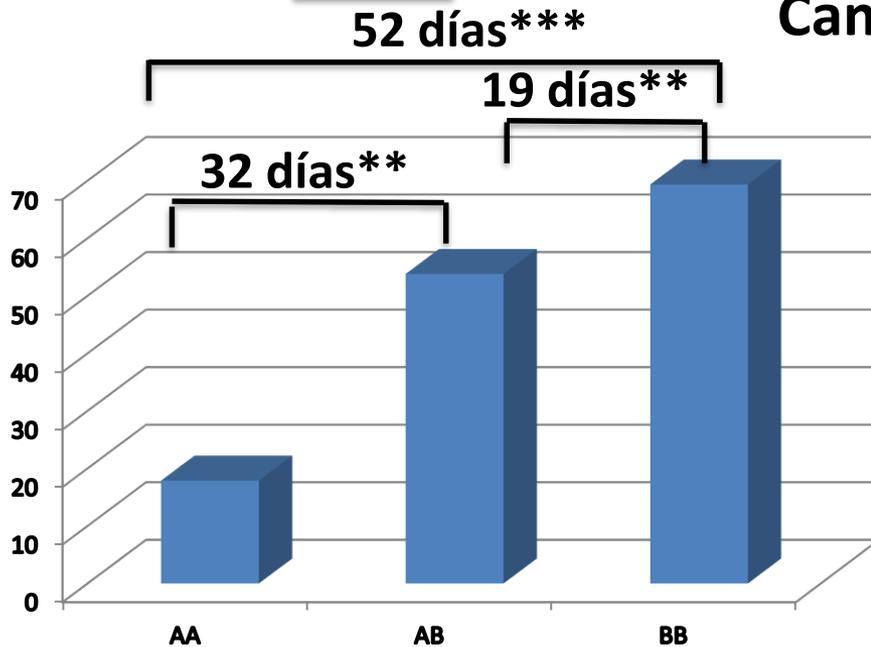
Selección asistida por marcadores (MAS).

Estacionalidad reproductiva: *MTNR1A/GDO*

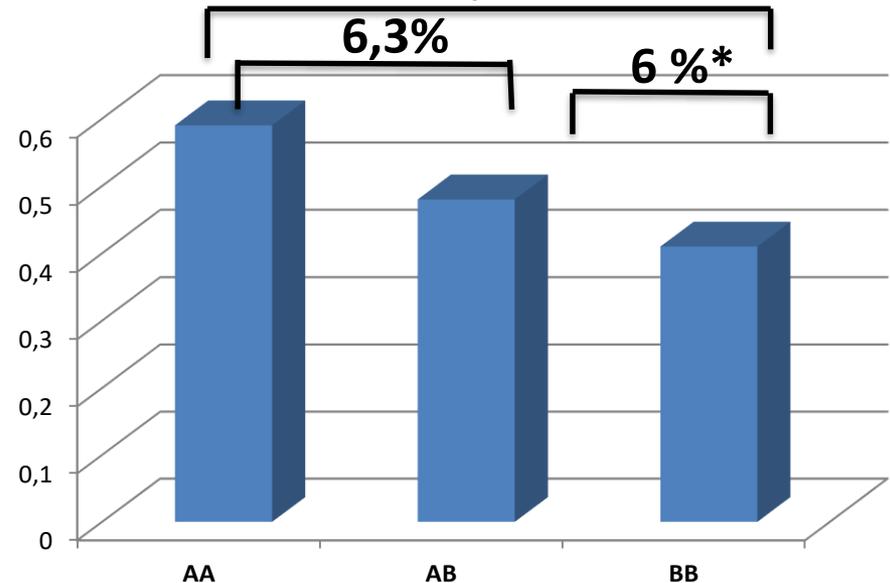
DTA

% celos

Cambio AA



$P < 0,0001$



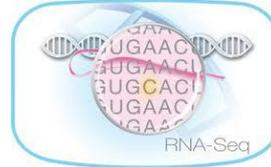
$P = 0,0043$

*** $P < 0,001$

** $P < 0,01$

* $P < 0,05$

Polimorfismos asociados a una mayor actividad ovárica y sexual



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

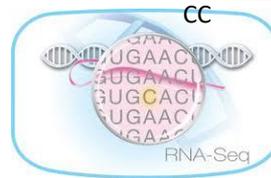
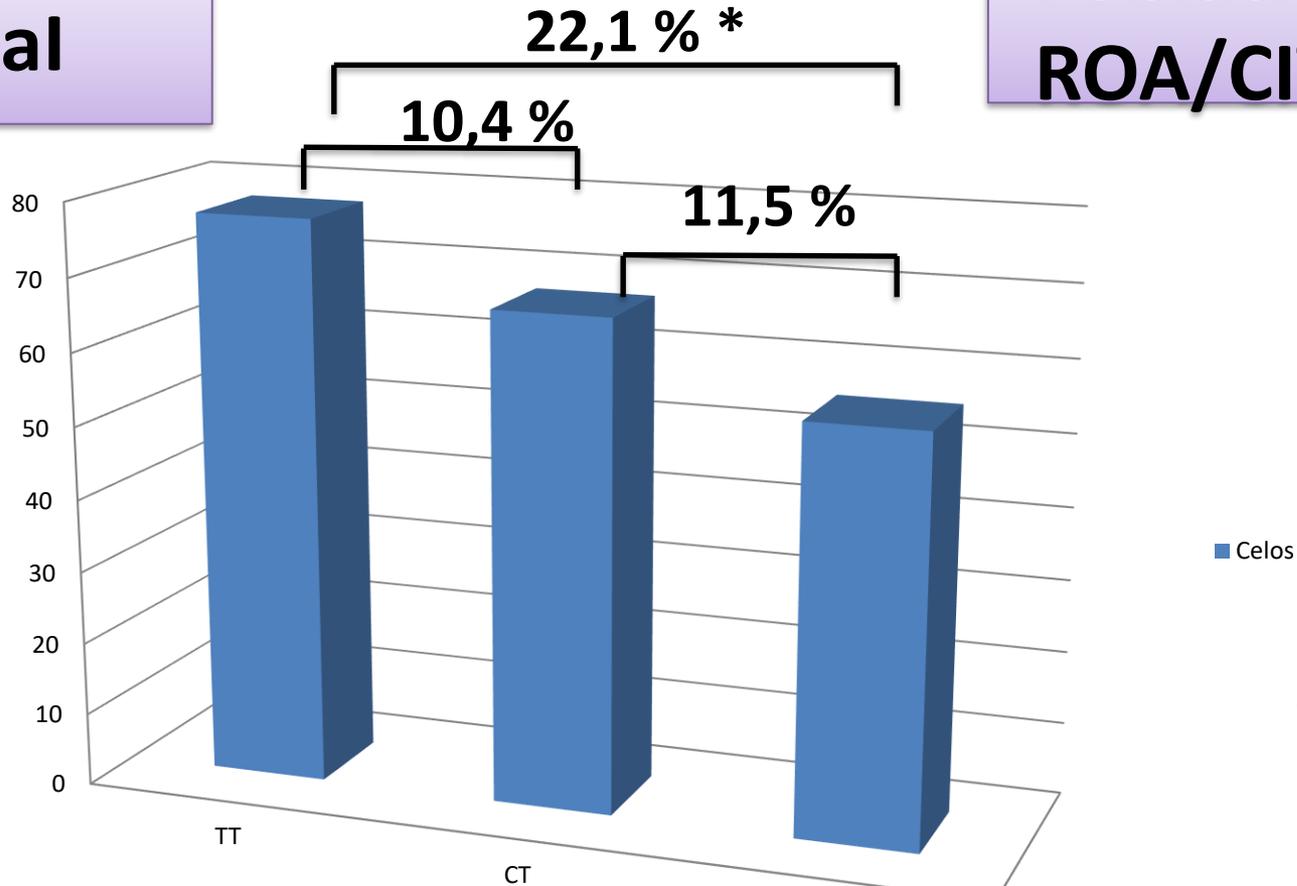
5 de diciembre de 2018

Selección asistida por marcadores (MAS).

Estacionalidad reproductiva: *MTNR1A/GDO*

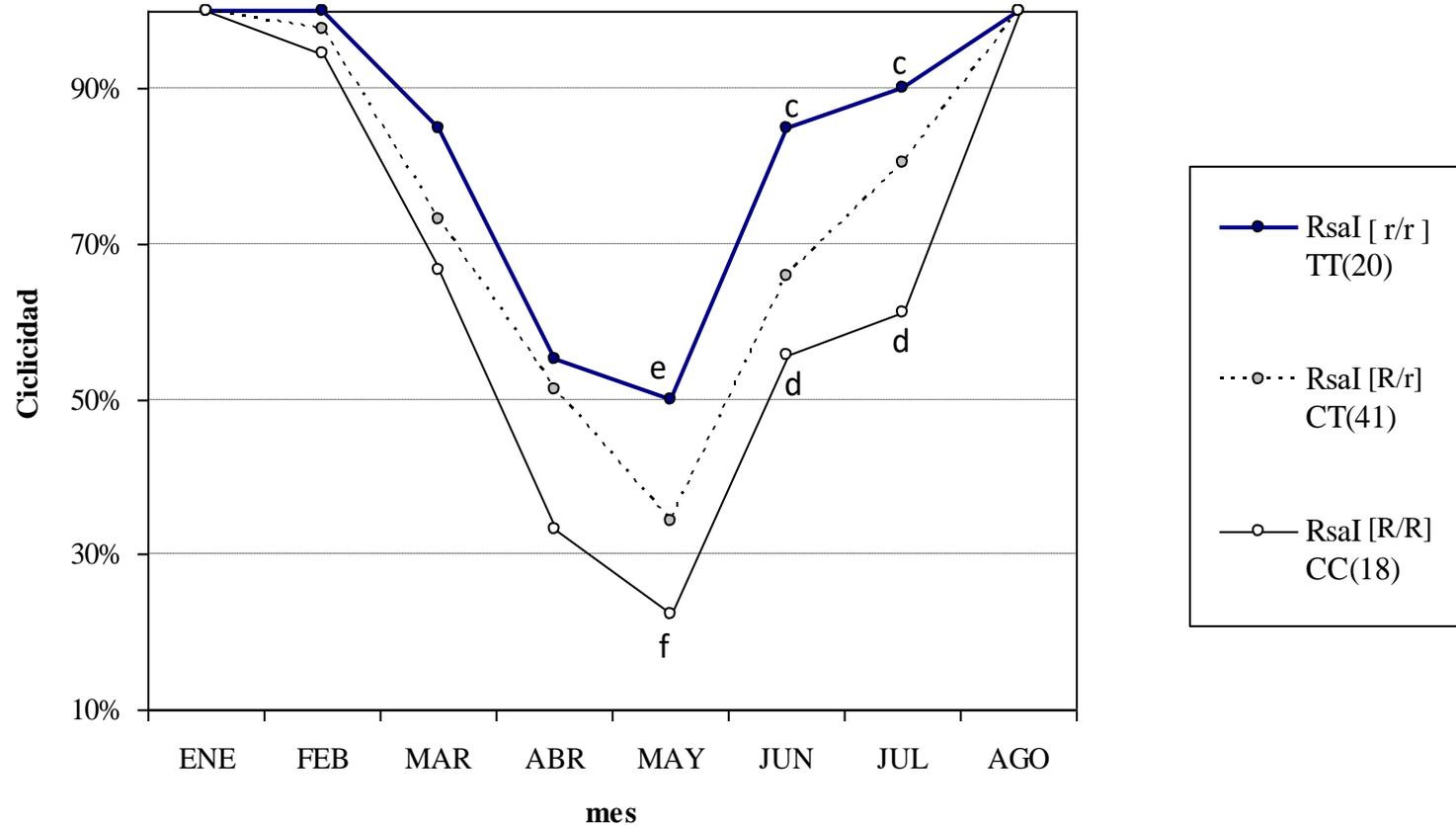
Rsal

Población
ROA/CITA



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

MTNR1A



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

En cada mes c,d: $P < 0.05$, e,f: $P < 0.1$,

Panel de SNPs de asignación de paternidad

Panel abierto

192 SNPs

MTNR1A/GDO

PRNP/scrapie

GDF9

FecX^R / ROA

KISS1R

**159 SNPs para la
asignación de
paternidad**

TMEM154

GHR

LEPR

SOCS2

FST

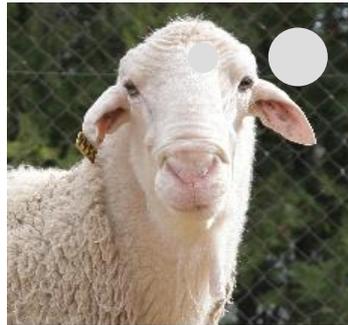
33 SNPs funcionales



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

Innovación genómica



¿Prolificidad,
estacionalidad
reproductiva,
precocidad
sexual...?

- Genes candidatos
- **Genotipado masivo de alta densidad,
secuenciación masiva del genoma...**



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

Innovación genómica

Plataformas de SNPs

Investigación orientada

Análisis de asociación de genoma completo



Infinium Assay

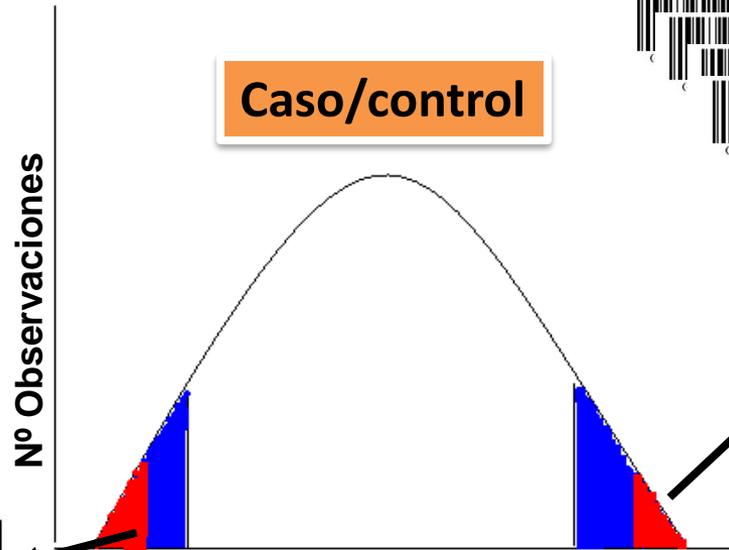
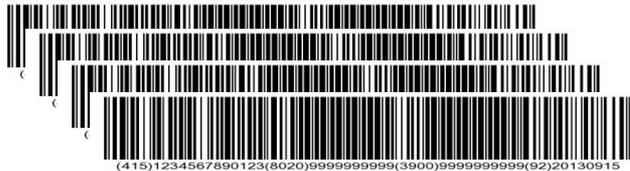
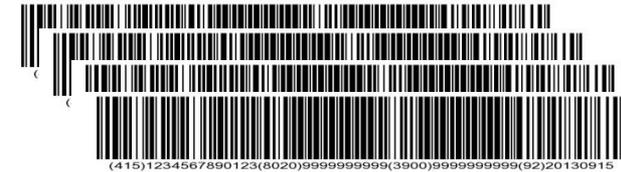
Caso/control

Nº Observaciones

Fenotipo corregido / VG

Alto VG

Bajo VG



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

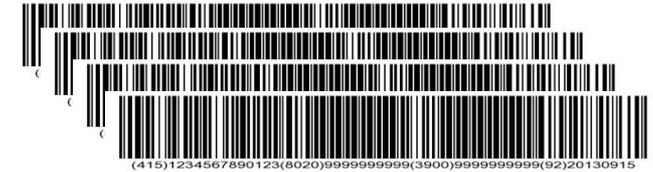
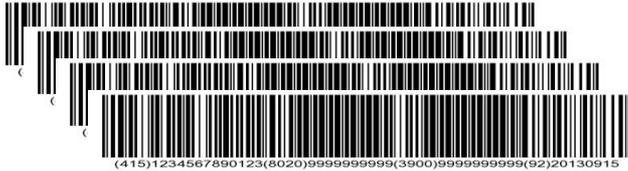
Innovación *genómica*

Investigación orientada

Bajo DTA

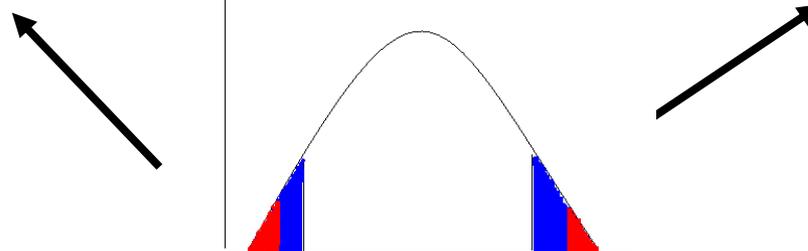
Alto DTA

Caso/control



AGCCT**C**ATATA**G**GGGTAAGAAC
TCCAG**C**TTATA**A**GGGTTAACCG
TGGCG**C**ATATA**G**GGGTTTGAAG
ACGAT**C**TTATA**A**GGGTAAACCC

AGCCT**A**ATATA**A**GGGTAAGAAC
TCCAG**A**TTATA**A**GGGTTAACCG
TGGCG**A**ATATA**G**GGGTTTGAAG
ACGAT**A**TTATA**G**GGGTAAACCC



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

Innovación *genómica*

Plataformas de SNPs



illumina



Infinium
Assay

Investigación orientada

Análisis de asociación de
genoma completo

¿Prolificidad,
estacionalidad
reproductiva, RCS,
CC, contenido de
vitamina E y A...?



Innovación técnica aplicada a la conservación y
mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018

Innovación genómica

Plataformas de SNPs



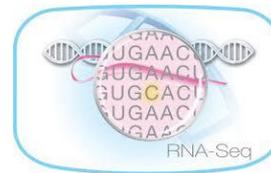
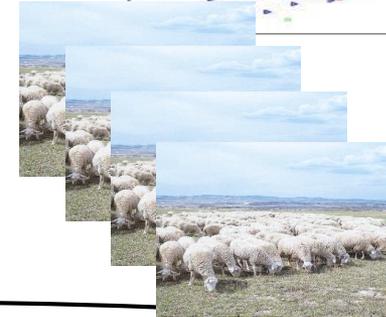
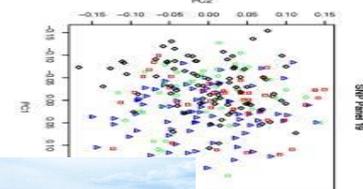
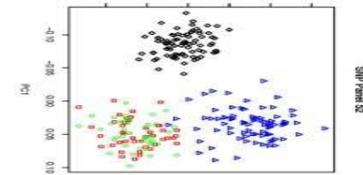
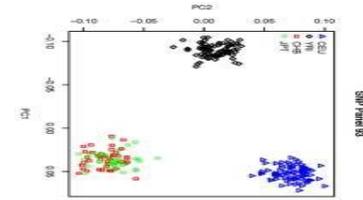
Infinium Assay

Investigación orientada

Análisis de asociación de genoma completo

¿Prolificidad, estacionalidad reproductiva, RCS, CC, contenido de vitamina E y A...?

Validación



Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

Panel de SNPs de asignación de paternidad

Panel abierto

192 SNPs

MTNR1A/GDO

PRNP/scrapie

GDF9

FecX^R / ROA

KISS1R

**159 SNPs para la
asignación de
paternidad**

TMEM154

GHR

LEPR

SOCS2

FST

33 SNPs funcionales

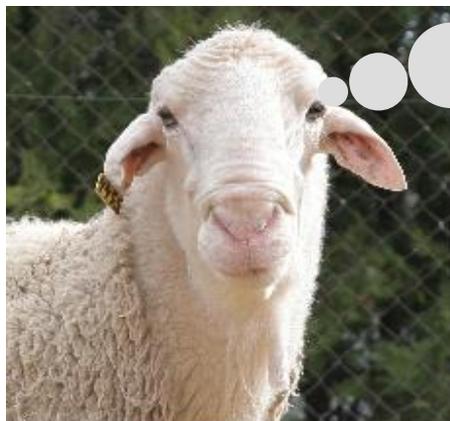


Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de las razas ovinas y bovinas de Teruel

5 de diciembre de 2018



Asociación de Criadores de Ovino de Raza Cartera



¡¡Seleccionando la mejor oveja en base a sus genes!!



UNION EUROPEA
Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Construyendo Europa desde Aragón

