



# Desarrollo de un panel de SNPs para la asignación de paternidad aplicado a los programas de mejora y conservación de razas ovinas de carne del Noreste de España

Calvo, J.H.<sup>1-2</sup> (jhalcalvo@aragon.es), Serrano, M.<sup>3</sup>, Tortereau, F.<sup>4</sup>, Sarto, P.<sup>2</sup>, Jiménez, M.A.<sup>3</sup>, Iguacel, L.P.<sup>2</sup>, Folch, J.<sup>2</sup>, Alabart, J.L.<sup>2</sup>, Fabre, S.<sup>4</sup> y Lahoz, B.<sup>2</sup>

## Resumen

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un panel de SNPs para la asignación de paternidad 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 Bilibilitana, 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 varió entre  $8,81 \times 10^{-67}$  (Cartera) y  $2,29 \times 10^{-64}$  (Roya Bilibilitana). La probabilidad de exclusión de un solo progenitor (PE1), o los dos progenitores (PE2) fue prácticamente 1 en todas las poblaciones. Finalmente, este panel fue testado en las razas Rasa Aragonesa, Navarra, Ansotana y Cartera mediante tecnología KASP usando un panel de 192 SNPs que incluyen los 159 SNPs para la asignación de paternidad y 33 SNPs funcionales (*PrnP*, *BMP15*, *MTNR1A*...).

**Palabras clave:** ovino de carne, paternidad, SNP, progreso genético.

1 ARAID, Av. de Ranillas 1-D. 50018 Zaragoza, España.

2 CITA-IA2, Producción y Sanidad animal, Av. Montañana 930. 50059 Zaragoza, España.

3 INIA, Mejora Genética Animal, Ctra. La Coruña km 7.5. 28040 Madrid, España.

4 Université de Toulouse, INRA, ENVT, GenPhySE, Chemin de Borde Rouge. 31326 Castanet-Tolosan, Francia.

## Introducción

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.). En la actualidad hay descritos 4 paneles de SNPs para la asignación de paternidad: Australia (Bell *et al.*, 2013), Nueva Zelanda (Clarke *et al.*, 2014), Estados Unidos (Heaton *et al.*, 2014) y Francia (Tortereau *et al.*, 2017). El objetivo de este trabajo fue 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

## Material y métodos

En total se ha llevado a cabo la extracción de ADN mediante métodos estándar de 260 muestras distribuidas de la siguiente manera: Rasa Aragonesa (n=38), Navarra (n=39), Ansotana (n=41), Xisqueta (n=41), Churra Tensina (n=38), Maellana (39), y Roya Bilbilitana (n=24). Igualmente, se extrajo ADN de 11 dúos (padre-cordero) y 3 tríos (padre-madre-cordero) realizándose una asignación de paternidad mediante 19 *loci* microsatélites: *CSRD247*, *FCB20*, *HSC*, *ILSTS005*, *ILSTS008*, *ILSTS11*, *INRA006*, *INRA063*, *INRA132*, *INRA172*, *INRA23*, *INRA49*, *MAF214*, *MAF65*, *McM42*, *OarAE129*, *OarCP49*, *SPS113*, y *SPS115*.

Finalmente, las muestras de ADN fueron genotipadas en Xenética Fontao (España) con el chip “Ovine SNP50 Bead Array (50K)”. Se utilizó el programa PLINK para extraer los datos de los SNPs presentes en los paneles descritos en otros países,

y para los filtrados de calidad de los genotipados, equilibrio Hardy Weinberg, y frecuencia del alelo menos común (MAF). Para estudiar la eficiencia de la asignación se calculó la probabilidad de exclusión conociendo un solo progenitor (PE1), es decir, qué probabilidad hay de que una vez asignado el padre, este no sea el correcto; la probabilidad de exclusión conociendo los dos progenitores (PE2), lo mismo que el anterior, pero asignando a los dos posibles progenitores; y la probabilidad de identidad ( $P_i$ ) que es la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar sean idénticos para estos marcadores (Schütz *et al.*, 2015).

La validación a mayor escala mediante genotipado con tecnología KASP (LGC, Biotools, España) se realizó en 1800 animales pertenecientes a las razas Rasa Aragonesa, Navarra, Ansotana y Cartera. El programa CERVUS se utilizó para la asignación de paternidad.

## Resultados y discusión

Estudios previos llevados a cabo por Tortereau *et al.* (2017) indicaban que el panel de 249 SNPs utilizado para la asignación de paternidad en razas francesas presentaba un valor de MAF medio alto en razas del Suroeste de Europa y especialmente en razas españolas (con un MAF medio de alrededor del 0,4 en Rasa Aragonesa, Merino, Churra, Castellana y Ojalada), según los datos disponibles del proyecto “SheepHapmap” (Kijas *et al.*, 2012). En este sentido, se extrajeron los datos de genotipado de los 249 SNPs del panel francés y los 161 SNPs del panel americano (Heaton *et al.*, 2015) del chip “Ovine SNP50 Bead Array (50K)”. Se estudió el MAF medio de ambos paneles encontrando una variabilidad similar entre las razas del presente estudio y alta para los dos paneles, pero superior para el panel francés. En concreto sus MAF medios fueron de 0,41 y 0,39 para el panel francés y americano, respectivamente. Sin embargo, los resultados de  $P_i$  y de PE fueron mejores para el panel francés, usando similar número de SNPs. Así, se decidió utilizar los SNPs del panel francés pero eliminando los SNPs que no cumplieren los siguientes criterios:

- Presentar herencia mendeliana, validándose a partir de los dúos y tríos.
- Porcentaje de individuos genotipados por SNP superior al 97%.
- Existencia de equilibrio Hardy Weinberg ( $P > 4,5 \cdot 10^{-6}$ ).
- MAF igual o superior a 0,3 en las 9 razas.
- Distribución uniforme por el genoma, separándose los SNPs en al menos 15 Mb, para reducir el número de SNPs en desequilibrio de ligamiento.

Finalmente, se seleccionaron 159 SNPs que cumplieran estos requisitos, los cuales presentaban un MAF medio 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 fuesen idénticos para estos marcadores varió entre  $8,81 \times 10^{-67}$  (Cartera) y  $2,29 \times 10^{-64}$  (Roya Bilbilitana). La probabilidad de exclusión de un solo progenitor (PE1), o dos progenitores (PE2) fue prácticamente 1 en todas las poblaciones (por ejemplo:  $1-PE1=2,49 \times 10^{-9}$ ;  $1-PE2=2,85 \times 10^{-23}$  para la raza Cartera). Estos valores fueron bastante mejores que los obtenidos en el panel americano, proporcionando una potencia muy elevada para poder discriminar casos de animales muy emparentados.

No hubo diferencias de asignación entre el panel de SNPs y el panel de microsátelites. 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, Anso-tana y Cartera.

## Conclusión

Se ha puesto a punto un panel de SNPs eficaz en un grupo de razas ovinas españolas, comprobando su utilidad a mayor escala mediante genotipado con tecnología KASP en muestras procedentes de ganaderías de diferentes razas. Las discrepancias entre algunos de los resultados de asignación de paternidad informados por las asociaciones y los encontrados por ADN 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 o de conservación.

## Agradecimientos

Financiado con fondos FEDER a través del programa Interreg V-A POCTE-FA 2014-2020 (Proyecto PIRINNOVI-EFA103/15) y el Fondo de Inversiones de

Teruel (FITE; proyectos TerInnOvi 2016 y2017), y con fondos del Gobierno de Aragón (Grupo SAGAS Ref. A14\_17R). Agradecemos la colaboración de las asociaciones en la selección y toma de muestras: Equipo Técnico Veterinario de UPRA-Grupo Pastores, ARANA, ARAMA, ACOAN, AGROBI, ARACOXI, ATURA, AGROJI y ANGORCA.

## Referencias bibliográficas

- BELL, A.M.; HENSHALL, J.M.; GILL, S.; GORE, K.; KIJAS, J.W. 2013. Success rates of commercial SNP based parentage assignment in sheep. En Proceedings of the 20<sup>th</sup> Conference of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics, Nueva 278-281.
- CLARKE, S.M.; HENRY, H.M.; DODDS, K.G.; JOWETT, T.W.D.; MANLEY, T.R.; ANDERSON, R.M. *et al.* 2014. A high throughput single nucleotide polymorphism multiplex assay for parentage assignment in New Zealand sheep. PLoS One, 9: e93392.
- HEATON, M.P.; LEYMASTER, K.A.; KALBFLEISCH, T.S.; KIJAS, J.W.; CLARKE, S.M.; MCEWAN, J. *et al.* 2014. SNPs for parentage testing and traceability in globally diverse breeds of sheep. PLoS One, 9: e94851
- KIJAS, J.W.; LENSTRA, J.A.; HAYES, B.; BOITARD, S.; PORTO NETO, L.R.; SAN CRISTOBAL, M. *et al.* 2012. Genome-wide analysis of the World's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. PLoS Biology, 10: e1001258.
- SCHÜTZ, E.; BREINIG, B. 2015. Analytical and statistical consideration on the use of the ISAG-ICAR-SNP bovine panel for parentage control, using the Illumina BeadChip technology: example on the German Holstein population. Genetics Selection and Evolution, 47: e3.
- TORTEREAU, F.; MORENO, C.R.; TOSSER-KLOPP, G.; SERVIN, B.; RAOUL, J. 2017. Development of a SNP panel dedicated to parentage assignment in French sheep populations. BMC Genetics, 18: e50.

## Development of a SNP parentage assignment panel in some North-eastern Spanish meat sheep breeds

### Summary

Accurate pedigree information is an essential tool in genetic breeding programs to ensure the highest rate of genetic gain and in conservation programs to avoid inbreeding. The objective of this study was to develop a SNP assay to use in some North-Eastern Spanish meat sheep populations for accurate pedigree assignment. Two hundred and sixty animals from nine sheep breeds were sampled: Rasa Aragonesa, Navarra, Ansotana, Xisqueta, Churra Tensina, Maellana, Roya Bilbilitana, Ojinegra and Cartera. We used SNP genotypes from the Illumina Ovine SNP50 BeadChip array. In total, 159 SNPs in Hardy-Weinberg equilibrium, displaying a MAF >0.3 and a call rate >0.97 in all the nine populations, and not associated with Mendelian errors in verified family trios or duos were selected. The average MAF was

0.43. The probability ( $P_i$ ) that two randomly selected individuals had identical genotypes within breed was very low (from  $8.81 \times 10^{-67}$  to  $2.29 \times 10^{-64}$  in Cartera and Roya Bilbilitana populations, respectively). The exclusion probabilities of either one or the two randomly selected parent(s) were close to 1 in all populations. The parentage assignment procedure was tested using KASP technology for genotyping in a final panel of 192 SNPs that included other functional SNPs (*PrnP*, *BMP15*, *MTNR1A*...).

*Keywords:* meat sheep, SNP, parentage assignment.