

D. Jorge Hugo Calvo Lacosta con DNI 25.453.882-N, investigador ARAID, responsable del Laboratorio de Genética molecular animal del Centro de Investigación y Tecnología agroalimentaria de Aragón (CITA),

## INFORMA

Según el contrato de investigación entre La Asociación de Ganaderos de Ovino de Raza Ojinegra de Teruel y el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón para el desarrollo del trabajo “GENOTIPADO DE MUESTRAS DE RAZA OJINEGRA DE TERUEL MEDIANTE UN PANEL DE 192 SNPs PARA PARA LLEVAR ACABO FILIACIONES Y GENOTIPADO DE GENES DE INTERÉS COMO EL DE RESISTENCIA A SCRAPIE Y OTROS” se ha realizado el análisis de 1232 muestras para la filiación y genotipados de genes de interés en la producción ovina (scrapie, clásico y atípico, estacionalidad reproductiva, precocidad sexual, crecimientos, y otros).

La metodología usada para el citado análisis ha sido mediante tecnología KASP (Kompetitive Allele Specific PCR or KBioscience Competitive Allele Specific PCR) usando un panel de 192 SNPs que incluyen los 159 SNPs para la asignación de paternidad y 33 SNPs funcionales (*PrnP*, *BMP15*, *MTNR1A*...), descrita en el artículo de Calvo, J.H., Serrano, M., Tortereau, F., Sarto, P., Jiménez, M.A., Iguacel, L.P., Folch, J., Alabart, J.L., Fabre, S. y Lahoz, B. 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. SEOC 2018. Zaragoza.

En el ANEXO I se realiza una descripción del panel de SNPs utilizados y cómo se han seleccionado los diferentes SNPs.

Y para que así conste, se firma el presente documento, en Zaragoza, a 04 de marzo de 2022.

  


Jorge Hugo Calvo Lacosta  
([jhcalvo@aragon.es](mailto:jhcalvo@aragon.es); tel. 976716471)



CITA-Aragón. Avda. Montañana, 930. 50.059-Zaragoza. Spain

**ANEXO  
RESUMEN**

**“GENOTIPADO DE 1.232 MUESTRAS DE RAZA OJINEGRA DE TERUEL MEDIANTE UN PANEL DE 192 SNPs PARA LLEVAR ACABO FILIACIONES Y GENOTIPADO DE GENES DE INTERÉS COMO EL DE RESISTENCIA A SCRAPIE Y OTROS”**

El sector ovino ha de basar su sostenibilidad futura en la incorporación permanente de nuevas tecnologías que le permita mejorar su rentabilidad, bien por un incremento de la producción, por una reducción de los costes productivos o lograr productos capaces de diferenciarse en el mercado, a partir de la mejora de eficiencias, productos y procesos. Una de estas nuevas tecnologías es el uso de la genómica aplicada a los esquemas de selección. Los programas de mejora genética tradicionales han permitido generar un importante progreso sobre todo para caracteres productivos. 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. En el proceso de selección genética, algunos de los mejores animales están genéticamente emparentados dado que provienen de las mismas familias de machos, reduciéndose de esta manera la variabilidad genética de la población y dando origen a individuos consanguíneos. Además, 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.), además de ser muy variable en función de los criterios de selección.

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, o polimorfismos de un solo nucleótido, a nivel internacional para

llevar a cabo las asignaciones de paternidad. Estos polimorfismos son más estables, es más fácil de estandarizar entre laboratorios, y presentan mayor cobertura por todo el genoma tanto en regiones codantes, que codificarán para proteína, como en regiones no codantes que son las más abundantes del genoma, como pueden ser espacios intergénicos, o regiones intrónicas. Además, presentan una característica que los hace de elección en nuestro estudio y es que son muy versátiles a la hora de sustituir SNPs poco informativos para paternidad por otros más informativos, y de añadir polimorfismos funcionales asociados a caracteres de interés económico o de eficiencia en las producciones. De este tipo de polimorfismos destacaríamos los SNPs de resistencia al scrapie, los relacionados con prolificidad, estacionalidad reproductiva y otras enfermedades hereditarias en ovino entre otros.

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).

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 variabilidad medio alto en razas del Suroeste de Europa y especialmente en razas españolas (con un MAF (frecuencia del alelo menos frecuente) medio de alrededor del 0,4 en Rasa Aragonesa, Merino, Churra, Castellana y Ojalada), según los datos disponibles del proyecto “SheepHapmap”, que es un consorcio internacional ovino (Kijas et al., 2012), en el cual participa el CITA. De esta forma, 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, llevados a cabo con la financiación obtenida en los proyectos “Innovación técnica y eficiencia productiva de las explotaciones de razas ovinas autóctonas del territorio pirenaico para mejorar su viabilidad (PIRINNOVI-POCTEFA\_Intereg)” y “Innovación técnica aplicada a la conservación y mejora de la eficiencia productiva de las razas ovinas autóctonas de Teruel. (TerInnOvi2017)”, y con las muestras cedidas por las asociaciones que controlan los libros

genealógicos de las citadas razas, se extrajeron los datos de los SNPs presentes en los paneles descritos en otros países, realizando diversos filtrados de calidad: equilibrio Hardy Weinberg, nº mínimo de SNPs genotipados, 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).

En total se ha llevado a cabo la extracción de ADN mediante métodos estándar de 260 muestras de las razas Rasa Aragonesa, Navarra, Churra Tensina, Ansotana, Xisqueta, Roya Bilbilitana, Maellana, Ojinegra y Cartera. 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*.

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.

Centrándonos en el panel francés, 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 cumplían 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  $6,41 \times 10^{-68}$  (Ojinegra) 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). En la raza Ojinegra estos valores fueron de 0,43,  $6,41 \times 10^{-68}$ ,  $3,74 \times 10^{-9}$ , y  $2,94 \times 10^{-23}$  para 1 MAF,  $P_i$ ,  $1-PE1$  y  $1-PE2$ , respectivamente. 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 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 clásico y atípico (*PrnP*), prolificidad (*GDF9*, *BMP15*), estacionalidad reproductiva (*MTNR1A*), precocidad sexual (*IGFR1*, *LEPR*, *Kiss1*, *Kiss1R*), y otros, 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 validó el 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. Los resultados mostraron que en aquellas explotaciones en las que se enviaron muestras de sangre y declararon el 100% de los posibles padres, el porcentaje de asignación de las corderas. Además, en la misma analítica se genotipo el gen *PrnP* para los alelos clásicos de resistencia al scrapie y atípico, genes de prolificidad, de estacionalidad reproductiva, de crecimiento, etc., que una vez validados en la población de Ojinegra podrán ser utilizados en la selección asistida por marcadores (MAS) para la preselección de reproductores para los alelos favorables para los diferentes caracteres de interés.

Genes funcionales:

## RESISTENCIA

### Scrapie

Riesgo	Genotipo	Individuo	Progenie primera generación
R1	ARR/ARR	Muy bajo riesgo	Bajo riesgo
R2	ARR/AHQ AHQ/AHQ	Bajo riesgo	Bajo riesgo
R3	<u>ARR/ARQ</u> <u>ARR/ARH</u>	Bajo riesgo	Algunos individuos pueden tener riesgo según el otro progenitor
R4	<u>ARQ/ARQ</u> <u>AHQ/ARH</u> <u>ARH/ARH</u> <u>ARQ/ARH</u> <u>AHQ/ARQ</u>	Riesgo ocasional	Una alta proporción de individuos pueden tener riesgo, dependiendo del otro progenitor
R5	ARR/VRQ VRQ/AHQ VRQ/ARQ VRQ/ARH VRQ/VRQ	Alto riesgo	Alto riesgo

Hunter N, Goldmann W, Foster JD, Cairns D, Smith G Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British

### Scrapie Atípico

Scrapie atípico	L más resistente que F a scrapie atípico.
-----------------	---

Ana B Rodríguez-Martínez, Joseba M Garrido, Sonia Maza, Leyre Benedicto, Mariví Geijo, Nieves Gómez, Esmeralda Minguijón, Sylvie L Benestad and Ramón A Juste. 2010. Atypical/Nor98 scrapie in the Basque Country: a case report of eight outbreaks. BMC Veterinary Research 6:17 <https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-17>

Moum T, Olsaker I, Hopp P, Moldal T, Valheim M, Benestad SL. 2005. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. J Gen Virol 86:231–5 [10.1099/vir.0.80437-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.80437-0)

## Resistencia Lentivirus/MAEDI

TMEM154		
	E	Susceptible a la infección por lentivirus del subgrupo 2 en Europa
	K	Resistente a infección por lentivirus del subgrupo 2 en Europa
	E	Susceptible a la infección por lentivirus del subgrupo 1 (en Usa y Suiza)
K	Resistente a infección por lentivirus del subgrupo 1 (en Usa y Suiza)	

Heaton et al. 2012. Reduced Lentivirus Susceptibility in Sheep with TMEM154 Mutations. PLOSone; <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002467>

Sider et al. 2013. Small ruminant lentivirus genetic subgroups associate with sheep TMEM154 genotypes. Vet Res. 2013; 44(1): 64..

## Recuento Células Somáticas/Resistencia Mastitis

### RCS/mastitis\_SOCS2

SOCS2	NN	Normal
	RN	Resistencia intermedia a las mastitis/asociado RCS intermedia
	RR	Resistente a las mastitis/asociado a menor RCS

Rupp R, Senin P, Sarry J, et al. A Point Mutation in Suppressor of Cytokine Signalling 2 (Socs2) Increases the Susceptibility to Inflammation of the Mammary Gland while Associated with Higher Body Weight and Size and Higher Milk Production in a Sheep Model. PLoS Genet. 2015;11(12):e1005629. Published 2015 Dec 11. doi:10.1371/journal.pgen.1005629

### RCS/mastitis\_OAR19\_1

NUP10	NN	Normal
	RN	Resistencia intermedia a las mastitis/asociado RCS intermedia
	RR	Resistente a las mastitis/asociado a menor RCS

Oner Y., Serrano M., Ramón M., Sarto P., Iguacel L. P., Joy Torrens M., Blanco M., Estrada O., Juan T., Calvo J. H. (2019). "Genome-wide association studies for somatic cell count in Assaf breed". 37th International Society for Animal Genetics Conference. ISAG 2019. Lleida, 7 al 12 de julio de 2019, 2019.

### RCS/mastitis\_OAR19\_1

ARPP2	NN	Normal
	SN	Resistencia intermedia a las mastitis/asociado RCS intermedia
	SS	Sensible a las mastitis/asociado a mayor RCS

Oner Y., Serrano M., Ramón M., Sarto P., Iguacel L. P., Joy Torrens M., Blanco M., Estrada O., Juan T., Calvo J. H. (2019). "Genome-wide association studies for somatic cell count in Assaf breed". 37th International Society for Animal Genetics Conference. ISAG 2019. Lleida, 7 al 12 de julio de 2019, 2019.



# PROLIFICIDAD

<b>FecXR/ROA</b>	Hembras	
	Normal	Normal
	Roa	Prolífica
	Esteril	Estéril
	Machos	
	Normal	Normal
	ROA	Prolífica

Martinez-Royo A., Jurado, J.J., Smulders, J.P., Martí, J.I., Alabart, J.L., Roche, A., Fantova E., Bodin L., Mulsant P., Serrano, M., Folch, J., y Calvo, J.H. 2008. A Deletion in Bone Morphogenetic Protein 15 Gene (BMP15) causes Sterility and increased Prolificacy in Rasa aragonesa Sheep. *Animal Genetics* 39 (3): 294- 297. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2008.01707.x

<b>FecXRa/ROA2</b>	Hembras	
	Normal	Normal
	ROA2	Prolífica
	Esteril	Estéril
	Machos	
	Normal	Normal
	ROA2	Prolífico

<b>FecXGr/Grivette</b>	Hembras	
	Normal	Normal
	Grivette	Prolífica
	Hiperprolíficas	Hiperprolíficas
	Machos	
	Normal	Normal
	Grivette	Prolífico

Calvo JH, Chantepie L, Serrano M, Sarto MP, Iguacel LP, Jiménez MA, Alabart JL, Folch J, Fabre S, Lahoz B. 2020. A new allele in the BMP15 gene (FecXRA) that affects prolificacy co-segregates with FecXR and FecXGR in Rasa aragonesa sheep. *Theriogenology*. 144:107-111. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.010.

## ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA

### GDO/MNTR1A

<b>GDO/MNTR1A</b>	DD	Menos estacionales
	D+	Estacionalidad media
	++	NORMALES

Calvo, J.H., Serrano, M., Martinez-Royo, A., Lahoz, B., Sarto, P., Ibañez-Deler, A., Folch, J., Alabart, J.L. 2018. SNP rs403212791 in exon 2 of the MTNR1A gene is associated with reproductive seasonality in the Rasa aragonesa sheep breed. *Theriogenology*, 113, pp. 63-72. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.02.013

### LEPR

<b>LEPR/EX8</b>	EE	Estacionales
	E+	Estacionalidad media
	++	NORMALES
<b>LEPR/EX20</b>	EE	Estacionales
	E+	Estacionalidad media
	++	NORMALES

Lakhssassi K., Serrano M., Lahoz B., Sarto P., Iguacel L., Folch J., Alabart J. L., Calvo J. H. (2019). "Leptin receptor LEPR gene is associated with reproductive seasonality in Rasa Aragonesa sheep breed". 70th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science City of Ghent (Belgium), 26 - 30 Aug 2019, 2019

## ESTRÉS TÉRMICO

<b>hsp90aa1</b>	HSR	RESISTENTE AL ESTRÉS TÉRMICO Menor fragmentación del semen
	HSA	AFECTADO POR ESTRÉS TÉRMICO Mayor fragmentación del semen

Salcés-Ortiz J, Ramón M, González C, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ, Calvo JH, Serrano MM. 2015. Differences in the ovine HSP90AA1 gene expression rates caused by two linked polymorphisms at its promoter affect rams sperm DNA fragmentation under environmental heat stress conditions *PLoSOne* 10(2):e0116360. doi: 10.1371/journal.pone.0116360