IDENTIFICACIÓN DE REGIONES GENÓMICAS QUE REGULAN LA DETERMINACIÓN DEL SEXO EN SALMÓN ATLÁNTICO

Gabián[1], M., Fernández, A.I., Morán, P., Villanueva, B., Chtioui, A. y Saura, M.
[1]INIA, Crta. La Coruña Km 7,5, 28040 Madrid. saura.maria@inia.es

INTRODUCCIÓN

Visualmente, los salmones sólo pueden clasificarse como machos o hembras en la edad adulta, una vez que se manifiestan los caracteres sexuales secundarios. Sin embargo, la identificación temprana del sexo es de gran importancia en los planes de conservación y de mejora genética para controlar la proporción de sexos.

Los salmónidos presentan un mecanismo de determinación sexual sin cromosomas sexuales reconocibles, en el que el macho es el sexo heterogamético (Davidson et al., 2010). La investigación sobre el mapa genético de la determinación sexual en salmónidos es en general escasa, particularmente en el caso del salmón atlántico. Se ha sugerido que en la diferenciación sexual de estos peces, además de factores genéticos podrían estar involucrados también factores ambientales y epigenéticos (Martínez et al., 2014).

El objetivo de este estudio fue identificar regiones genómicas asociadas a la determinación del sexo en salmón atlántico. Para ello se utilizó un chip de SNPs (*Single Nucleotide Poymorphism*) de alta densidad, desarrollado recientemente para esta especie y se realizó un análisis de asociación del genoma completo (GWAS, *Genome-Wide Association Analysis*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se genotiparon muestras de 204 salmones adultos (95 machos y 109 hembras), procedentes de cinco ríos que cubren todo el rango de distribución de la especie en la Península Ibérica (Miño, Ulla, Sea, Urumea y Bidasoa) con el chip de SNPs de 220K (Aquagen/CIGENE). Se utilizaron filtros estándar de calidad para SNPs y muestras. El número final de SNPs y muestras disponibles para los análisis fue de 163.747 y 198, respectivamente.

Para detectar asociaciones entre los SNPs y el sexo se realizó un GWAS con el programa *GenAbel* (paquete estadístico R, GenABEL project developers, 2013). Se analizó cada SNP de manera independiente asumiendo un modelo binomial y corrigiendo para la estructura poblacional. Para corregir el valor de probabilidad para múltiples comparaciones, se utilizó el método gráfico *QQ-plot*, que representa desviaciones de los valores de probabilidad observados y esperados. Aquellos SNPs que mostraron una asociación significativa con el sexo, de acuerdo al umbral definido para el valor de *p* obtenido en el *QQ-plot*, se consideraron como candidatos para ser incluidos en regiones QTL. Estas regiones se definieron como segmentos del genoma que contenían, al menos, dos SNPs consecutivos separados a una distancia ≤ 1 Mb.

Con el objetivo de identificar los genes incluidos en cada región, se utilizó la secuencia del genoma de *Salmo salar,* cuyo genoma está organizado en 29 cromosomas de diferentes tamaños. Dicha secuencia está disponible en la base de datos del NCBI. Utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), se identificaron genes de interés por su relación con la determinación sexual. Mediante búsqueda directa, se identificaron los genes anotados en la secuencia de salmón atlántico que estaban contenidos o cerca (< 5 Mb) de regiones QTL. Se consideraron 5 Mb porque es la distancia a la cual el desequilibrio de ligamiento alcanza valores basales en estas poblaciones. A continuación y mediante búsqueda indirecta, se identificaron genes relacionados con la determinación del sexo descritas en especies próximas al salmón en la secuencia de *S. salar*, y se comprobó que estuvieran contenidos o cerca de regiones QTL. Del mismo modo, se compararon las regiones QTL que no contenían genes anotados con la base de datos del NCBI, para identificar genes asociados con el sexo en otras especies. Por último, para determinar la anotación funcional de los genes identificados se utilizaron bases de datos (*Swiss Prot*, *DAVID*) de diferentes taxones por similitud de secuencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectaron 324 asociaciones significativas (-log(*p*) > 2.8) con el sexo y 51 regiones QTL candidatas que contenían un total de 185 SNPs. En 20 de estas regiones se identificaron 26

genes relacionados con determinación o diferenciación sexual. Estos genes se mapearon en 14 de los 29 cromosomas de salmón atlántico (Tabla 1). En las 31 regiones restantes no se pudo detectar ningún gen directamente asociado con el sexo, aunque sí se identificaron 112 genes relacionados con mecanismos de transcripción y traducción que podrían estar implicados en la regulación de este proceso.

De entre los genes identificados, tres están implicados en la determinación sexual: *sdY*, *ctnb1* y *sf1*. El gen *sdY* (*sexually dimorphic on the Y-chromosome*) es el gen determinante del sexo específico de machos en trucha arcoíris, y se ha identificado en la mayoría de las especies de la familia de los salmónidos estudiados hasta la fecha (Yano et al., 2013). En salmón atlántico los estudios son escasos, y se ha visto cierta inestabilidad en la posición de este locus (Yano et al., 2013; Lubieniecki et al., 2015a). Eisbrenner et al. (2014) mapearon este gen en los cromosomas Ssa02, 03 y 06 en una población de salmón atlántico canadiense introducida en Tasmania. En el presente estudio hemos detectado similitud parcial de la secuencia de este gen en los cromosomas Ssa02, Ssa06, Ssa19 y Ssa21, dentro (o cerca) de regiones que resultaron significativas en el GWAS. Este resultado está en línea con la hipótesis de que la región determinante del sexo en salmónidos no está restringida a un único cromosoma y tiene la habilidad de translocarse entre cromosomas, no sólo entre especies sino dentro de la misma especie, como resultado de la alta densidad de ADN repetido en esta familia. El gen *ctnnb1* (*catenin beta 1*) se localiza en los cromosomas Ssa02 y Ssa13, en ambos casos a 1 Mb de una región QTL. Este gen actúa junto al gen *Rspo1* (*R-spondin 1*) (también en *Ssa02*) en la determinación y la diferenciación de los ovarios, de manera que ambos se activan en las células de estos órganos mediante la ruta de señalización de la insulina (Lubieniecki et al., 2015b). El gen *sf1* (*splicing factor 1*) se localiza en el cromosoma Ssa20 a 2 Mb de una región QTL. La anotación funcional reveló que se expresa tanto en ovarios como en testículos y está implicado en la regulación de la transcripción de la aromatasa, de la cual depende la proporción relativa de andrógenos y estrógenos (Schalburg et al., 2013).

En relación a los genes identificados que están relacionados con el desarrollo de las gónadas, los más interesantes se encontraron mayoritariamente en los cromosomas Ssa02 y Ssa06. En el cromosoma Ssa02 se identificaron los siguientes genes: (i) *cyp11b*, que regula la síntesis de andrógenos (también en Ssa05); (ii) *ctnnb1,* que interviene en la morfogénesis de las células implicadas en la diferenciación de los genitales (también en Ssa13); (iii) *tex10*, que se expresa en testículos y regula el inicio de la replicación del ADN; (iv) *Tekt2,* que está relacionado con la movilidad de los espermatozoides; (v) *Tdrp* y *Znf271,* que intervienen en la espermatogénesis; (vi) *Rspo1,* que regula la producción de células germinales masculinas e interviene en la meiosis; y (vii) *dnd*, que participa en el desarrollo de células germinales. Los genes identificados en el cromosoma Ssa06 fueron: (i) *col1a1,* que codifica para una cadena de colágeno que regula la fijación de las células germinales en los testículos y su posterior diferenciación; (ii) *Ppp1r9b*, que interviene en el comportamiento reproductivo del macho; (iii) *gopc*, que participa en la diferenciación del núcleo de los espermatozoides; (iv) *cited2*, que interviene en la diferenciación de las gónadas masculinas; (v) *gata4*, que participa en el desarrollo de las gónadas masculinas e interviene en la espermatogénesis; y (vi) *erα*, que participa en el desarrollo de las gónadas femeninas.

En resumen, en este estudio se ha explotado la información contenida en un chip de SNPs de alta densidad para realizar un mapeo de regiones asociadas con la determinación y diferenciación sexual en salmón atlántico. La señal detectada en el GWAS apoya que el gen *sdY* se localiza en el cromosoma Ssa02, aunque se sugieren otras localizaciones no descritas previamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Caviler, T.D. 1992. T. Am. Fish. Soc. 144: 423-430. • Davidson, W.S. 2010. Gen. Biol. 11:403 • Eisbrenner, W.D. 2014. Heredity 113:86-92 • Lubieniecki, K.P. 2015a. G3 5:2513-2522 • Lubieniecki, K.P. 2015b. Phys. Gen. 47:581-587 • Martínez, P. 2014. Front. Genet. 5:340 • Schalburg, K.R. 2013 Comp. Biochem. Physiol. B 164:236-246.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por el proyecto RZ2012-00011-CO2-01, en el marco del VI Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica. Agradecer la colaboración de la Xunta de Galicia (en particular a Pablo Caballero Javierre),

la Universidad de Oviedo (Eva García Vázquez) y el Gobierno de Navarra por la cesión de las muestras, y a Almudena Fernández (INIA) por la discusión del análisis estadístico.

Tabla 1. *Cromosomas que contienen genes dentro o cerca (< 5 Mb) de regiones QTL (asociadas significativamente al sexo en el GWAS). Entre paréntesis se identifica el número de SNPs incluido en cada región.*

Cromosoma	Genes
Ssa02	*cyp11b* (4), *ctnnb1* (4), *tex10* (4), *Tekt2* (7), *Tdrp* (4), *Rspo1* (4), *dnd* (11), *sdY* (11), *Znf271* (2)
Ssa04	*slbp2* (2)
Ssa05	*cyp11b* (2)
Ssa06	*col1a1* (2), *Ppp1r9b* (2), *gopc* (6), *cited2* (6), *sdY* (6), *gata4* (2), *erα* (2)
Ssa12	*Tex264* (2), *fancd2* (2)
Ssa 13	*ctnnb1* (5)
Ssa 15	*ncoa1* (6), *pgm3* (4), *erβ* (4)
Ssa 18	*Fmn2* (2)
Ssa19	*sdY* (9)
Ssa 20	*sf1* (4)
Ssa21	*sdY* (9)
Ssa 27	*spag1a* (2)
Ssa 28	*fshr* (2)
Ssa 29	*Ptchd3* (2)

IDENTIFICATION OF GENOMIC REGIONS REGULATING SEX DETERMINATION IN ATLANTIC SALMON

ABSTRACT: Early sex determination and differentiation are fundamental in wild and aquaculture populations. Although salmonids are male heterogametic, morphologically distinguishable sex chromosomes are not generally found. In this study we used high-density SNP data from populations of Spanish Atlantic salmon in a genome wide association analysis (GWAS) to identify genomic regions involved in sex determination and differentiation. Gender registers and genotypes from a 220K SNP chip were available for 204 samples. A total of 185 significant associations were detected in the GWAS and considered to be included in putative QTL regions. In total, 51 QTL regions were identified. Functional annotation revealed that 26 genes contained in these regions were directly associated to sex determination or gonad differentiation. Most of them mapped to chromosomes Ssa02 and Ssa06. Candidate genes to be responsible of sex differentiation are proposed, including the *sdY* gene that is the master male-specific sex-determining gene in most salmonids, the *ctnb1* gene that participates in the determination and differentiation of the ovary, and the *sf1* gene that expresses both in testis and ovary, regulating the transcription of aromatase gene. To our knowledge, this is the first study investigating the genetic basis of sex determination in Atlantic salmon from genomic data.

Keywords*:* Atlantic salmon, sex-determination, *sdY*, SNP-array