ANÁLISIS GWAS DE CARACTERES RELACIONADOS CON LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN RASA ARAGONESA MEDIANTE EL CHIP DE MEDIA Y ALTA DENSIDAD

Lakhssassi, K. [1], Lahoz, B. [1], Sarto, P. [1], Iguacel, L. P. [1], Folch, J.[1], Alabart, J.L.[1], Ramón, M.[2], Calvo, J.H.[1,3] y Serrano, M. [4]

[1] CITA-IA2. Av. Montañana 930, 50059, Zaragoza, España. [2] IRIAF. Cersyra-Valdepeñas, Av. del Vino 10, 13300, Ciudad Real, España [3] ARAID. Av. Ranillas I-D, 50018, Zaragoza, España. [4] INIA. Ctra. de La Coruña km 7,5. 28040 Madrid, España.

INTRODUCCIÓN

La estacionalidad reproductiva en ovino de carne provoca una variación de la oferta-demanda de corderos a lo largo del año que da lugar a precios muy bajos en primavera, cuando hay más oferta de corderos, y muy altos en otoño, cuando la oferta es mucho menor (Fantova y Casas, 2010). Esto afecta en gran medida a la economía de los agricultores, los consumidores y la industria alimentaria. Para hacer frente a esta situación, se están empleando tratamientos hormonales como implantes de melatonina, progestágenos+eCG y otras técnicas, que tienen como fin forzar la reproducción en contra-estación y así homogenizar la producción de corderos a lo largo del año. Sin embargo, la UE limita de forma creciente el uso de productos hormonales en la producción animal. De hecho, el uso de estos tratamientos está ya prohibido en las ganaderías ecológicas. Existe, por tanto, la necesidad de identificar métodos alternativos eficaces. Una posibilidad, es el uso de estrategias genéticas que nos permitan detectar genes asociados a la estacionalidad reproductiva para seleccionar los animales más fértiles en época de anestro estacional que contribuyan a incrementar la eficiencia y rentabilidad de las explotaciones.

En consecuencia, el objetivo principal de este trabajo es el estudio de asociación de genoma completo (GWAS) con el fin de identificar nuevos SNPs y genes asociados a la estacionalidad reproductiva en ovejas de Rasa Aragonesa mediante chips de SNPs de media (50K) y alta densidad (680K) de *Illumina Ovine Beadchip*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Datos. En este estudio se utilizaron 205 ovejas Rasa Aragonesa pertenecientes a la granja experimental de Ayés (Huesca) de Oviaragón: 108 de ellas genotipadas con el chip de 50K (Illumina OvineSNP50 BeadChip) y 97 con el chip de 680K (Illumina AgResearch Sheep HD de 680 K). Desde enero hasta septiembre se tomaron datos de peso y condición corporal (CC) cada 3 semanas, así como una muestra de plasma sanguíneo para medir la concentración de progesterona semanalmente. Igualmente, durante todo el periodo se controló la actividad sexual de las hembras mediante detección de celos por machos vasectomizados provistos de arneses con pastillas marcadoras. Los caracteres analizados fueron los fenotipos relacionados con la estacionalidad reproductiva en ovejas descritos por Martinez-Royo et al. (2017): número total de días de anestro (DTA); ciclicidad por progesterona (CiP4) y ciclicidad por celos (CiCe). Brevemente, DTA serían los días totales de anestro reproductivo para cada oveja, considerando como tales aquellos periodos con 3 o más medidas de progesterona por debajo del umbral de actividad ovárica, situado en 0,5 ng/ml. CiP4 sería el porcentaje de meses cíclicos por progesterona, considerando un mes cíclico para cada oveja aquel en el que al menos hay una medida de concentración de progesterona superior al umbral de actividad ovárica. Por último, CiCe se correspondería al porcentaje de meses cíclicos por celos, considerando un mes cíclico para cada oveja aquel en el que ha mostrado al menos un celo.

Análisis. Se utilizó el software Plink1.9 (Chang et al., 2015) para la edición y filtrado de calidad de los datos y el programa Beagle4.0 (Browning y Browning, 2007) para la imputación. Para la detección de regiones genómicas asociadas a los caracteres estudiados en ese trabajo, se realizó un análisis de asociación a genoma completo (GWAS) con el programa GCTA (Genome-wide Complex Trait Analysis) (Yang et al., 2011) a nivel genómico usando un modelo lineal mixto (MLMA) y cromosómico con el MLMA-LOCO (leaving-one-chromosome-out) incluyendo la edad como covariable discreta y la CC y peso como covariables cuantitativas. El análisis GWAS se llevó a cabo bajo distintos escenarios: 1) análisis con SNPs de 50k y 680k imputados; 2) análisis con solo los SNPs comunes entre los chips de 50k y 680k; 3) análisis únicamente con los SNPs de 680k. Tras el control de calidad quedaron

disponibles para el estudio GWAS un total de 583.882 SNPs y 205 animales; 41.012 SNPs y 205 animales; 567.387 SNPs y 97 animales, respectivamente para cada escenario. Los p-valor fueron corregidos mediante Bonferroni y FDR (False Discovery Rate, Benjamini y Hochberg, 1995) a nivel genómico y cromosómico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con MLMA y LOCO fueron muy similares. No se encontraron resultados significativos a nivel genómico, pero sí a nivel cromosómico con una FDR del 10%. Los SNPs significativos fueron distintos en los tres análisis realizados (Tabla 1).

Los SNPs del cromosoma 23 aparecen para los 3 caracteres en el escenario 1 y solo para el carácter CiCe en el escenario 3. Estos SNPs se encuentran cercanos al gen *CD226* que en humano se ha relacionado con enfermedades reproductivas como el teratoma quístico ovárico y teratoma maduro del ovario. El SNP s20800.1 del cromosoma 15 fue significativo para DTA y CiP4 en el escenario 2, mientras que el SNP oar3_OAR15_2070855 del mismo cromosoma se encuentra asociado con DTA en el escenario 3. Por otro lado, los SNPs del cromosoma 4 significativos para CiP4 están a 34kb del gen *NPY* (Neuropeptide Y) que influye en muchos procesos fisiológicos, incluyendo los ritmos circadianos, anorexia y pérdida de peso. Clarke et al. (2005) determinaron que el *NPY* estimula el consumo de alimento e inhibe la reproducción en la oveja. Esto explicaría uno de los mecanismos neuroendocrinos y fisiológicos que integran la nutrición con la reproducción.

La divergencia de resultados significativos se puede explicar por la escasa potencia del estudio debido al limitado número de animales analizados. Se recomienda ampliar el tamaño muestral para validar los resultados obtenidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Benjamini, Y. & Hochberg, Y. 1995. J. R. Statist. Soc. B, 57, 289–300. • Browning, SR. & Browning, BL. 2007. Am. J. Hum. Genet. 81: 1084-1097. • Chang, C.C. et al. 2015. GigaScience 4 (www.cog-genomics.org/plink/1.9/). • Clarke, I.J., Backholer, K. & Tilbrook, A.J. 2005. Endocrinology. 146: 769-775.• Fantova, E. & Casas, J.P. 2010. Albeitar 141: 8-9 • Martinez-Royo, A., Alabart, J.L., Sarto, P., Serrano, M., Lahoz, B., Folch, J. & Calvo. 2017. Theriogenology 99:21-29 • Yang, J. et al. 2011. Am. J. Hum. Genet. 88(1): 76-82.

Agradecimientos: Financiado con fondos FEDER, los proyectos INIA RTA2013-0041 y RTA2015-0090, y el Gobierno de Aragón (Grupo SAGAS Ref. A14_17R). K. Lakhssassi está financiada por un contrato para la formación de doctores del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidad (BES-2017-080154). Al Equipo Técnico Veterinario de UPRA-Grupo Pastores en la selección y toma de muestras.

GWAS OF REPRODUCTIVE SEASONALITY TRAITS IN RASA ARAGONESA THROUGH THE MEDIUM AND HIGH-DENSITY CHIPS

ABSTRACT: The aim of this study was to identify genomic regions influencing 3 reproductive seasonality traits in the Rasa Aragonesa sheep breed: total days of anoestrus (DTA), the progesterone cycling months (CiP4) and the oestrus cycling months (CiCe). A total of 205 ewes were included in this study: 108 of them were genotyped with the 50K chip and 97 with the 680K *Illumina Ovine Beadchip*. GWAS was carried out under different scenarios: 1) analysis with imputed SNPs of 50K and 680K; 2) analysis with the common SNPs between the 50K and 680K chips; 3) analysis with SNPs of the 680K chip only. We used the MLMA and the MLMA-LOCO of GCTA software for the association analysis. Different SNPs reached the chromosome-wide threshold significance level depending on the analysis method and the analyzed trait. CD226 and NPY genes were the most important candidate genes. The first one is related to reproductive diseases such as cystic ovarian teratoma and mature ovarian teratoma in human and the other one influences many physiological processes, including circadian rhythms, anorexia and weight loss. The divergence of significant results can be explained by the low power of the study due to the limited number of animals analyzed. It is recommended to enlarge the sample size to validate the results obtained.

Keywords*:* seasonality, Rasa Aragonesa, GWAS, GCTA

Tabla 1. *SNPs significativos a nivel cromosómico (FDR 10%) asociados con cada rasgo de esta con los SNPs de los chips de 50k y 680k imputados; 2) análisis con los SNPs comunes entre lo del chip de 680k.*

	Escenario1		Escenario2	
	Chr	**SNP**	**Chr**	**SNP**
DTA	23	oar3_OAR23_7427625	11	s30798.1
			11	s68143.1
			15	s20800.1
			26	OAR26_2545550.1
CiP4	4	oar3_OAR4_71540823	15	s20800.1
	4	oar3_OAR4_71552651	20	OAR20_3201268.1
	6	oar3_OAR6_114690755		
	7	oar3_OAR7_87670575		
	23	oar3_OAR23_7427625		
CiCe	18	oar3_OAR18_19470396	12	OAR12_27129992.1
	23	oar3_OAR23_7427625	27	s05401.1
	23	oar3_OAR23_7428353		
	23	oar3_OAR23_48239663		