

Exclusión de paternidad mediante un panel de 89 marcadores SNP en una muestra de ovinos Corriedale y Merino de Uruguay

F. Macedo¹, N. Grasso², E.A. Navajas², D. Gimeno³ y G. Ciappesoni²

¹Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay
Recibido Agosto 12, 2013. Aceptado Noviembre 04, 2013.

Exclusion of paternity based on a panel of 89 SNP markers in a sample of Corriedale and Merino sheep from Uruguay

Abstract. The performance of an 89 single nucleotide polymorphism (SNP) marker panel for paternity exclusion was studied in populations of Corriedale and Merino sheep in Uruguay. Minor allele frequency (MAF) values of the markers ranged from 0.05 to 0.5 for Corriedale and from 0.08 to 0.5 for Merino. Using fewer than 50 markers, high probability values (0.9999) were achieved for excluding both parents and also when one of the parents was known. In the most common case of paternity exclusion, when only the genotype of a possible parent is given and the mother is unknown, achieving a probability value of 0.9999 involved almost all the markers for Merino and it was not possible to reach that level for Corriedale (maximum value = 0.9998). These results suggest that the panel could be useful with Corriedale and Merino populations. However, it may be insufficient to establish paternity in highly related populations. For that reason, development of an SNP panel for paternity exclusion under more complex situations is suggested.

Key words: Parentage, Pedigree, SNP, Sheep

Resumen. Se estudió el desempeño de un panel de 89 marcadores del tipo polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) para la exclusión de paternidad en poblaciones de ovinos Corriedale y Merino del Uruguay. El valor de la menor frecuencia alélica (MAF) de los marcadores varió entre 0.05 y 0.5 en la raza Corriedale y 0.08 y 0.5 para Merino. Se lograron valores altos de probabilidad de exclusión (0.9999) de ambos padres y con un padre conocido usando menos de 50 marcadores. Cuando se cuenta solamente con un posible genotipo paterno y sin información de la madre, que es el caso más común de exclusión de paternidad, se alcanzó un valor de 0.9999 de probabilidad, utilizando la totalidad de marcadores del panel en los animales Merino pero sólo fue posible llegar a 0.9998 en la raza Corriedale. Estos resultados sugieren que el panel puede resultar de utilidad en las poblaciones Corriedale y Merino. Sin embargo, en casos específicos de poblaciones muy emparentadas (situación frecuente en cabañas) puede ser insuficiente, razón por la cual se propone el desarrollo de un panel de SNP para excluir paternidades en situaciones más complejas.

Palabras clave: Genealogía, Ovinos, Paternidad, SNP

Introducción

La evaluación genética de reproductores depende de registros fenotípicos y genealógicos, los cuales deben ser confiables para que los resultados reflejen de mejor forma la realidad.

Estudios en bovinos lecheros encontraron pérdidas en la ganancia genética de entre 3.5% y 15% cuando existen entre 10% y 11% de errores en la

asignación de paternidad (Israel y Weller, 2000; Banos *et al.*, 2001). Por otro lado, se informan errores genealógicos que varían entre un 1.3 y 30% (Ron *et al.*, 1996). Dadas estas razones es importante establecer metodologías fiables de exclusión de paternidad para mejorar la calidad de los registros genealógicos en poblaciones bajo evaluación genética.

¹Autor para la correspondencia, e-mail: fmacedo@fvvet.edu.uy

²INIA Las Brujas km 10, Ruta 48, Rincón del Colorado, Departamento de Canelones, Uruguay

³Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL), Rambla Baltasar Brum 3764, Montevideo, Uruguay

Actualmente, la mayoría de las metodologías usan marcadores microsatélites (STR) gracias a su alto valor informativo (Baumung *et al.*, 2004). No obstante, el uso de este tipo de marcadores puede llevar a resultados ambiguos en algunos casos y puede dificultar las pruebas de exclusión de parentesco (Phillips *et al.*, 2008). Los marcadores de polimorfismo de nucleótido simple (SNP) surgen como una alternativa ventajosa dada su abundancia en el genoma, estabilidad y bajo costo de procesamiento en análisis automatizados (Heaton *et al.*, 2002).

En Uruguay, se han probado paneles de STR para determinar paternidad con diferentes resultados (Tomasco *et al.*, 2002; Peraza *et al.*, 2013) y

en la actualidad se busca desarrollar un panel de SNP de alta confiabilidad.

Recientemente Kijas *et al.*, (2012) presentaron un panel para exclusión de paternidad que podría ser aplicado en un amplio número de razas. Aún frente al potencial de este panel, las frecuencias de los alelos pueden variar entre poblaciones haciendo variar así su capacidad informativa (Heaton *et al.*, 2002).

El objetivo de este trabajo fue analizar este panel de 89 marcadores SNP en muestras de individuos de las razas Corriedale y Merino Australiano de Uruguay para determinar el poder de exclusión para resolver casos de paternidad.

Materiales y Métodos

Muestras y Genotipado

El estudio se realizó con 108 individuos (55 corderos, 43 corderas y 10 carneros) de la raza Corriedale pertenecientes a una población de investigación del Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL) y 110 individuos (44 corderos, 56 corderas y 10 carneros) de la raza Merino Australiano provenientes de un núcleo de selección localizado en una estación experimental del INIA. El DNA del total de animales utilizados fue extraído en la Unidad de Biotecnología de INIA Las Brujas.

Los genotipos de los 89 SNP especificados por Kijas *et al.* (2012) que se estudiaron en este trabajo se obtuvieron mediante el genotipado masivo con la plataforma *OvineSNP50 BeadChip* de Illumina® en Geneseek, Nebraska, California (*OvineSNP50 Datasheet* - Illumina 2010).

Métodos estadísticos

Se calculó la menor frecuencia alélica (MAF) para cada marcador.

Se consideraron tres situaciones de exclusión de paternidad: exclusión de ambos padres (AP), exclusión de paternidad con el genotipo materno conocido (PCGM) y exclusión de paternidad sin el genotipo materno conocido (PSGM) para cada marcador.

Estos valores se obtuvieron mediante el paquete *Cervus*® (Kalinowski *et al.*, 2007).

Las probabilidades de exclusión acumulada de grupos de marcadores (ordenados por MAF de forma decreciente) se calculó mediante $P=1-(1-P_1)(1-P_2)...(1-P_k)$ donde P es la probabilidad de exclusión acumulada, P_k es la probabilidad de exclusión de cada marcador y k es la cantidad de marcadores (Jamieson y Taylor, 1997).

Resultados y Discusión

Se obtuvieron lecturas por marcador exitosas que variaron entre 93.5 y 100% en la muestra de Corriedale y entre 85.5 y 100% en la muestra de Merino. La excepción se presentó en el marcador oY1, del que no se obtuvieron lecturas en ninguna de las muestras de Merino y en solo 31.5% en las muestras de Corriedale, razón por la que se excluyó este marcador del estudio.

Todos los marcadores bajo estudio fueron bialélicos en las dos razas. En la Figura 1 se puede observar la distribución de MAF de los marcadores para cada una de las poblaciones.

La media de MAF fue de 0.34 tanto para la muestra de Corriedale como para la de Merino, mientras que las frecuencias mínimas y máximas fueron de 0.05 y 0.50 para la raza Corriedale y de

0.08 y 0.50 en Merino. La cantidad de marcadores que se encontraban por debajo de un nivel de 0.20 de MAF resultó ser 11 en Corriedale y nueve en Merinos. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Kijas *et al.* (2012), puesto que ninguno de los marcadores en ese caso presentaba MAF (promedio de las poblaciones animales usadas) menor a 0.20. El desarrollo de paneles similares en bovinos *Wagyu* arrojó valores promedio de MAF de 0.433 con variación entre 0.297 y 0.500 considerados como muy informativos (Hara *et al.*, 2010). Esto sugiere que los marcadores que se encuentran por debajo de 0.20 en las muestras analizadas pueden afectar negativamente el poder de exclusión de paternidad en paneles de SNP.

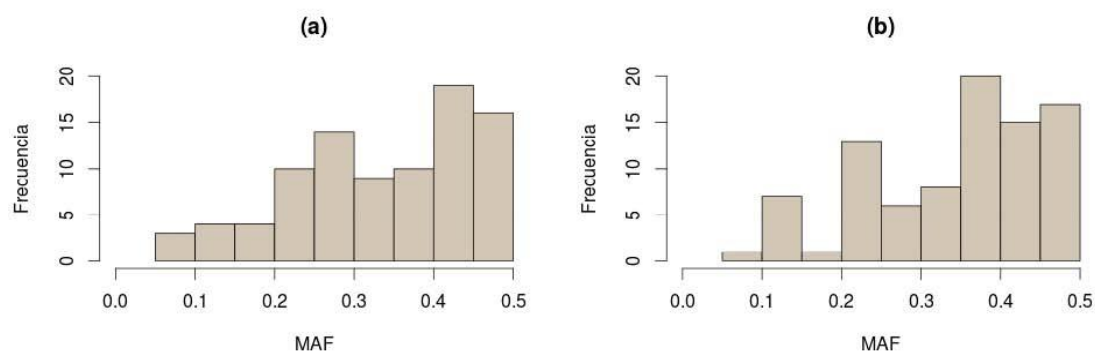


Figura 1. Distribución de las frecuencias alélicas del alelo menor (MAF) de los marcadores para las muestras de ovinos de la raza Corriedale (a) y la raza Merino (b).

En cuanto a las probabilidades de exclusión, el panel de marcadores presentó desempeño similar en ambas muestras. En la Figura 2 se presenta la curva de probabilidades de exclusión con sucesivos

marcadores para las tres situaciones propuestas (AP, en PCGM y PSGM) en ambas razas.

Para AP se logran valores de probabilidad de 0.9999 con 29 y 27 marcadores para Corriedale y

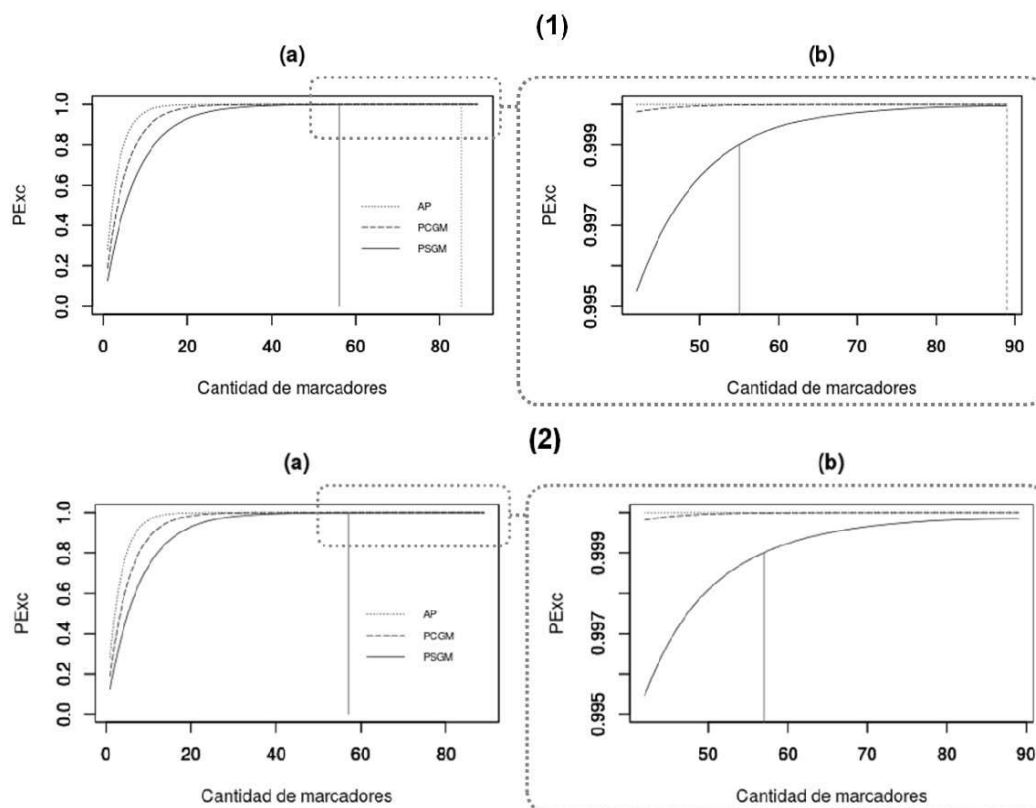


Figura 2. (a) Probabilidad de exclusión acumulada (PExc) en Merino (1) y Corriedale (2). Se muestran las curvas para los 3 casos de exclusión considerados. (b) Detalle a menor escala del comportamiento de las curvas en último tramo. Las líneas verticales llena y punteada indican cantidad de SNP necesarios para obtener valores de 0.999 y 0.9999 en PSGM. Los marcadores se ordenaron por MAF de forma decreciente.

Merino, respectivamente, mientras que para PCGM se alcanzaron valores de 0.9999 con 46 marcadores en Corriedale y 44 en Merino. Estos valores se presentan superiores a los logrados por Heaton *et al.* (2002) en bovinos, que mediante un panel de 32 SNP, observaron valores de 0.999 y 0.994 para razas poco emparentadas y Angus puro, respectivamente.

Para el caso PSGM, situación más corriente en las cabañas, se obtuvieron valores de 0.999 con 56 marcadores en la muestra de Merinos, mientras que el mismo valor se obtuvo con 57 marcadores para la raza Corriedale. Un trabajo reciente realizado en una muestra de raza Angus muy emparentada indicó que una probabilidad de exclusión de 0.999 se logra con 55 SNP (Fernández *et al.*, 2013), resultado muy semejante a los obtenidos en el presente trabajo. El uso de la totalidad de marcadores en Corriedale obtuvo un máximo de 0.9998 para esta última situación, mientras que 85 marcadores en Merino lograron valores de 0.9999. Estudios en la raza bovina Negra Japonesa indican que con un total de 87 marcadores SNP se logran valores de 0.99998

(Hara *et al.*, 2010), que resultan ser superiores a los observados en este trabajo.

En conclusión, este trabajo sugiere que el panel propuesto por Kijas *et al.* (2012) puede resultar útil en la resolución de diferentes casos de paternidad. Por otro lado puede presentar dificultades al momento de excluir paternidades en poblaciones muy consanguíneas, puesto que estructuras poblacionales muy emparentadas pueden afectar la capacidad de exclusión de un panel de marcadores (Fernández *et al.*, 2013). Especialmente en la raza Corriedale, la presencia de una importante porción de marcadores poco informativos reduce el poder de exclusión, limitando la probabilidad de todo el panel a 0.9998, valor inferior al recomendado. Sin embargo, dadas las condiciones en que el mismo fue desarrollado, es importante considerarlo en el diseño de paneles propios o adicionales para las situaciones particulares de estas dos razas en el Uruguay. Se sugiere ampliar el estudio a un mayor número de cabañas así como también a otras razas relevantes en Uruguay.

Literatura citada

- Banos, G., G. R. Wiggans, and R. L. Powell. 2001. Impact of paternity errors in cow identification on genetic evaluations and international comparisons. *J. Dairy Sci.* 84(11),2523-9.
- Baumung, R., H. Simianer, and I. Hoffmann. 2004. Genetic diversity studies in farm animals - a survey. *J. Anim. Breed. Genet.* 121(6), 361-373.
- Fernández, M., D. E. Goszczynski, J. P. Lirón, E. E. Villegas-Castagnasso, M. H. Carino, M. V. Ripoli, A. Rogberg-Muñoz, D. M. Posik, P. Peral-García, and G. Giovambattista. 2013. Comparison of the effectiveness of microsatellites and SNP panels for genetic identification, traceability and assessment of parentage in an inbred Angus herd. *Genet. Molecular Biol.*, 191, 185-191.
- Hara, K., Y. Kon, S. Sasazaki, F. Mukai, and H. Mannen. 2010. Development of novel SNP system for individual and pedigree control in a Japanese Black cattle population using whole-genome genotyping assay. *J. Anim. Sci.* 81(4), 506-12.
- Heaton, M. P., G. P. Harhay, G. L. Bennett, R. T. Stone, W. M. Grosse, E. Casas, J. W. Keele, T. P. L. Smith, C-G. Chitko-McKown, and W. W. Laegreid, 2002. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mammalian Genome*, 13(5), 272-81.
- Illumina. 2010. Ovine SNP50 Genotyping BeadChip. DataSheet:DNA Analysis. http://res.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_ovinesnp50.pdf Acceso Octubre, 21, 2013.
- Israel, C., and J. I. Weller. 2000. Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations. *J. Dairy Sci.* 83(1), 181-187.
- Jamieson, A., and S. C. Taylor. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim. Genet.* 28(6), 397-400.
- Kalinowski, S. T., M. L. Taper, and T. C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(5), 1099-1106.
- Kijas, J. W., J. Mcewan, S. M. Clarke, J. F. Maddox, R. McCulloch, F. Driver, K. Ilic, and M. P. Heaton. 2012. Development of a SNP panel for parentage assignment in sheep. *Plant and Animal Genome XX Conference*. San Diego, California. Poster#P0577.
- Peraza, P., O. Ravagnolo, M. Dalla Riza, y L. Kelly. 2013. Desarrollo de un multiplex de microsatélites para diagnóstico de paternidad en ovinos Corriedale del Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 17, 1, 114-119.
- Phillips, C., M. Fondevila, M. García-Magariños, A. Rodríguez, A. Salas, A. Carracedo, and M. V. Lareu. 2008. Resolving relationship tests that show ambiguous STR results using autosomal SNPs as supplementary markers. *Forensic Science International: Genetics*, 2(3), 198-204.
- Ron, M., Y. Blanc, M. Band, E. Ezra, and J. I. Weller. 1996. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. *J. Dairy Sci.* 79(4), 676-681.
- Tomasco, I., G. Wlasiuk, and E. Lessa, E. 2002. Evaluation of polymorphism in ten microsatellite loci in Uruguayan sheep flocks. *Genet. Molecular Biol.* 25, 37-42.