

## **CARACTERIZACIÓN DEL GEN RECEPTOR DE LA MELATONINA 1A (*MTNR1A*) EN LA RAZA OVINA RASA ARAGONESA: ASOCIACIÓN CON LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA.**

Martinez-Royo, A., Lahoz, B., Alabart, J.L., Folch, J. y Calvo, J.H.

<sup>1</sup>Unidad de Tecnología en Producción animal. CITA. 59059. Zaragoza.  
amartinezroyo@aragon.es

### **INTRODUCCIÓN**

Para aumentar la rentabilidad de las explotaciones ovinas y facilitar la comercialización de la carne es necesario homogenizar la producción y por tanto los precios de venta de los corderos a lo largo del año. En este sentido, los partos en la raza Rasa Aragonesa en condiciones naturales se producen principalmente en invierno-primavera. Como consecuencia de esta estacionalidad reproductiva, se produce una mayor oferta del producto de Marzo a Septiembre, estableciéndose un precio de mercado relativamente bajo. Del mismo modo, se origina una disminución de la oferta de septiembre a febrero, que eleva los precios, de venta. Esta paradoja en el mercado, está tratando de resolverse en las explotaciones ganaderas mediante el uso de tratamientos hormonales de inducción del celo (esponjas de progestágeno + eCG), o con la utilización de implantes de melatonina. Sin embargo la UE limita de forma creciente el uso de productos hormonales en la producción animal. De hecho, ya prohíbe su uso de estos tratamientos en las ganaderías ecológicas. Una alternativa para homogenizar la producción de corderos a lo largo del año, es el uso de estrategias que nos permitan detectar genes asociados a la estacionalidad reproductiva. Del abanico de genes relacionados con la actividad reproductiva estacional se ha propuesto repetidamente en ovino el gen candidato del receptor de la melatonina subtipo 1A (*MNTR1A*). Desempeña un papel clave en el control de la estacionalidad inducida por el fotoperíodo, ya que está mediado por los niveles circadianos de la hormona melatonina. En diferentes estudios se han encontrado dos mutaciones silentes (SNP606 y 612) asociadas a caracteres de estacionalidad y que estaban en desequilibrio de ligamiento con posibles polimorfismos en una región cercana (Pelletier et al.2000; Chu et al., 2003; Mura et al., 2009; Mateescu et al., 2009) en diferentes razas ovinas.

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la detección y caracterización de polimorfismos en la región promotora y zona codante del gen *MTNR1A*, y se ha evaluado la asociación de este gen a la estacionalidad reproductiva en ovejas de la raza Rasa Aragonesa.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

La elección de animales que se secuenciaron para la búsqueda de nuevas mutaciones se llevó a cabo eligiendo animales extremos para el carácter prolificidad según su VG (N=5); y animales extremos para el carácter ciclicidad fuera de estación reproductiva, pertenecientes a un diseño familiar de medio-hermanas (N=6, 2 ovejas de cada familia). Los cebadores fueron diseñados a partir de la secuencia Genbank núm. NM\_001009725 y AF078545, para las zonas exónicas del gen *MTNR1A* y para la región promotora, respectivamente.

Para los estudios de asociación se utilizaron un total de 80 ovejas pertenecientes a tres familias de medio-hermanas con 26, 25 y 29 animales por familia que se han representado por los machos A, B y C, respectivamente. Todas las ovejas presentaron la misma edad, condición corporal, y mismas condiciones de manejo y alimentación. Como medida de estacionalidad, se procedió a la recogida de datos sobre la detección de celos en período de anestro estacional en nuestras condiciones de explotación. Para este fin, se observó diariamente la aparición de celos en el lote de las 80 ovejas desde enero hasta agosto de 2009, utilizando cuatro carneros vasectomizados provistos de arneses con pastillas marcadoras. Para no confundir las marcas se cambió el color del marcador de los arneses cada 2 semanas,.

Para los estudios de asociación del gen *MNTR1A* con estacionalidad se amplificó un fragmento del exón 2, que contiene los SNPs C/T y G/A en las posiciones 606 y 612, respectivamente, de la secuencia de referencia U14109, y que se genotiparon mediante digestión con enzimas de restricción *RsaI* y *MnlI*, respectivamente. Debido a que en la región promotora del gen *MTNR1A* se encontraron numerosos SNPs, se puso a punto una

PCR que abarcara estos polimorfismos para posteriormente enviar los fragmentos a secuenciar.

La clasificación en ovejas cíclicas y no cíclicas para un mes determinado se codificó como variable dicotómica "1" y "0", respectivamente. Todas las ovejas, excepto una que fue excluida del estudio, presentaron al menos un celo en los meses de enero y agosto. El porcentaje de ovejas cíclicas entre Febrero y Julio de 2009 se analizó mediante un modelo lineal generalizado para variables categóricas (dicotómicas) con medidas repetidas mediante el procedimiento CATMOD del paquete estadístico SAS. El modelo utilizado fue el siguiente:  $FC_{ik} = \mu + Gen_i + Mes_k + (G \times M)_{ik}$ , donde  $FC_{ik}$  es la frecuencia de ovejas cíclicas en el genotipo (i) y el mes (k);  $\mu$  es la media general del porcentaje de ciclicidad del total de las ovejas;  $Gen_i$  es el efecto del genotipo (i) anidado al macho (9 niveles: tres genotipos posibles en 3 familias de medio hermanas);  $Mes_k$  es el efecto del factor Mes, tratado como medida repetida de la variable dicotómica cíclica/no cíclica (1/0) en los 6 meses de ensayo (6 niveles: Febrero, Marzo, Abril, Mayo, Junio y Julio);  $(G \times M)_{ik}$  es el efecto de la interacción Genotipo x Mes (54 niveles).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado de la búsqueda de la secuencia codante del gen, se encontraron un total de 11 mutaciones tipo SNP de las cuales 7 eran sinónimas, 2 conservativas y 2 no conservativas sin efecto sobre la conformación de la proteína. Cuatro de ellas no habían sido descritas previamente en otras razas y ocupan las posiciones 363, 383, 385 y 423 según la secuencia depositada en GenBank U14109. Dos de ellas son silentes sin cambio de aminoácido, otra es conservativa con cambio de Serina por Asparagina (S112N), y la última es no conservativa con cambio de Serina por Prolina (S113P). Todas las mutaciones encontradas en la secuencia aminoacídica fueron analizadas con el programa Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) para la predicción de sus posibles efectos sobre la función o la estructura de la proteína, no encontrando mutaciones potencialmente dañinas. Igualmente se han encontrado en Rasa Aragonesa los dos SNPs silentes, que a pesar de ser sinónimos han demostrado asociación a estacionalidad reproductiva en otras razas (SNP606 y 612) (Pelletier et al., 2000). Los tres machos fueron heterocigotos para los dos SNPs. Los estudios de asociación mostraron un efecto significativo del genotipo del SNP606 anidado al macho para el carácter estacionalidad/ciclicidad reproductiva. En promedio, el porcentaje de ovejas cíclicas fue un 21.9% mayor en las homocigotas TT que en las CC (77.5 vs 55.6%,  $p < 0.01$ , Tabla 1). Las ovejas heterocigotas (grupo CT) mostraron valores intermedios (67.1%), sin significación estadística respecto a los genotipos TT o CC. Dentro de las tres familias, se observó la misma tendencia. Por meses, las diferencias más grandes entre los genotipos TT y CC se alcanzaron en los meses de Mayo (27.8%,  $P < 0.1$ ), Junio (29.4%,  $P < 0.05$ ) y Julio (28.9%,  $P < 0.05$ ), y siguieron la misma tendencia que cuando se analizaron las familias individualmente. Para el SNP612, se encontraron diferencias significativas del genotipo anidado al macho para el carácter estacionalidad/ciclicidad reproductiva entre los genotipos GG y AA. Sin embargo, esto se debe a la presencia de una única hembra con genotipo AA que presentó el 100% de ciclicidad a contraestación durante todo el estudio. Al eliminar este animal del análisis, la diferencia significativa desaparece. En promedio, el porcentaje de ovejas cíclicas fue un 37.0% y 32.2% mayor en la homocigota AA que en las ovejas GA y GG, respectivamente (63.0 y 67.8%, ambos:  $p < 0.01$ ), sin diferencias significativas entre los genotipos GA y GG.

El estudio para la búsqueda de mutaciones en la región promotora reveló un total de 17 SNPs. De estos destacan 7 SNPs que afectan a posibles factores reguladores de la transcripción: SNPs 422 y 423 (motivo EF2), SNP436, 527 y 686 (motivo SRY), SNP482 (motivo Nkx-2) y SNP750 (motivos Brn-2 y Oct-1). La posición de los SNPs se establece en relación a la secuencia del GenBank núm. AY524665. Los 17 SNPs se analizaron mediante secuenciación en las tres familias de medio-hermanas. Sólo el macho "C" resultó ser heterocigoto para alguno de los SNPs encontrados, concretamente para los SNPs 431, 527, 686, 791 y 895, no encontrando asociación significativa con el carácter estacionalidad, si bien estos estudios no están finalizados todavía.

Como conclusión parece que el alelo T del SNP606 está asociado a un mayor porcentaje de hembras cíclicas en la raza Rasa Aragonesa, indicando que dicho SNP puede estar en desequilibrio de ligamiento con una mutación responsable cercana al gen *MTNR1A*, ya que otras mutaciones localizadas tanto en su zona codante como en su promotor, no parecen presentar asociación significativa con el carácter estacionalidad.

**Tabla 1.** Porcentaje medio de ovejas cíclicas (1) durante el período de Febrero a Julio basado en el estudio de frecuencias de los genotipos para el SNP606 en las tres familias (A, B y C). Número de hembras entre paréntesis.

Genotipo SNP606	Media	macho A	macho B	macho C
TT	77.5 (20) a	83.3 (10) a	71.7 (10) a	----- (0)
CT	67.1 (41) ab	74.4 (15) ab	64.3 (14) a*	61.1 (12) a
CC	55.6 (18) b	50.0 (1) b	----- (0)	55.9 (17) a

\*1 hembra fue excluida del estudio de asociación debida a la falta de ciclicidad en los meses de enero a agosto. a,b: P< 0.01.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pelletier, J., Bodin, L., Hanocq, E., et al. 2000. Biol. Reprod. 62(4): 1096-1101.
- Chu, M.X., Ji, C.L. & Chen, G.H. 2003. J. Anim. Sci. 16(12): 1701-1704.
- Mateescu, R.G., Lunsford, A.K. & Thonney, M.L. 2009. J. Anim. Sci. 87(8): 2485-2488.
- Mura, M.C., Luridiana, S., Vacca, G.M., Bini, P.P. & Carcangiu, V. 2010. Theriogenology 74(9):1579-1586.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado con los proyectos INIA RTA2006-0140, TRACE PET-2008-0076, INNPACTO IPT-010000-2010-33 y cofinanciado con fondos FEDER. A. Martínez-Royo y B. Lahoz reciben una beca de Formación de investigadores de tipo Predoctoral de INIA.

#### CHARACTERIZATION AND ASSOCIATION STUDIES BETWEEN MELATONIN RECEPTOR 1A (*MTNR1A*) POLYMORPHISMS AND REPRODUCTIVE SEASONALITY TRAIT IN RASA ARAGONESA SHEEP BREED.

**ABSTRACT:** This work focuses on the characterization and evaluation of *MTNR1A* as a candidate gene related to reproductive seasonality trait in the Rasa Aragonesa sheep breed. *MTNR1A* has shown influence on reproductive seasonality in other breeds. A significant effect was found between SNP606 of the *MTNR1A* gene and spontaneous out of season oestrous behaviour. The T allele was associated with cyclicity in Rasa Aragonesa breed. This finding, along with that this polymorphism does not result in an amino-acid substitution, suggest that SNP606 may act in linkage equilibrium with a mutation in other genes responsible for out of season breeding. New polymorphisms in the coding region (11 SNPs) of the gene *MTNR1A* did not show any association for breeding out of season in the Rasa Aragonesa breed. Association between the polymorphisms found in the promotor region (17 SNPs) and cyclicity have not been completed yet.

**Keywords:** *Ovis aries*, reproductive seasonality, *MTNR1A*, Rasa aragonesa, sheep.