

ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL EXÓN 7 DEL GEN DE LA β -CASEÍNA (CSN2) CON LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE EN OVINO MERINO

Corral, J.M.¹, Izquierdo, M.¹, Mateos, S.¹, Parejo, J.C.², Salazar, J.², Rabasco, A.², Martínez-Trancón, M.², Sansinforiano, M.E.², Hernández, F.I.¹, Portilla, F.J.², Padilla, J.A.²

¹ Centro de Investigación La Orden-Valdesequera, Junta de Extremadura. Carretera Nacional V, Km 374, Guadajira 06071 (Badajoz). juanmanuel.corral@juntaextremadura.net

² Genética y Mejora Animal, Facultad de Veterinaria, Avda. de la Universidad s/n, 10071 (Cáceres). jpadilla@unex.es

INTRODUCCIÓN

El polimorfismo de las proteínas de la leche afecta a la composición y a la calidad del queso. En particular, según Amigo *et al.*, (2000), la β -caseína (β -CN) tiene un papel importante en la estabilidad de la micela, y en la disponibilidad y distribución del calcio en la leche. Estas diferencias genéticas han sido utilizadas como criterio de selección de caracteres de leche en ganado caprino por Bonifacio *et al.* (2001). Bastos *et al.* (2001) identificaron mediante PCR-SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism) dos patrones conformacionales en un fragmento amplificado del exón 7 del gen CSN2 (Genbank X79703), que correspondía con una sustitución nucleotídica A/G (Met \rightarrow Val) en la posición 12029 de la secuencia del gen (Ceriotti *et al.*, 2004) El objetivo de este trabajo fue determinar las variantes alélicas del exón 7 del gen de la β -caseína ovina (CSN2) en nueve líneas de la raza ovina Merina y su asociación con caracteres de producción y composición de la leche. La existencia de animales portadores de genotipos mejorantes para cantidad y calidad de leche incrementaría la respuesta a la selección y por tanto dinamizaría el Programa de Mejora de ovino Merino para actitud lechera.

MATERIAL Y MÉTODOS

La identificación de los diferentes genotipos del exon 7 del gen CSN2 se realizó mediante PCR-SSCP. Los fragmentos amplificados mediante los cebadores descritos por Bastos *et al.*, (2001) se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 15% durante 24 horas a voltaje (700 V) y temperatura constante (15°C) y visualizadas por tinción con plata (Figura 1). La verificación del método de genotipado se realizó por secuenciación doble de cada uno de los genotipos detectados, empleando secuenciación cíclica (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Applied Biosystems). Una vez identificados los genotipos, se estudió la diversidad genética del locus CSN2 mediante el genotipado de 1112 animales de raza Merina procedentes de 9 líneas distintas (Tabla 2) según descripción en Corral *et al.* (2005a). Además, se evaluó la posible asociación de cada genotipo con los caracteres de producción y calidad de leche utilizando información de 1025 lactaciones procedentes de ovejas de la línea Perales criadas en la Finca Valdesequera (Junta de Extremadura) durante los años 1999-2006 según metodología descrita por Corral *et al.* (2005b). Los datos se analizaron con un modelo mixto definido como:

$$Y_{ijkl} = \mu + X_i + T_j + P_k + NP_l + Gen_m + Oveja_n + e_{ijklmn}$$

Donde Y_{ijkl} es el valor de cada uno de los caracteres de la producción de leche producción al primer control, producción real, producción tipificada a 120 días y cantidad de leche ordeñada, estas tres últimas calculadas con el método Fleischmann o de calidad de leche (porcentaje medio diario de proteína, grasa, lactosa, extracto seco magro y extracto seco total), μ es la media para cada carácter, X_i es el efecto del intervalo parto-destete, T_j es el efecto del tipo de parto, P_k es el efecto de la paridera, NP_l es el efecto del número de parto, Gen_m es el efecto del genotipo, $Oveja_n$ es el efecto aleatorio de la oveja y e_{ijklmn} es el error residual que incluye los efectos del ambiente asociado con cada animal. Se utilizó el procedimiento mixed de SAS (1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran los diferentes patrones electroforéticos (genotipos) encontrados. En la Tabla 1, presentamos el alineamiento de las secuencias obtenidas de

dos animales homocigotos (AA, GG) con las secuencias publicadas (GenBank X79703 y AY444504). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Ceriotti *et al.*, (2004). Los genotipos AA y GG obtenidos por secuenciación directa, corresponden con los patrones electroforéticos 1 y 2. La frecuencia media de los alelos A y G fueron 0.7644 y 0.2356, respectivamente. Excepto la línea de Merino Negro, todas las líneas estaban en equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) para este locus. Este resultado era de esperar dado que esta raza no ha sido seleccionada para caracteres de aptitud lechera. La frecuencia del alelo CSN2*G (23.56%) es del mismo orden que la obtenida por Ceriotti *et al.*, (2004) en las razas Comisana y Sarda. Los estadísticos F (Wright, 1965), ($F_{IS} = 0.015$; $F_{IT} = 0.042$; $F_{ST} = 0.027$) nos indican que para este gen CSN2 no existe divergencia genética entre las líneas. La heterocigosis observada y esperada fue de 0.349 y 0.360, respectivamente. El análisis de resultados indica que existe un efecto significativo entre los genotipos de las caseínas estudiadas y la cantidad de leche producida (Tabla 3), pero no resultó significativo para la composición de dicha leche, (Tabla 4). Los animales de genotipo GG presentan mayores producciones totales de leche al primer control ($p=0.0323$), producción total real ($p=0.0966$), producción total tipificada ($p=0.0325$) y leche total ordeñada. Dada la escasa producción lechera de la oveja Merina y considerando que el genotipo GG produce considerablemente más cantidad de leche que el AA y que el efecto del genotipo AA no resulta significativamente mejor en relación a la calidad de dicha leche, se podría utilizar la información procedente del genotipo directamente en un programa de selección asistida por marcadores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amigo, L., Recio, I., Ramos, M. 2000. Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk- a review. *International Dairy Journal*, 10, 135-149.
- Bastos, E., Cravador, A., Azevedo, J., Guedes-Pinto, H. 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed "Churra da Terra Quente". *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5, 7-15.
- Bonifacio, C., Santos, I.C., Belo, C., Cravador. 2001. A. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of α s1-casein, β -casein and κ -casein genes in charnequeira portuguese indigenous goat breed.
- Ceriotti, G., Chessa, S., Bolla, P., Budelli, E., Bianchi, L., Duranti, E., Caroli, A. 2004. Single nucleotide polymorphisms in the ovine casein genes detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *J. Dairy Sci.* 87 2606-13.
- Corral, J.M., Izquierdo, M., González, J., Parejo, J.C., Rabasco, A., Martínez, M., Sansinforiano, E. and Padilla, J.A. 2005a. Estudio de las variantes alélicas de la β -lactoglobulina en la raza Merina y su relación con la producción lechera. *ITEA Vol. Extra N° 26. Tomo I*, 30-32.
- Corral, J.M., Izquierdo, M., Roa, I., Parejo, J.C., Rabasco, A., Martínez-Trancón, M., Sansinforiano, M.E., Hernández, F.I., Padilla, J.A. 2005b. Análisis del locus microsatélite CSN3 en la raza Merina. Congreso Sociedad Española de Genética (SEG), Roquetas del Mar, Almería (Spain).
- SAS. 1998. User's Guide, Release 6.12. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Wright S. 1965 The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420

AGRADECIMIENTOS

Beca predoctoral I.N.I.A., Plan Regional de Investigación Proyecto PRI+DT+I (2PR03B027) y fondos FEDER, Junta de Extremadura (Consejería de Infraestructuras y Desarrollo Tecnológico), Asociación de criadores de ganado Merino.

Tabla 1. Alineamiento múltiple de secuencias mediante el programa CLUSTAL W v1.83.		
ID	Secuencia 5' → 3'	Genotipo
OV27	TCCCCAGAAAGCAGTGCCCCAGAGAGATGTGCCCATCCAGGCCTTTCTGC	GG
OV28	TCCCCAGAAAGCAGTGCCCCAGAGAGATATGCCCATCCAGGCCTTTCTGC	AA
X79703	TCCCCAGAAAGCAGTGCCCCAGAGAGATGTGCCCATCCAGGCCTTTCTGC	AA
AY444504	TCCCCAGAAAGCAGTGCCCCAGAGAGATGTGCCCATCCAGGCCTTTCTGC *****▲*****	GG

OV27 y OV28 son los animales secuenciados en este trabajo. Los nucleótidos idénticos están representados por * y las sustituciones están escritas por el símbolo ▲

Figura 1. Patrones PCR-SSCP del gen β -caseína ovina (CSN2)

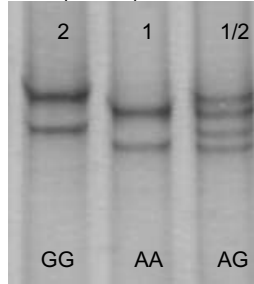


Tabla 2. Distribución de los animales por genotipo y frecuencias génicas del locus de CSN2 en las diferentes líneas de Merino analizadas

Líneas	Genotipo			Frecuencias génicas		HWE*	
	n	AA	AG	GG	A		G
Granda (L1)	55	28	26	1	0.7455	0.2545	0.1477
Hidalgo (L2)	60	42	14	4	0.8167	0.1833	0.0944
Jordan (L3)	56	42	11	3	0.8482	0.1518	0.0997
Lamex (L4)	58	38	16	4	0.7931	0.2069	0.2365
L.Montenegro (L5)	59	43	16	0	0.8644	0.1356	0.5809
M. Común (L6)	64	45	17	2	0.8359	0.1641	0.6669
Merino Negro (L7)	26	25	1	0	0.9808	0.0192	-
Perales (L8)	685	359	274	52	0.7241	0.2759	1.0000
Serena (L9)	49	34	13	2	0.8265	0.1735	0.6146
Total	1112	656	388	68	0.7644	0.2356	0,2734

(n = tamaño muestra). *valores de p derivados del test χ^2

Tabla 3. Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los caracteres de producción de leche al primer control (prodto1), producción total real (prodtot2), tipificada a 120 días (prodtota) y total ordeñada (prodtoord) para los diferentes genotipos de CSN2.

Genotipo	N	prodto1(ml) LSM \pm SE	prodtot2(l) LSM \pm SE	prodtota(l) LSM \pm SE	prodtoord(l) LSM \pm SE
AA	509	437.45 \pm 13.56 ^a	33.70 \pm 1.28 ^a	37.91 \pm 1.27 ^a	10.09 \pm 0.64 ^a
AG	416	473.39 \pm 14.36 ^b	36.14 \pm 1.36 ^{ab}	40.63 \pm 1.35 ^{ab}	10.79 \pm 0.68 ^{ab}
GG	100	500.07 \pm 28.65 ^b	39.27 \pm 2.76 ^b	44.90 \pm 2.76 ^b	12.73 \pm 1.37 ^b

Valores con diferentes superíndices en la misma columna difieren significativamente a, b ($p < 0.05$).

Tabla 4. Medias mínimo cuadráticas y error estándar de los caracteres de calidad de leche para los diferentes genotipos de CSN2.

Genotipo	N	PGD	PPDI	PESMDI	PESTDI	PLACDI	
		LSM \pm SE	LSM \pm SE	LSM \pm SE	LSM \pm SE	N	LSM \pm SE
AA	380	7.30 \pm 0.08	6.45 \pm 0.07	11.55 \pm 0.05	18.70 \pm 0.12	319	4.36 \pm 0.03
AG	318	7.25 \pm 0.09	6.39 \pm 0.07	11.53 \pm 0.05	18.59 \pm 0.13	272	4.38 \pm 0.03
GG	92	7.18 \pm 0.16	6.39 \pm 0.13	11.65 \pm 0.10	18.78 \pm 0.23	79	4.44 \pm 0.05

PGDI = % de grasa diaria. PPDI = % de proteína diaria. PESMDI = % de extracto seco magro diario. PESTDI = % extracto seco total diario. PLACDI = % de lactosa diaria.