

ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL TRANSCRIPTOMA DE LA GLÁNDULA MAMARIA DE LA OVEJA EN LACTACIÓN.

Suárez-Vega A., Gutiérrez-Gil B., Arranz J.J.*

jjars@unileon.es

Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León

El objetivo de este trabajo es la detección de la variabilidad presente en los genes expresados en la glándula mamaria de la oveja durante la lactación. Para este estudio se han utilizado muestras procedentes de 8 ovejas libres de mamitis y del mismo lote de manejo, 4 ovejas de raza Assaf y 4 ovejas de raza Churra. De cada animal se recogieron 50 ml de leche los días 10, 50, 120 y 150 de lactación. Las muestras fueron recogidas una hora después del ordeño de la mañana, coincidiendo con el punto de máxima concentración de células somáticas en leche. El RNA se extrajo a partir de 50 ml de leche siguiendo el protocolo descrito por Suarez-Vega et al. (2015). La integridad del RNA (valor RIN) se analizó utilizando el Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent technologies). Los valores de RIN de las muestras de RNA oscilaron entre 7 y 9. Las genotecas de RNA de extremos pareados (paired-end libraries) con fragmentos de 300 pb se crearon con el kit True-Seq RNA-Seq simple preparation v2 (Illumina). Los fragmentos fueron secuenciados en el CNAG en un secuenciador Illumina Hi-Seq 2000, generando lecturas paired-end de 75 pb. El alineamiento de las lecturas frente a la versión *Oar_v3.1* del genoma ovino se realizó con la herramienta bioinformática STAR (Dobin et al., 2013). Después del alineamiento, se utilizó los software *Samtools* (Li et al., 2009) y *Picard* (<http://picard.sourceforge.net>) para unir en un mismo archivo los alineamientos procedentes de las diferentes réplicas técnicas del mismo animal y marcar las lecturas duplicadas. La detección de variantes genéticas se realizó con el programa bioinformático GATK (v.3.4.46) (McKenna et al., 2010). Una vez realizada la detección de variantes (polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) e inserciones/deleciones), éstas fueron filtradas para obtener únicamente aquellas que cumplieran determinados criterios de calidad (QUAL>30, MQ>40, QD>5, FS<60 y DP>5) con los softwares *vcffilter* (<https://github.com/ekg/vcflib>) y *SnpSift* (Cingolani et al., 2012a). La anotación funcional de las variantes detectadas se realizó con los programas *Variant Effect Predictor* (McLaren et al., 2010) y *SnpEff* (Cingolani et al., 2012b). En total se detectaron 216.637 variantes, identificando un polimorfismo cada 11.962 pares de bases. De ellas, 197.946 fueron SNPs, 10.086 deleciones y 8.603 inserciones. En la clasificación de las variantes en función de su impacto a nivel funcional, la mayoría (85,14%) se clasificaron dentro de variantes “modificadoras”,

término designado a marcadores definidos por el propio investigador, en nuestro caso regiones en las que se habían descrito QTL con efecto sobre caracteres de producción de leche en el ganado ovino, y a variantes cuyo efecto es difícil de predecir. El 9,53% tenían un efecto leve, el 4,87% moderado y sólo el 0,46% de las variantes tenían un alto impacto funcional. En cuanto a localización en el genoma de los polimorfismos el 14,75% de las variantes se localizarían en exones, en contraste con un 24,55% de las variantes localizadas en posiciones *downstream* a los genes anotados y el 20,96% en regiones intergénicas. El alto porcentaje de mutaciones detectadas en regiones no codificantes sugiere que existe un alto porcentaje de regiones genómicas no anotadas en el genoma ovino que están siendo expresadas en las células somáticas de la leche. Por otra parte, de todas las variantes detectadas, un 17,3% (36.794) se corresponderían con mutaciones no descritas previamente en el genoma ovino. En conclusión, este estudio constituye el primer análisis realizado sobre la variabilidad en el transcriptoma mamario de la oveja, permitiéndonos obtener una idea preliminar del tipo de mutaciones presentes en dicho transcriptoma, su localización y posibles consecuencias funcionales, que deberían ser confirmadas en investigaciones futuras. Además, la identificación de 36.794 mutaciones nuevas podría ser de gran utilidad para el desarrollo de plataformas de genotipado en las dos razas ovinas estudiadas.

Referencias bibliográficas

Cingolani, P., et al. 2012a. *Front. Genet.* 3:35. doi:10.3389/fgene.2012.00035. •Cingolani, P., et al., 2012b. *Fly (Austin)*. 6:80–92. doi:10.4161/fly.19695. •Dobin, A., et al. 2013. *Bioinformatics*. 29:15–21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635. •Li, H., et al. 2009. *Bioinformatics*. 25:2078–2079. doi:10.1093/bioinformatics/btp352. •McKenna, A., et al. 2010. *Genome Res.* 20:1297–303. doi:10.1101/gr.107524.110. •McLaren, W., et al. 2010. *Bioinformatics*. 26:2069–70. doi:10.1093/bioinformatics/btq330. •Suárez-Vega, A., et al. 2015. *Scientific Reports*. 5:. 18399. doi:10.1038/srep18399.

Agradecimientos

Las actividades descritas se han realizado dentro del proyecto **AGL2015-66035-R** financiado por el MINECO.