

ORIGEN DE LAS VARIANTES DE LOS GENES DE LAS CASEÍNAS EN PEQUEÑOS RUMIANTES: UNA COMPARACIÓN ENTRE OVEJA Y CABRA.

Luigi-Sierra¹, M.G., Mármol-Sánchez¹, E., Cardoso^{1,2}, T.F. y Amills^{1,3}, M.

¹Centre de Recerca Agrigenòmica (CRAG), CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, Bellaterra 08193. ²CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasilia-D. F 70.040-020, Brazil.

³Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193.

Maria.luigi@cragenomica.es

INTRODUCCIÓN

Las caseínas representan cerca del 80% de las proteínas totales de la leche y son las responsables de la coagulación de la misma, por ende de gran importancia para la tecnología de los alimentos particularmente para la fabricación de quesos y otros subproductos lácteos (Park et al., 2017). Estas proteínas son codificadas por cuatro genes (*CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2* y *CSN3*) localizados en una región genómica de aproximadamente 250 kb, localización muy conservada en diversos rumiantes como bovino, ovino y caprino (Hayes et al., 1993; Leveziel et al., 1991). Aunque se han realizado algunos estudios en los que se han descrito polimorfismos de los genes de las caseínas ovinas (Bastos et al., 2001; Ceriotti et al., 2004; Corral et al., 2010; Noce et al. 2016, Suárez-Vega et al., 2017), el nivel de conocimiento sobre este tema es todavía muy escaso. Así pues, hemos abordado el estudio de la variabilidad de las caseínas en ovejas domésticas (*Ovis aries*) y en su ancestro, el muflón (*Ovis orientalis*), mediante el análisis de secuencias genómicas. Asimismo, hemos comparado los resultados obtenidos en ovino con datos de caprino, generados a partir del análisis de secuencias genómicas, para determinar si existen diferencias entre ambas especies en cuanto al origen de la diversidad de los genes de las caseínas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron, a partir del Sequence Read Archive de NCBI, secuencias genómicas de 40 ovejas domésticas provenientes de África (n= 10), Europa (n= 9), Lejano Oriente (n= 9) y Oriente Próximo (n= 12), así como 17 secuencias de muflón originarios de Irán. Las secuencias fueron alineadas respecto al genoma de referencia ovino *Oar_v3.1* (Archibald et al., 2010) utilizando el software de alineamiento BWA MEM (Li, 2013). Se llevó a cabo un proceso de SNP-calling mediante el software *Genome analysis toolkit* (GATK) de acuerdo a los procedimientos recomendados (McKenna et al., 2010) para identificar las posiciones polimórficas y crear los archivos VCF. Posteriormente se usó el programa Beagle v 4.1 (Browning y Browning, 2016), para imputar los datos de SNPs basado en la verosimilitud de los genotipos de cada población. La ubicación de los genes de las caseínas (*CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2* y *CSN3*) se obtuvo usando como referencia la versión del genoma ovino *Oar_v3.1* (Archibald et al., 2010). Se extrajeron las variantes presentes en los genes de las caseínas usando la herramienta BCftools v1.8. (<https://samtools.github.io/bcftools/bcftools.html>). Los SNPs presentes en cada gen fueron anotados y se estimó su posible efecto funcional mediante el software SnpEff v4.3 (Cingolani et al., 2012). Las consecuencias de las mutaciones no sinónimas se predijeron con el software SIFT 4G (Vaser et al., 2016), considerando como deletéreas aquellas variantes con una puntuación SIFT inferior a 0.05. Adicionalmente, a nivel génico, se estimó la diversidad nucleotídica (coeficiente π) y la heterocigosidad esperada y observada por individuo en cada uno de los genes de las caseínas mediante el software VCFtools (Danecek et al., 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron un total de 43.293.496 SNPs en ovejas domésticas y 42.388.204 SNPs en muflón, de los cuales 26.447.141 fueron detectados en ambos grupos. Al analizar el contenido de SNPs de cada gen de las caseínas, se encontró mayor variabilidad en muflón que en oveja, tal como puede observarse en la **Figura 1**. De los 11 SNPs no-sinónimos identificados en oveja doméstica, 6 se encontraron presentes en muflón, así como 2 de las 4 mutaciones deletéreas encontradas, indicando que probablemente la aparición de dichas mutaciones se produjo antes de la domesticación de la oveja (**Tabla 1**). Resultados similares fueron reportados por Guan y colaboradores (comunicación personal) en un análisis en el que se comparó la diversidad de los genes de las caseínas en cabra y bezoar.

Así pues, dichos autores encontraron que cabras y bezoares compartían entre un 36 y 55% de las variantes identificadas en los genes de las caseínas, y además comprobaron la presencia, en el bezoar, de variantes descritas por otros autores en cabras domésticas y asociadas a cambios en la composición de la leche (Marletta et al., 2007). Al analizar detalladamente las mutaciones no-sinónimas presentes en los genes de las caseínas en ovinos, encontramos mutaciones reportadas en la bibliografía (**Tabla 2**), estando asociadas a diferentes variantes génicas que tienen efecto sobre la producción láctea y las características tecnológicas de la leche. Un ejemplo es la mutación c.595A>G, del gen *CSN2*, descrita en varias razas domésticas (Bastos et al., 2001; Ceriotti et al., 2004; Corral et al., 2010; Suárez-Vega et al., 2017). Así pues, el alelo A se asocia a un incremento del contenido de proteína y grasa de la leche, mientras que al G se le atribuye un aumento de la producción láctea (Corral et al., 2010).

Se estimaron valores de heterocigosidad observada (H_o) entre 0,10 y 0,29 en muflón, y entre 0,15 y 0,21 en ovejas. Por su parte, los valores de heterocigosidad esperada (H_e) oscilaron entre 0,14 y 0,33 en muflón y 0,19 y 0,28 en ovejas. Se encontró mayor diversidad nucleotídica de los genes de las caseínas en muflón que en ovejas domésticas, con un valor de π estimado entre 0,14 y 0,34 en muflón y 0,19 y 0,29 en ovejas Alberto et al. (2018), sugirieron que el mayor grado de polimorfismo de la población de muflón posiblemente se deba a la reducción del tamaño efectivo de las poblaciones de ovejas durante la domesticación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberto, F.J. 2018. Nat. Commun. 9: 813
- Archibald, A.L. 2010. Anim Genet. 41: 449-453.
- Bastos, E. 2001. BASE 5: 7-15-15.
- Browning, B.L. 2016. Am J Hum Genet 98:116-126
- Ceriotti, G. 2004. J Dairy Sci 87: 2606-2613.
- Cingolani, P. 2012. Fly 6: 80–92.
- Corral, J.M. 2010. Livestock Sci 129: 73-79.
- Danecek, P. 2011. BIOINFP 27: 15
- Giambra, I.J. 2012. Anim. Genet. 43: 642–645.
- Guan, D. 2019. No publicado.
- Hayes, H. 1993. Cell Genet. 64: 281–285.
- Leveziel, H. 1991. Anim. Genet. 22: 1-10.
- Li, H., 2013. arXiv:1303.3997.
- Marletta, D. 2007. Lait 87: 491-504
- McKenna, A. 2010. Genome Res. 20: 1297-1303.
- Noce, A. 2016. Anim. Genet. 47: 717-726
- Othman, O.E. 2013. JGEB 11: 129-134.
- Park, Y.W. 2017. Handbook of milk of non-bovine mammals, Second edition. ed. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- Selvaggi, M. 2014. Journal of the Sci. of Food and Agric. 94: 3090–3099.
- Suárez-Vega, A. BMC Genomics 18: 170.
- Vaser, R. 2016. Nat. Protoc 11: 1-9.



Figura 1. Variación compartida entre muflón y oveja doméstica. **A:** *CSN1S1*, **B:** *CSN2*, **C:** *CSN1S2*, **D:** *CSN3*.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado con el proyecto AGL2016-76108-R concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). Luigi-Sierra, M.G es beneficiaria de una beca FPI de MINECO (BES-2017-079709) y Mármol-Sánchez, E de una beca FPU de MECD (FPU15/01733).

Tabla 1. Frecuencia de mutaciones no sinónimas identificadas en diferentes poblaciones de ovejas domésticas y muflón.

Gen	Variante	Sustitución Nucleotídica	Efecto*	Or. Lejano	Europa	Irán	Marruecos	Muflón
CSN1S1	rs593739642	c.34G>T	p.Val12Phe - DEL	0	0	0	0.05	0
	Oar_3.1:6:85091243:G>A	c.73G>A	p.Gly25Arg	0	0	0	0	0.029
	Oar_3.1:6:85093731:T>C	c.191T>C	p.Ile64Thr	0	0	0	0	0.029
	Oar_3.1:6:85094448:C>T	c.215C>T	p.Ala72Val	0	0	0	0	0.029
	Oar_3.1:6:85098887:A>C	c.385A>C	p.Lys129Gln	0	0	0	0	0.148
	rs420959261	c.626C>T	p.Thr209Ile - DEL	0.75	0.7	0.85	0.85	0.029
CSN1S2	Oar_3.1:6:85184193:G>A	c.34G>A	p.Val12Ile	0	0	0	0	0.059
	rs588453493	c.178G>A	P.Val60Ile	0	0	0.05	0.05	0
	rs596411552	c.187G>T	p.Ala63Ser	0	0	0.05	0.05	0
	rs430397133	c.268G>T	p.Asp90Tyr - DEL	0.7	0.2	0.7	0.35	0.118
	rs591309828	c.344T>C	p.Leu115Pro	0.1	0	0.05	0.05	0.176
	rs597242020	c.353G>A	p.Gly118Asp	0	0	0.05	0	0
	rs424657035	C.358A>G	p.Ile120Val	0.7	0.4	0.7	0.4	0.059
	Oar_3.1:6:85190241:C>T	c.407C>T	c.407C>T	0	0	0	0	0.118
	Oar_3.1:6:85193514:T>C	c.487T>G	p.Phe163Val	0	0	0	0	0.059
	rs399378277	c.527G>A	p.Arg176His	0	0	0	0	0.059
CSN2	Oar_3.1:6:85116838:A>G	c.679A>G	p.Thr227Ala	0	0	0	0	0.029
	rs416941267	c.634C>A	p.Leu212Ile	0.05	0.3	0.2	0.15	0.5
	rs430298704	c.595A>G	p.Met199Val	0.1	0.15	0	0.1	0
CSN3	rs420470202	c.307G>A	p.Ala103Thr	0	0	0	0	0.15
	Oar_3.1:6:85316665:A>G	c.410A>G	p.Lys137Arg - DEL	0	0	0	0	0.029

* DEL, deletéreo.

Tabla 2. Mutaciones no-sinónimas identificadas y descritas por otros investigadores en ovinos domésticos.

Gen	Variante	Sustitución Aminoacídica	Alelo Asociado
CSN1S1	rs420959261	p.Thr209Ile	C^{1,2}
CSN1S2	rs588453493	P.Val60Ile	C³
	rs596411552	p.Ala63Ser	C³
	rs430397133	p.Asp90Tyr	B³
	rs424657035	p.Ile120Val	B³
	rs399378277	p.Arg176His	G³
CSN2	rs430298704	p.Met199Val	G^{4,5,6}

¹Cerioti et al., (2004), ²Othman et al., (2013); ³Giambra y Erhardt, (2012); ⁴Bastos et al., (2001); ⁵Corral et al., (2010); ⁶Suárez-Vega et al., (2017).

ORIGIN OF THE CASEIN GENE VARIANTS IN SMALL RUMINANT: A COMPARISON BETWEEN SHEEP AND GOAT.

ABSTRACT: The aim of this study was to characterize the diversity of the ovine casein genes, estimate if such variation emerged before domestication and compare it with the results already reported in caprine. Whole genome sequences from 40 domestic sheep (*Ovis aries*) and 17 mouflons (*Ovis orientalis*) were used. Our analysis showed that domestic sheep and mouflon share a large proportion of casein variants. Most of the missense variants segregated in both species and some of them had already been reported to have an impact on milk yield and composition. These results indicate that an important part of casein polymorphisms were already segregating prior to the domestication of sheep similar to the results reported in goat and bezoar by Guan et al. (unpublished).

Keywords: sheep, goat, casein, polymorphism.