

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS SNPS DE LA KAPPA CASEÍNA (CSN3) Y VALORES GENÉTICOS PARA LA PRODUCCIÓN LECHERA EN LA RAZA CAPRINA MURCIANO-GRANADINA

STUDY OF THE EFFECTS OF KAPPA CASEIN (CSN3) GENOTYPE ON MILK PRODUCTION BREEDING VALUE COMPONENT IN MURCIANO-GRANADINA GOAT BREED

Asociación del polimorfismo del gen de la CSN3 con caracteres productivos

Association of CSN3 casein gene polymorphisms on productive characters

Landi, V.^{1,2*}, Gómez, M.^{1,2}, Pleguezuelos, J.^{2,3}, Gama, T. L.⁴, Carolino, N.⁴, Delgado, J. V.², Martínez, A.^{1,2}

¹Animal Breeding Consulting SL - Parque científico tecnológico de Córdoba -Rabanales21. *landivincenzo@yahoo.it.

²Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria – Universidad de Córdoba. 14071 Córdoba, España.

³Asociación Nacional de Criadores de Caprino de Raza Murciano Granadina. 18220 Albolote, Granada.

⁴Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, Santarém - Fonte Boa 2005-04. Portugal.

Abstract

The milk "casein" type proteins in goats are controlled by four genes located in the so-called casein complex on chromosome 6. Many studies that confront the genotypes of these genes with the amount of the corresponding proteins in milk or with several technical features as the clotting ability of proteins to produce cheese. But there is difficulty in finding a population under production control and with standardized phenotypic observations in this species. This work is part of a larger study aimed to study the complex of casein (CSN1S1, CSN2, CSN1S2, y CSN3) in Murciano-Granadina goat breed. In this first study, the SNPs present in the K casein gene were analyzed using the technique of SnapShot including them in an statistical model to assess if does exist association between breeding values for milk production traits of animals studied. The results show a significant association between genotype with total milk production at 210 days. A difference between the two genotypes has been found. Further studies including more animals and the other three casein genes which are still remaining, are necessary.

This work was partially supported by Torres Quevedo Program of MCI ministry.

Palabras clave:

SNPs
Valor de cría
CSN3 caseínas

Keywords:

SNPs
Breeding value
Casein CSN3

Resumen

Las proteínas de la leche en la especie caprina, pertenecientes al tipo "caseína", están controladas por cuatro genes situados en el complejo caseína, localizado en el cromosoma 6. Son muchos los estudios realizados en los que se relacionan los genotipos para dichas caseínas con su cantidad correspondiente en la leche o con varias cualidades técnicas como la capacidad de coagulación de las proteínas para la producción quesera. Sin embargo, existe dificultad para encontrar una población bajo un control de rendimientos adecuado y por lo tanto con observaciones fenotípicas estandarizadas en esta especie. Este trabajo forma parte de un proyecto más amplio, cuyo objetivo es estudiar el complejo de las caseínas (CNS1S1, CNS1S2, CNS2 y CSN3) en la raza caprina Murciano Granadina. En este primer estudio, los SNPs presentes en el gen de la Kappa caseína se han analizado mediante la técnica de SnapShot, para posteriormente aplicar un modelo estadístico con el fin de evaluar sus efectos sobre el valor genético de los caracteres de producción láctea. Los resultados obtenidos muestran una asociación significativa del genotipo con la producción total de la leche estandarizada a los 210 días. También se encontraron diferencias entre los dos genotipos (AA y BB), sugiriendo que existe algún tipo de relación entre los genotipos de este gen y los valores de cría estudiados. Es necesario realizar un estudio más amplio incluyendo más animales y los tres genes de las caseínas restantes.

Este proyecto se realiza con financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación, Torres Quevedo.

Introducción

Los genes para las cuatro caseínas (CSN1S1, CSN2, CSN1S2, y CSN3) están situados en el cromosoma 6 del ganado caprino y representan un grupo de ligamiento único de 250 Kbps (Vacca et al. 2009). Estos genes codifican respectivamente para las proteínas α S1-CN, β -CN, α S2-CN, and κ -CN, principales componentes de la leche (Caroli et al. 2006; Gigli et al. 2008). Estos genes determinan diferentes características nutricionales y físicas de la leche y se heredan como haplotipos (Caroli et al. 2006).

En la especie caprina se han encontrado un elevado número de polimorfismos que afectan a la porción codificante de estos genes y que tienen efectos sobre la producción lechera, hecho que hace difícil un estudio (Caroli et al. 2006). La κ -CN caseína representa el 15% de las proteínas de la leche caprina y es codificada por un gen constituido por 5 exones (Yahyaoui et al. 2003). Los polimorfismos encontrados que afectan a este gen son 16 (Caroli et al. 2006) correspondientes a 13 variantes proteicas diferentes, así como una gran variedad de polimorfismos neutros (Caroli et al. 2006). Este tipo de caseína históricamente no ha sido relacionada con las caseínas “sensibles al calcio” pero es funcionalmente importante para la estabilización de las micelas (Pirisi et al. 1999); también determina el tamaño y la estabilidad del coágulo que es una característica importante en la producción de queso (Yahyaoui et al. 2003). Sin embargo, la influencia del CSN3 sobre los caracteres productivos de la leche no ha sido aclarada aún (Hayes et al. 2006). La escasez de poblaciones caprinas bajo un esquema de selección moderno (BLUP), no ha permitido la realización de estudios sobre la relación de los polimorfismos con los rendimientos fenotípicos. En efecto, se sabe que algunos polimorfismos de la CSN3 son responsables de la presencia de una mayor cantidad de proteínas en la leche, así como, de la mejora de las cualidades tecnológicas del cuajo, pero todavía no hay resultados claros (Caravaca et al. 2009) del efecto de la CSN3 sobre los caracteres de producción. De las 7 mutaciones presentes en el exón 4 del gen de la κ caseína, sólo 3 se han identificado en las razas caprinas de la Península Ibérica, y que se corresponden a los tipos A, B y C (Yahyaoui et al. 2003). El objetivo de este estudio ha sido el genotipado de dichos polimorfismos de la caseína CSN3 en sementales de raza Murciano-Granadina, y su relación con los valores genéticos de los caracteres de producción de leche. Se pretende utilizar los marcadores como un modelo de selección asistida por marcadores.

Material y métodos

Para este estudio se emplearon los resultados de la evaluación genética 2010 de la raza caprina Murciano-Granadina, seleccionándose los primeros 47 machos, escogidos según la fiabilidad de su valor de cría o valor mejorante. Con ello se garantiza el disponer de animales con un mayor nivel de confianza asociado a este valor genético predicho. Los valores de cría se han calculado según los fenotipos recolectados en controles funcionales y estandarizados a 210 días de lactación, utilizando la metodología BLUP Modelo Animal con observaciones repetidas. Los diferentes valores, analizados estadísticamente, se muestran en la tabla I. De cada uno de los animales se extrajo el DNA a partir de 5 μ l de sangre, utilizando el método de Walsh (1991). Con los cebadores 5'-TCC CAA TGT TGT ACT TTC TTA ACA TC-3' y 5'-GCG TTGTCC TCT TTG ATG TCT CCT TAG-3', diseñados a través del software Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000), y utilizando la secuencia AF485339 se amplificó, mediante PCR, un fragmento de 400 bp del IV exón del gen de la κ caseína. La PCR se realizó en 25 μ l totales, compuestos por: 1 U de polimerasa Taq (Biotools Madrid), 1X PCR buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTPs, 0,1 μ M de cada cebador y 25 ng de DNA genómico. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C durante 5 minutos, 35 ciclos de 95 °C-25 segundos, 55 °C-45 segundos y 72 °C-45 segundos. Cinco microlitros del producto de la reacción fueron purificados con 1U de Shrimp Alkaline Phosphatase y 0,2 U de Esonuclease I (Fermentas) incubándolos a 37°C durante 3 horas, a 80°C y durante 15 minutos para inactivar las enzimas. El producto purificado se utilizó como DNA molde para la reacción de primera extensión, utilizando el kit comercial SNAPShot multiplex system (Applied Biosystems). La reacción estuvo compuesta por 5 μ l del producto de la PCR purificado, 0,4 μ l de SNAPSHOT miX, 1 μ l de buffer de PCR 5X, 0,2 μ M de los cebadores 328Rmer: AGCAATGGTATTGATGGCAGGGA, 440Fmer (AT) 13GAAGCTTCCTCAGAATCGATTG, y agua hasta 10 μ l. Los ciclos térmicos utilizados fueron los aconsejados por el fabricante. Estos cebadores individualizan mutaciones, que permiten distinguir las dos principales especificadas en las razas europeas para la K caseína, así como, características de los tipos alélicos “A” y “B”. La primera es una sustitución A>G, que afecta al nucleótido 328 de la secuencia AF485339, y la segunda, una sustitución C>T, que afecta al nucleótido 440. Los tipos alélicos “A” y “B” vienen definidos por combinaciones de SNPs para los dos loci 328 y 440 (GG-CC: tipo “A”; AA-CC: tipo “B”; AA-TT: tipo “C”). La reacción de extensión se purificó con 1 U de Shrimp Alkaline Phosphatase incubándola a 37 °C durante 1

hora, y a 80 °C durante 15 minutos. Un total de 1 µl de producto purificado, 0,15µl de Liz 120 (Applied Biosystems) y 2 µl de formamida desionizada fueron cargados en un secuenciador automático ABI Prism 377 después de la desnaturalización a 95°C durante 3 minutos. Los resultados fueron tipificados posteriormente con el software ABI Genescan y Genemapper 4 (Applied Biosystems). El análisis estadístico se realizó con el programa Microsoft Excel 2010 para el cálculo de las frecuencias alélicas, y los estadísticos básicos utilizando el software SAS (SAS Institute 2001), aplicando el procedimiento GLM para verificar la relación entre los genotipos y los valores genéticos, y poder observar así las posibles diferencias existentes entre individuos con genotipos diferentes.

Resultados y discusión

Los resultados del análisis de las dos mutaciones, obtenidos en este trabajo, coinciden con los presentados en otros estudios. En efecto, el SNPs 440mer resultó ser completamente monomórfico para el alelo C en la muestra estudiada, algo que no se había considerado en los otros análisis: este mismo resultado coincide con el obtenido en la misma raza por Yahyaoui et al. (2003). Sin embargo, los mismos autores, en una publicación anterior (Yahyaoui et al. 2001), encontraron una frecuencia muy baja de sustitución de Timina (T), que identifica al alelo "C" de la proteína. Probablemente, y con una frecuencia tan baja, esta mutación ha podido desaparecer de la población, o simplemente, como alternativa, que no esté presente en la porción seleccionada para este estudio, pues está asociada a una baja producción. El *locus* 328mer presentó una frecuencia alélica del 71,28% para el alelo A y del 28,72% para el alelo G. A nivel genotípico, se obtuvo un 6,38% de animales homocigotos para el genotipo GG (tipo AA), mientras que Caravaca et al. (2009) observaron un 12,4% para la misma raza. Se encontró un 48,94% de homocigotos para el genotipo AA (tipo BB), frente al 41,3% del estudio de Caravaca et al. (2009). Finalmente se identificaron un 44,68% de animales heterocigotos, es decir, un porcentaje muy similar al 44,20% obtenido por Caravaca et al. (2009).

Las pequeñas discrepancias observadas entre nuestros resultados y los de la literatura pueden ser debidos, básicamente, al tipo de muestreo realizado. En el presente trabajo se tomaron en cuenta animales con valores de cría diferentes, tanto positivos como negativos, pero siempre con elevadas fiabilidades. Todos los animales de este estudio forman parte del núcleo de selección de la población Murciano-Granadina.

En el conjunto global de datos, sólo el valor de cría para los kg de leche estandarizada a los 210 días (Tabla I), resultó estar influenciado significativamente por el genotipo del *locus* de la caseína CSN3.

Tabla I. Estadísticos simples de los valores de cría (VG). El asterisco en la columna de la media indica los valores influenciados por el genotipo con $P < 0,05$ (*Simple statistical breeding value (VG)*). *The star indicate the $P > 0, 05$* .

VG	N	Me	DE	Mín.	Máx.
LAC210	47	-7,46*	29,71	-70,84	61,65
GRAS210	47	-0,37	1,95	-4,67	3,65
PROT210	47	-0,26	1,21	-3,27	2,44
SE210	47	-1,19	5,21	-13,29	9,97

Leyenda: LAC210, valor de cría por kg de leche a 210 días de lactación; GRAS210, PROT210, SE210, valores de cría para la producción, respectivamente, de proteína total, grasas totales y extracto seco a 210 días. Para cada valor sigue el número de observaciones (N), la media (Me), la desviación estándar (DE) el valor mínimo (Mín) y el valor Máximo (Máx). (LAC210, breeding value for kg of milk on 210 days; GRAS210, Prot210, SE210 mean breeding value for fat, protein and dry extract, respectively. For every value follow the number of observations (N), the mean (Me), the standard deviation (DE), minimum and maximum value (Mín, Máx)).

Asimismo, los tres diferentes genotipos también resultaron correlacionados significativamente con las diferencias productivas del mismo carácter fenotípico (Tabla II). Se observó que el genotipo GG, correspondiente al tipo AA de la CSN3, estuvo asociado a los valores de cría menos mejorantes para todas las características (Tabla II). La presencia del genotipo AA (tipo BB), se ha asociado a una mejor calidad de la leche en diferentes estudios (Chessa et al. 2003; Caravaca et al. 2009), encontrándose, según nuestros resultados, en los valores de cría más positivos. Al tratarse de una heterogénea muestrade fenotipos, tenemos presentes animales con valores genéticos muy negativos, lo que conlleva que la media sea también negativa. Inesperadamente, los animales heterocigotos obtuvieron valores de la media ligeramente superiores a los otros genotipos. Cabe recalcar que el número de animales analizados para el estudio es bajo, y que la presencia de

animales con el genotipo GG (n=3) no permite obtener resultados estadísticamente significativos y poder llegar así a conclusiones claras. En estudios futuros se espera poder ampliar, de forma substancial, el tamaño de muestra. También, y como ya observaron diferentes autores (Jann et al. 2004; Hayes et al. 2006; Caravaca et al. 2009), las caseínas están codificadas por un clúster de genes que se comporta como un único haplotipo, y algunas de las caseínas menos estudiadas (CNS1S2 y β) quizás puedan tener también una repercusión importante en la producción y composición proteica de la leche en los rumiantes. Los resultados preliminares obtenidos nos exhortan a plantearnos un estudio en más profundidad del mismo, que incluya, por una parte, a más animales muestreados, así como, a los otros tres genes que componen el clúster: CSNS1, CSN2 y CSN1S2.

Tabla II. Medias de los valores de cría de las muestras analizadas según el método LS-MEANS, divididas por genotipos de la caseína CSN3. P<0, 05 (**) (*mean value of breeding value of analyzed samples by Ls-means method divided by genotype*).

GENOTIPO	TIPO*	VGLAC210	VGGRAS210	VGPROT210	VGESEC210
AA	BB	-9,41**	-0,62	-0,47	-1,88
AG	AB	-0,43**	0,06	0,11	0,05
GG	AA	-41,78**	-1,51	-1,19	-4,62

*: Nomenclatura según Yahyaoui et al. (2003).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido cofinanciado por el programa Torres Quevedo del Ministerio de Ciencia e Innovación de España.

Bibliografía

- Caravaca F., Carrizosa J., Urrutia B., Baena F., Jordana J., Amills M., Badaoui B., Sánchez A., Angiolillo A. & Serradilla J.M. (2009) Effect of α S1casein (CSN1S1) and κ casein (CSN3) genotypes on milk composition in Murciano-Granadina goats J Dairy Sci 92, 2960-4.
- Caroli A., Chiatti F., Chessa S., Rignanese D., Bolla P. & Pagnacco G. (2006) Focusing on the goat casein complex. J Dairy Sci 89, 3178-87.
- Chessa S., Budelli E., Gutscher K., Caroli A. & Erhardt G. (2003) Short communication: Simultaneous identification of five kappa-casein (CSN3) alleles in domestic goat by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. J Dairy Sci 86, 3726-9.
- Gigli I., Maizon D.O., Riggio V., Sardina M.T. & Portolano B. (2008) Short communication: casein haplotype variability in sicilian dairy goat breeds. J Dairy Sci 91, 3687-92.
- Hayes B., Hagesaether N., DNADNAoy T., Pellerud G., Berg P.R. & Lien S. (2006) Effects on production traits of haplotypes among casein genes in Norwegian goats and evidence for a site of preferential recombination. Genetics 174, 455-64.
- Pirisi A., Piredda G., Papoff C.M., Di Salvo R., Pintus S., Garro G., Ferranti P. & Chianese L. (1999) Effects of sheep alpha s1-casein CC, CD and DD genotypes on milk composition and cheesemaking properties. J Dairy Res 66, 409-19.
- Jann O.C., Ibeagha-Awemu E.M., Ozbeyaz C., Zaragoza P., Williams J.L., Ajmone-Marsan P., Lenstra J.A., Moazami-Goudarzi K. & Erhardt G. (2004) Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus. Genet Sel Evol 36, 243-57.
- Rozen S. & Skaletsky H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Methods in Molecular Biology. (ed. by Krawetz S MS), pp. 365-86. Humana Press, Totowa, NJ.
- SAS Institute (2001) SAS/STAT User's guide. In: Release 8.02. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Vacca G.M., Ali H.O.A.B., Carcangiu V., Pazzola M. & Dettori M.L. (2009) Genetic structure of the casein gene cluster in the Tunisian native goat breed. Small Ruminant Research 87, 33-8.
- Walsh P., Metzger D. & Higuchi R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 10, 506-13.
- Yahyaoui M.H., Angiolillo A., Pilla F., Sánchez A. & Folch J.M. (2003) Characterization and genotyping of the caprine kappa-casein variants. J Dairy Sci 86, 2715-20.
- Yahyaoui M.H., Coll A., Sánchez A. & Folch J.M. (2001) Genetic polymorphism of the caprine Kappa casein gene. Journal of Dairy Research 78, 209-16.