

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

T E S I S

**ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DEL GEN DE LA KAPPA
CASEÍNA EN BÚFALO ACUÁTICO (*Bubalus bubalis*) EN
LA CUENCA DEL PAPALOAPAN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

JAVIER SANTAMARÍA ALCÁNTARA

ASESOR DE TESIS:

DR. JOSÉ ABAD ZVALETA

JUNIO 2016

INDICE

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	2
3	ANTECEDENTES	4
3.1	Generalidades de los búfalos acuáticos.....	4
3.2	Clasificación taxonómica.....	4
3.3	Origen y distribución.....	4
3.4	El búfalo en México.....	5
3.5	Generalidades de la leche.....	6
3.6	Composición de la leche	7
3.7	Las caseínas	8
3.8	Producción de leche de rumiantes	9
3.9	El mejoramiento genético.....	11
3.10	Selección Asistida por Marcadores moleculares (SAM)	12
3.11	Factores y marcadores asociados a la calidad de la leche	13
3.12	Gen de la k-caseína (CSN3).....	14
3.13	El gen CSN3 como marcador molecular	15
3.14	Estudios del gen CSN3.....	16
3.15	Estudios del gen de la kappa caseína en Búfalos.....	19
3.16	Técnicas Moleculares para la genotipificación.....	22
3.16.1	Microsatelites.	22
3.16.2	RFLP	23
3.16.3	PCR-RFLP.	24
4	JUSTIFICACIÓN	24
5	OBJETIVOS	25
5.1	Objetivo general	25
5.2	Objetivos particulares.....	25
6	HIPÓTESIS	26
7	MATERIALES Y MÉTODOS	26
7.1	Localización geográfica.....	26
7.2	Toma de muestras de sangre	27
7.3	Extracción de ADN.....	27

7.4	Estimación y confirmación de presencia de ADN genómico	28
7.5	Análisis Bioinformático	28
7.6	<i>Diseño y alineamiento de oligonucleótidos contra el molde</i>	28
7.7	Cálculo de Tm teórica	29
7.8	Amplificación del ADN	29
7.9	Visualización de productos de PCR en gel de agarosa.....	31
7.10	Ensayos de restricción RFLP.....	31
7.11	Detección de Polimorfismos mediante secuenciación	32
7.12	Alineamiento entre las muestras secuenciadas provenientes de búfalos	32
8	RESULTADOS.....	32
8.1	Confirmación de la presencia de ADN genómico	32
8.2	Alineamiento de oligonucleótidos seleccionados contra la secuencia de la región de estudio de búfalo acuático.	33
8.3	PCR	36
8.4	Análisis de la secuencia amplificada (Región polimórfica análoga al marcador MB002) y elección de enzimas de restricción.....	37
8.5	Digestiones RFLP	39
8.5.1	Digestiones con enzima Hinf I	40
8.5.2	Digestiones con enzima Acu I	40
8.6	Análisis de los resultados de secuenciación (Región polimórfica análoga al marcador MB002) y Clustal.....	42
9	DISCUSIÓN	47
10	CONCLUSIONES	51
11	PERSPECTIVAS.....	52
12	REFERENCIAS.....	55
13	ANEXOS	64
13.11	Anexo 1 Quick g DNA TM Blood Miniprep.....	64
13.12	Anexo 2 Secuencia del gen CSN3 en búfalo Acuático obtenida del NCBI con clave de acceso AM900443.1. Esta secuencia contiene los exones del 1-5 del gen cas-k	66

1 RESUMEN

Las caseínas son una familia de proteínas de la leche que se encuentran en distintas formas moleculares, estas han sido agrupadas en α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína y κ -caseína, con distintas variantes alélicas de cada una. Diversos estudios han demostrado que la presencia de una u otra variante se asocia a la calidad y propiedades de la leche en distintas especies animales. Los estudios se han concentrado a la descripción de las variantes alélicas A y B del gen *CNS3* (κ -caseína), hoy en día muy estudiadas y fuertemente asociadas a la mejor calidad de la leche. Por lo cual resulta de gran importancia el análisis e identificación de animales que poseen estas variantes deseables a fin de mejorar la calidad en la producción de los hatos productivos. Con el objetivo de analizar la región análoga al marcador MB002 del gen *CNS3*, determinar las frecuencias alélicas presentes la población de búfalos acuáticos muestreada e identificar individuos portadores de las variantes deseables. Se realizaron ensayos de RFLP's utilizando las enzimas de restricción Hinf I y Acu I. Fueron secuenciadas muestras representativas de productos de restricciones de cada genotipo identificado. Se identificaron dos polimorfismos de nucleótido simple (por sus siglas en ingles SNP's), que caracterizan a dos variantes alélicas del gen y se obtuvieron las frecuencias génicas para cada una de estas, las cuales fueron 0.835 para el alelo A y 0.165 para el alelo B. Se observó alta frecuencia de homocigotos AA y ausencia de individuos homocigotos de la variante deseable BB. Conociendo el estado genético de dicho

marcador es posible generar recomendaciones para futuros programas de selección de animales portadores de la variante alélica deseable.

2 INTRODUCCIÓN

Debido a su alto valor nutricional, contenido de lípidos, proteínas, lactosa, sólidos totales y residuos minerales, la leche de búfalo se utiliza en diferentes regiones del mundo, para la fabricación de quesos, productos fermentados, o para su consumo en fresco (FAO, 2015). A pesar de que el búfalo de río es de origen asiático, se explota hoy en algunos países de Sudamérica, mediante la utilización de instalaciones lecheras vacunas adaptadas esta nueva especie. Hace apenas un par de décadas, esta especie fue introducida a México buscando mejorar los niveles de producción láctea, gracias a su excelente calidad de leche, y ganancia de peso superiores a la de los bovinos, su rusticidad, la cual permite su producción sin necesidad de grandes inversiones, además de adaptarse fácilmente a cualquier clima, requiriendo solo de agua, pasto y sombra, (Torres, 2006) condiciones que se encuentran en gran parte de la Cuenca del Papaloapan.

La ganadería en México ha pasado por un proceso de desarrollo, lento y de bajo rendimiento. Esto ha sido asociado a diversas causas principalmente la falta de financiamiento y la escasa o nula aplicación de tecnología dentro de los sistemas de selección y mejoramiento genético, limitándose casi totalmente al uso de estrategias tradicionales (Pereda *et al.*, 2005; Gallardo *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2009).

Gracias al producto de las investigaciones en Biología Molecular, hoy día contamos con gran variedad de herramientas nos permiten acelerar los procesos de selección

buscando mejorar el rendimiento y efectividad de los sistemas productivos. Una de estas herramientas y de las más importantes es la selección asistida por marcadores (SAM), la cual permite seleccionar individuos portadores de genes o variantes génicas de interés, para ser los predecesores de la futura progenie y así asegurar la presencia de características deseables en el futuro (Dekkers, 2005).

Existe una gran variedad de genes que han sido asociados al contenido proteico en la leche y por lo tanto a su calidad. El gen de la k-caseína ha sido ampliamente estudiado con este fin y hasta ahora se han descrito hasta 9 distintas variantes alélicas de este gen en varias especies animales productoras de leche, considerado hoy en día como un marcador molecular, siendo las variantes A y B, las más frecuentes reportadas en bovinos especializados (Requena y Agüera, 2007).

La variante B, es la de mayor interés debido a que está asociada a resistencia térmica, menor tiempo de coagulación, mejor formación del cuajo y tamaños de micelas más variado, características favorables para la industria de los quesos que se resumen en mayores rendimientos, comparado con la variante A la cual ofrece mayor tiempo de coagulación, mayor tamaño de micela y menores rendimientos (Azevedo *et al.*, 2008).

La importancia del estudio y determinación de las variantes alélicas presentes en búfalo acuático radica en el conocimiento y aprovechamiento de dicho marcador genético para las poblaciones seleccionadas y además añade la posibilidad de generar información para implementar sistemas de selección asistida en esta especie de manera temprana.

3 ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de los búfalos acuáticos

El búfalo acuático es un animal multipropósito, se adapta fácilmente a regiones tropicales y subtropicales, especialmente en zonas inundables donde los bovinos tienen muy pocas posibilidades de prosperar, pero el búfalo puede aprovechar de manera mucho más eficiente los recursos forrajeros (López *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006).

Por ello, esta especie se ha presentado como una alternativa de producción rentable para los ganaderos (Martínez *et al.*, 2006), además tiene una ganancia de peso de 0.9 a 1.0 kg/día contra una ganancia promedio de 0.75 kg/día de los bovinos (Ranjhan, 2007) y un rendimiento lácteo superior a la del bovino, ya que con tan solo 5 L se puede elaborar 1 kg de queso en comparación con la leche de bovino de la cual se requiere de 8 a 10 L para 1 kg de queso (Rosales, 2009).

3.2 Clasificación taxonómica

El búfalo acuático es un rumiante perteneciente a la familia *Bovidae*, subfamilia *Bovinae*, tribu *Bovini*, en la que se incluyen los géneros *Bos* (bovinos, gaur, banteng y kouprey), *Bison* (bisonte americano y europeo), *Syncerus* (búfalo africano) y *Bubalus* (búfalo de agua y otras especies salvajes). El búfalo doméstico es descendiente de la especie salvaje *Bubalus arnee* (Borghese y Mazzi 2005; Montiel, 2008).

3.3 Origen y distribución

Esta especie data sus orígenes en el continente Asiático, aproximadamente 60,000 a.C. Sin embargo, su domesticación fue varios miles de años después alrededor del

año 3,000 a.C. al sur del mismo continente, específicamente en la India, Irak y China (INTA, 2006; Almaguer, 2007). La población de búfalos acuáticos se encuentra distribuida en todos los continentes y la población de estos, hoy en día, se estima en alrededor de 168 millones de cabezas: más del 95 por ciento se encuentra en Asia; el dos por ciento en África, particularmente en Egipto; otro dos por ciento en América, y menos del uno por ciento en Australia y Europa. En el continente Americano, Brasil se sitúa en primer puesto con 3, 500,000 cabezas, Venezuela 150,000; Argentina 50,000; México 40,000 y Colombia 30,000 (FAO, 2015).

3.4 El búfalo en México

La introducción de búfalos México se llevó a cabo por primera vez en el año de 1996 por un grupo de ganaderos mexicanos en sociedad con el señor A. P. Leonards de origen estadounidense, fue llevada a cabo por el sureste mexicano con animales provenientes de la India, estos llegaron a Belice y tras completarse el papeleo y permisos pertinentes, fueron importados los primeros ejemplares a México. Hoy en día existen búfalos en Nayarit y algunos estados del sur como Veracruz, Tabasco, Campeche, Puebla y Chiapas estimándose una población de 40,000 cabezas en esta región (Patiño *et al.*, 20011; FAO, 2015). A pesar de que han pasado más dos décadas desde su introducción se conoce poco sobre la situación de esta especie en el país (Suazo, 2011). En algunas unidades productivas esta especie es manejada en sistemas doble propósito para producción de carne y leche, la cual es usada principalmente para la elaboración de queso mozzarella como en el estado de Nayarit (Lopez, 2015). En el estado de Veracruz, se ha reportado la existencia

de hasta 500 cabezas en un solo rancho, las cuales son manejadas en el sistema de monopropósito cuya producción está dirigida hacia carne (Suazo, 2011).

En México las principales razas de búfalos presentes son la Murrah y Carabao la primera en mucho mayor proporción que la segunda, así como cruza de estas (Suazo, 2011).

La producción de esta especie va en aumento debido a su buena capacidad de producir carne, su rusticidad que le otorga una alta resistencia a enfermedades y su capacidad nata de producir volúmenes considerables de leche de buena calidad (Presicce, 2007).

Para resaltar la importancia de esta especie en el país, el 13 de noviembre del año 2015 se llevó a cabo una conferencia en el estado de Veracruz, titulada “Inicio de la temporada de nacimiento del Búfalo”, mediante la cual se informa de cómo esta especie es una alternativa altamente rentable para ganaderos y productores (Lopez, 2015).

3.5 Generalidades de la leche

La leche es un líquido blanco y opaco de sabor dulce segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos tras el nacimiento de la cría, tiene una composición compleja, y potencial de hidrogeno (pH) cercano a la neutralidad (Alais, 2003). La función natural de la leche es la de ser el alimento exclusivo de los mamíferos jóvenes durante el período crítico de su existencia, tras el nacimiento, cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituida por otros alimentos. Entre sus diferentes funciones fisiológicas están: proteger el tracto gastrointestinal de las crías contra patógenos, toxinas e inflamación y contribuir a la salud metabólica

regulando los procesos de obtención de energía, en especial el metabolismo de la glucosa y la insulina, las cuales se llevan a cabo principalmente por proteínas y péptidos, incluyendo las inmunoglobulinas, las enzimas, los inhibidores enzimáticos, los factores de crecimiento, las hormonas y los agentes antibacteriales contenidos en la misma (Alais, 2003).

La leche de varias especies animales principalmente la de bovino, es usada para consumo como parte de la dieta humana siendo esta una fuente importante de proteínas, minerales y vitaminas. Además, es utilizada como la materia prima principal para la elaboración de una gran cantidad de derivados lácteos, entre los cuales encontramos principalmente a los quesos y algunos otros productos resultados del procesamiento de la misma (Molina *et al.*, 2006).

3.6 Composición de la leche

Químicamente la leche es una suspensión de materias proteicas (caseína y albuminoides), en un suero constituido por una solución verdadera que está conformado principalmente por grasas, lactosa y sales. A ellos se añaden otros componentes numerosos, presentes en cantidades mínimas; lecitinas, vitaminas, enzimas, nucleótidos (nt), gases disueltos, etc. (Alais, 2003; Wolter *et al.*, 2004).

Uno de los constituyentes de mayor importancia comercial en la leche después de las proteínas son los lípidos, ya que la leche se valora tanto por su contenido de grasa, como de proteínas, estos componentes confieren propiedades tecnológicas únicas, que influyen en el comportamiento de la leche y la mayoría de los productos lácteos (Thompson *et al.*, 2009). Ambos constituyentes en la leche de búfalo componen alrededor del 12.2 % del total de los compuestos (Figura 1), mientras en

la leche de bovinos el 8.2 %. Su composición y concentración varían según la especie, raza que la produce y etapa de la lactancia (Agudelo y Beyoda, 2005).

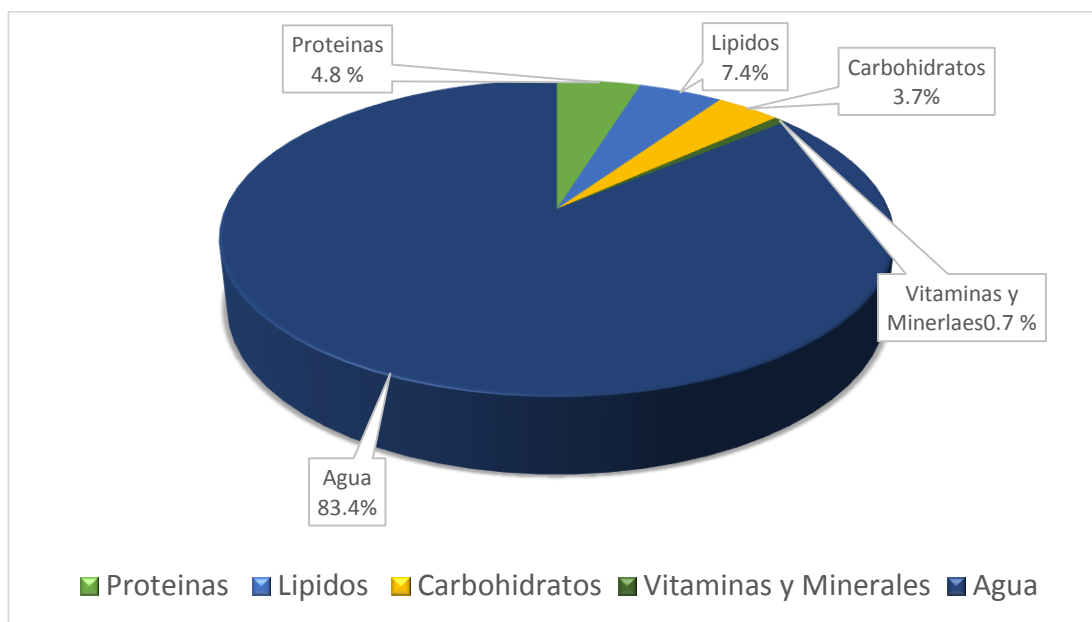


Figura1. Composición de la leche de búfalo (Fuente: Alais, 2003)

3.7 Las caseínas

Las proteínas de la leche se dividen en dos grandes grupos: las séricas, que constituyen un 20 % de la proteína total y las caseínas, que constituyen un 80 % del total. Las proteínas séricas de la leche, son proteínas sensibles al calor, se desnaturalizan fácilmente y se vuelven insolubles después del tratamiento térmico y existen dos principales tipos, α -lactoalbúmina y β -lactoalbúmina (Alais, 2003).

Las caseínas son proteínas producidas en las células de las glándulas mamarias, estas poseen el elemento fósforo y por lo general se encuentran asociadas a calcio (Requena *et al.*, 2007). Durante la etapa de lactancia, se inician los procesos de agregación y asociación de las caseínas en partículas esféricas, llamadas micelas de caseína las cuales tienen una estructura sólida y esponjosa formada por un 92

% de caseína y un 8 % de sales (principalmente fosfato de calcio en estado coloidal) (Ferradini *et al.*, 2006).

Las caseínas han sido clasificadas como; α 1- caseína (CSN1S1), α 2-caseína (CSN1S2), β -caseína (CSN2) y k-caseína (CSN3), además de la γ -caseína (γ -CN), la cual se encuentra en mayor proporción y se deriva de la degradación de la β -caseína (Bawden *et al.*,1999; Farrel, 2004; Belteanu *et al.*, 2007).

Las proteínas de caseína se caracterizan por la gran cantidad de variantes génicas que se han descrito, así como por la presencia de un número variable de grupos fosfatos unidos a serina y restos prolina, exponiéndose a un número mayor de procesos de fosforilación y modificación de la estructura respectivamente (Phadungath, 2005; Ferradani *et al.*,2006; Kaminski *et al.*, 2007).

3.8 Producción de leche de rumiantes

Las diferentes especies de mamíferos producen leche que en forma general tiene una composición muy semejante, pero puede presentar diferencias importantes en su composición centesimal y tener, como consecuencia, propiedades muy diferentes. En la tabla 1 se muestra la diferencia en la composición de la leche de distintas especies de rumiantes, la cual es característica tanto por su elevada proporción de caseína en el contenido de proteínas y por una proporción bastante elevada de ácidos orgánicos de bajo peso (Alais, 2003).

Tabla 1. Datos analíticos sobre los distintos tipos de leche de algunos rumiantes productores de leche.

Especie	Composición p. 100 g				Materias Nitrogenadas		
	Solidos Totales	Materia Grasa	Lactosa	Sales	Totales	Caseína %	N.P.N %
Vaca	12.5	3.5	4.7	0.8	3.5	78	5
Cabra	13.8	4.3	4.7	0.8	4	75	7
Oveja	19.1	7.5	4.5	1.1	6	77	5
Búfala	17.8	7.5	4.7	0.8	4.8	80	-
Reno	31.9	17.5	2.5	1.5	10.4	80	-

M.N.N.P: Materias nitrogenadas no proteicas. Fuente: Alais, 2003.

Como es posible observar en la tabla anterior dentro de los mismos rumiantes existe diferencia en el contenido caseína. Es evidente que la leche de búfalo tiene un contenido nutritivo superior a la leche de los bovinos, superando varios de sus componentes, otorgándole características importantes como por ejemplo mejores rendimientos en la elaboración de productos lácteos (Alais, 2003; Requena y Agüera, 2007).

Incluso dentro de una misma especie, las diferentes razas producen leches cuya composición varía, aunque dentro de límites reducidos, conservando constantes ciertos contenidos. Existen, incluso variaciones individuales; la aptitud lechera es hereditaria y una de las bases para la selección (Alais, 2003).

3.9 El mejoramiento genético

La mejora genética de las poblaciones persigue como principal objetivo, obtener avances en características económicamente importantes y esto se logra generación tras generación a través del aumento de la frecuencia de genes o variantes genéticas favorables para la manifestación de una característica dada (Visscher *et al.*, 2008).

Los sistemas de selección junto a los de cruza son la base en el mejoramiento animal. Para que estos sistemas tengan éxito es necesario tener como base sólidos conocimientos de los parámetros genéticos y tener claro la forma en que pueden realizarse cruza para aumentar la frecuencia de los alelos deseados en la progenie, logrando las características genéticas deseadas (Visscher *et al.*, 2008).

Existen dos tipos de selección: la natural y la artificial. La selección natural consiste en los cambios génicos producidos por la fuerza de la evolución en los seres vivos generando cambios graduales anatómicos y fisiológicos (Warwick *et al.*, 1992), por lo cual esta no trae directamente beneficios productivos.

Por su parte la selección artificial, es totalmente controlada por el hombre y está basada en dos aspectos principales, la selección de reemplazos y la eliminación de animales no deseados (Rodero *et al.*, 2000). Entre múltiples estrategias usadas para la selección artificial dirigidas al mejoramiento, se incluyen: la selección tradicional, la selección por pedigrí, la selección por prueba de progenie, y la SAM, siendo esta última la más prometedora como una herramienta de biología molecular.

La selección tradicional es una estrategia que esencialmente se fundamenta en la observación de los atributos físicos y características biológicas del animal candidato a ser progenitor de la siguiente generación, estas características pueden o no ser

cuantificables y se basan en la experiencia y percepción individual de cada ganadero, llevando a resultados en tiempos prolongados. Pero es bien sabido que su aplicación ha sido la base en los sistemas de mejoramiento animal durante muchos años (Vergara *et al.*, 2004; Van Eenennaam , 2006).

3.10 Selección Asistida por Marcadores moleculares (SAM)

El increíble desarrollo y uso de la biotecnología en las distintas áreas incluyendo la industria ganadera, ha contribuido a la determinación de la variabilidad genética presente en el genoma de diversas especies animales, posibilitando así obtener una mejor comprensión de la relación existente entre genotipo y fenotipo observado (Casas, 2002).

Los marcadores genéticos moleculares son fragmentos de ADN que debido a la ligación con otra fracción de ADN sirven de referencia para detectar la transmisión de un segmento de cromosoma y con ello la transmisión de una característica conocida de una generación a otra (Dekkers y Hospital, 2005). La SAM consiste en seleccionar animales portadores de estos marcadores moleculares que pueden ser genes o variantes genéticas, asegurándose así de tener un desempeño favorable en rasgos productivos de interés en la progenie (Cunningham y Meghen, 2001; Dekkers y Hospital, 2002; Eenennaam V., 2006; Canizal y Rivera, 2007). Cabe mencionar que la mayoría de los rasgos elegidos para su aplicación son cuantitativos y además son el resultado de la influencia de varios genes y factores ambientales.

La caracterización de los genomas con ayuda de distintos marcadores moleculares como microsatélites y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) ha dado paso a

la identificación de QTL's (Loci de rasgos cuantitativos) y de mayor especificidad QTN's (nucleótidos de rasgos cuantitativos) asociados a rasgos cuantitativos de gran interés económico como la resistencia a enfermedades, la fecundidad, habilidad materna, la calidad y rendimiento de la producción láctea (Casas, 2002; Deyoung *et al.*, 2005). La SAM ha contribuido al incremento de la productividad en la ganadería. La información generada por la identificación y estudio de un marcador genético refuerza la decisión para la selección de animales altamente productivos, ya que los animales que heredan el marcador también heredarán los efectos positivos asociados a este (Dekkers, 2004; Naqvy, 2007).

3.11 Factores y marcadores asociados a la calidad de la leche

La gran mayoría de los productos lácteos derivados de la leche dependen de la proteína y los lípidos presentes en esta (Phadungath, 2005), la concentración de ambos componentes es de los mejores indicadores para medir de la calidad de la leche; por lo tanto, mejorar estas características hoy en día es uno de los objetivos de la industria ganadera. Las condiciones adecuadas, así como una alimentación apropiada de los animales favorece la producción óptima de leche, sin embargo, la variación en su composición y por tanto su calidad está directamente relacionada a la composición genética del animal (Requena *et al.*, 2007).

Una gran porción de características asociadas a la calidad de la leche puede estar afectadas en cierto grado por los genes, ya que la mayoría de ellos están asociados a características cuantitativas. Por lo cual, la búsqueda y estudio de genes y/o marcadores asociados a rasgos de calidad de la leche es uno de los objetivos

principales para el mejoramiento de esta característica (Kaminski, 2004; Luden, 2005).

En el caso de la mayoría del ganado lechero, los polimorfismos del gen de la K-caseína, son ampliamente usados como marcadores moleculares por estar ligados con gran influencia en la calidad de la leche y propiedades de esta en cuanto al proceso de manufactura de productos lácteos (Farrel, 2004; Azevedo *et al.*, 2008).

3.12 Gen de la k-caseína (CSN3)

Los mapeos realizados han revelado que el orden y orientación de los genes de la caseína son conservados en varias especies incluyendo al búfalo. Los genes que codifican a las proteínas de caseína en esta especie se localizan en el cromosoma 7 en un locus de aproximadamente 250 kb conservando una homología de 97 % y la organización en forma de clúster de sus genes homólogos en bovinos; α 1-caseína, β -caseína, α 2-caseína y k-caseína (Das *et al.*, 2000).

La orientación transcripcional va en el sentido 5' a 3', excepto β -caseína, la cual es transcrita en sentido 3' a 5' (Jann *et al.*, 2004; Kaminski, 2004; Azevedo *et al.*, 2008).

Los genes CSN1S1, CSN1S2 y CNS2 se encuentran en una región de aproximadamente 140 kb y pertenecen a un primer grupo, mientras que el gen de la CNS3 corresponde a segundo y se localiza en una región de 70 kb aproximadamente (Farrel *et al.*, 2004).

El producto del gen CSN3 constituye el 12 % de las caseínas presentes en la leche de razas lecheras, su tamaño es de 14 kb y está formado por cinco exones y cuatro intrones (Das *et al.*, 2000) (Figura 2). La proteína tiene un peso molecular de 19,037 Da., y contiene 169 aminoácidos (Farrel *et al.*, 2004).

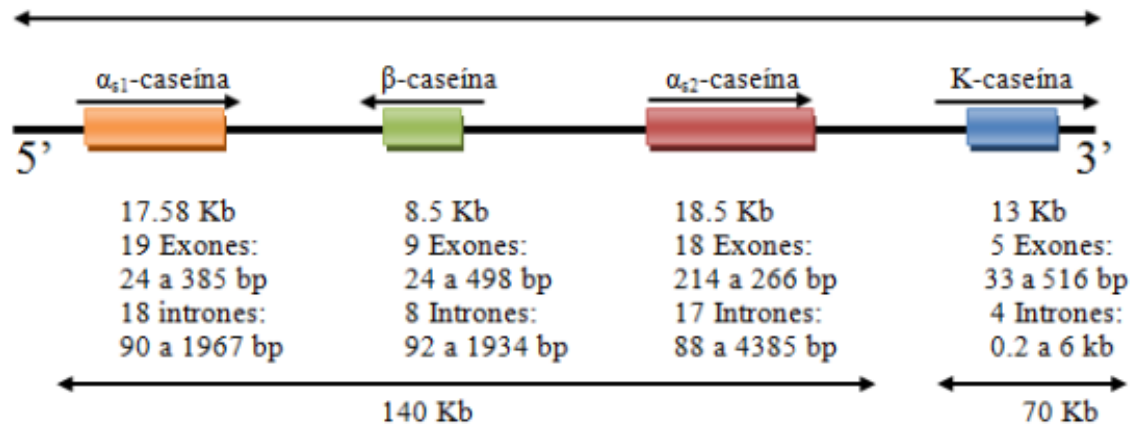


Figura 2. Estructura del locus de genes que codifican para las caseínas.

(Fuente: Bawden and Nicholas, 1999).

El papel que juega la k-caseína en la regulación del tamaño de las micelas y mantener de suspensión las caseínas en la leche, han sido el principal motivo para el estudio de este gen en las especies y razas lecheras.

3.13 El gen *CSN3* como marcador molecular

El estudio del gen de la k-caseína como marcador molecular en bovinos se lleva a cabo desde hace varios años. Se han identificado varios alelos de los genes de la caseína, incluyendo la k-caseína, caracterizándose cada uno de ellos por la sustitución de un par de bases en su secuencia de nucleótidos, lo que nos lleva a la expresión final de una proteína con características químicas y físicas ligeramente distintas (Schaar, 1981;).

La caracterización de los polimorfismos de este gen en distintas especies de interés comercial, principalmente bovinos ha permitido deducir su gran influencia en las propiedades de la leche para la industria láctea y de los derivados de esta (los

quesos principalmente). En ganado lechero se ha demostrado un incremento de 0.08 % más de proteínas, mayor contenido en sólidos totales, mejor consistencia del cuajo, menor tiempo de coagulación, mayor estabilidad al calor y a la congelación en animales portadores del genotipo homocigoto BB del gen de CSN3, traduciéndose en un incremento en el rendimiento de entre 5 y 10 % en la producción de quesos respecto a aquellos animales de genotipo AA para este gen los cuales producen más litros de leche (Van Eenennaam y Medrano,1991; Lar *et al.*, 1998; Lara *et al.*, 2002).

3.14 Estudios del gen CSN3

El gen CNS3 ha sido ampliamente estudiado en bovinos principalmente y algunas otras especies animales productoras de leche.

La k-Cn caprina, por ejemplo, fue aislada de la leche por Zittle y Custer en 1966 y su secuencia de 171 aminoácidos fue determinada posteriormente por Mercier 10 años después, demostrando que esta se muestra heterogénea en el análisis por electroforesis con al menos 5 isoformas diferentes. Demostrándose en estudios posteriores una fuerte correlación de las variantes de este gen con diferencias en las características productivas de cabras, atribuyendo efectos positivos a la presencia de la variante BB (Zi *et al*, 2011).

Por su parte en bovinos la principal especie productora leche en el mundo, hasta el día de hoy, se han caracterizado 9 variantes del gen de la k-caseína (A, B, C, E, F, G, H, I y J) y la mayoría de los estudios de tipificación mediante las técnicas de PCR-RFLP se enfocan a la determinación de la variante A y B las cuales son las variantes con mayor frecuencia en su segregación. En bovinos se ha descrito que

la diferencia que existe entre la variante A y B consiste en la sustitución de adenina por citosina en el codón 136 lo que resulta en el cambio de treonina por isoleucina, además de la sustitución del aminoácido ácido aspártico por alanina en la posición 148 (Tabla 2) (Neeling, 1964; Woychik, 1964; Schmidt, 1964; citado por Formaggioni *et al.*, 1999; Barroso *et al.*, 1998)

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos (AA) de las formas alélicas del gen Cas k (Fuente: Pacheco, 2010)
(SGE: Electroforesis en gel de almidón; IEF: Isoelectroenfoque).

Alel	Triplete, posición y cambio de AA en la proteína										Método	Raza o especie	Referencia
o	10	36	97	104	130	135	136	148	155	Stop	SGE		
A	Arg CGC	Pro CCT	Arg CGT	Ser TCA	Pro CCT	Thr ACC	Thr ACC	Asp GAT	Ser AGC	Paro TAA	alcalino	<i>Bos Taurus y Holstein</i> (Canada, Australia y USA)	MacKinlay y Wake, 1964
B							Ile ATC	Ala GCT			SGE a pH 8.6	<i>Bos Taurus</i> (Italia)	Di Stacio y Merlin 1977
C			His CAT					Val GCT			IEF	<i>Bos Taurus</i> : Yakut (Rusia y Finlandia)	Erhardt y Senft, 1989
Yak		Leu CTT			Arg CGT			Ala GCT		TGA	SSCP	<i>Bos Grunniens</i> (Yak)	Prinzenberg <i>et al.</i> , 1999

Los genotipos κ -CN están asociados con el porcentaje de proteína y las diferentes concentraciones relativas de las 6 principales proteínas de la leche. La variante κ -CN B se asocia con un mayor porcentaje de proteínas, resistencia térmica, menor tiempo de coagulación, mejor cuajo y tamaño de micelas (calidades importantes para la industria láctea), comparada con la variante A (Azevedo *et al.*, 2008). Se ha demostrado que de los individuos portadores del genotipo BB se obtiene mejor producción de quesos respecto al AA (Azevedo *et al.*, 2008). Las variantes de κ -caseína en este orden AA, AE, AB, EE, BB, presenta concentraciones κ -CN relativos de 3,77, 3,98, 4,12, 4,15, 4.17, y 4.55 % (w / w), respectivamente.

Las variaciones en este gen de forma individual o en combinación con las variantes de otros genes de las caseínas, afectan la calidad y cantidad de leche, así como sus propiedades para elaboración de productos lácteos (Martin *et al.*, 2002; Hoogendoorn *et al.*, 2003; Caroli *et al.*, 2009; Pauciullo *et al.*, 2013).

3.15 Estudios del gen de la kappa caseína en Búfalos

En búfalo existen pocos estudios enfocados a la identificación y análisis de QTL's, no obstante en algunos países, ya hace algunos años se empezó a estudiar en esta especie los genotipos del gen CSN3 debido a que al igual que el bovino, esta es una especie productora de leche sobre la cual se tiene mucho interés hoy en día y tales estudios se enfocan a la identificación de las variantes A y B descritas en bovinos, las cuales son las principales aleloformas de interés industrial y económico por sus efectos en la calidad y

propiedades de la leche proveniente de sus respectivos portadores (Mitra *et al.*, 1998).

Es de importancia hacer de conocimiento que, al ser los bovinos la primera especie donde se describieron las variantes del gen de CSN3, la secuencia de nucleótidos y aminoácidos que caracterizan a cada una de sus variantes en esta especie se ha usado como referencia para señalar si otra especie presenta cierta variante, aunque existen cambios en las secuencias de otras especies y variación en la nomenclatura a criterio de los autores.

En el búfalo acuático los polimorfismos del gen CSN3 han sido estudiados desde la década de los 80 usando la técnica de PCR-Polimorfismos de los fragmentos de restricción (por sus siglas en inglés RFLP). Un importante estudio a finales de la década de los 90 reveló mediante análisis de secuenciación la presencia de dos polimorfismos de nucleótidos simples (SNP's) en el codón 135 un cambio de ACC (Thr) por ATC (Ile) acompañado de una mutación silenciosa en el codón 136 ACC (Thr) por ACT (Thr) a los cuales nombró X1 (ACC) y X2 (ATC) respectivamente (Mitra *et al.*, 1998). Sin embargo, en la década pasada muchos de los estudios de tipificación de este gen en búfalo acuático, reportan monomórfico el gen CSN3, según los resultados obtenidos empleando técnicas como PCR-RFLP usando las enzimas de restricción Hind III y Hinf I por mencionar algunas (enzimas usadas en la genotipificación de ganado bovino), obteniendo siempre GCTTC en el codón 148 y GATTC en la región intrónica clasificando como homocigotos para el alelo B los búfalos sometidos a esta prueba (Octaviano

et al., 2005; Rafey and Darwish, 2007; Dayen *et al.*, 2009; Othman, 2005; Riaz *et al.*, 2008; Shende *et al.*, 2009). Por su parte hay estudios que afirman haber encontrado los alelotipos A y B en búfalos de la raza Murrah mediante PCR-RFLP usando las enzimas *hind III* y *Hinf* (Rajesh , *et al.*, 2007). Pese a esta confusión, más recientemente, en la última década la caracterización de los alelotipos en búfalos ha sido explicada, ya que distintos estudios han reportado los SNP's encontrado por Mitra en 1998. Por ejemplo mediante la técnica de secuenciación fue revelado un polimorfismo que consiste en dos SNP's en los codones 135 ACC/ATC y 136 ACC/ ACT en búfalos de la raza Murrah, presentándose la variante ACC en ambos codones con mucha mayor frecuencia (De Sousa *et al.*, 2012). En búfalos egipcios mediante la técnica de PCR-RFLP usando la enzima de restricción *Acu I*, sumado a la técnica de secuenciación fueron obtenidos resultados similares que muestran los mismos SNP's en los codones 135 y 136 con un valor ligeramente más alto de frecuencias para la variante 135-ACT/136-ATC a la cual los autores llaman Alelo B (X2 para Mitra) (Soheir *et al.*, 2013). En búfalos de pantano de Indonesia, se llevó a cabo la técnica de PCR-RFLP con la enzima de restricción *EcoRV*, acoplada a la técnica PIRA para el diseño de oligonucleótidos se revelo la presencia de los SNP's nombrados como variante "C" 135-ACC/136-ACC y variante "T" 135-ATC/136-ACT, quienes encontraron una muy alta frecuencia de homocigotos "ACC" alrededor de 0.6 a 0.50 (Rini *et al.*, 2014).

3.16 Técnicas Moleculares para la genotipificación

Como se ha ido evidenciando, es de gran importancia conocer el genotipo de los animales que conforman un hato productivo para lo cual, existe una abundante gama de técnicas moleculares modernas y marcadores genéticos usados para evaluar directa o indirectamente variaciones en la información genética de individuos y poblaciones, tales como: polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD), número variable de repeticiones en tándem (VNTR), repeticiones simples en tándem (STR) o microsatelites y polimorfismo de nucleótido simple (SNP) (Sachinandam *et al.*, 2001).

3.16.1 Microsatelites.

Son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pb o nucleótidos (di, tri, tetra y sexta nucleótidos), que se repiten en tándem y el número de repeticiones que presentan es relativamente pequeño (10 a 50 veces) por lo que se identifican fácilmente mediante PCR (Goldsteinr y Schlötterre, 1999; Fries *et al.*, 1990; Tautz, 1989; Weber y May, 1989). Se encuentran distribuidos al azar con frecuencia en el ADN genómico en la heterocromatina próxima al centrómero del cromosoma tanto en el ADN extracromosómico como el ADN mitocondrial. Presentan un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, tienen una confiabilidad del 100% y son fáciles de medir y analizar. Estos Loci se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y es probable que se formen por eventos de

rompimiento que generan polimorfismos con valores superiores al 90% (Lewin, 2001)

3.16.2 RFLP

Este tipo de estudio involucra la detección de un segmento específico (marcador molecular) en el ADN de estudio por hibridación con un fragmento de secuencia complementaria al marcador (sonda). En el proceso, el ADN en estudio es digerido por medio de una enzima de restricción. Este tipo de enzimas corta el ADN en una secuencia determinada o sitio de restricción. La variabilidad genética presente en el marcador molecular se observa como diferencias en la secuencia del ADN genómico debidas a duplicaciones, deleciones, inserciones, etc. que modifican la distancia entre pares de sitios de restricción y generan fragmentos polimórficos de diferentes tamaños (Picca *et al.*, 2004). Los fragmentos obtenidos por la enzima de restricción se separan por su tamaño mediante electroforesis y se transfieren a una membrana donde son hibridados con la sonda. En el proceso, la sonda hibrida solamente con fragmentos de ADN inmovilizados en la membrana que presenten la secuencia complementaria a la misma. Para visualizar los polimorfismos se expone la membrana a una placa radiográfica. La ventaja de los RFLP's radica en que son altamente reproducibles, codominantes y multialélicos. A su vez cuentan con la desventaja de ser muy laboriosos, difíciles de automatizar, requieren de infraestructura adecuada para mantener las sondas, trabajar con isotopos radioactivos, lo que los hace relativamente costosos y riesgoso (Picca *et al.*, 2004).

3.16.3 PCR-RFLP.

El análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's) fue el primer marcador de ADN utilizado por biólogos poblacionales (Parker *et al.*, 1998). Este método permite ver diferencias específicas del ADN que son reconocidas por enzimas de restricción particulares (endonucleasas). Cada una de las endonucleasas reconoce y corta solamente una secuencia específica de bases, siempre y cuando éstas no estén protegidas (metiladas). Por consiguiente cualquier ADN que no esté metilado puede ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida y cualquier mutación dentro de esos sitios, podría cambiar el patrón del fragmento y permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genomas (Valadez y Kahl, 2000). La técnica radica en el corte con enzimas de restricción de los productos amplificados por PCR. Si dos amplicones presentan una variación de la secuencia nucleotídica, en los sitios de reconocimientos de las enzimas de restricción, generarán distintos patrones de fragmentos (Lara *et al.*, 2005).

4 JUSTIFICACIÓN

Los estudios de genotipificación y efectos del gen de la CSN3 se han concentrado en razas bovinas lecheras especializadas, dejando de lado otras especies de interés comercial y cuya producción va en aumento, tal es el caso del búfalo acuático del cual apenas se empieza a estudiar su información genética. En el búfalo acuático la tecnología del DNA principalmente ha sido aplicada para la verificación de descendencia. No

obstante, el búfalo acuático es una especie importante a considerar como alternativa de producción por la relación costo-beneficio que implica su producción. Además diversos estudios han demostrado la gran diversidad genética existente entre búfalos de distintas poblaciones y como sucede en otras especies como el bovino esta diversidad trae consigo diferencias en los niveles productivos de cada individuo. El estudio del marcador RAMMB002 permitió la caracterización e identificación de las principales variantes de interés comercial (A y B) del gen de la CSN3 en búfalo acuático, además de contribuir en la colección de información genética de esta especie, los resultados pueden servir como información de apoyo en futuros programas de selección y mejoramiento animal.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar la región análoga al marcador MB002 de la *kappa caseína* (RAMMB002) e identificar los alelos presentes en esta región para el gen CSN3 en Búfalo acuático

5.2 Objetivos particulares

- Amplificar la región análoga al marcador MB002 del gen $CAS\kappa$ de individuos seleccionados mediante PCR.
- Secuenciar y analizar dicha región del gen e identificar las variantes presentes en este marcador.

- Determinar frecuencias alélicas y genotípicas del gen $CAS\kappa$ de las variantes encontradas en la población seleccionada mediante PCR-RFLP.
- Generar recomendaciones sobre el manejo de los búfalos.

6 HIPÓTESIS

Los búfalos acuáticos muestreados en la cuenca del Papaloapan, por ser principalmente de la raza Murrah presentan mayor proporción del alelo “A” del gen $CSN3$, el cual se caracteriza por la presencia de los codones ACC/ACC en la posición 135 y 136.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Localización geográfica

Las muestras usadas en el presente trabajo fueron obtenidas en la región de la cuenca del Papaloapan del estado de Veracruz. En ranchos ubicados en Isla, Playa Vicente y Los Tigres Ver (Figura 3). La región del Papaloapan está limitada al norte con la región del Sotavento y el golfo de México, al sur con el estado de Oaxaca, al oeste con las regiones de Sotavento y capital, al este con a región de los Tuxtlas y a sureste con la región Olmeca. La región del Papaloapan tiene un clima cálido semihúmedo y húmedo, con una precipitación anual promedio de 1,300 a 3,000 mm. Esta región se encuentra al Noroeste de la Sierra de Oaxaca o Sierra Norte, con una latitud norte de $18^{\circ} 05'$, una longitud oeste de $96^{\circ} 08'$, a una altitud de 20 m.s.n.m. (OEIDRUS-OAXACA, 2005).

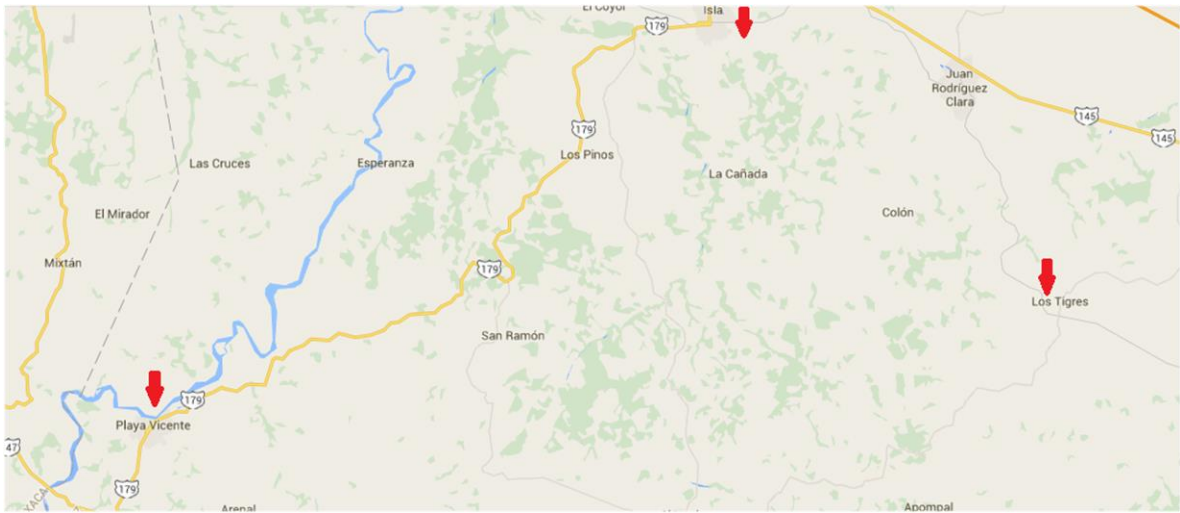


Figura 3. Localización Geográfica de los puntos donde se ubican los ranchos donde fue realizada la toma de muestras usadas en este estudio.

7.2 Toma de muestras de sangre

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena yugular (3-5 mL/animal) a 120 búfalos acuáticos (*Bubalis Bubalis*) principalmente de la raza Murrah aproximadamente el 60 % de la población total de cada rancho y se depositaron en tubos conteniendo EDTA (10.8 mg) como anticoagulante, después de obtener la muestra de sangre, esta se almacenó a -20°C en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, hasta su procesamiento.

7.3 Extracción de ADN

Se utilizó el kit **Quick g DNA™ Blood Miniprep** usando la metodología como lo indica el proveedor (Anexo 1).

7.4 Estimación y confirmación de presencia de ADN genómico

La estimación relativa y confirmación de presencia de ADN genómico se realizó en geles de agarosa al 3 % p/v (Voytas, 2000), tomando 3 μ L de cada muestra equivalente a 20-50 ng/ μ L aproximadamente de ADN genómico, en buffer de carga SBX 6x (40 % sacarosa, 0.25 % bromofenol y 0.25 % xilencianol). Las muestras fueron corridas a voltaje constante de 100 volts durante 30 minutos. La solución amortiguadora para la corrida electroforética fue TAE (Tris, acetato EDTA) 1x. Los geles fueron teñidos en solución de bromuro de etidio, sumergiéndolos durante 10 minutos y posteriormente se eliminó el exceso de colorante por medio de lavados con agua destilada. La estimación relativa y confirmación de presencia de ADN se realizó en un fotodocumentador (INGENIUS SYNGENNE®).

7.5 Análisis Bioinformático

Se llevó a cabo una serie de análisis bioinformáticos para el diseño de oligonucleótidos, determinación de las temperaturas de alineamiento (T_m) teóricas. Además se realizaron análisis con la herramienta Clustal W, en la página electrónica de la **Pole BioInformatique Lyonnais-Network Protein Sequence Analysis**.

7.6 Diseño y alineamiento de oligonucleótidos contra el molde

Fueron usados como referencia los oligonucleótidos utilizados para amplificar el marcador MB002 estudiado en ADN bovino **Oligo F:** ATCATTTATGGCCATTCCACCAAAG, **Oligo R:** GCCCATTTTCGCCTTCTC TGTAACAGA (Cortes, 2011) y se realizó un alineamiento en la región

análoga al marcador en búfalo para observar que efectivamente existiera su complementario en la cadena molde del gen en búfalo acuático.

7.7 Cálculo de Tm teórica

El cálculo de la Tm teórica y los parámetros a considerarse para el diseño de oligonucleótidos se realizó en la página de **ThermoFisher Scientific** sección de Tm Calculator.

7.8 Amplificación del ADN

A partir de ADN genómico extraído de los individuos muestreados se amplificó, por medio de la PCR punto final la región análoga al marcador, MB002 del gen *CSN3* bovino. La mezcla de reacción para amplificar dicha región fue usada como se indica en la tabla 3.

Tabla 3. Reacción de amplificación de ADN

Reactivo	Volumen
Dream Green Taq DNA polimerasa	6.25 μ L
H ₂ O destilada estéril	3.75 μ L
Oligonucleótidos (50 pM)	1 μ L (C/U)
ADN molde	3 μ L
Volumen final	15 μ L

Para determinar la T_m experimental óptima se realizó una PCR con un barrido de temperaturas desde 52 hasta 63 °C en el termociclador MAXYGENE (AXYGEN Scientific®)

Tabla 4. Oligonucleótidos para la amplificación de ADN de búfalo acuático

Nombre	Secuencia	T_m (°C)	Longitud(pb)
MB002 F	ATCATTTATGGCCATTCCACCAAAG	54	25
MB002 R	GCCCATTTAGCCTTCTCTGTAACAGA	60	26

F: secuencia inicial 5' R: secuencia terminal 3'

Las amplificación se realizó en el termociclador MAXYGENE (AXYGEN Scientific®) utilizando el par de oligonucleótidos ya mencionados y bajo las condiciones mostradas en la Tabla 5.

Tabla 5. Programa de amplificación de la región RAMB002 a partir de ADN de búfalo acuático.

No. de ciclos	Etapas	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	Desnaturalización	5	94
30	Desnaturalización	1	94
	Alineamiento	0.5	56
	Extensión	0.5	72
1	Extensión final	10	72

Por cada 1000 pb el tiempo de extensión es de 1 min.

7.9 Visualización de productos de PCR en gel de agarosa

Los productos de PCR de cada muestra fueron separados en un gel de agarosa al 3 % (Voytas, 2000). Se cargaron 3 μ L muestras directamente del tubo de PCR, no fue necesario mezclar con buffer de carga ya que el kit de PCR usado contiene su propio buffer.

La migración se efectuó a voltaje constante de 100 volts, durante un tiempo de 30 minutos. La solución amortiguadora que se usó para dicha migración TAE (Tris, Acetato EDTA) 1X.

El gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio y observado en un sistema de fotodocumentación (INGENIUS SYNGENNE®).

7.10 Ensayos de restricción RFLP

Fueron realizados ensayos de restricción utilizando el fragmento amplificado como blanco y la enzima de restricción *Hinf I* y *Acu I* (Fermentas®) los cuales incluyen sus propios buffers de reacción, para el diagnóstico posible de los alelos del gen *CNS3*. Fueron digeridos 12 μ L de producto de PCR de cada muestra con 20 U de la enzima *Hinf I*, aforándose a 20 μ L y fueron incubados por dos horas a 37 °C. Y en un segundo ensayo de restricción, fueron digeridos 12 μ L cada producto de PCR con 20 U de enzima *Acu I*, durante 40 minutos a 37 °C como lo marcan los respectivos proveedores.

Los fragmentos digeridos durante cada ensayo fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Las bandas fueron visualizadas en el sistema de fotodocumentación (INGENIUS SYNGENNE®) y se analizaron los patrones de restricción para la detección de los alelomorfismos presentes.

7.11 Detección de Polimorfismos mediante secuenciación

Fueron elegidas 10 muestras de las 97 totales (de las que se obtuvo amplificación), las cuales fueron categorizadas durante los ensayos RFLP's, seis homocigotas BB, dos heterocigotas AB y dos no determinadas y con cada una de ellas se llevó a cabo una PCR como la que se describió anteriormente conservando las proporciones de cada reactivo pero a volumen final de 25 μ L, los productos de PCR fueron purificados mediante el kit comercial [®]Agentcourt AMPure [®]XP como lo indica el manual y fueron secuenciados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

7.12 Alineamiento entre las muestras secuenciadas provenientes de búfalos

Una vez obtenida la secuenciación se realizó un análisis Clustal W, el cual tuvo el propósito de observar las diferencias en la secuencia entre muestras, y así poder identificar los cambios de nucleótidos existentes entre dichas muestras.

8 RESULTADOS

8.1 Confirmación de la presencia de ADN genómico

Los geles de agarosa al 1.5 % mostraron la presencia de ADN genómico en cada una de las muestras (Figura 4). A pesar de que no todas las bandas se presentan bien definidas, esto no fue impedimento para una correcta amplificación de la región de interés mediante PCR punto final.

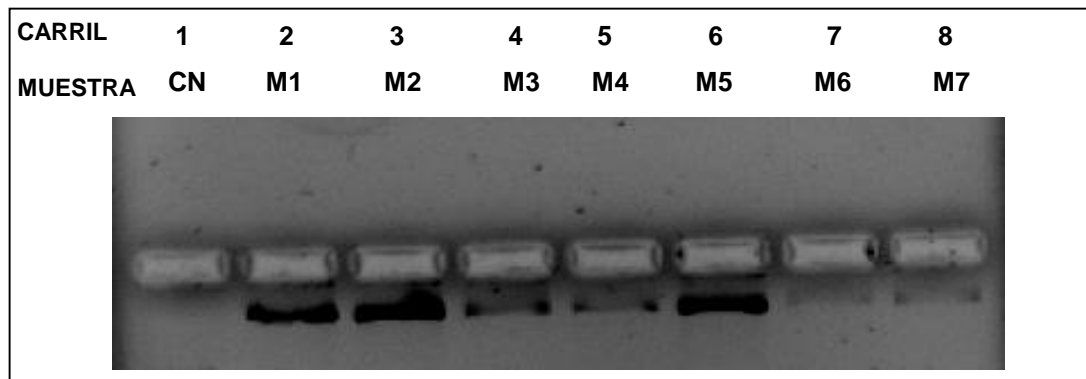


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %; las bandas corresponden a ADN genómico. (M1-M7: muestras;CN: control Negativo)

8.2 Alineamiento de oligonucleótidos seleccionados contra la secuencia de la región de estudio de búfalo acuático.

El resultado obtenido del Clustal W entre la secuencia que se amplificó (RAMB002) y el par de oligonucleótidos obtenidos de referencias de estudios en bovinos (Cortes, 2011) se muestra en la figura 5.

BUFALOSEQUENCE	CCCACATTTATCATTATGGCCATTCCACCAAAGAAAAATCAGGATAAAACAGAAATCCC
PRIMERF	-----ATCATTATGGCCATTCCACCAAAG-----
PRIMER-R	-----
BUFALOSEQUENCE	TACCATCAATACCATTGTTAGTGTTGAGCCTACAAGTACACCTATCACTGAAGCAATAGA
PRIMERF	-----
PRIMER-R	-----
BUFALOSEQUENCE	GAACTGTAGCTACTCTAGAAGCTTCTCAGAAAGTTATTGAGAGTGTACCTGAGACCAA
PRIMERF	-----
PRIMER-R	-----
BUFALOSEQUENCE	CACAGCCCAAGTTACTTCAACCGTCGTCTAAAACTCTAAGGAGACATCAAAGAAGACAA
PRIMERF	-----
PRIMER-R	-----
BUFALOSEQUENCE	CACAGGTAATAAGCAAAATGAATAATAGCCAAGATTCATGGACTTATTAATAAAATCAT
PRIMERF	-----
PRIMER-R	-----
BUFALOSEQUENCE	AACATCTAACTAGCATAGATGGATAAATTAATCTGTTACAGAGAAGGCAAAATGGGCT
PRIMERF	-----
PRIMER-R	-----TCTGTTACAGAGAAGGCGAAATGGGC-

Figura 5. Alineamiento de la secuencia amplificada obtenida del NCBI con clave de acceso AM900443.1 contra los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región en bovinos.

El análisis Clustal W permitió aceptar el uso de los oligonucleótidos empleados en otro estudio para amplificar la región MB002 de ADN de bovinos, pero se pudo identificar un nucleótido que no coincide (G/A) en oligonucleótido reverso comparado con la región de ADN bovino, por lo cual se hizo el cambio requerido y fueron mandados a sintetizar. Quedando los oligonucleótidos como se muestra a en la tabla 6.

Tabla 6. Cebadores utilizados para amplificación de región análoga a MB002.

Oligonucleótido F	5' ATCATTTATGGCCATTCCACCAAAG 3'
Oligonucleótido R	3' GCCCATTTAGCCTTCTCTGTAACAGA 5'

El cálculo de la temperatura media (Tm) mediante el Tm Calculator permitió obtener la Tm general óptima teórica y la de cada oligonucleótido, así mismo también se observaron otros parámetros importantes como el porcentaje de GC y peso molecular en g/mol como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultado obtenido del cálculo de las temperaturas óptimas para la alineación de oligonucleótidos y otros parámetros.

Oligonucleótido	Secuencia	PM g/mol	% de G y C	Tm	Tm optima
Directo: F	ATCATTTATGGCC ATTCCACCAAAG	7585.0	40	57.8 °C	52.8 °C
Reverso: R	GCCCATTTAGCCT TCTCTGTAACAGA	7585.0	46.15	61.1 °C	

(PM: Peso molecular; Tm: Temperatura media)

El resultado del cálculo de la Tm permitió tener un rango para establecer la temperatura óptima de alineamiento experimental, así como también la verificación del porcentaje de C y G adecuado ($40 < \%GC < 60$), tamaño ideal 20-25 nucleótidos, entre otros. Esto permitió elegirlos como adecuados para el estudio.

8.3 PCR

El resultado del ensayo de PCR llevado a cabo con rangos de temperatura (50-60°C) permitió observar la amplificación de un solo fragmento de ADN con el peso molecular esperado (350 pb aproximadamente), así mismo se observó como mejor temperatura de alineamiento experimental 56 °C. Sin embargo, no coincidió con el valor teórico de la Tm óptima, pero se encontró dentro del rango esperado, dando una banda clara y con mayor intensidad (figura 6 -carril 7).

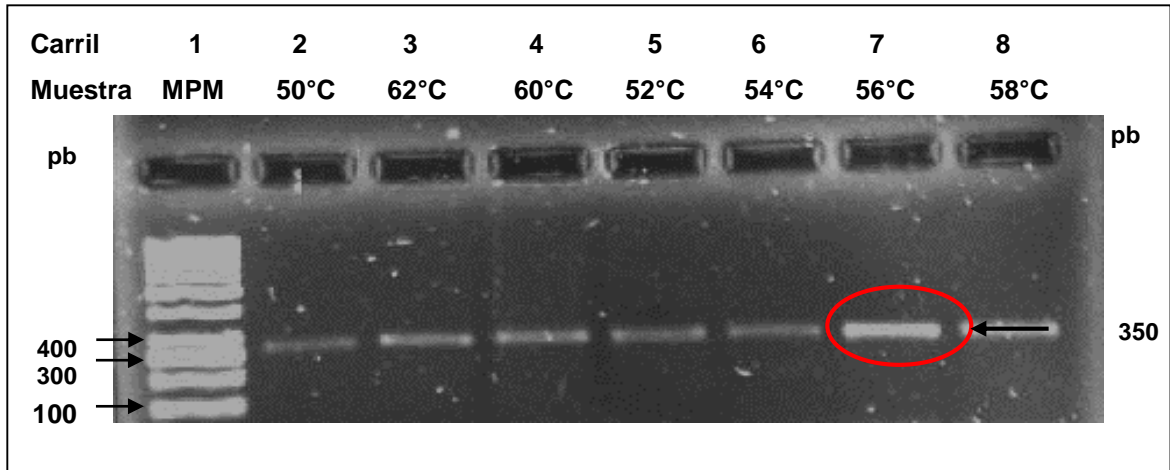


Figura 6. Productos de PCR obtenidos del ensayo bajo gradiente de temperatura en gel de agarosa al 3 % de muestras de ADN de búfalo acuático. Se observa la presencia de fragmentos de aproximadamente 350 pb. El marcador de peso molecular **Thermo Scientific GeneRuler 50 pb DNA Ladder** (carril 1). Productos de PCR amplificados bajo diferentes temperaturas de alineamiento (carriles 2-8).

De las 120 muestras analizadas solo se obtuvieron 97 amplificaciones para la región de estudio RAMMB002. Como se muestra en la figura 7.

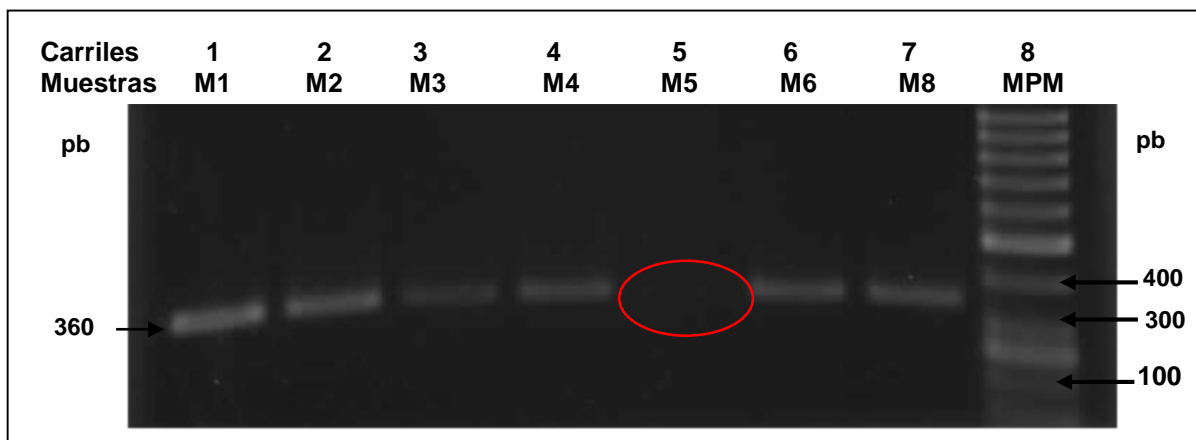


Figura 7. Productos de PCR de distintas muestras de búfalos acuáticos amplificados bajo temperatura de alineamiento de 56°C. En los carriles del 1 al 7 fueron cargados los productos un ensayo de PCR y en el carril 8 el marcador de peso molecular anteriormente descrito de 50 pb.

En la figura 7 se observa la ausencia de una banda sobre el carril número 5, lo que evidencia que no hubo amplificación de dicha muestra, del mismo modo, ocurrió en otras 27 muestras.

8.4 Análisis de la secuencia amplificada (Región polimórfica análoga al marcador MB002) y elección de enzimas de restricción.

Con el fin de estimar el tamaño del producto de PCR y observar sitios de restricción se analizó la secuencia de nucleótidos del exón IV de la región de estudio, la cual fue obtenida del NCBI (Figura 8).

CATTCTGCATAATTTATTCTTTTTACAGCGCTGTGAGAAAGAGGAAAGA
 TTCTTCAATGACAAAATAGCCAAATATATCCCAATTCAGTATGTGCTGAG
 TAGGTATCCTAGTTATGGACTCAATTACTACCAACAGAAACCAGTTGCA
 CTAATTAATAATCAATTTCTGCCATACCCATATTATGCAAAGCCAGCTGC
 AGTTAGGTCACCTGCCCAAATTCTTCAATGGCAAGTTTTGCCAAATACT
 GTGCCTGCCAAGTCCTGCCAAGCCCAGCCAACTACCATGACACGTAC
 CCACACCCACATTTATCATTATGGCCATTCCACCAAAGAAAAATCAGG
 AAAAAACAGAAATCCCTACCATCAATACCATTGTTAGTGTTGAGCCTAC
 AAGTACACCTATCACTGAAGCAATAGAGAACACTGTAGCTACTCTAGAA
 GCTTCCTCAGAAGTTATTGAGAGTGTACCTGAGACCAACACAGCCCAA
 GTTACTTCAACCGTCGTCTAAAACTCTAAGGAGACATCAAAGAAGACA
 ACACAGGTAATAAGCAAATGAATAATAGCCAA GATTCATGGACTTAT
 TAATAAATCATAACATCTAACTAGCATAGATGGATAAATTAAT TCTGT
 TACAGAGAAGGCAAATGGGC TAATTATACTTACATTTACTTGTTCTTT
 ATCGTGTATATACTAGATTCTTTCCCAACAAG

Figura 8. Secuencia de nucleótidos del fragmento en estudio del gen de la K-caseína en búfalo acuático. (Gris: Exon IV del gen CSN3; Azul: Sitios de Unión de los oligonucleótidos; Amarillo: Posibles sitios de restricción, Subrayado: Tripletes).

La diferenciación entre los alelotipos es posible gracias al conocimiento de una región polimórfica a la que algunos autores llaman marcador MB002 de la k-caseína descrita en bovino, muy conservada y estudiada en otras especies, la cual ocupa alrededor del 40 % del exón IV y alrededor de 88

nucleótidos del intrón IV. Esta región presenta SNP's tanto en bovinos como en búfalos y otras especies los cuales hacen la posible diferenciación entre variantes génicas del gen CSN3 (Figura 9).

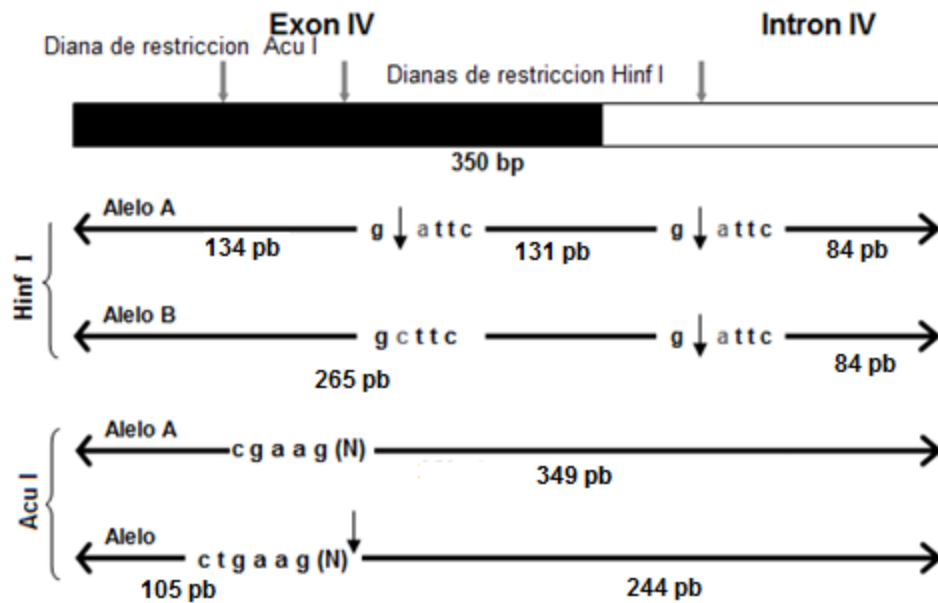


Figura 9. Representación gráfica del marcador RAMB002 en búfalo acuático. Se muestra la imagen como dicho marcador abarca parte del exón e intrón IV y se muestran los patrones de restricción según la secuencia de nucleótidos.

Se ha observado que en bovinos la enzima Hinf I puede encontrar dos sitios de corte, el primero en el triplete 148 y el segundo en la región intrónica. Mientras Acu I puede presentar un sitio de corte en el triplete 135 en búfalos (Fuente: Pacheco, 2010).

8.5 Digestiones RFLP

Por medio del análisis de la región de estudio se pudo identificar regiones correspondientes a sitios de restricción para enzimas usadas en la genotipificación del gen CSN3 en búfalo acuático. Los productos de PCR se digirieron con las enzimas *Hinf I* (Othman 2005; Dayem *et al.*, 2009;

Mahmoud *et al.*, 2010; Gangaraj *et al.*, 2008; Shende *et al.*, 2009) y *Acu I* (El Nahas *et al.*, 2013) respectivamente en ensayos separados.

8.5.1 Digestiones con enzima *Hinf I*

Las digestiones realizadas con la enzima *Hinf I*, mostraron en las 97 muestras analizadas un único patrón de restricción que corresponde a individuos portadores del genotipo homocigoto BB (carriles 2-10) presentando dos fragmentos de 84 y 265 pb aproximadamente (figura 10).

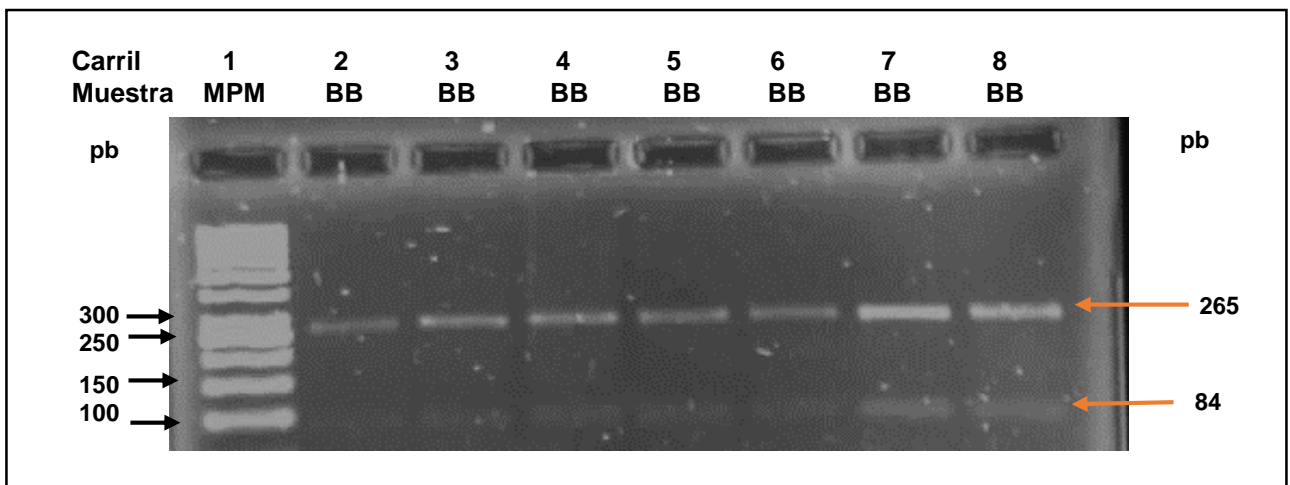


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 3 % de productos de la digestión usando la enzima *Hinf I* de la región marcadora del gen *CNS3* en búfalos acuático.

8.5.2 Digestiones con enzima *Acu I*

De las digestiones realizadas con la enzima *Acu I*, se obtuvieron 2 patrones de restricción correspondientes al genotipo homocigoto AA (carriles 2, 3 y 5) observándose el fragmento sin corte alguno de 349 pb, heterocigotos AB donde se observan 3 fragmentos correspondientes a bandas de 105, 244 y

349 pb (carriles 4 y 6). No se observó en ninguna muestra la presencia del genotipo homocigoto BB, el cual presentaría exclusivamente un patrón de dos bandas de 105 y 244 pb (Figura 11).

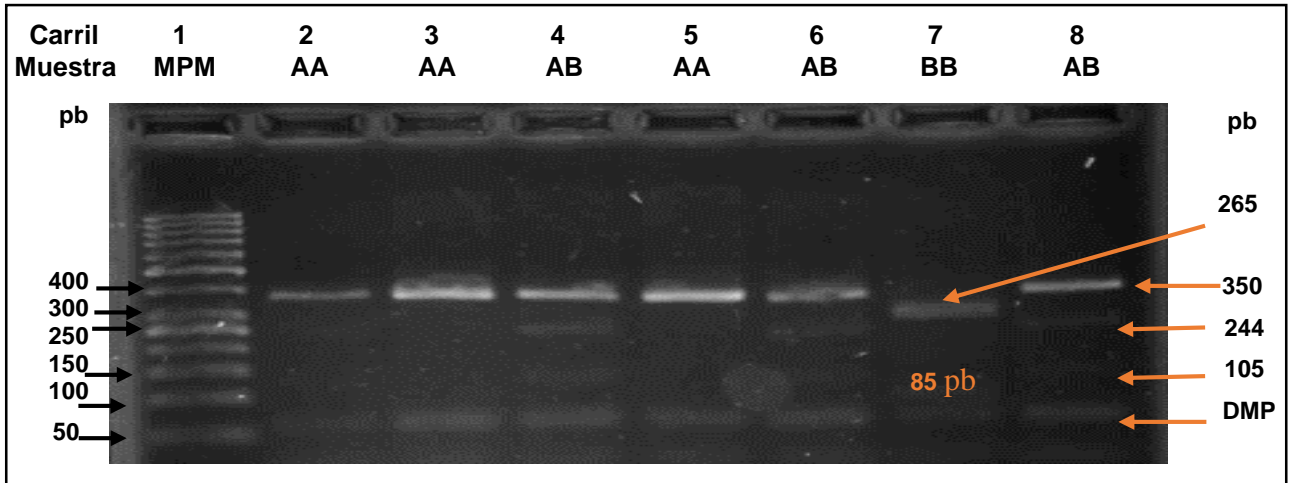


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 3 % de productos de la digestión usando la enzima Acu I de la región marcadora del gen *CASκ* en búfalos acuático. (DMP: Dímeros de oligonucleótidos).

En el gel (figura 11) se muestra una digestión mixta con las enzimas Hinf I y Acu I (carril 7), donde se observan dos bandas, una de 85 y 265 pb presentado un corte con la enzima Hinf I en el triplete 148 sugiriendo el genotipo BB. Sin embargo, no existe corte de la enzima Acu I, sugiriendo el genotipo homocigoto nombrado por distintos autores como AA, CC o X_2X_2 .

Encerrado por el ovalo azul se observa los tripletes 135 y 136 los cuales presentan en dos muestras el sitio de restricción de la enzima *Acu I* (ACT¹³⁶GAAG(N)) para dichas muestras con genotipo heterocigoto, que presentan ambos nucleótidos denotados como (Y), tanto C como T en los codones 135 ACC/ATC y 136 ACC/ACT. Mientras en las ocho muestras restantes homocigotas no se encuentra dicho sitio, presentándose como (CCGAA(N)). La presencia de ambos nucleótidos durante la secuenciación se explica por la existencia de un par de genes autosómicos, uno en cada cromosoma homologo, codificantes para la misma proteína provenientes uno de cada progenitor.

Este resultado se muestra claramente en el diagrama de secuenciación donde se puede observar la presencia de dos picos de fluorescencia para los nucleótidos C y T en ambas posiciones (Figura 13).

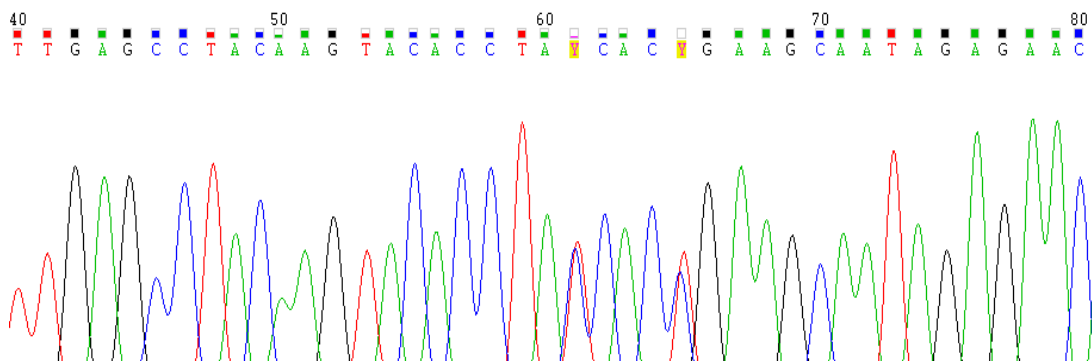


Figura 13. Diagrama de picos de fluorescencia de la secuenciación del fragmento donde ocurre el cambio de nucleótido en la muestra M44xxx4 de genotipo heterocigoto para el exón IV del gen *CSN3* en búfalo acuático. La letra Y denota la presencia de ambos nucleótidos tanto C como T en ambas posiciones.

Por otro lado, en todas las muestras se observó la secuencia GATTC en la región intrónica (diana de restricción de Hinf I), por lo tanto, existe el sitio de corte para esta enzima en casi todas las muestras a excepción de un espécimen el cual se presenta heterogéneo en esta posición (Figura 14).

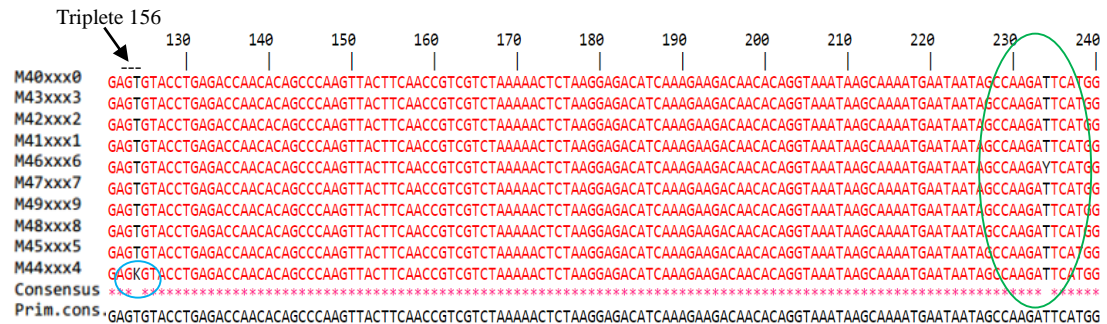


Figura 14. Continuación de Clustal de secuencias de productos de PCR de 10 muestras de DNA de búfalo acuático. Los nombres de las muestras desde M40xxx0 hasta M44xxx4.

El segundo sitio de restricción para la enzima Hinf I se encuentra encerrado en color verde correspondiente a la región intrónica. La letra Y denota la presencia de dos nucleótidos en esa posición C y T.

Encerrado en un círculo azul se encuentra un cambio de nucleótido no esperado en el exón 4 en el tercer nucleótido del triplete 155 de la *k*-caseína en la muestra M44xxx4.

Del mismo modo existe un cambio de nucleótido no esperado en el sitio de restricción ubicado en la región intrónica para la enzima Hinf I, se muestra heterocigota, la letra Y denotando la presencia de los nucleótidos C Y T en la misma posición en la muestra M46xxx6 (Figura 15).

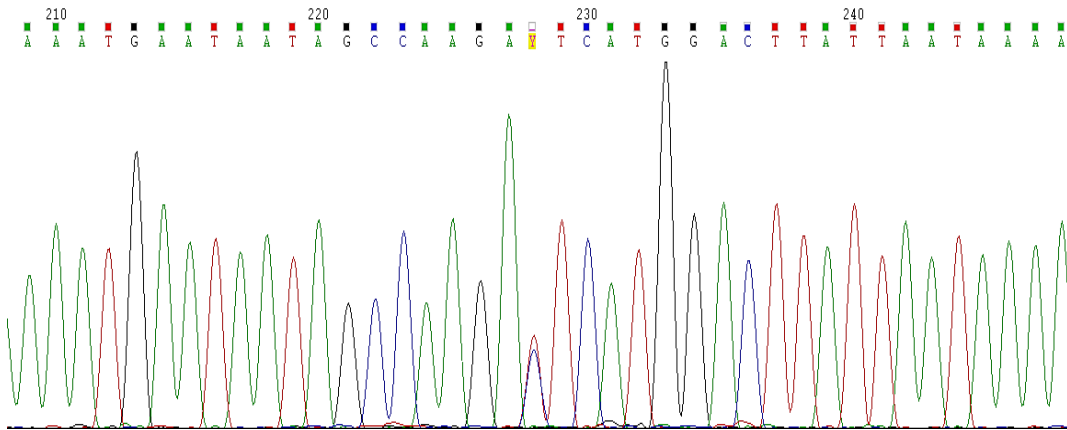


Figura 15. Diagrama de picos de fluorescencia de secuenciación de la muestra M46xxx6 la cual presenta dos picos denotados con la letra Y correspondientes a los nucleótidos C/T en el segundo sitio de restricción de la enzima Hinf I como lo muestra el Clustal.

Por último las frecuencias génicas y genotípicas fueron calculadas y estas se muestran en la tabla 9.

Diferenciados por la enzima Acu I un total de 65 individuos fueron agrupados como portadores del genotipo Homocigoto AA, mientras 32 se mostraron heterocigotos AB, sin presencia de Homocigotos BB.

Las fórmulas para el cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Formulas usadas para el cálculo de las frecuencias génicas y genotípicas, así como un ejemplo del cálculo del alelo A.

Fórmulas	Ejemplo
Frecuencias alélicas	$P(A) = (2AA + AB) / 2n$ $P(A) = (2 \times 65 + 32) / 2 \times 97$ $P(A) = 0.835$
Frecuencias genotípicas	$P(AA) = \text{No. AA} / n$ $P(AA) = 65 / 97 = 0.67$

Las frecuencias alélicas calculadas a partir de los datos anteriores correspondieron a 0.835 para el alelo A y 0.165 para el alelo B. Mientras las frecuencias genotípicas fueron 0.67 para el homocigoto AA y 0.33 para los heterocigotos AB para el total de la población muestreada. Asimismo, se observa la heterocigosidad media de 0.331 de los mismos.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas en búfalos acuáticos del Edo de Veracruz

Genotipo observado	Frecuencias	
	Número de individuos portadores	Frecuencias Genotípicas
AA	65	0.67
AB	32	0.33
BB	0	0
ALELOS		Frecuencias alélicas
A		0.835
B		0.165
Heterocigosidad	0.33	

9 DISCUSIÓN

Fueron obtenidas 120 muestras totales de sangre de búfalos acuáticos principalmente de la raza Murrah, que representan alrededor del 60 % de cada población de 3 ranchos de la región del Papaloapan del Edo. Veracruz. De estas fue obtenido DNA genómico de buena calidad y con él se llevaron a cabo ensayos de PCR. Aunque solamente se obtuvo amplicones de 97 de la 120 muestras, a pesar de haberse realizado una correcta extracción de ADN genómico (corroborado por geles y Nanodrop). Los fragmentos amplificados mostraron un peso de 350 pb aproximadamente, observándose como bandas limpias y bien definidas, este resultado coincide con fragmentos obtenidos por PCR en muestras de búfalo de río egipcio usando el mismo par de oligonucleótidos (Othan, E., 2005).

La ausencia de amplificación en algunas muestras puede deberse a la presencia de cambios en algunos nucleótidos, que afectan la unión de los oligonucleótidos a su molde o a la presencia de inhibidores de la PCR como el EDTA, que pudieron estar presentes en altas concentraciones en algunas muestras. Sin embargo, la causa específica de esto no es resuelta en este estudio.

Fueron usadas tanto la enzima Hinf I como la enzima Acu I para realizar los ensayos de restricción.

El genotipificado mediante el uso de ambas enzimas ofrece como resultados el diagnóstico de los alelos A y B para cada una respectivamente, los cuales son nombrados igual por nomenclatura, pero estos son distintos, ya que los

sitios de restricción de estas enzimas se encuentran en distintas posiciones del marcador; por tanto cada enzima detecta distintos cambios. Aunque recientemente ha sido reportado que la enzima Acu I permite la eficiente diferenciación de los alelos A y B específicamente para búfalo acuático, mientras que por su parte Hinf I siempre muestra genotipos homocigotos BB como resultado, siendo este último un resultado errado (El Nahas et al. 2013), tal cual se obtuvo en el presente estudio.

Los ensayos de restricción usando la enzima Hinf I mostraron siempre la presencia de dos fragmentos de 85 y 265 pb, correspondiendo exclusivamente a la presencia de la variante "B", descrita en bovinos. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por diversos autores quienes también concluyen que los búfalos acuáticos tienen genotipo monomorfico BB para el gen *CNS3* después de realizar pruebas de PCR-RFLP (Octaviano et al., 2005; Rafey and Darwish, 2007; Dayen et al., 2009; Othman, 2005; Riaz et al., 2008; Shende et al., 2009). Aunque por otro lado hay reportes de la posible genotipificación mediante PCR-RFLP usando las enzimas Hinf I y Hind III para el gen *CSN3* en búfalo acuático y estos reportan la existencia de ambos alelos, aunque muy baja frecuencia de individuos con el alelo A (Rajesh et al., 2007).

Sin embargo, los resultados encontrados en el presente estudio por la enzima Hinf I no son muy acertados para las muestras de búfalos analizadas ya que los análisis de las secuencias demuestran que existen cambios de nucleótidos simples entre los genomas de cada animal independientemente

de la presencia de un solo sitio de restricción para la enzima Hinf I en el intrón IV. La causa de la deficiente diferenciación queda demostrada con la secuenciación y alineamiento Clustal W, esta se debe a que el triplete que codifica para el aminoácido 148 y la región intrónica (posible segunda diana de restricción para Hinf I) se encuentran conservados en todos los genomas de búfalos, presentándose siempre como GCTTC en vez de GATTC para el triplete 148 y mostrando siempre el sitio de corte GATTC en la región intrónica, lo que nos arroja genotipo homocigoto BB en los análisis de restricción con esta enzima.

Los resultados obtenidos en los ensayos de restricción con la enzima Acu I muestran el gen de la kappa caseína heterogéneo con al menos dos variantes alélicas, mostrando bandas de 349 pb (sin corte) para el genotipo homocigoto AA y bandas de 349, 244 y 105 pb para el genotipo heterocigoto AB, mientras no se presentaron muestras con genotipo homocigoto BB. Los cambios de nucleótidos que caracterizan a las variantes alélicas que diferencia la enzima Acu I aparecen juntos en ambos tripletes, en el 135 un cambio de ACC (Thr) / ATC (LLe) y en el triplete 136 una mutación silenciosa ACC (Thr) / ACT (Thr), estos resultados son semejantes a los encontrados en búfalos egipcios, de pantano y Murrah (Mitra *et al.*, 1998; De Sousa *et al.*, 2012; Soheir *et al.*, 2013; El Nahas *et al.* 2013; Rini *et al.*, 2014).

Mediante este estudio fue posible la identificación y determinación de las frecuencias alélicas del gen CSN3 en muestras obtenidas de búfalos acuáticos, encontrándose el alelo A (nombrado por otros autores como “C” o

X₂) como predominante presentando una frecuencia alélica de 0.835, mientras que la del alelo B correspondió a tan sólo 0.165. Resultados similares fueron descritos por Mitra y colaboradores (1998) en búfalos Murrah, Nili-Ravi y búfalos egipcios describiendo los mismos polimorfismos en los codones 135 (ACC/ATC) y 136 (ACC/ACT). Las frecuencias encontradas por estos autores fueron de 0.88 para ACC-ACC (Alelo A) y 0.12 para ATC-ACT (Alelo B).

En el inicio las secuencias (obtenidas por el servicio de secuenciación) se observan muchas variaciones, pero estas no son tomadas en cuenta ya que en esta región los proveedores del servicio no garantizan certeza en la secuencia de bases hasta a partir de la base 50.

Dos de las muestras secuenciadas no mostraron resultados claros durante los ensayos de PCR-RFLP. Sin embargo, durante la secuenciación estas muestras se observan cómo homocigotas para el genotipo AA, probablemente hubo un error al llevar a cabo las pruebas de RFLP's con estas muestras o estas fueron contaminadas, pero la razón no está determinada.

En el análisis de las secuenciaciones mediante análisis Clustal W se observó un par de SNP's más, no descrito antes en la literatura en las muestras M44xxx4 y M46xxx6 en el codón 155 y la región del intrón IV respectivamente, dichos cambios no habían sido reportados en la literatura anteriormente. Este resultado no se percibió durante los ensayos de restricciones ya que las enzimas no abarcan esa región y el último de ellos

puede ser explicado por encontrarse en una región intrónica las cuales son susceptibles a cambios (Lewin, 2001) o por errores en la síntesis de la cadena complementaria por la Polimerasa. Sin embargo, Paula De Sousa reporto también por primera vez un cambio no esperado en el codón 151 de este gen presentando los nucleótidos citosina y adenina en la misma posición detectado mediante secuenciación (De Sousa *et al.*, 2012).

10 CONCLUSIONES

El gen *CSN3* fue analizado mediante diferentes análisis bioinformáticos, ensayos de restricción y secuenciación que permitieron revelarlo como heterogéneo por cambios de nucleótidos simples (SNP'S), estos cambios permitieron comparar e identificar las aleloformas descritas anteriormente del gen presentes en dicha especie.

La región RAMB002 (análoga al marcador MB002) de la K-caseína pudo ser amplificada con éxito con el uso de los oligonucleótidos específicos usados en el presente trabajo.

La enzima de restricción Hinf I no permite la discriminación alélica en el búfalo acuático como lo hace con el ganado bovino, debido a la conservación de esas secuencias específicas entre los genomas de búfalo y cambio de secuencias de una especie a otra, quedando descartada para estos fines.

El uso de la enzima de restricción Acu I es recomendable para la genotipificación del gen *CSN3* en búfalo acuático, ya que permite identificar fácilmente mediante la técnica PCR-RFLP la presencia de una u otra variante gracias a que su sitio de restricción se encuentra justo sobre un par de SNP's.

Las frecuencias alélicas del gen CSN3 fueron calculadas observando una alta frecuencia del alelo "A" y una baja frecuencia del alelo "B" en las poblaciones de búfalos acuáticos muestreadas en la cuenca del Papaloapan. Si la presencia del alelo B del gen CNS3 demuestra tener el potencial que expresa en bovinos, esta prueba es apta para la selección de animales portadores de los genotipos deseados, que incrementen la productividad de leche y derivados lácteos; como quesos.

El grado de heterocigosidad es relativamente bajo, existiendo un alto grado de homocigosis para el alelo A, siendo esto malo desde el punto de vista productivo, en el cual se prefiere tener altas frecuencias del alelo B.

Con los resultados obtenidos se pueden generar recomendaciones que ayuden a aumentar el grado de heterocigosidad de los hatos o aumentar la homocigosis del alelo B el cual es la variante alélica deseada, según los objetivos de producción de cada explotación de Bufalos.

11 PERSPECTIVAS

La selección asistida por marcadores moleculares o genéticos es factible de aplicar en la industria ganadera dedicada a la producción animal, gracias a la identificación y obtención de genes o marcadores candidatos que pueden ser usados para identificación y selección de individuos portadores de estos. Una vez caracterizados genéticamente los animales, la información de la presencia del marcador en el hato puede ser usada para incrementar la frecuencia de del marcador asociado positivamente a la característica de interés, seleccionando principalmente y de ser posible animales que tengan

dos copias de este marcador contra los que tengan una o no lo posean. Por lo general la mejor manera de incrementar la frecuencia del marcador es mediante el uso de sementales que lleven dos copias de este (Homocigotos BB) (Figura 12-2).

La identificación de animales portadores de los marcadores genera un costo que se justifica al incrementar características productivas de toda una generación futura (FAO, 2003).

Usando los datos obtenidos en los ensayos anteriores existen dos vías a seguir según los objetivos de producción de los productores y datos generados por ensayos posteriores. Sin embargo, es necesario realizar un ensayo claro entre genotipo y fenotipo en cuanto a calidad de leche para esta especie, lo cual definiría el vínculo existente entre genotipo y mejoras en la calidad de la leche. De ser así, al usar este marcador como un criterio de selección, se deberían elegir de preferencia animales homocigotos del genotipo BB, para ser la base de la siguiente generación. Sin embargo, al no existir homocigotos BB en la población muestreada, deberían hacerse cruza entre búfalos heterocigotos, machos AB y hembras AB esperando en la siguiente generación obtener una mezcla entre heterocigotos AB y homocigotos AA y BB, obteniendo de aquí vientres y posiblemente machos homocigotos BB para la siguiente generación como se muestra en la figura 12.

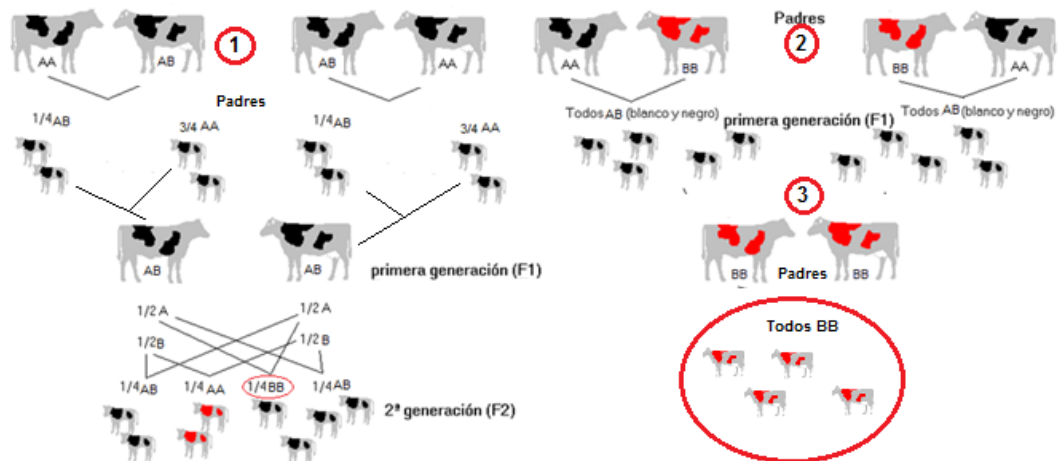


Figura 12. Esquema de cruces para la obtención de animales homocigotos para la variable deseable B. Se enumeran 3 casos en la figura: El número 1, que es el estado de los animales muestreados en este estudio (homocigotos AA y heterocigotos AB); el número 2 (existencia de homocigotos A y B) y el número 3 la idealidad (existencia solo de homocigotos BB). Para diferenciar entre genotipos se usaron los colores rojo y negro, AA y BB respectivamente.

En ausencia de animales homocigotos para la variante deseable BB (Figura 12-3) solo hay una vía que es la cruce de homocigotos AA con heterocigotos AB (Figura 12-1). Por lo cual el genotipo deseado BB se podría obtener hasta una segunda generación. A pesar de no existir homocigotos, en el esquema se incluye un ejemplo de cruces de homocigotos de cada genotipo machos y hembras (Figura 12-2).

12 REFERENCIAS

- Addeo, F., S. Soulier, S., Pelissier, J.P., Chobert, J. M., Mercier, J.C., & Ribadeau-Dumas, B. (1978). Preparation and fractionation of goat kappa-casein: analysis of the glycan and peptide components. *Journal of Dairy Research*, 45(02), 191-196.
- Agudelo, G. D. A. & Bedoya M. O. (2005). Composición nutricional de la leche de Ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación*, 2 (001), 38-42.
- Alais, C. (2003). Composición y propiedades de la leche y modificaciones que experimentan sus componentes principales. La Ciencia de la leche. Principios de la Técnica Lechera. Traduc. Lacas, A. 7, 31-38.
- Almaguer, Y. (2007). El búfalo, una opción de la ganadería. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=63612734014>. Consultado en mayo 2015.
- Azevedo, A. L. S., Nascimento, C. S., Steinberg, R. S., Carvalho, M. R. S., Peixoto, M. G. C., Teodoro, D. R. L., Verneque, R. S., Guimaraes S. E. F. & Machado M. A. (2008). Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genetics and Molecular Research*, 7(3), 623-630.
- Barroso, A., Dunner S. & Canon J. (1998). Technical note: Detection of bovine kappa-casein variants A and B, C and E by means of polymerase chain reaction-singlestrand conformation polymorphism(PCR-SSCP). *Journal of Animal Science*, 76(6), 1535-1538.
- Balteanu, V. A., Vlaic, A., Rusu, A. R., Creangă, S., Pop, F. D., Odagiu, A., Pântea M. L. & Hâncu V. (2007a). Milk proteins polymorphism in Romanian Grey Steppe cattle studied by isoelectric focusing technique (IEF). Identification of a new allele alpha S1-casein allele: alpha S1 IRV. Bulletin of USAMV-CN, *Anim. Sci. and Biotech*, 63/64(1-2), 304-310.
- Bawden, W. S. & Nicholas K. R. (1999). Molecular genetics of milk production. In: R. Casein variants A, B, C and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Journal of Animal Science*, 76, 1535-1538.

- Borghese, A. and Mazzi, M. (2005). Buffalo population and strategies in the world. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Pp: 1-39.
- Canizal, J. E. & Rivera M. S .E. (2007). Situación actual de la ganadería bovina para abasto en México. Disponible en: <http://fmvz.uat.edu.mx/bovinos/MVZ.Zertuche/Material%20de%20apoyo%20a%20alumnos/Situaci%20F2n%20y%20Perspectivas/situaactganad2007.pdf>. Consultado en junio 2015.
- Caroli A. M., Chessa S & Erhardt G. J. Milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. (2009). *Journal Dairy Science*, 92 (11), 5335–5352.
- Casas, E. (2002). Identification of quantitative trait loci in beef cattle. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 10 (1), 54-60.
- Cortes López, N. G. (2011). *Frecuencias Alélicas y genotípicas del kappa caseína en bovinos de doble propósito*. (Tesis de Licenciatura). Universidad del Papaloapan. Tuxtepec, Oaxaca, México.
- Cunningham, E. P. & Meghen C. M. (2001). Biological Identification systems: Genetics markers. *Rev. Sci. Tech. off Int. Epiz*, 20 (2), 491-500.
- Das P., G. Tiwari, S., Jain S. & Garg L. C. (2000). Rapid communication: nucleotide sequence of the river buffalo beta-casein CDNA. *Journal of Animal Science*. 78(5), 1390.
- Dayem A. M. H. A., Mahmoud K. G. M., Nawito M. F., Ayoub M. M & Darwish S. F. (2009). Genotyping of kappa-casein gene in Egyptian buffalo bulls. *Livestock Science*; 122(2), 286–289.
- Dekeks, J. C .M. & Hospital F. (2002). The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews of Genetics*, 3(1), 22-32.
- Dekkers J. C. M. (2004). Commercial application of marked-and gene-assisted selection in livestock: Strategies and Lessons. *Journal of Animal Science*, 82, 313-328.

- Dekkers J. C. M. (2005) Implementation of marker assisted selection into breeding programs. In: 4th. European Poultry *Genetics Symposium. Croatia*, 1-9.
- Deyoung, R. W. & Honeycutt R. L. (2005). The molecular tool box: Genetic techniques in wild life ecology and management *.Journal of Wildlife Management, 69(4)*, 1362-1384.
- Di Stasio L., Sartore G. & Dassat P. (1977). Variazione delle frequenze geniche di alcuni sistemi di polimorfismo biochimico nella razza bovina Piemontese. *Proc. XXIIInd Conf. Ass. Genet. It., Pisa*, 1976, 17-19.
- Erhardt, G., Godovac-Zimmermann, J. & Conti, A. (1989) Isolation and complete primary sequence of a new ovine wild-type β -lactoglobulin C. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 370(2)*, 757 .. 62.
- FarrelJr, H. M., Jiménez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hangand, K. F. & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' Milk-Six thre vision. *Journal of Dairy Science, 87 (6)*, 1641-1672.
- Ferrandini, E., Castillo, M., López, M. B. & Laencina, J. (2006). Modelos estructurales de la micela de caseína. In *Anales de Veterinaria de MURCIA*, 22, 5-18.
- Food and Agriculture organization. (2003). Molecular marker assisted selection as a potential tool for genetic improvement of crops, forest trees, livestock and fish in development countries. Electronic forum on biotechnology in food and agriculture. Conf 10. En línea en <http://www.fao.org/BIOTECH/conf10.html>: Fecha de consulta: 18 de Febrero de 2015.
- Food and Agriculture Organization (FAO, 2015).Disponible en: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/composicion-de-la-leche/es/#.VcqXuvkuFp8>.Consultado agosto 2015.
- Formaggioni, P., Summer, A., Malacarne, M. & Mariani, P. (1999). Milk protein polymorphism: Detection and diffusion of the genetic variants in Bos genus.

- Disponible en <http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/formaggioni/formaggioni.htm>. Consultado en Octubre de 20015.
- Fries, R., Eggen, A., & Strazinger, G. (1990). The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics*, 8, 403-406.
- Gallardo, N J. L., Luna, M. E. & Albarran, D. M. (2006). Situacion actual y perspectiva de la producción de carne de bovino en Mexico. 1-45.
- Goldstein, D. B. & Schlöterre, C. (1999). Microsatellites. Oxford University Press
- Habib, M. Y., Coll, A., Sanchez, A. & Folch, J. M. (2005). Caracterización de variantes genéticas en el gen de la k-caseína caprina. Departamento de patología y producción animal. Facultad de Veterinaria. Univ. Aut. Barc.1-3.
- Hoogendoorn B., Coleman S. L., Guy C. A., Smith K., Bowen T., Buckland P. R. & O'Donovan M. C. (2003) Functional analysis of human promoter polymorphisms. *Human Molecular Genetic*. 12(1), 2249–2254.
- INTA. (2006). Características productivas del búfalo de agua. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Corrientes, Argentina, 408, 4.
- Jann, O. C., Ibeaghua-Awemu, E. M. E., Özbeyaz, 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. *Genetics Selection Evolution*, 36, 243-257.
- Kamiński S. (2004). Polymorphism of milk protein genes in coding and regulatory regions and their effects on gene expression and milk performance traits. *Animal Science and Reports*, 22 (1), 109-113.
- Kamiński, S., Cieślińskay, A. & Kostyra, E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics*, 48 (3), 189-198.
- Lara M. A. C., Gama, L. T., Bufarah, G., Sereno, J. R. B., Celegato E. M. L. & De Abreu, U. P. (2002). Genetic polymorphisms at the K-casein locus in Pantaneiro cattle. *Archivos de Zootecnia*, 51 (193-194), 99-105.

- Lara, M. A. C., Nardon, R. F., Bufarah, G., Demarchi, J. J. A. A., Sereno, J. R., Santos, R. A. & Abreu, U. G. P. (2005). Polimorfismo del gen calpaína en razas vacunas por la técnica PCR-RFLP. *Arch. Zootec.* 54: 305-310.
- Landi, V., Gomez, M., Pleguezuelos, J., Gama, T. L., Carolino, N., Delgado, J. V. & Martínez, A. (2011). Analisis de Asociacion entre los SNPs de la kappa caseina (CNS3) y valores geneticos para la producción lechera en la raza caprina Murciano-Granadina. Actas Iberoamericanas de Conservacion Animal. Departamneto de Genetica- Faultad de veterinaria . Universidad de Cordoba. 1:161-164 pp.
- Lewin, B. (2001). Genes. 7a Ed. Edit. INTERAMERICANA-Mc-GRAWILL.
- Lopez, C. H. (2015). Imagen del Golfo. Hay 40,000 cabezas de ganado de búfalo en el país. [Noticias electronicas]. Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. Agencia Imagen del Golfo. 5 de octubre de 2015. [Consultado 23 de diciembre de 2015] .Disponible en: <http://www.imagendelgolfo.com.mx/resumen.php?id=40968250>.
- López, J. R., Fundora, O., & Arabel, E. 2005. ¿Por qué el búfalo de agua presenta mayor eficiencia productiva que los vacunos?. http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/razas_de_bufalos/28-bufalo_mas_eficiente.pdf [consultado el 8 de abril de 2015].
- Lunden, A. (2005). Indicators of milk and beef quality. In: *European Association for Animal Production* , 112, 464.
- Mackinlay, A. G. & Wake, R. G. (1964). The heterogeneity of k-casein. *Biochimica et Biophysica. ACTA* 93:378-386.
- Martin, P., Szymanowska M., Zwierzchowski L. & Leroux, C. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reprod. Nutr. Dev.* 42(1), 433–459.
- Martínez, D. E., Jacobo, R. A., Cipolini M.F. & Martínez E. I. (2006). Brucelosis en búfalos del noroeste de la provincia de Corrientes. Universidad Nacional del Nordeste; Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen: V-046.

- Mitra A., Schlee, P., Krause, I., Blusch, J., Werner, T., Balakrishnan, C. R. & Pirchner, F. Kappa-casein polymorphisms in Indian dairy cattle and buffalo, a new genetic variant in buffalo. 1998). *Anim. Biotechnol*, 9:81–87.
- Montiel, N. S. (2008). Origen del búfalo en Venezuela. Otra alternativa de producción de leche. XIV Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Maracaibo, Venezuela. 363-392.
- Molina, L. H.; Benavides, T.; Brito, C.; Carrillo, B. & Molina, I. (2006). Relationship between a and b variants of κ -casein and β -lactoglobulin and coagulation properties of milk. In *Journal dairy technology*. (2) 59: 188-191.
- Naqvi, A. N. (2007). Application of molecular genetics technologies in livestock production: potentials for developing countries. *Advances in Biological Research*, 1(3-4), 72-82.
- Neelin, J. M. (1964) Variants of K-casein revealed by improved starch gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, 47, 506-9.
- Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (OEIDRUS). Tarjeta distrital de información estadística básica. (2005). Distrito 06 Tuxtepec. Oaxaca, México.
- Otaviano A. R., Tonhati H., Sena J. A. D. & Muñoz M. F .C. Kappa-casein gene study with molecular variations in female buffaloes, *Bubalus bubalis*. *Genet. Mol. Biol*, 28:237–24.
- Othan, E. O. (2005). The identification of kappa-casein genotyping in Egyptian river buffalo using PCR-RFLP. *National Research Center*.267-271.
- Patiño, E. M., Crudeli, G. A., Mitat, A. & Simplicio J. F. El búfalo en América. En: *Bubalinocultura de las Américas*. Corrientes: Ediciones Moglia. 2011. 273 pp.
- Pauciullo, A., Shuiep, E. S., Cosenza, G., Ramunno, L. & Erhardt, G. (2013). Molecular characterization and genetic variability at κ -casein gene (CSN3) in camels. *Gene*, 513(1), 22–30.
- Paula-De Sousa, M.A, Sodre-Lima, A. C., Silva, E., Schierholt, A. & Da Silva-Chavez, L. C. (2002). Polimorfismos no gene da kappa caseína em uma

- populacao de búfalos Murrah e Mesticos. Simp. Brasileiro de Melhoramento Animal. Uberaba. Brasil.
- Parker, P., Snow, M., Schug, G., & Booton P. (1998). What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79(2), 361-382.
- Pereda, S. M. E., Gonzales, M., Arjona, S., Bueno, A. & Mensoza, M. (2005). Ajuste de modelos de crecimiento y calculo de requerimientos nutricionales para bovinos Brahman en Tamaulipas, Mexico. *Agrociencia*, 39, 19-27.
- Phadungath, C. (2005). Casein micelle structure: a concise review. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 27(1), 201-212.
- Picca, A.; Helguera, M.; Salomón, N. & Carrera, A. (2004). Marcadores Moleculares. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Buenos Aires Argentina. Ediciones INTA, 61-68.
- Presicce, G. A. (2007). Reproduction in the Water Buffalo. *Reproduction Domestic Animal*, 42(s2), 24-32.
- Prinzenberg, E. M. & Erhardt, G. (1998) High resolution SSCP analysis reveals new alleles at the K-casein (CSN3) locus in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. In *Proceedings XXVIth. International Conference Animal Genetics* (pp 9-14).
- Rafey, G. A. & Darwish, S. F. (2007). A PCR-RFLP assay to detect genetic variants of kappa-casein gene in cattle and buffalo. *Arab J. Biotech.* 11(1), 11-18. Disponible en <http://www.acgssr.org/BioTechnology/VIIIJanu ary 2008/Abstract/...02.pdf>.
- Ranjhan, S. K. (2007). Buffalo as a social animal for humanity. *Italian Journal of Animal Science*, 6(2), 30-38.
- Requena, F. D. & Agüera, E. L. (2007). Genética de la caseína de la leche en el bovino Frisón (Milk of casein of genetic in the Frison bovine). REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria*. 7(1) ,1695-7504.
- Riaz, M. N., Malik, N. A., Nasreen, F. & Qureshi, J. A. (2008). Molecular marker assisted study of kappa casein gene in Nili-Ravi (Buffalo) breed of Pakistan.Pak. *Veterinay Journal*, 28 (3), 103-106.

- Rini, A. O., Sumantri, C. & Damayanthi, E. (2014). K-casein gene polymorphisms in riverine and swamp buffalo in Indonesia. *Faculty of Animal Science. Bogor Agricultural University*, 4 (3), 1-4 .
- Rodero, E. & Herrera, M. (2000). El concepto de raza.Un enfoque epistemológico. *Archivo de Zootecnia*,49(185), 5-16.
- Romero, S., Espinosa, G., Cuevas, R., Moctezuma, L. & Jolalpa, B. (2009). Demandas tecnológicas y de política para mejorar la competitividad de la cadena agroalimentaria de la leche en el estado de Hidalgo. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 13(24), 770-787
- Rosales, R. (2009). El búfalo de agua en Costa Rica: Una alternativa de producción de carne y leche. EN: Revista Universidad Tecnica Nacional (ECAG), 50, 14-18.
- Schaar, J., Hanson, B. & Petterson, H. E. (1985). Effects of genetic variants of k-casein and b-lactoglobulin on cheesemaking. *Journal of Dairy Research* 52. 429-37.
- Shende, T. C., Sawane, M. P. & Pawar, V. D. (2009). Genotyping of Pandharpuri Buffalo for k-casein using PCR-RFLp. *Journal of veterinary an Animal Sciences*, 5 (5), 174-178 pp.
- Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S. C., Kakol, J. M., Stein, L. D., Marth, G., & Hunt, S. E. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409(6822), 928-933.
- Soheir, M., Nahas, E. L., Mona, A., & Taha, D. A. (2013). Genetic characterization of Egyptian buffalo CSN3 gene. *Journal of Gentetic Engineering and Biotechnology*, 11, 123-127.
- Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S. C., Kakol, J. M., Stein, L. D., Marth, G., & Hunt, S. E. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*,409(6822), 928-933.

- Suazo Cortéz, R. (2011). Seroprevalencia de brucelosis en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en tres unidades de producción localizadas en los municipios de Isla y Juan Rodríguez Clara, Veracruz, México (Tesis Doctoral).
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphism markers. *Nucleic Acids. Research*, 12, 4127-4138.
- Thompson, A., Boland, M., & Singh H. (2009). Milk Proteins from Expression to Food. 1 Elsevier. USA. 535.
- Torres, E. (2006). Manual de buenas Prácticas en producción Bubalina.1: 49.
- Valadez, E., & Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Van Eenennaam, A. & Medrano, J. F. (1991). Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. *Journal of DairyScience* 74, 1730-1742.
- Van Eenennaam A. L. (2006). What is the future of the animal Biotechnology?. *California Agriculture*, 60 (3), 132-139.
- Vergara E. M. & Truffer R. (2004). Selección genética en bovinos ¿Porqué breed plan?. EN: Conferencia IV Jornadas Nacionales de Cría Bovina Intensiva Venado Tuerto, Santa Fe, Argentina, 1-6.
- Visscher P. M., Hill W. G. and Wray N. R. (2008). Heretability in the genomicsera-concepts and misconseptions. *Nature Reviews Genetics*, 255-264.
- Weber, J.L. y P. May. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44, 388-396.
- Warwick, E. J. & Legates J. E. (1992). Cria y mejora del Ganado. 3ed. Editorial McGraw-Hill, Mexico. 614pp.
- Wolter, W., & Kloppert, B. (2004). Interpretación de los resultados del conteo celular y de la aplicación de la terapia. Avances en el Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina. Guadalajara, Jalisco, México, 1-5. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos57/celulas-somaticas-bovina/celulas-somaticas-bovina2.shtml#ixzz44k83LhQK>

Zittle, C. A. & Custer, J. H. (1966). Identification of the k-casein among the components of whole goat casein. Journal of Dairy Science., 49, 788-791.

13 ANEXOS

13.11 Anexo 1 Quick g DNA™ Blood Miniprep

El Quick-g DNA™ es un producto simple para la rápida extracción de DNA total (genómicos mitocondrial, viral,..) de una variedad de muestras biológicas. Para el procesamiento, sencillamente agregar la formula especial de Buffer de lisis a la muestra. No es necesario el uso de desnaturalizantes orgánicos o proteinasa k (digestión) además de la exclusiva química usada en el kit.

✓ **Protocolo de extracción.**

El siguiente es un proceso para la purificación de DNA a partir de 100 ml de sangre entera, suero o plasma, los volúmenes pueden ser ajustados a 200 ml máximo dependiendo de los requerimientos: fresca, congelada o sangre conservada (EDTA, citrato o heparina) puede ser usada si el material no es procesado inmediatamente, la muestra puede ser estabilizada para su procesamiento posterior.

1. Agregar 400 ml de Buffer genómicos de lisis a 100 ml de sangre, suero o plasma (4:1). Mezclar completamente por vortex durante 4-6 segundos. A continuación dejarlo de 5-10 minutos a temperatura ambiente

Nota: agregar 200 ml de Buffer de lisis a muestras de menos 50 ml, para muestras de más de 50 ml agregar con una proporción (4:1) (80 ml Buffer de lisis a 200 ml de sangre)

2. Transferir la mezcla a una columna Zymon- spin (tubo). Centrifugar a 10 000 X g un minuto, desechar el tubo con el excedente.
3. Transferir la columna a un nuevo tubo, agregar 200 ml de Buffer de prelavado de DNA a la columna, centrifugar a 10 000 X g ,1 minuto.
4. Agregar 500 ml de Buffer de lavado g-DNA a la columna ,centrifugar a 10 000 x g, 1 minuto
5. Transferir a un tubo de microcentrifuga limpio. Agregar 50 ml de buffer a elución de DNA a la columna, incubar de 2-5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a máxima velocidad 30 segundos para diluir el DNA.

El DNA diluido puede ser usado inmediatamente o conservado a – 20 °C para su uso futuro.

✓ **Procesamiento de muestras conservadas.**

El inmediato procesamiento de muestras de sangre con este kit es recomendado. Sin embargo si las muestras de sangre no pueden ser procesadas inmediatamente, las muestras pueden ser estabilizadas con Buffer de lisis para su posterior procesamiento, hacer lo siguiente: Agregar 4 volúmenes de Buffer de lisis a un volumen de sangre fresca (4:1), mezclar a vortex. La sangre fresca mezclada con buffer de lisis puede ser almacenada

a temperatura ambiente de 1-2 semanas ,0-4 °C por 1-2 meses, 20 °C por 6 meses o 1 año, -70 °C por muchos años

Las muestras conservadas -40 °C deben llegar a temperatura ambiente antes del procesamiento comenzar en el paso 2 cuando se está purificando ADN de muestras estabilizadas con buffer de lisis.

13.12 Anexo 2 Secuencia del gen CSN3 en búfalo Acuático obtenida del NCBI con clave de acceso AM900443.1. Esta secuencia

```
1  TTCCTGTAAA  TACCACAATC  TGGTCAGGAC  TTCATGGAAA  AAATGAAATC  ACAGTTAACA
61  CTTTTCTGTG  GAGAAATGTA  AGCAAAAGCA  GATATTCTTT  CCTTAATTAT  CTAGGAAAAT
121 TATTTGGTTA  GCGGTATTTT  ACCAAAATAC  CCCCATATT  GGTGGCTTTA  AGATATATAT
181 TTTGTAAAGC  AGAATAAGCC  ATCTTTGAAA  CAGAACAATT  ATTCTGAATT  TAGTTATTTA
241 ATTTTGTACA  TCCAGAATGA  TTCACATATA  TTATTGAAAT  TTACAAATCT  AAGTGCAAGC
301 AATAAATGCT  GAAGAAGATG  TGAAGAAAGG  GGAATCCTCC  TACTGTGTTG  GTGGCAATGT
361 AAACGGTAG  AGCCACTATG  GAGAACATTA  TGGAGATTCC  TTCAGAAATT  AAAAAAAAAA
421 AATCTATGTG  CAACTTGATT  CATAAGAAAC  TAATCAATCA  ACAAACAGGT  GTTTATATGA
481 TGAATTTACT  GAAGAATAAA  ATGAAAATGG  ATCCCTACTT  TATATTGATT  AATATTTTCA
541 ATTTGGATTT  AACATAAATT  ATTCTTGGGC  ATATAAAAGA  TGATCAGTTT  TCTAATTGTT
601 AAATACTGAT  GGCTGTAATT  CTAGAAAGAG  GACGACCAAC  CACAGCCCAT  AATATACGTA
661 GAATTACTION  ATACCCAGGT  TCTTGAAATA  ATAAGAAACA  TTTGAAATGT  AAAAGTGCTA
721 TGGCTAGCTA  CTTTTCATTT  AATAATAGCT  TTAAATTCAA  ATAGGTGGAA  TTAGTTGATT
781 AAAATGCAAT  TAATATCTT  AAAATCCTC  TATATCTTTT  CATAAACATA  AAAGTTCAGT
841 CTTAAAAAAG  TGTGAATAAT  CTGTTTCAA  ATCTTATGAA  TGACAACCTC  ATTTCTTCT
901 CCGCATCCA  TTAACCGAGA  CTGATGTAAA  GATGGCCCTG  CTATCGTCAG  ATCTTTCCTT
961 TCTGTCATCT  TCCTATTGGT  GCAATGTAAA  AGGAAGATAA  ATCATGACGC  AAGACACTAA
1021 CACCCTTTAA  TTAGTCTCTG  GTTATTTACC  TTGGGTGTTT  CTACAGTGG  AAAGCCAAC
1081 TGAACCTACT  GCCAAGCAAG  AGCTGACGGT  CACAAGGAAA  GTAATCACA  TTTAAACATT
1141 CAAAGAGAAT  AATTCTTAC  AGCAGACTGT  AATTATTACA  CCACCAAAGT  TATTTTAGAA
1201 GAACATTTT  TTCCTTTGG  CTTTATTGT  TAAGCTTGAA  TATCCTTGT  CATCATTATG
```

1261 ATATTAGTTT CTAATCTAAA ACTTAGATTT TGTGTAATGT TATGATGAAA TTTATTTTTA
1321 ACTTCACTTT GGGTTAAAGT CAAGATTTTA TACTTGCTAA AGTACTGATG ACAATGTAGA
1381 TTCTTAAAAA AAAAAAGAA AGTATGTTCA AGACAGTGAA TCTATTCCTA CAGACAAATG
1441 TGGAGGGCTA ACTTTTTAGG AAGATGAAAG TACAGGATAA TCCAGATTGA TCCCTTAATT
1501 AATTTCAAAA TTTTATTTCT GTCTAAAGGT TATAATTTCA TTTGTCATAG TATACAACCT
1561 TAAAAAATAA CAGGACTTAT ACATCCTTAC TGAAAGCTGA ATAGTTCTGT TTCACAAATT
1621 TTTCTGGATT GCCAAGTTAT GAAGGCAAAT TCAAGTACTT CCTGTTTTAA ATAACTGATA
1681 AGTAAAGAAT AGTCTTATTT CTCTGGTTTC TGTTTATGCT AAAAAGGGAA TAACTACTAC
1741 CGTTTTACAA GATGTTTTTG TATGAGTGTT TGTGATATCA TTTTGCATGA ATTATAAAAA
1801 ATTCCATGAT TCACCATAGA AATATGTGTC AGACTACAAT CTAAAAGGT AGCCAGTGAT
1861 TATTGTACAA TATTTTTTCT ATATTCACTG TACTGTATTG TAATCATCAA TCTTGCTAAG
1921 AGACTAGATA TTAATTATTC CAACCACAAA AAAGAAATGA TAATTATGTG ACATGACAGA
1981 GTTGTTAATT ATCAGTACAA TTGCAATCAA ATTACAATAC ACAAATACAT TAAATAAACA
2041 TGTTAGACAC ATTAAATTAA CACAATGCTA TATATTAAAT CCATTTCAAC TAAGAAAAAT
2101 TTCACTGGCA AGCAAAGAAT TCATAAGGAG CTCCATTCTA TTCAATGAAA TTTGGGGAAA
2161 CAATCAATGC TGTAGGTTGC TCAAATTTGA ACTCACGTTA AGTTCTTTTC CATTCAAGTGA
2221 TATTCCATCA GAGGTTCTGA AGTCAGTTTA GTAGACAGCC TTTCTAATCA TTCTTACCTG
2281 GAAATCAAAA GTGAATTGAG CCTGGTGTA CACTTTTATC AAGCCTGAAC TTCTAAGTCT
2341 GTGACCCTAG TCTATAAAAC TCAGTTTGCA GGTTTCAAGT CTATACAAGT ATGATGATAA
2401 CAATGGCTGT AACAAGATGT AGTATTTAAT TCATAAATGC AAAATTTATT AATATTTTAA
2461 AAATCTAAAA TGTTATATGT ATCTTTCTAA AAAGACAATT TAGCTTTTAA AATCAAATAA
2521 ATAGGTATTA CTACCCATA CTGAGTCTT TAGAAAAGATA AGGTTAATTT ATTTCTTCAA
2581 ATATTCATC CAGAAAACG TAATTGACAT ATCTAACATT TTTTCATTAA ATTGATCAAG
2641 CTAATTATAT AACTTATGAT TACTGGAGAA GCAGATTATG AAAAATGCAG TTTCAGGATA
2701 CTCTGCCCAA TCTCTTTAAA TATTCCTATT AGATCAATCA CAGAATTAGA GAATTTTCAA
2761 CATTTCAGTT CAAACTTTTA TTTATAGGCA AGAAGAATAC TAGGGCCAGA TAAAGGGAAA
2821 TACTTATTC AAGTAGAGAA TAGAGCCCAA GATGGAGATC AGTCCTCCAA AGGAATGTGT
2881 AGTCACCTCA GTTTCTTATC TGAAGCCACT CAACTAATGT TAGGAAAGCT ATCTAATTCT
2941 TTAGCCTGGC ATTTAATGCC TCATCTTTCT TTGCCCTAAA CTTTCTATCC AACTTTGTCT
3001 TTCCCTTCCC TCCATTCAAA TGCCCATGGA TATTCCTAAA GAGTTCTCTT TTTTCTTGA
3061 AGTTCCTCAC TATTAATCTC TGCATGGGCA AGTCCCACCT ATATGCTATG TCCTACAGAA
3121 ATAATTTATT GTTTCTTAA CTGAACACTT CTATCTGTAG AACAGCACTT TTGTGACACT

3181 TTCTACTCTC TTTTATCTAA CAGTGATTTG TGTACATTGC AACTCTTCCT AAAATTTATG
3241 TTACTTGACC AATTCACCTT AATAATCTCA AACTGACAC ACAGAGCTTT GTTCCTACTA
3301 CATTCTTGGT ACATATGAAA TGAATACAGG ATCAACCTTG TAATGACTCA TTCAGTAACA
3361 TAACCAAAAA TTAGATTCAT ATATTTCCCTA CCATTTTGTT TTTCTAAAGC TTTTAATAAA
3421 ATAGATTTTT CACATTGGCT ATATCTCCCC CTCAATCTGG CTTTTCCCAC TCTTAAATCA
3481 AAGAAAACAT TGCTCCAAGT CACTCCTAAA TTATCAGCAA CAGATTCTGT TAATCTAATG
3541 TTTTAAATTT AATTTTAGGT ACAATGATGA AGAGTTTTTTT CCTAGTTGTG ACTATCCTGG
3601 CATTAAACCCT GCCATTTTGG GTGAGTTAAT TTCATCTAAT CAGTTTGTAT CAAATTTTTT
3661 TAATTTATTG AAGGGCTTTA ATTGTGTAAG TTTCTAAATA CAGTTATATT TTATAGAACA
3721 AAATAGCTGC ATAAGTAATT TATTTTACATA TTTATTTTTTCT TTATTAAGT CATATTCTTC
3781 TGGATATTCT TCTGGTTTCT AGGAATAAAG AAGTCACACT CTATCGTCTA GAGAAAACCT
3841 TTAAAATCT CATATGATGG AGAAAATACA TTTTGGGGGA AAAATCCTGA AAATATTTTT
3901 AAATTATAAT ATGTACTION AATAATTCAC AAAAAATAAA TATATAAACC ATAGATGAAG
3961 ATCAGAAATG TTTTGTAGTA AATTCCTATT TCATGCAAAC TCCAATTTGT TTCAAAATA
4021 AATCCTTAAA ATATTAGGAG CTTGTATAAG CTTTTTTACC AATTTCAAAT AACTTGACAT
4081 GACTTTTTAA TATTTAAATG TATTGTAAGT TTTGTTATAA TATTTCCATT GTGTCAACTC
4141 CCTCTCAGGG ACTATATGCA TAAACACCTC TTTGATTTTT AGGCAAACAT CTGAAAGCAT
4201 CAGATGTTTA TTTTCTGTT CTTACTGTTG GCAAATAAGT GCCTGGGATC CCCAAATGAA
4261 CATGAAAATA AAACAGACCA ATAGCCAAAA CAATGAGGAA AACTAGTCAA AAAAATTTAA
4321 AGAAAAAAT CCCAAACCTT TTTCATATTA CATGTAATTA CAGAGTGTA TGCCTGAAAA
4381 TCATAGAGTT ATTTATGGAT ACAATCCCTG AGAGGGAGTT GACAAAATAT GAAGATTATA
4441 ACAAAGTTA CAATATATTT GAATGTTAAG CATACATATC AAGTTATTTG AAATTGGTAA
4501 AAAGAAAAA GAAAACTTA AACAACATCC TAATATTTTA AGAATTTAGT CTCTAAATAG
4561 ACTGGAGTTT GTGTGAGATA GGAATTTAAT TAAAAACATC ATACATTACC ATGTGTAATA
4621 TTAGATAGCC AGTGGAAATT TGCTGTATAA TGCAGGGAGC TCAAACCTAG GGCTCTGTGA
4681 CAACCTAGAG GGGTAGGATG GGGTGAAGG TGAAGGGAG GTTCAAGGCG GAGGGGACAT
4741 AACATACCAA TGGCTGATTC ATATTAATAT ATGGCAGAAA CCAACACAAT ATTGTAAGC
4801 AATTATCCTC CAACTAAAAA TAAACACATT TAAATTTTTA ATATCTGATG CTGTATGACC
4861 TTCTCTGTT TTGATGGGCA GGGCATCCT CAGTAAATCT TTAATCCAAT TTTCTGTTAA
4921 TGGGCAGGGC TGTGTTCCCT CCCTGTTGTT TGACCTGAAG CCAAATTATG GTGGAGGTAA
4981 TGAAGATAAT GTCTGGCGAC CTCCTTTAAA AGGTCCCATG CAAACACTGC TGCACTCAGT
5041 GCCCTCAGCC TGCAGCAGGC CACCTCTGAC CAATGCCTCT GCCAGAGACT CCTGGACACT

5101 TATGGGCAAG TCTGGTTCAG TCTCTTGTGG GGTCAGTCT TCTTTCTCTT GGGTCCTGGT
5161 GCACACAAGC TTTTGTTTGT GCCCTCCAAG AGTCTGTTTC CTCAGTCTCTG TGTAAGTTCT
5221 AGAGGCTCTA TGGTGGGGTT AATGGTGACC TCTTCTAAGA GGGCTTATGC CATACCAGG
5281 TCTACTGCAC CCAGAGCTCC TGCCCTGCAG CAGTCAACTG CTGACCTGTA CCTCCGCAGG
5341 AGACATTCAA ACAAAGTTCT GGCTCAGTCT CTGTGGGGTC TCTGGGTCCT GGTGCATACC
5401 AGGTTTATTT GAGCCCTCCA AGCATCTCTG GCAGGTATAG GTTTGTATTC TAAATGCTAT
5461 TTCACCCTTC TACCATCTTG CTGGGGCTTC TCCTTTGCCC TTGGACATGA GGCATCTTTC
5521 CTCTGTGGGA TCCAACATTC TTCTGTCTGAT GGTGTTCAG CAGTGAGTTG AAATTTTGGG
5581 GTTCTTGCAA AAGATGAGCA GAAGTCCTTC TACTCTGTAA CAACTACTT CACTCTACA
5641 ACAAAGTGA AAATTCATAA AGAGATGGGA ATACCAGACC ACCTGACCTG CATCCTGAAA
5701 AATCTGTATG CAGGTCAAGA AGCAGCAGAT AGAACTGGGC ATGGAACAAC AGACTTGTTT
5761 CAAATCAGGA AAGGAGTACA TCAAGGCTGT ATATTGTCAC CCTGCTTATT AACTTATACA
5821 CACAGTACAT CATGAGAAAT ACTGGGCTGG ATGAAGCACA AGTTGGAGTC AAGATTGCCA
5881 GGAGAAATAT CAATAGCCTC AGATATGCAG ATGACACCAC CCTTATGGCA GAAAGTGAAG
5941 AAGAACTAAA GAGCCTCTTC ATGAAAAGTGA AAGAAGAGAG TGAAAAAGTT GGCTTAAAAC
6001 TCAACATTCA GAAAACGAAG ATCATGGCAT CCGGTCCCCT CACTTCATGG CAAATAGATG
6061 AGGAAACAAT GGAAACAGTG ACAGACTTTC TTTTCTTGGG CTCCAAAATC ACTGCAGATG
6121 GTGACTGCAG CCATGAAATT AAAAGATGCT TGCTCCTTGG AAGAAAAGCT ATGACCAACC
6181 TAGATAGCAT ATTA AAAAGC AGAGACATTA TTTTGCCAAA CAAGATATGT CTGGTCAAAG
6241 CTATGGCTTT TCCAGTAGTC ATGTATGGAT GTGAGAGTTG GACTATAAAG AAAGCTGAGC
6301 ACTGAAGAAT TGATGCTTTT GAACTGTGGT GTTGGAGAAG ACTCTTGATA ATCCCTTGGG
6361 CTGCAAGGAG ATCCAACCAG TCTGTCTTAA AGGAAATCAG TCCTGAATAT TCACTGGAAG
6421 GACAGATTCT GAAGCTGAAG CTCCAATACT TCGNCATCT GATGCGAAGA ACCGACTCAT
6481 TGGAAAAGAC CCTGATTCTG GGAAAGATTA AAGGCAGGAG GAGAAGGGAA CGACAGAGGA
6541 TGAGATGGTT GGATGCATTA CCGACTCTGG ACGTGGGTTT AAATAAGCTC CAGGTGTTGG
6601 TGATGAACAG GGAAGCCTGG CGTGCTGCAG TCCATGGGAT TGCAAAGATC TGATATGACT
6661 GAGTAACTGA ACTGAATTGA TGACCTCTC CTAAATTGTA AAATTTGGAA CAGCACTAGT
6721 CCTGTGTTCA TAATTCATTT ATTATTAAT TTAGTTTTGC TTCAAGTTA ATATCTCTTA
6781 AATAATCTA TTTGGTAAAT TCTTAGAATC TTTTTTAAA AATTTGAATT ACTATGACCT
6841 TCACATTTCT TCCTTCTTT TTTGAAATTT TATTTTATTG TGGCCACCTG CATATTTAGA
6901 ACTCGGCTT TCTCTTGAGG GATAGAGGTT AAAGTTTAAA TCAGAAAGTG ATTCACAAC
6961 GCTTGACCTC TGAAAACATC TTCTTGAATC ATTTGAGCCA GTGCTAGCCC CAACTCTCC

7021 TTCCTGTCTT CACAAAGCTA CAAGCCCCAT GGATATAAAC AAATAATTCA AAAGAAGAAT
7081 GAAAGTTTAT ATAGATTTTT ACCATCCAAT CTTATTATAC AATCTTACTT ACCCAATCAA
7141 AATCATACAA CTTAATATAG CAGTTGGAGA AGGCAATGGC ACCCCATTCC AGTACTCTTG
7201 CCTGGAAGAT CCCATGGACT GAGGAGCCTG GTAGACTGCA GTCCATGGGG TCGCTAGGAG
7261 TCAGACATGA CTGTGTAACT TTCAAGTAGA CAACCTGAGC GACTTCACTT TCACTTTTTCA
7321 TTTTCATGCA TTGGAGAAGG AAATGGCAAC CCACTCCAGT GGTCTTGCCT GGAGAATCCC
7381 AGGGACGGGG AAGCCTGGTG GGCTGCCGTC TCTGGGGTCG CACAGAGCCA GACACGACTG
7441 AAGCGACTTA GCAGCAGCAG CAGCAATACA GCAATGTTGT AGCATCTTTT ATGTGCTAAA
7501 TGTATTCCTT CTCTCCAAAA TATAAATAGC TAAGATAATA TTTATTACTA GCAATTACAA
7561 GATGAACTGC ACAATCTTAT AGTCTATTGA TGGCATTATA AATTGGTGTA TCTTTACTGT
7621 ACAGCAGTAT AATAATTTCT GTCAAAGAAT TTTCCCCCA AAATCATATT TTTGAAAGAC
7681 TGTTTTAAGA AATCACTGAA AACTATTTAA AAGGCCATTG ACATCTGGGC TTTCTGGTG
7741 TCTCAGACAG TAAACAATAT GCCTGCATGC AGGAGACCTA GTTTTCATCA TTGGATTGGG
7801 AAGATTTCCC CGGAGAAGGG AATGGCTACC CACTCAAGTA TCTTACCTGG AGAATCCATG
7861 GACAGGGGAG CCTCGTGGGC TACAGTTCAT AGGTCATTTT AAAAGTCCAT TGATATCTAT
7921 CCAGATGTTA TCCATGCCTG TATTATAAT AAAAACATTT TTTGATAAAC CTTTAAAAGT
7981 TAACAATAAA GAACAAACAT TTCATGACAT AACCATTGAT TGTTTTTCAA CTTTGAATAT
8041 GCAAGTATGA AAACGAGGT GATGAAAAA TGATATGAGA TCATATGCCT TTAAAAAATT
8101 TAAGATACAA GATCCTAAAA TGAACATATA CCAGGAATAC ATAATGCATA TAGACTGATA
8161 TTATATTCAA ATCTATATCT AAATTTTCAG GATTTTTTATG TGTAGGCAAA CTTTCAATAT
8221 TAATATAACT TTTTAAATTT TAAACTAATG ACTTAATAAA TTTAGAGGTA AATAAGTCCC
8281 TGTCTTAAAC CACCCTGTAT TTTATTTTAT TTTTAAAT CTCTGATATC CTATACCAAC
8341 AACTTCCTAA AGGTTTATAG GATCTTTTAT ATCCCAGGGG TATGTGTGAA AAGTCTTAAA
8401 CTAAACTGT CATCTTAAAA CTATTTACTA TTATGAACTC ACCTTTTGTA AGTTTTAAAG
8461 CTTCATATAG ATATGCCTGG AAACACTTTT CTCACTCCTG ATTTCTATG CATGTTACAA
8521 TCCAGACCTA AGAAAAGTAC TATAAATACA TGATAATTTT TTAAATGCTA TTATTTATAT
8581 AACATTTATA TACCAGTTTT ATGCTAGAGG CAATTTTTTA ATCAAGCACT GGGACAACCC
8641 AGATGGATGA TACGGGGAGG GAGGAGGGAG GGGGATCCAG GATGGGGAAC ACGTGTACAC
8701 CCGTGGCAGA TTCATGATGA TGATGGCAA AACCAATACA ATATTGTAAA CTAATTAGCC
8761 TCTAATTAAA ATAAATAAAC TTATATTTAA AAAAAGAAAA CCTCATAAAT CATCTTAGGA
8821 GAGCAGAAAC AGAAAAATAT GCTAAATTCT CCTCTTATTT TTAGCAATAT ATATTCAATA
8881 CAAATTGAAT ATAGGTTGTT CATGTTCTTC ATTTAAGCAA TATCATATAT AGCTGTTGGT

8941 ACAGAGATCA AATGATCATA TTCTTTTCAA TCTTGAATTT TTCTCCCTAA ATAGTGATTT
 9001 TTAAGAACTT AACCATGGGG CTCATTATTG CTATTTAAGT TAGCATGTAT CTGTCATTTT
 9061 TTGAGGGTTT CACAGACTAT CTGCTAAGTC ACTTCAGTCG TGTCTGACTC TATGCGACTC
 9121 CATAAACGGC AGCCCACCAG GCTCTCCCGT CTCTGGGATT CTCCAGGCAA GAACACTGGA
 9181 GTGGGTGTC AATTCCTTCT CCAATGCATG AAAGTGAAAA GTGAAAGTGA ATTCGCTCCG
 9241 TTGTGTCCAA CACTTAGCGA CCCCATGGAC TGCAGCCAC CAGGCTCCTC CATCCATGGG
 9301 ATTTTCCAGG CAAGAGTACT GGAGTGGGGT GCCATTGCCT TCTCCGTCAC AGACTATAGA
 9361 TAACCTAGAA AAGTGCTTTA TAATATTTTA CAATACTAAA ATAAAAGCAA GAAAAACATG
 9421 TTTTATCTTT TTTATAAAG ATATTTTAAA ATCACAAAA CTAGACTCTA TCATGCTTTT
 9481 TTTCTTCTAA CTTCTTGTTT CTGATTCTTT CTCTGAATCT CTGCAGGGTG CCCAGGAGCA
 9541 AAACCAAGAA CAACCAATAG TAAGTTTGTT TCCAGTAGAG ATATGAATCC AAAGAATAAA
 9601 ATTCGCAAAA GTTTAATGAT ATTTAAATGC CTTCTATCTA AAGACTAAGT AAATATTTAA
 9661 ACTACATAAA ATAATTGAAT AATCTTTGTA AAAATAATCA TTTTAGCAAC CACTCATATG
 9721 AATCAACATC AATGTTTATC TAAAATCTTG GTATCACTTT ACAGGCCAAG TCGTGTTGAT
 9781 TTTTCATGAGT ATTTAGCAAC ATGAGAAAAAC CTTTTCAGAA TTTAATACTG GGAAAACAAT
 9841 GAAAACAAAA GCAAAGCTTA ATATTTCTTC TGTCTACTTT TTAAGAAATG GGAATGATC
 9901 CCTCTCTGAA ACATCTTCTG ATGCTTCTCA TACAATTGTA TTCATTCCCC CAGTTTGTTT
 9961 GAATGAATAC CTTTAAATAC GTCTCCTTTA ATGAGAAAGC CTGCTTTTGA GGTATAATTT
 10021 CATTAATTTG TTTCTATTCA TAAGAAAGA TCTAATGATT TTATATTTTA TAACTGCACC
 10081 TAATTAATAT TAATTAATTA ATAGAACTAA TCAATTATTA TAATTAGTTA ATGATAATAT
 10141 AATATTATCT ATATCACATG ATGTGATATA TATCACATTA TATCACATGA GGTGATGTGA
 10201 TGTGGAATAT ATATATTATA TTTATCATAT AATATGTGAT ATAATGTGAT ATATATCATT
 10261 ATATATGTGA TATACATCAT TATACATATA TAATGATATA CATTATATAT ATGATATATA
 10321 TCACATTATA TCACAATATA TCACATGATG TGATGTGATG TGGAATATAT ATTATATTAT
 10381 TATATAATTA TATATAATAT ATATTATATA TTAATAATTG ACTAGTTCTA TTACTTTGGC
 10441 CACCTGATGC GAAGAGCTGA CTCATTTGAA AAGACCCTGA TGCTAAGAAA GATTGAGGGC
 10501 AGGAGGAGAA GGGGACGACA GAGGATGAGA TGGTTGGATG GCATCATGGA CTCAATGGAC
 10561 ATGGGTTTGG GTGGACTCCA GGAATTGGTG ATGGACAGGG TGGCCTAGCG TGCTGCAGTT
 10621 CATGGGGTCG CAAAGAGTCG GACATGACTG AGCAACTGAA CTGAAAACCTG AATATATAAT
 10681 ATATAAATAT TATGATATTT ATATATAATA TATATTATAA AATTTTATAA ATTATATAAA
 10741 AATATATAAA CCCAAGAATC CACATCACAT CATTACATAT AATATATAAT ATAATGTATA
 10801 ATATAATTTA TAATATTAGA TGATTATATA ATATACAATA TTAATATATC AGTATATAAT

10861 ATAATTGTAT ATAGTAACT GCATCTAATT AATGTATTTT ATGACTGCAC CTAATTGATA
10921 GAACTGTGGC AAATAAAGAT GGAAAATTTT CTAAGTATC TTTAACGGAT AAAACTAAGC
10981 AGAAAAAAAA CCCCAACATA TAAACCCAGG AATCCACATC ACATTATTTT TACTATTTTG
11041 CTAGAATTAG TTTGGATAAA ATGCACCCCTT AGCCTAATCC CTAGATAAAT AAAATAAAAA
11101 ACAGTTACAA ACATGTGGTA AGAATAAATA TATATATATA TATACATATA CATACTCATA
11161 TATATGGAAA GAAATATACA GTTTTTTTCT TTGTGTGTAG TATGCTTGTG TACTGTATGT
11221 CAAAGCTCTC TATGAAACTG GTCTAGCTGT GGTGCTTATA AAGTGAACA TTTACTGAGC
11281 ACTTTTTATA TATGCCAAGC TCTGGGCAA GTGGTTTATA TTATGAGCTA TCTCATCTAA
11341 TTTTTTTGAA ACTAATGTTA TTTTAAATAT TTGCTGAAAA TCAAGAAGTA GAAGGAAGAC
11401 GTACAAATCC ATATTTTATA AAATAATATG GTTTATGGGT TCACTATTCC AAATGTTGTA
11461 CTTTCTTAAC ATCAAATACT GTAACAATTT GTTCAAAAA ATTCTGATTT AAAGTATCTC
11521 TTCACTCTGC TGCTGCTGCT GCTGCTAAGT CGCTTCAGTC CTGTCTGACT CTGCGACCC
11581 CATTGACGGC AGCCCACTAG GCTCCCCAGT CCCTGGGATT CTCCAGGCAA GAAATAATAT
11641 CATTCTGCAT AATTTATTCT TTTTACAGCG CTGTGAGAAA GAGGAAAGAT TCTTCAATGA
11701 CAAAATAGCC AAATATATCC CAATTCAGTA TGTGCTGAGT AGGTATCCTA GTTATGGACT
11761 CAATTACTAC CAACAGAAAC CAGTTGCACT AATTAATAAT CAATTTCTGC CATACCATA
11821 TTATGCAAAG CCAGCTGCAG TTAGGTCACC TGCCCAAATT CTTCAATGGC AAGTTTTGCC
11881 AAATACTGTG CCTGCCAAGT CCTGCCAAGC CCAGCCAACCT ACCATGACAC GTCACCCACA
11941 CCCACATTTA TCATTTATGG CCATTCCACC AAAGAAAAAT CAGGATAAAA CAGAAATCCC
12001 TACCATCAAT ACCATTGTTA GTGTTGAGCC TACAAGTACA CCTATCACTG AAGCAATAGA
12061 GAACACTGTA GCTACTCTAG AAGCTTCTCT AGAAGTTATT GAGAGTGTAC CTGAGACCAA
12121 CACAGCCCAA GTTACTTCAA CCGTCGTCTA AAAACTCTAA GGAGACATCA AAGAAGACAA
12181 CACAGGTAAA TAAGCAAAAT GAATAATAGC CAAGATTCAT GGACTTATTA ATAAAATCAT
12241 AACATCTAAA CTAGCATAGA TGGATAAATT AAATCTGTTA CAGAGAAGGC AAAATGGGCT
12301 AATTATAACT TACATTTACT TGTCTTTTAT CGTGTATATA CTAGATTCTT TCCCAACAAG
12361 AAAGTTTTAA AATATTTTAC AAAATGAATA AAAATTGCAG ATTTTATTAT TAAACCTTTT
12421 TCAACAATTG GTATACTCCT TGAATCTATT AGTTTTATTT TACTCCTGTT CACACACAAA
12481 GACAGTAAAA TACAGTGTC AACTCATGATT TTTCTTATCT CAAAAATATG TTTGCTTAGA
12541 AAAAAATCAT ATAGGATATG AGTTTAAATA CATTTTAATT GTATAACCAGC GTTGTTTTAC
12601 TCTACTTTTG GTAAGAATAG AATGAAAGGA AACAATGTTT CACTCATAGC ATTTTATCTC
12661 AGGCATCACT TCTGAAAGGA TGTATAAGGT TAGGTGCCCA AATTTCTTCC TATTGTAAGG

12721 TAATCCCACA GAAAAATTCT AATTTTTTAA CTTGAGAAGC ACCTACTTAT TAAAAGGAAA
12781 CTTTCAGAAC TTTAAATATA ATGTAAAATA TGTCTATTTA TTATTTGGAT CAATGGATAA
12841 TGGCAGAGTC CAAAATAATT GAAAACATAT GAAGAAGTTA AACAGAAAGA TCAATAAGAT
12901 AGAAAATAAC TAAAGATCGT GAAATAATTT AGGAAGAAAG TGACAACATT TTGAAGGTCT
12961 AGGCAACAAA TACTTTCATC ACAGTGTCTA CATGATTTTT GGTCTAAAAT GAACTCAGCA
13021 TGATATAATG GTAATAGCAT TAGATCAGAG AAGGCTGGTT CTTCTGTTGT GTGACTTTAA
13081 GCAATTCATT ACTCTCTCTA AAGAGTCATC ACTCTCATTT TCCCAAAATT TTGGTTGCTA
13141 TGAGATTCAA ATGAGAAAAGC ATATTGTGAA TGAGATGTAA AAAACAATCT GTGAAATATA
13201 ATGCTCTAGA AAAGATGAAG TATAATTAGT AAATATTTAA ATTTACTTTC AACTAAAATA
13261 TCAAGTCCTT ACTAAATTAT CAAAACACTA TAACAATCTC AGTTTAATCC TGTAGCAGCC
13321 ATATGGAATG GATTATATTA CCATCTTGAA TCCACAAATG AAAGCTATGG ATGCAAATTG
13381 CTACCGCTGA AAGTTCAAAA CTGGAAACCA AATCAAACCT GCTTGATTTT AGATAGTAAG
13441 GCTTAATTAG TACGTCTGCT ATTTCCATAT GGGCTATTTG TTAAAAAAT AAAAAATAAA
13501 ACAGAAAACA TACTCTAATT TTCCAAGATC AGCATATGTG TAAATTTTAT TACTGAGATT
13561 GTGTTTAATA GGACATCTGG TAAGAAAGAG AAGATAATAA ACTGATAAAT CTTTGACTCA
13621 TTAAAATTTT AAAAAAGAAA TGAAAAAATT AATGGACACA AAATGAAAAC AAGTAATTGA
13681 GTATGCAACT ATCTATTTTA TTGATATGAA ATACATTATT ACATGATTTT TTAATAAAAT
13741 AATCATTATC TCAATAGTTA ACATTTGTTT AAAACTCAAG AACCTAGATT CCTAAGTTAA
13801 AACCACACAG TATAAGATCA CTTATAAAAA AGAATGTATA GGACTGTGTC TTTCTGTGAA
13861 TATTAGATGA AGACAATTGT ATCAGTTCAC TATGTGGTGA ATTTAAATAT TTAATTTTAT
13921 ATATTTACTT AGATAAACTC CTTGGATACA GACATGAAGC AAATCACGGA AGCTAAATAA
13981 AATACATATC ATGAGAACTG TTAGCACACT GTGAACTAAA TCTCTAAATT GTCATTTTTT
14041 ATAG**GTCTAG CTGAAACCA ATGACTACTT CAAACTTTCC TTTGGCCAGT TGTCTGCCTT**
14101 **CAGTGAACAG AGAATATGAT TTTCACAGAT TCGGCTCCTT TCTCGTCTCC TCTTACATTT**
14161 **TGCATTTATG CCACATTTAG TTTTTTGATT CCTGCATAAT AAAGCTAATC AAATGCAATG**
14221 GGTCTCTTTT CTTTTTTTAT TTATTTTAAAT TGGAGGTTCA TTAFTTTTACA ATATTGTATT
14281 GGTCTTGCCA CACATCAACA TGAATCTGCC ACGGGCATAAC ATGTGTTCCC CATCCTGAAC
14341 CCCCCTCCCT CCTCCCTCCC CATAACCATCC CTCTGGGTCA TCCCAGTGCA CCACCCCAAG
14401 CATCCTGTAT CCTGCATTGA ACCTGGACTG GCATTCGTTT CTTATATGAT ATTATACATG
14461 TTTAAATGCA ATTCTCCCAA ATCATCCAC CCTCTCTCTC TCCCACAGAG TCCAAAAGAC
14521 TGTTCTATAC ATCAGTGTCT CTTTTGCTGT CTCGCACACA GGGTTATCAT TACCATCTTT
14581 CTAATTTTCA TATATATGCA TTAGTACACT GTATTGGTGG TTTTCTTTT TGGCTTACTT

14641 CACTCTGTAT AATAGGCTCC AGTTTCATCC ACCTCATTAG AACTGATTCA AA



Exones



Intrones