

XI Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Santa Maria, RS – 07 e 08 de setembro de 2015

Polimorfismos no gene MyoD1 aumenta taxa de crescimento de ovinos Santa Inês

Luís Fernando Batista Pinto¹, Geraldo Magalhães Melo Filho², Ariana Nascimento Meira², Evandro Neves Muniz³, Hymerson Costa Azevedo³, Luiz Lehmann Coutinho⁴

¹Professor da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - UFBA, Salvador. e-mail: luisfbp@gmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UFBA, Salvador. e-mail: gmagalhaesf@gmail.com, arimeira@hotmail.com

³Pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju. e-mail evandro.muniz@embrapa.br, hymerson.azevedo@embrapa.br

⁴Professor da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ/USP, Piracicaba. e-mail: llcoutho@usp.br

Resumo: Este estudo teve por objetivo analisar possíveis associações entre polimorfismos no gene MyoD1 e características de interesse econômico em ovinos Santa Inês. Um total de 96 animais foram avaliados para os pesos ao nascimento, 30, 60, 90 e 112 dias de idade, além dos ganhos de peso do nascimento a desmama e da desmama aos 240 dias de idade. O sequenciamento de 2.428 pb do gene MyoD1 foi realizado em todos os animais e um SNP nesta sequência foi testado para associação com as características citadas. O SNP estudado teve efeito significativo ($P < 0,05$) sobre pesos aos 60, 90 e 112 dias de idade, além de ganho de peso do nascimento ao desmame. O efeito de substituição alélica para este marcador foi igual a 0,9698 kg, 1,4554 kg, 2,2306 kg e 23,6630 gramas, para os pesos aos 60, 90 e 112 (Desmama) dias de idade e ganho de peso do nascimento ao desmame, respectivamente. O percentual de variância residual explicado por este marcador foi 2,56%, 3,52%, 6,60% e 11,67%, para os pesos aos 60, 90 e 112 (Desmama) dias de idade e ganho de peso do nascimento ao desmame, respectivamente. A frequência do alelo G (15,4%), que aumenta os pesos e ganhos de peso, é muito inferior a do alelo T (84,6%) na amostra estudada. Assim, ampliar a frequência do alelo G na população pode trazer importantes ganhos em crescimento.

Palavras-chave: carcaça, carne, ovinocultura, SNP

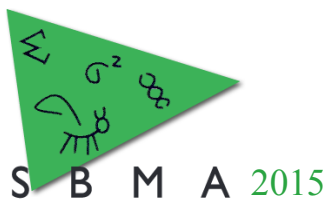
Polymorphisms in the MyoD1 gene increase growth in Santa Ines sheep

Abstract: This study aimed to identify associations between single nucleotide polymorphisms in the MyoD1 gene and growth traits in Santa Ines sheep. A total of 96 animals were evaluated for weights at birth, 30, 60, 90 and at 112 days of age, beyond the weight gains from birth to weaning and from weaning to 240 days of age. Sequencing of 2,428 bp MyoD1 gene was performed in all animals and a SNP in this sequence was tested for association with the traits. The SNP studied had significant effects ($P < 0.05$) on the weights 60, 90 and 112 days of age, and weight gain from birth to weaning. The allele substitution effect for this marker was equal to 0.9698 kg, 1.4554 kg, 2.2306 kg and 23.6630 grams to the weights at 60, 90 and 112 days old and weight gain from birth to weaning, respectively. The percentage of residual variance explained by this SNP was 2.56%, 3.52%, 6.60% and 11.67% for the weights 60, 90 and 112 days old and weight gain from birth to weaning, respectively. The frequency of G allele (15.4%), which increases the weights and weight gains, is much lower than the T allele (84.6%) in the our sample size. Thus increase the frequency of G allele in the population can improve the Santa Ines growth.

Keywords: carcass, meat, ovine, SNP

Introdução

A raça Santa Inês tem atributos que a qualificam como boa opção para ovinocultura em regiões tropicais semiáridas (Jucá et al., 2014), mas como toda raça necessita de trabalhos de seleção que aprimorem continuamente seu desempenho, especialmente suas taxas de crescimento. O crescimento de um cordeiro, logo após o nascimento, caracteriza-se principalmente pelo aumento de massa óssea e muscular. Fatores de regulação miogênica estão envolvidos na formação dos tecidos musculares (Silva e Carvalho, 2007), atuando principalmente durante a fase embrionária e são controlados por uma família de genes conhecida como MyoD (Myogenic Differentiation). Essa família é constituída por quatro genes, dentre eles o gene MyoD1 que está relacionado com o recrutamento e proliferação de células precursoras



XI Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Santa Maria, RS – 07 e 08 de setembro de 2015

da musculatura (mioblastos). Assim, trata-se de um gene que pode ser um bom candidato para associação com características de crescimento, como pesos e ganhos de peso, mas não há relatos de associação deste gene com características de crescimento em ovinos. Assim, o objetivo deste estudo foi realizar testes de associação entre polimorfismos do tipo SNP (*single Nucleotide polymorphisms*) no gene MyoD1 em ovinos Santa Inês com pesos e ganhos de peso em diferentes idades.

Material e Métodos

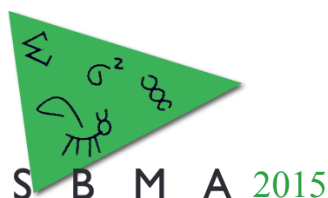
O presente estudo foi desenvolvido com 96 cordeiros Santa Inês nascidos e criados no Campo Experimental Pedro Arle da Embrapa Tabuleiros Costeiros, entre 2010 e 2012. Foi realizada a pesagem dos animais ao nascimento, aos 30, 60, 90, 112 (desmama) e 240 dias de idade. Além disso, foram calculados os ganhos de peso diário do nascimento a desmama e da desmama aos 240 dias de idade.

Coletou-se 5 ml de sangue dos animais em tubos vacutainer contendo EDTA. O sequenciamento ocorreu a partir de produtos de amplificadores dos genes estudados. O desenho do *primer* para a amplificação do gene MyoD1 foi realizado utilizando a sequência Gene ID: 443405 (*Ovis aries*) no NCBI (National Center for Biotechnology Information). Foram utilizados os primers forward (CAG ACC CTC AGT GCT TTG CT) e reverse (CCT GCC TGC CGT ATA AAC AT). Para a amplificação do fragmento do gene do MyoD1 foram utilizados 15 μ L da reação contendo 0,3 μ M de cada primer, taq Emerald_{amp} Max Hs (Takara Bio, USA) e 100ng do DNA molde. A amplificação foi realizada em um termociclador Veriti® (Applied Biosystems, USA) e consistiu numa etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 98°C, seguida por 45 ciclos de amplificação (desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 3 minutos), e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram corados com o GelRed (Biotium, USA) e posteriormente separados em gel de agarose a 1%. Foi observado se houve a amplificação da banda desejada, utilizando como controle positivo para o gene MyoD1, um pool de DNA de ovinos Santa Inês. Após a amplificação das amostras, foi feita a purificação dos amplicons, com esferas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. As amostras foram diluídas para 2 nM, o qual foi quantificado com fluorômetro Qubit® (Life Technologies, USA), sendo diluído para 0,2 ng/ μ L. O sequenciamento foi realizado na plataforma Miseq da Illumina. Para a preparação das amostras utilizou-se os kits Nextera® XT DNA *Sample Preparation* e Nextera® XT Index. Após o preparo da biblioteca as amostras foram submetidas ao sequenciamento usando o kit MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycle). Foram sequenciados 2.428 pb, dos quais 1.085 pb foram alinhados a partir de informações do gene referência depositadas no NCBI e um total de 19 SNPs foram identificados. O SNP utilizado no presente estudo está na posição 34370841 (G/T) em um éxon e modifica a sequência de aminoácido de Treonina para Asparagina.

Foi realizada análise de variância com o modelo: $y_{ijkl} = u + T_i + A_j + MyoD1_k + \beta D_{ijkl} + \alpha I_{ijkl} + P_l + e_{ijkl}$ onde: y_{ijkl} é o valor fenotípico para a característica em análise; u é a média geral da característica; T_i é o efeito fixo de tipo de parto (simples, duplo ou triplo), A_j é o efeito fixo de ano de nascimento (2010, 2011, 2012), $MyoD1_k$ é o efeito de substituição alélica para o marcador em análise; βD_{ijkl} é o efeito da covariável peso vivo da mãe à desmama, αI_{ijkl} é o efeito da covariável idade do animal no momento da avaliação da característica; P_l é o efeito aleatório de pai; e e_{ijkl} é o resíduo experimental. Foi utilizado 5% como nível de significância.

Resultados e Discussão

O SNP em estudo teve efeito significativo ($P < 0,05$) sobre pesos aos 60, 90 e 112 (Desmama) dias de idade, além de ganho de peso do nascimento ao desmame (Tabela 1). A frequência do alelo G (15,4%), que aumenta os pesos e ganhos de peso, é muito inferior a do alelo T (84,6%) na amostra estudada. Assim, ampliar a frequência do alelo G na população pode trazer importantes ganhos em crescimento. O efeito de substituição alélica para este marcador foi igual a 0,9698 kg, sendo as estimativas do peso médio de animais TT aos 60 dias igual a 9,7227 kg, enquanto os genótipos TG e GG apresentaram estimativas de 10,6925 e 11,6623 kg, respectivamente. Este marcador explicou 2,56% da variação total para esta característica. Já para o peso aos 90 dias, o efeito de substituição alélica foi de 1,4554 kg, sendo que as estimativas de peso médio nesta idade foram 14,0930 kg (TT), 15,5484 kg (TG) e 17,0038 kg (GG). Neste caso a variação explicada foi de 3,52%. No peso à desmama o efeito de



XI Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
Santa Maria, RS – 07 e 08 de setembro de 2015

substituição alélica foi de 2,2306 kg, sendo os pesos médios estimados de 18,5330 kg (TT), 20,7636 kg (TG) e 22,9942 kg (GG) e 6,60% da variação para o λ desmama foi explicada. Para ganho de peso do nascimento à desmama o efeito de substituição alélica foi de 23,6630 g, com médias estimadas de 135,3300 g (TT), 158,9930 g (TG) e 182,6560 g (GG). Um percentual expressivo (11,67%) da variação desta característica foi explicado por este marcador.

Tabela 1 - Teste de associação do SNP (G/T) na posição 34370841 do gene MyoD1 em ovinos da raça Santa Inês

Característica	Genótipo			P-ANOVA	R ²	CV	P-MyoD1
	TT	GT	GG				
Peso ao nascer (kg)	3,63	3,81	3,69	<.0001	0,61	13,11	0,4658
Peso aos 30 dias (kg)	6,13	6,52	7,88	0,0202	0,40	31,22	0,2541
Peso aos 60 dias (kg)	9,67	11,19	14,16	0,0034	0,47	28,84	0,0210
Peso aos 90 dias (kg)	14,30	16,70	20,93	<.0001	0,59	22,48	0,0027
Peso ao Desmame (kg)	19,04	22,43	28,33	<.0001	0,67	17,27	<.0001
Peso aos 240 dias (kg)	27,33	29,96	32,70	<.0001	0,69	16,28	0,0609
GPND (g/dia)	141,14	169,32	230,58	0,0011	0,53	22,12	<.0001
GPD240 (g/dia)	66,42	59,08	35,19	<.0001	0,80	29,53	0,1407

GPND - Ganho de Peso do Nascimento a Desmama; GPD240 - Ganho de Peso da Desmama aos 240 dias.

Conclusões

O SNP utilizado no presente estudo, mutação (G/T) localizada na posição 34370841, pode ser utilizado na seleção dos pesos aos 60, 90 e 112 (desmame) dias de idade e ganho de peso do nascimento a desmama, sendo o alelo G o que proporciona maiores valores para as variáveis citadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Embrapa Tabuleiros Costeiros por disponibilizar a infraestrutura e os animais experimentais; Ao Dr. Luiz Lehmann Coutinho por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP; ao CNPQ pelo apoio financeiro concedido nos projetos 562551/2010-7 e 474494/2010-1; e a FAPESB pelo apoio financeiro concedido via Projeto APP0116/2009.

Literatura citada

- Jucá, A. F.; Favari, J. C.; Melo-Filho, G. M.; Ribeiro-Filho, A. L.; Azevedo, H. C.; Muniz, E. N.; Pinto, L. F. B. 2014. Performance of the Santa Ines breed raised on pasture in semiarid tropical regions and factors that explain trait variation. *Tropical Animal Health and Production*, 46:1249-1256.
- Silva, M. D. P.; e Carvalho, R. F. 2007. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36:21-31.