

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

Polimorfismos do gene MyoG em ovinos Santa Inês

Luís Fernando Batista Pinto¹, Dayne Motta Sanders², Ariana Nascimento Meira³, Luiz Lehmann Coutinho⁴, Evandro Neves Muniz⁵, Hymerson Costa Azevedo⁵

¹Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, Salvador/Bahia, Brasil. E-mail: luisfbp@gmail.com

²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos – UFBA, Salvador/Bahia, Brasil. Bolsista FAPESB.

³Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UFBA, Salvador/Bahia, Brasil. Bolsista FAPESB.

⁴Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba/São Paulo, Brasil.

⁵Embrapa Tabuleiros Costeiros – Aracajú/Sergipe, Brasil.

Resumo: O objetivo desse trabalho foi identificar possíveis polimorfismos no gene da miogenina (MyoG) que possam posteriormente ser utilizados em testes de associação com características de interesse econômico em ovinos. Todas as 96 amostras amplificaram e mantiveram qualidade de alinhamento satisfatória para análise, o que indica a boa qualidade dos *primers* utilizados. A região do gene MyoG aqui estudada teve um total de 1937 pb alinhados em função do gene referência depositado no NCBI. Nesta sequência foram identificadas 34 mutações em relação ao gene referência, mas apenas 13 mutações apresentaram distribuição de frequência genotípica que as tornam potenciais marcadores para estudos de associação. Grande parte das 13 mutações estão em íntron, sendo apenas uma em éxon.

Palavras-chave: miogênese, marcador molecular, ovelhas, SNP

Abstract: this study aimed to identify polymorphisms in MyoG gene that can later be used in association analysis with economic traits in Santa Ines. All 96 samples amplified and maintained satisfactory quality of the alignment for analysis, which indicates the quality of the primers. The MyoG region of the gene studied here had a total of 1937 bp aligned against the reference gene deposited in NCBI. In this sequence were identified 34 mutations compared to the reference gene, but only 13 showed good genotypic frequency distribution which makes them potential markers for association studies. Most of these 13 mutations are in intron, only one SNP in exon.

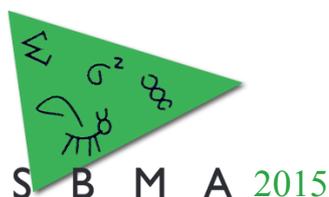
Keywords: myogenesis, molecular marker, sheep, SNP

Introdução

A raça Santa Inês necessita de trabalhos de seleção que aprimorem suas taxas de crescimento, como pode ser observado em Juca et al. (2014). Características como ganho de peso diário estão associadas ao desenvolvimento muscular. Então, polimorfismos de genes que regulam a formação muscular podem fornecer importantes informações para os programas de seleção. Neste contexto tem-se o gene MyoG, que atua na formação da Miogenina, e tem importante função no desenvolvimento muscular. Assim, este estudo teve por objetivo identificar polimorfismos no gene da miogenina (MyoG) em ovinos Santa Inês.

Material e Métodos

Foram analisados 96 ovinos da raça Santa Inês, nascidos nas safras de 2010 a 2012, na fazenda experimental da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Frei Paulo/Sergipe. Foram coletados 5 ml de sangue de cada animal, os quais foram estocados e refrigerados para posterior extração de leucócitos, seguindo protocolo descrito pela Embrapa (Oliveira *et al.*, 2007). Os leucócitos foram encaminhados à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, onde foi realizada a extração do DNA genômico, amplificação da região alvo, preparação da biblioteca e o sequenciamento. A extração do DNA foi realizada utilizando método de precipitação com soluções salina e proteinase K seguindo



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

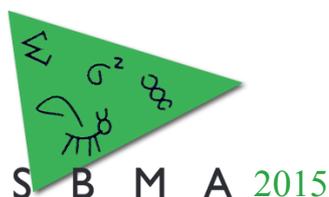
protocolo da Embrapa (Oliveira *et al.*, 2007). Para a amplificação do fragmento do gene do MyoG foram utilizados 15 µL da reação contendo 0,3 µM de cada primer, taq polimerase e 150ng do DNA molde. A amplificação foi realizada em um termociclador Veriti® (Applied Biosystems, USA) e consistiu numa etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 98°C, seguida por uma etapa de 20 ciclos de amplificação, sendo (desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento de 65°C a 55°C Δ -5°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 3 minutos), seguido por uma segunda etapa de 20 ciclos de amplificação, sendo (desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento de 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 3 minutos) e, por fim, extensão final a 72°C por 5 minutos. Foram utilizados os primers forward 5' ACT ACC TGC CTG TCC ACC TC 3' e reverse 3' TCC TCC ACT GTG ATG CTG TC 5'. Após a amplificação das amostras, foi realizada a purificação dos amplicons. As amostras foram diluídas a 0,2 ng/µl e encaminhado para o preparo da biblioteca e em seguida o sequenciamento. Para o preparo da biblioteca utilizou-se o kit Nextera® XT DNA *Sample Preparation* e Nextera® XT Index (Illumina, San Diego, USA). O sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, USA) usando o kit MiSeq Reagent v2 (500 cycle). Após sequenciamento realizou-se a filtragem dos dados, alinhamento das *reads* contra o genoma referência dos ovinos no NCBI (*Ovis aries*) e detecção dos polimorfismos. Por fim, realizou-se a anotação funcional dos SNPs usando o programa VEP (*Variant Effect Predictor*) do *Ensembl*, para identificar as localizações das mutações no genoma e prováveis efeitos funcionais em região codificadoras do gene. As frequências alélica e genotípica foram estimadas para cada locus por contagem simples dos alelos e dos genótipos, respectivamente.

Resultados e Discussão

Todas as 96 amostras amplificaram e mantiveram qualidade do alinhamento satisfatória para análise, o que indica a boa qualidade dos *primers* utilizados. A região do gene MyoG aqui estudada teve um total de 1937 pb alinhados em função do gene referência depositado no NCBI. Nesta sequência foram identificadas 34 mutações em relação ao gene referência, mas apenas as 13 mutações da Tabela 1 apresentaram todos os três genótipos possíveis. Grande parte destas mutações estão em íntron, sendo apenas um SNP em éxon. A mutação em éxon aqui encontrada é do tipo sinônima, ou seja, o aminoácido codificado não é alterado pela troca de base na sequência. Duas mutações são deleções de base e ambas ainda não foram depositadas no NCBI.

Tabela 1. Frequências genotípicas e alélicas dos SNPs do gene MyoG em ovinos Santa Inês

Posição do SNP	Variação existente	Base nitrogenada trocada (SNP)	N	Genótipos	Frequência genotípica	Alelos	Frequência Alélica	Região
196250	rs414881660	G/A	44	GG	0,458	G	0,693	Intron
			45	GA	0,469	A	0,307	
			7	AA	0,073			
196300	-	*	59	§	0,615	*	0,797	Intron
			35	¢	0,365		0,203	
			2	£	0,020			
196441	rs417690032	A/G	44	AA	0,458	A	0,682	Intron
			43	AG	0,448	G	0,318	
			09	GG	0,094			
196545	rs426956376	C/T	67	CC	0,698	C	0,823	Intron
			24	CT	0,250	T	0,177	
			5	TT	0,052			
196556	rs407552631	T/G	25	TT	0,260	T	0,448	Intron
			36	TG	0,375	G	0,552	
			35	GG	0,365			
196837	rs410212255	G/A	58	GG	0,604	G	0,792	Intron
			36	GA	0,375	A	0,208	
			02	AA	0,021			



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

Tabela 1. Frequências genóticas e alélicas dos SNPs do gene MyoG em ovinos Santa Inês

Posição do SNP	Variação existente	Base nitrogenada trocada (SNP)	N	Genótipos	Frequência genotípica	Frequência		Região
						Alelos	Alélica	
197117	<u>rs419534498</u>	G/A	58	GG	0,604	G	0,771	Intron
			32	GA	0,333	A	0,229	
			06	AA	0,063			
			23	AA	0,240	A	0,500	
197167	<u>rs400160301</u>	A/G	50	AG	0,521	G	0,500	Intron
			23	GG	0,240			
			47	CC	0,490	C	0,693	
197302	<u>rs422285781</u>	C/G	39	CG	0,406	G	0,307	Intron
			10	GG	0,104			
			01	TT	0,010	T	0,042	
197322	<u>rs405981477</u>	T/C	06	TC	0,063	C	0,958	Intron
			89	CC	0,927			
			39	GG	0,406	G	0,635	
197537	<u>rs412105535</u>	G/A	44	GA	0,458	A	0,365	Intron
			13	AA	0,135			
			84	CGGG CGGG	0,875	CGGG	0,880	
197558	-	CGGG/CGG	01	CGGG CGG	0,010	CGG	0,120	Intron
			11	CGG CGG	0,115			
			47	GG	0,490	G	0,678	
197617	<u>rs405517044</u>	G/A	36	GA	0,375	A	0,322	Exon
			13	AA	0,135			

* - CGTGTGTGTGTGTGTGT/CGTGTGTGTGTGTGT; § - Homozigoto para o alelo CGTGTGTGTGTGTGTGT; € Heterozigoto; £ - homozigoto para o alelo CGTGTGTGTGTGTGT;

Pode se observar na Tabela 1 que a menor frequência alélica foi igual a aproximadamente 4%, para o alelo T do marcador localizado na posição 197322. Assim, espera-se que uma vez detectada associação entre os marcadores aqui identificados e as características de interesse que foram avaliadas nestes animais, não seja tão difícil os trabalhos de seleção para ampliar a frequência do alelo favorável.

Conclusões

Existem pelo menos 34 mutações no gene MyoG na raça Santa Inês em relação ao gene referência depositado no NCBI, sendo 13 delas boas opções para utilização em estudos de associação.

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.; Faveri, 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 Inês breed raised on pasture in semiarid tropical regions and factors that explain trait variation. *Tropical Animal Health and Production*, 46:1249-1256.
- Oliveira, M. C. S.; Regitano, L. C. A.; Roese, A. D.; Anthonisen, D. G.; Patrocínio, E.; Parma, M. M.; Scagliuse, S. M. M.; Timóteo, W. H. B.; e Jardim, S. N. 2007. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. São Carlos: EMBRAPA Pecuária Sudeste.