

Genotipagem de SNP ligado ao fenótipo *Slick-Hair* em bovinos usando a técnica de tetra-primer ARMS-PCR¹

Jessica Capelli do Nascimento^{2,3}, Kevin Schefer dos Santos^{2,4}, Larissa Fernandes Canonici^{2,3}, Fernando Rodrigues de Oliveira⁵, Hyago Passe Pereira⁶, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁷, Marta Fonseca Martins^{8,9}, João Cláudio do Carmo Panetto⁸, Marco Antonio Machado^{8,9}, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva^{8,9,10}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Parte do projeto “Seleção Genômica em Raças Bovinas Leiteiras no Brasil”, liderado por Marcos Vinicius Gualberto B. Silva

²Bolsista PIBIC CNPq

³Graduando em Farmácia – Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora – Suprema

⁴Graduando em Biologia – Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES/JF

⁵Biólogo, Bolsista de Apoio Técnico – Fapemig

⁶Mestrando em Biologia – Universidade Federal de Juiz de Fora

⁷Analista da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG

⁸Pesquisador da Embrapa Gado de Leite

⁹Bolsista de Produtividade do CNPq

¹⁰Orientador – marcos.vb.silva@embrapa.br

Resumo: Em países tropicais e subtropicais as elevadas temperaturas causam estresse térmico nos bovinos interferindo em sua produtividade. O tipo de pelagem dos animais está relacionado à tolerância térmica e está também associada a fatores genéticos. Polimorfismos na sequência no gene do receptor da prolactina (PRLR) estão associados à presença de um tipo diferente de pelagem em bovinos, constituída por pelos curtos, lisos e brilhantes, denominada *slick hair*, que está relacionada com maior tolerância ao calor. Variações na sequência deste gene já foram descritas nas raças Senepol, Carora, Crioulo Limonero e Romosinuano. Na raça Carora, foi identificado um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), localizado no gene PRLR, na posição 39136666, no cromossomo 20, gerando um códon de parada, sendo que este mesmo SNP foi confirmado na raça Caracu. Um total de 10 animais Caracu, previamente sequenciados e com genótipos conhecidos para este SNP, foram usados para o desenvolvimento de uma metodologia de genotipagem utilizando a técnica de tetra-primer ARMS-PCR. Após inúmeras padronizações, a metodologia foi desenvolvida com sucesso, possibilitando a genotipagem dos alelos para o SNP da posição 39136666, por meio de uma técnica simples e econômica de genotipagem, envolvendo apenas um único PCR seguido de eletroforese em gel nativo de poliacrilamida corado com prata.

Palavras-chave: Caracu, genotipagem de SNP, estresse térmico, tetra-primer ARMS-PCR

Genotyping of SNP linked to *Slick-Hair* phenotype using tetra-primer ARMS-PCR technique

Abstract: In tropical and subtropical countries the high temperatures cause thermal stress in the cattle affecting their productivity. The type of coat of the animal is related to its thermal tolerance and also associated with genetic factors. Polymorphisms in the prolactin receptor gene sequence (PRLR) are associated with the presence of a different type of coat in cattle, consisting of short, smooth and shiny hair, called *slick hair*, which is related to a higher tolerance to heat.

Variations in the sequence of this gene have already been described in the breeds Senepol, Carora, Crioulo Limonero and Romosinuano. In the Carora breed, a single nucleotide polymorphism (SNP), located at position 39136666 in the sequence of the RLR gene, was identified on chromosome 20 and generates a stop codon. This same SNP was confirmed in the Caracu breed as well. A total of 10 Caracu animals, previously sequenced and showing known genotypes for this SNP, were used for the development of a genotyping methodology using the tetra-primer ARMS-PCR technique. After various standardization procedures, the methodology was successfully developed, allowing the genotyping of the SNP located at position 39136666 by means of a simple and inexpensive technique of genotyping, involving only a single PCR followed by electrophoresis in native polyacrylamide gel stained with silver.

Keywords: Caracu, SNP genotyping, heat stress, tetra-primer ARMS-PCR

Introdução

Nos ambientes tropicais e subtropicais as altas temperaturas ocasionam estresse térmico em bovinos, sendo a capacidade de manter a homeostase na temperatura corporal de extrema importância (Olson et al., 2003). As características do pelame influenciam diretamente a capacidade de termorregulação dos bovinos de clima tropical (Gilbert & Bailey, 2001; Olson et al., 2003).

Existe variação genética para tolerância ao calor (Dikmen et al., 2012) e foram identificados polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) associados a essa variação genética (Hayes et al., 2009; Dikmen et al., 2013). Uma variação no gene do receptor de prolactina está relacionada à presença de um tipo diferente de pelagem em bovinos da raça Senepol, constituída por pelos curtos, lisos e brilhantes, denominada “*slick hair*”, e que está relacionada com a maior tolerância ao calor (Olson et al., 2003). A característica também é encontrada nas raças Carora, Crioulo Limonero e Romosinuano, mas provocada por outros SNPs no mesmo gene (Hammond et al., 1996; Olson et al., 2003; Brenneman et al., 2007; Neto et al., 2018).

O gado Carora é encontrado em ambiente tropical com uma grande variedade de temperaturas. Esta raça apresenta um conjunto de características que a diferencia de outras raças criadas nas mesmas condições e define o seu elevado nível de adaptação às condições tropicais (Tullo et al., 2011). Na raça Carora, a característica *slick hair* é causada pela substituição da base C pela T na posição 39136666 do cromossomo bovino 20 no gene do receptor da prolactina (PRLR), gerando um códon de parada (Neto et al., 2018). Esta mesma substituição foi encontrada na raça Caracu, que é a maior raça em peso animal, dentre as raças crioulas do Brasil, sendo rústica e de dupla aptidão.

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são considerados um dos mais importantes marcadores moleculares existentes na atualidade (Chiapparino et al., 2004). Nos países em desenvolvimento, é muito difícil e caro genotipar um grande número de animais por métodos que envolvem manipulações por PCR e pós-PCR (Ahlawat et al., 2014). Um método simples e econômico de genotipagem de SNPs que envolve apenas um único PCR seguido de eletroforese em gel é chamado de tetra-primer ARMS-PCR (Chiapparino et al., 2004). Essa técnica usa dois conjuntos de primers, os externos e internos (Li et al., 2014). Os *primers* externos amplificam um grande fragmento do gene alvo, independentemente de seu genótipo e cada primer interno se combina com um dos primers externos para gerar fragmentos menores e específicos, de acordo com o alelo presente, que podem ser facilmente observados em gel de eletroforese, diferenciando homozigotos e heterozigotos (Li et al., 2014).

O objetivo do estudo foi desenvolver uma metodologia de genotipagem simples e de baixo custo, para o SNP localizado na posição 39136666, do cromossomo bovino 20, no gene do receptor da prolactina (PRLR) e que causa a característica *slick hair* nas raças Carora e Caracu, utilizando a técnica tetra-primer ARMS-PCR.

Material e Métodos

Foram utilizados neste trabalho 10 amostras de DNA genômico de sangue de touros e vacas da raça Caracu, que foram previamente extraídos pelo método de fenol/clorofórmio e sequenciados pela plataforma Illumina Hiseq 2500 v4. Os genótipos para o *Slick hair* foram extraídos a partir das sequências geradas para cada amostra e foram utilizados como controle para validar os resultados da técnica tetra-primer ARMS-PCR.

Para os testes de PCR, foram desenhados quatro primers no programa *Primer 1* (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>), sendo dois primers internos alelo específicos (*inner primers*) e dois primers externos (*outer primers*) (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para a genotipagem do SNP localizado na posição 39136666, no cromossomo bovino 20, no gene do receptor da prolactina (PRLR) em bovinos.

Nome	Sequência 5'-3'
Forward inner primer (C allele)	AAGCCTGACCAAGACACGGTGTGGCAAC
Reverse inner primer (T allele)	AGATCAAGGGGGTTTTGTCTTGGGGGCA
Forward outer primer	ACCACAGCCACTTCGCTGGACCAAACAG
Reverse outer primer	CCAGGATGTTGCTATCTGTCAACCCGGGA

Para estabelecer a melhor condição de PCR foram feitos inúmeros testes, utilizando diferentes concentrações de *primers*, de MgCl₂, diferentes temperaturas de ligação dos *primers* e uso ou não da ciclagem *touch down*. Os produtos resultantes da amplificação do DNA foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corados com nitrato de prata. A (corrida realizada a 500 volts por 2h). Os tamanhos dos fragmentos observados no gel variaram de acordo com os alelos

presentes. A banda de 322 pares de base (pb) sempre foi visualizada. A banda de 206 pb foi visualizada quando o alelo C estava presente e a banda de 172 pb, quando o alelo T estava presente.

Resultados e Discussão

As reações de PCR foram padronizadas num volume total de 25 μ L, contendo 50 ng de DNA, 15 pmol de cada *primer* interno e 2,5 pmol de cada *primer* externo, 200 μ M de dNTP, 2 mM de $MgCl_2$, 1X de tampão de PCR (Promega, Madison, EUA) e 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, EUA). As amostras foram submetidas a 94 °C por 2 min, seguido de 5 ciclos de 30s de desnaturação (94 °C), 30 s de ligação (começando o ciclo 1 com 70 °C e diminuindo 1 °C a cada ciclo) e 30 s de extensão (72 °C), mais 25 ciclos de 30 s de desnaturação (94 °C), 30 s de ligação (65 °C) e 30 s de extensão (72 °C), e um passo final de 5 min a 72 °C para extensão final. A Figura 1 mostra o perfil das bandas no gel, diferenciando claramente os genótipos CC, TT e CT.

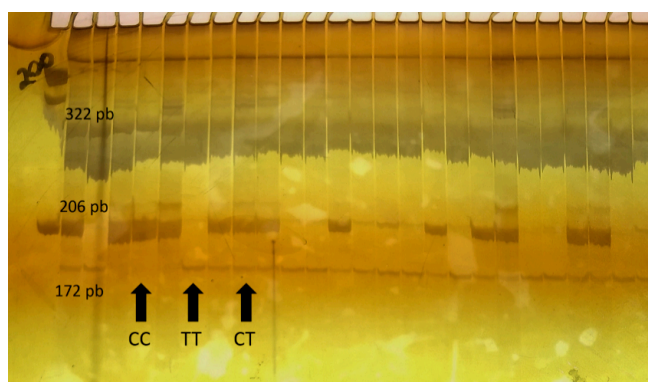


Figura 1. Gel de poliacrilamida 8% mostrando o padrão de bandas obtido pela técnica *tetra-primer ARMS-PCR* para o gene do receptor de prolactina em bovinos.

A técnica de tetra-primer ARMS PCR foi eficiente para a perfeita diferenciação entre os alelos do SNP localizado na posição 39136666, do cromossomo bovino 20, no gene prolactina (PRLR). O tamanho das bandas amplificadas foi diferente o suficiente para serem distinguidas por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. A melhor condição de PCR foi obtida com diferença de concentração de 6:1 entre os *primers* internos e externos e o uso da ferramenta *touch down* mostrou melhores resultados. Os 10 touros previamente sequenciados tiveram os genótipos confirmados pela técnica desenvolvida.

Rincón & Medrano (2003) e Chiapparino et al. (2004) desenvolveram protocolos de genotipagem por *tetra-primer ARMS-PCR* de proteínas do leite bovino e SNPs em cevada, respectivamente. Eles confirmaram a eficiência do método, mostrando ser uma técnica robusta, rápida, de fácil reprodução e de baixo custo. Como o estudo foi pioneiro na genotipagem do SNP que causa a característica *slick hair* nas raças Carora e Caracu, não há na literatura outros estudos sobre genotipagem do mesmo.

Conclusões

Os genótipos dos 10 animais da raça Caracu foram confirmados por meio da técnica *tetra-primer ARMS-PCR*, portanto o protocolo de genotipagem desenvolvido foi muito eficiente, mostrando ser uma alternativa rápida e barata para a identificação dos alelos do SNP localizado na posição 39136666, do cromossomo bovino 20, no gene prolactina (PRLR), que está envolvido na expressão do fenótipo *slick hair* encontrado nas raças Carora e Caracu.

Referências

- AHLAWAT, S.; SHARMA, R.; MAITRA, A.; ROY, M.; TANTI, M. S. Designing, optimization and validation of tetra-primer ARMS PCR protocol for genotyping mutations in caprine Fec genes. **Meta Gene**, v.2, p.439-49, 2014.
- BRENNEMAN, R. A.; CHASE, C. C. JR.; OLSON, T. A.; RILEY, D. G.; COLEMAN, S. W. Genetic diversity among Angus, American Brahman, Senepol and Romosinuano cattle breeds. **Animal Genetics**, v.38, p.50-53, 2007.

CHIAPPARINO, E.; LEE, D.; DONINI, P. Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. **Genome**, v.4, p.414-20, 2004.

DIKMEN, S.; COLE, J. B.; NULL, D. J.; HANSEN, P. J. Genome-wide association mapping for identification of quantitative trait loci for rectal temperature during heat stress in Holstein cattle. **Plos One**, v.7, p.69202, 2013.

DIKMEN, S.; COLE, J. B.; NULL, D. J.; HANSEN, P. J. Heritability of rectal temperature and genetic correlations with production and reproduction traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.95, p. 3401-5, 2012.

HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; CHASE, C. C. JR.; BOWERS, E. J.; RANDEL, R. D.; MURPHY, C. N.; VOGT, D. W.; TEWOLDE, A. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. **Journal of Animal Science**, v.74, p.295-303, 1996.

HAYES, B. J.; BOWMAN, P. J.; CHAMBERLAIN, A. J.; SAVIN, K.; VAN TASSELL, C. P.; SONSTEGARD, T. S.; GODDARD, M.E. A validated genome wide association study to breed cattle adapted to an environment altered by climate change. **Plos one**, v. 4, p.e6676, 2009.

LI, M.; SUN, X.; JIANG, J.; SUN, Y.; LAN, X.; LEI, C.; ZHANG, C.; CHEN, H. Tetra-primer ARMS-PCR is an efficient SNPgenotyping method: An example from SIRT2. **Analytical Methods**, v.6, p. 1835-1840, 2014.

NETO, L. R. P.; BICKHART, D. M.; HERNANDEZ, A. J. L.; UTSUNOMIYA, Y. T.; PAGAN, M.; JIMENEZ, E.; HANSEN, P. J.; DIKMEN, S.; SCHROEDER, S. G.; KIM, E. S.; SUN, J.; CRESPO, E.; AMATI, N.; COLE, J. B.; NULL, D. J.; GARCIA, J. F.; REVERTER, A.; BARENDSE, W.; SONSTEGARD, T. S. Convergent Evolution of Slick Coat in Cattle through Truncation Mutations in the Prolactin Receptor. **Frontiers in Genetics**, v.9, p.1-8, 2018.

OLSON, T. A.; LUCENA, C.; CHASE, C. C. JR.; HAMMOND, A .C. Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerant in *Bos taurus* cattle. **Journal Animal Science**, v.81, p.80-90, 2003.

Rincón, G.; Medrano, J. F. Single nucleotide polymorphism genotyping of bovine milk protein genes using the tetra-primer ARMS-PCR. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.120, p.331–337, 2003.

Tullo, E.; Biffani, S.; Alvarez, J. C.; Rizzi, R. Genetic variability and population structure in the Carora dairy breed. **Italian Journal Animal Science**, v.10, p.12-29, 2011.