

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Frequência alélica e genotípica do SNP ligado ao fenótipo *slick hair* no gene do receptor da prolactina (PRLR) em bovinos da raça Caracu¹

Jessica Capelli do Nascimento^{2,3}, Otto Samuel Gonçalves Seiberlick^{2,4}, Bianca de Oliveira Carvalho^{2,4}, Hyago Passe Pereira⁵, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁶, Marta Fonseca Martins^{7,8}, João Cláudio do Carmo Panetto⁷, Marco Antonio Machado^{7,8}, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva^{7,9}

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

⁵Doutorando em Biologia - Universidade Federal de Juiz de Fora

⁶Analista da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG

⁷Pesquisador da Embrapa Gado de Leite.

⁸Bolsista de Produtividade do CNPq

⁹Orientador – marcos.vb.silva@embrapa.br

Resumo: Em ambientes tropicais e subtropicais, a expressão de características produtivas em bovinos é dificultada pelos efeitos ambientais como o estresse térmico, agravado pelo aquecimento global. Regiões genômicas associadas à tolerância ao calor foram recentemente descritas e polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) relacionados a essa variação foram identificados. Uma mutação no gene do receptor de prolactina, no SNP 39136666 foi relacionada à presença de um tipo diferente de pelagem denominada “*slick hair*” em animais da raça Carora e Caracu, que está associado com a maior tolerância ao calor. Foram genotipados neste trabalho, 61 animais da raça Cararu Caldeano, utilizando a técnica *tetra-primers ARMS-PCR*. A frequência alélica e genotípica foi calculada respectivamente: T (80%) e C (20%); TT (64%), CT (33%) e CC (3%). Observou-se uma prevalência do alelo T, que está relacionado ao fenótipo *slick hair*. Esse marcador tem potencial para ser usado em programas de melhoramento genético e seleção.

Palavras-chave: Genotipagem, Caracu Caldeano, tetra-primer ARMS-PCR

Allelic and genotypic frequency of the SNP linked to slick hair phenotype in the prolactin receptor gene (PRLR) in Caracu cattle

Abstract: In tropical and subtropical environments, the expression of productive traits in cattle is hampered by environmental effects such as thermal stress which is aggravated by global warming. Genomic regions associated with heat tolerance were recently described and single nucleotide polymorphisms (SNPs) related to this variation were identified. A mutation in the prolactin receptor gene at SNP 39136666 was related to the presence of a different type of coat called slick hair in Carora and Caracu animals, which is associated with higher heat tolerance. Sixty-one animals of the Cararu Caldeano breed were genotyped using the ARMS-PCR tetra-primers technique. The allele and genotype frequency were calculated, respectively: T (80%) and C (20%); TT (64%), CT (33%) and CC (3%). A prevalence of the T allele was observed, which is related to the slick hair phenotype. This marker has potential to be used in breeding and selection programs.

Keywords: Genotyping, Caracu Caldeano, tetra-primer ARMS-PCR

Introdução

Em ambientes tropicais e subtropicais, a expressão de características produtivas é restrita pelos efeitos ambientais, como o estresse térmico resultante de altas temperaturas (Burrow, 2001). Um recurso vantajoso para os animais nestas regiões é a capacidade de manter a homeostase na temperatura corporal (Olson et al., 2003).

Regiões genômicas associadas à tolerância ao calor foram descritas (Dikmen et al., 2012) e identificados polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) relacionados a essa variação genética (Hayes et

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

al., 2009; Dikmen et al., 2013). Uma mutação no gene do receptor de prolactina está relacionada à presença de um tipo diferente de pelagem em bovinos da raça Senepol, caracterizada por pelos curtos, lisos e brilhantes, denominada “*slick hair*”, e que está associado com a maior tolerância ao calor (Olson et al., 2003). Esse fenótipo também é encontrado nas raças Carora, Crioulo Limonero e Romosinuano, mas relacionados a outros SNPs no mesmo gene (Hammond et al., 1996; Olson et al., 2003; Brenneman et al., 2007; Neto et al., 2018).

Bovinos da raça Carora apresentam um conjunto de características que os 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). Na raça brasileira localmente adaptada denominada Caracu Caldeano, selecionada desde 1893 para produção de leite, esta mesma substituição foi encontrada. Esta é a maior raça em peso animal, dentre as raças crioulas do Brasil, sendo rústica e de dupla aptidão. Para fins de seleção e melhoramento animal para o fenótipo *slick hair*, é de fundamental importância a avaliação da frequência dessa mutação na raça Caracu Caldeano.

Uma técnica simples e econômica de genotipagem de SNPs que utiliza apenas uma única reação de PCR é chamado de *tetra-primer ARMS-PCR* (Chiapparino et al., 2004). Dois conjuntos de *primers*, os externos e internos são usados na reação (Li et al., 2014). Cada primer interno se combina com um dos primers externos para gerar fragmentos específicos, de acordo com o alelo presente, que podem ser facilmente observados em por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, diferenciando indivíduos homocigotos e heterocigotos (Li et al., 2014). Os primers externos amplificam o fragmento maior do gene alvo, independentemente de seu genótipo, funcionando como um controle interno da PCR. Nascimento et al. (2018) desenvolveram uma metodologia para a genotipagem do SNP 39136666 na raça Caracu, utilizando *tetra-primer ARMS-PCR*, que se mostrou eficiente, rápida e barata.

O objetivo deste trabalho foi determinar a frequência alélica e genotípica do SNP 39136666 no cromossomo bovino 20, responsável pelo fenótipo *slick hair* na raça Caracu Caldeano.

Material e Métodos

Foram utilizados 61 animais das raças Caracu Caldeano, sendo 11 touros e 50 vacas que integram o Banco de DNA de bovinos de Leite da Embrapa Gado de Leite. O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue, utilizando um protocolo adaptado da técnica de Sambrook e Russel (2001).

A genotipagem foi realizada por meio da técnica *tetra-primers ARMS-PCR* (Chiapparino et al., 2004). Em 25 µL de PCR, foram utilizados 50ng de DNA, 15 pmol de cada *primer* interno e 2,5 pmol de cada *primer* externo, 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 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 30 s 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. Os primers utilizados foram: *forward inner primer* (alelo C) 5'-AAGCCTGACCAAGACACGGTGTGGCAAC-3', *reverse inner primer* (alelo T) 5'-AGATCAAGGGGGTTTTGTCTTGGGGGCA-3', *forward outer primer* 5'-ACCACAGCCACTTCGCTGGACCAACAG-3' e *reverse outer primer* 5'-CAGGATGTTGCTATCTGTACCCGGGA-3', utilizando o web tool descrito por Collins & Ke (2012).

Os produtos resultantes da amplificação do DNA foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida nativo 8%, corados com nitrato de prata. A corrida foi realizada a 500 volts por duas horas. Os tamanhos dos fragmentos observados no gel variaram de acordo com os alelos presentes. A banda de 322 pares de base (pb) foi sempre visualizada, sendo utilizada como controle interno da PCR. 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, como na Figura 1.

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

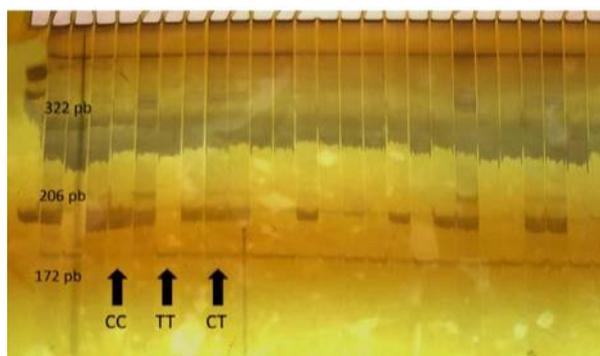


Figura 1. Foto do gel de poliacrilamida 8% mostrando o padrão de bandas obtido pela técnica *tetra-primer ARMS-PCR* para o gene do receptor de prolactina em bovino

Resultados e Discussão

Foram genotipados um total de 61 animais da raça Caracu Caldeano e calculada a frequência alélica e genotípica conforme demonstrado nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Resultado da frequência alélica (C/T) do SNP 39136666 presente no gene do receptor da prolactina (PRLR) em animais bovinos da raça Caracu Caldeano.

Alelo	Frequência
T	80%
C	20%

Tabela 2. Resultado da frequência genotípica (C/T) do SNP 39136666 presente no gene do receptor da prolactina (PRLR) em animais bovinos da raça Caracu Caldeano.

Genótipo	Frequência
TT	64%
CT	33%
CC	3%

Conclusões

Observamos na raça Caracu Caldeano a predominância do alelo T, que está relacionado ao fenótipo *slick hair*. Esses dados, sugerem que os animais portadores desse alelo podem apresentar maior tolerância ao calor e com isso uma maior adaptação ao clima tropical, favorecendo para uma melhor qualidade de vida e conseqüentemente maior produção. Esse marcador SNP poderá ser usado em programas de melhoramento genético da raça. Outras raças que compartilham dos mesmos ancestrais do Caracu devem ser avaliados quanto à ocorrência desta mesma mutação.

Agradecimentos

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Referências

ANDREW COLLINS, XIAYI KE. Primer1: Primer Design Web Service for Tetra-Primer ARMS-PCR. **The Open Bioinformatics Journal**, v. 6, p. 55-58, 2012.

BRENNEMAN RA, CHASE CC JR, OLSON TA, RILEY DG, COLEMAN SW. Genetic diversity among

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Angus, American Brahman, Senepol and Romosinuano cattle breeds. **Animal Genetics**, v.38, p.50-53, 2007.

BURROW HM. Variances and covariances between productive and adaptive traits and temperament in a composite breed of tropical beef cattle. **Livestock Production Science**, v. 70, p.213-233,2001.

DIKMEN S, COLE JB, NULL DJ, HANSEN PJ. 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 JB, NULL DJ, HANSEN PJ. 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.

EI FARO L. **Estudo da curva de lactação de um rebanho da raça Caracu**. Jaboticabal: UNESP/Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 190 f, 1996. (Tese de Mestrado).

HAMMOND AC, OLSON TA, CHASE CC JR, BOWERS EJ, RANDEL RD, MURPHY CN, VOGT DW, 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 BJ, BOWMAN PJ, CHAMBERLAIN AJ, SAVIN K, VAN TASSELL CP, SONSTEGARD TS, GODDARD ME. A validated genome wide association study to breed cattle adapted to an environment altered by climate change. **Plos One**, v.4, p.e6676, 2009.

LIMA MLP, NETO LM, FIGUEIREDO LA, RAZOOK AG. Os bovinos da raça Caracu. **Zootecnia**, v. 30, p.1-12, 1992.

NASCIMENTO JC, SANTOS KS, CANONICI LF, OLIVEIRA FR, PEREIRA HP, FAZA DRLR, MARTINS MF, PANETTO, JCC, MACHADO MA, SILVA MVGB. Genotipagem de SNP ligado ao fenótipo Slick-Hair em bovinos, usando a técnica de tetra-primer ARMS-PCR. In: XXII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite. XXII. Anais. Juiz de Fora/MG. Embrapa Gado de Leite, 2018. 4 p PA/AG: 02.13.05.010.00.03.

NICOLAU CVJ, SILVA RG, MOTA LSL, VERÍSSIMO CJ. Características da pele e do pelame em bovinos da raça Caracu. **Revista Arquivos de Zootecnia**, v.53, p.25-34, 2004.

NETO LRP, BICKHART DM, HERNANDEZ AJL, UTSUNOMIYA YT, PAGAN M, JIMENEZ E, HANSEN PJ, DIKMEN S, SCHROEDER SG, KIM ES, SUN J, CRESPO E, AMATI N, COLE JB, NULL DJ, GARCIA JF, REVERTER A, BARENDSE W, SONSTEGARD TS. Convergent Evolution of Slick Coat in Cattle through Truncation Mutations in the Prolactin Receptor. **Frontiers in Genetics**, v.9, p.1-8, 2018.

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