



47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

Salvador, BA – UFBA, 27 a 30 de julho de 2010

Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia
Brasileira de Vanguarda



Prospecção de Polimorfismos de Base Única (SNPs) no gene κ -caseína (KCN) na raça Girolando¹.

Patrícia Ianella², Tatiana Amabile de Campos³, Samuel Rezende de Paiva^{4,5}, Marta Fonseca Martins Guimarães⁶, Marcos Vinícius Gualberto Barbosa da Silva^{5,6}, Alexandre Rodrigues Caetano⁴.

¹Parte de Projeto de Pós Doutorado - PDI

²Pós-Doutoranda Capes PNPD. e-mail: ianellabio@yahoo.com.br

³Bolsista DTI – CNPq - MAPA e-mail: tacmps@yahoo.com.br

⁴EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia. e-mail: samuel@cenragen.embrapa.br, acaetano@cenragen.embrapa.br,

⁵Bolsista Produtividade CNPq

⁶EMBRAPA - Gado de Leite: e-mail: mmartins@cnpqgl.embrapa.br, marcos@cnpqgl.embrapa.br

Resumo: Variantes do gene κ -caseína (KCN) tem sido associadas ao desempenho de lactação, composição do leite e eficiência de produção de queijos e derivados. O presente trabalho teve por objetivo identificar SNPs, inferir haplótipos e relacionar os mesmos com as variantes já identificadas deste gene. Para tanto, um fragmento do gene KCN foi ressequenciado em 96 touros da raça Girolando. Sete SNPs foram identificados num fragmento de 453pb do éxon 4 deste gene, sendo um deles ainda não reportado. Estes polimorfismos resultaram em 10 diferentes haplótipos dos quais dois deles não correspondem a nenhuma variante conhecida. A variante mais freqüente foi a variante A (57,5%), e a variante B, altamente relacionada à maior porcentagem de proteínas no leite, foi encontrada em uma freqüência muito baixa (1,1%).

Palavras-chave: *Bos taurus*, inferência de haplótipos, sequenciamento DNA, melhoramento genético

Single Nucleotides Polymorphisms (SNPs) prospection in κ -casein gene in Brazilian sires Girolando breed.

Abstract: κ -casein (KCN) gene variants have been related to lactation performance, milk composition and cheese yield efficient. This work had the aim to identify SNPs, to infer haplotypes and to correlate these haplotypes with KCN variants. A fragment of the KCN gene was resequenced in a total of 96 Girolando bulls. Seven SNPs was identified in a 453bp fragment from exon 4, and one of these was never before reported. These polymorphisms are arranged in 10 haplotypes and two of these do not correspond to any known variant. The most frequent variant observed was A (57.5%) and the B variant, which is related to higher milk protein percentage, was found in a extremely low frequency (1.1%).

Keywords: *Bos Taurus*, DNA sequencing, genetic improvement, haplotype inference

Introdução

O leite bovino possui quatro caseínas, que são proteínas codificadas por membros de uma família multigênica localizada no cromossomo bovino 6 (Rijinkels, 2002). As caseínas e suas variantes tem sido extensamente estudadas e associadas ao desempenho de lactação, composição do leite e eficiência de produção de queijos e derivados. A κ -caseína (KCN) constitui 12% das caseínas e seus variantes tem sido muito estudadas devido à sua influência nas propriedades de produção de leite. Quatorze variantes do KCN foram descritas e relacionadas com SNPs em diferentes posições do gene (Carolli *et al.* 2009). As variantes A e B são as mais comuns em todas as raças tanto em *Bos taurus* quanto em *Bos indicus*, sendo que a variante B está altamente relacionada ao aumento de produção e qualidade de queijo. O objetivo deste trabalho foi prospectar SNPs no gene κ -caseína por meio do ressequenciamento do éxon 4 em animais da raça Girolando, determinar os haplótipos e relacionar os mesmos as diferentes variantes deste gene.

Material e Métodos

Para o presente estudo foram utilizadas 96 amostras de DNA de touros da raça Girolando utilizados em teste de progênie. Parte da região codificante dos genes da κ -caseína foi amplificado a partir dos iniciadores 5'-TGTGCTGAGTAGGTATCCTAGTTATGG-3' e 5'-GCGTTGTCTTCTTTGATGTCTCCTTAG-3'. O produto de PCR de 453pb gerado foi purificado com



EXOSAP-IT (Amersham), e submetido à reação de sequenciamento utilizando o kit BigDye terminator v.3.1 (Applied Biosystems). Os produtos da reação foram então purificados e submetidos à eletroforese capilar em sequenciador ABI3100 (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram analisadas utilizando os programas Phred/Phrap/Consed e, a identificação das SNPs foi realizada com o programa Polyphred. Para as análises das freqüências alélicas foi utilizado o programa MsTools®, a determinação dos haplótipos foi realizada utilizando-se os softwares Arlequin ver 3.1 e Haploview 4.2, que também foi utilizado para análise de Desequilíbrio de Ligação.

Resultados e Discussão

A prospecção de polimorfismos de base única no fragmento de 453pb do éxon 4 do gene KCN resultou na identificação de sete SNPs, sendo um ainda não reportado na literatura (Tabela 1). O maior valor de MAF (Minor Allele Frequency) observado (0,14) foi para o SNP de posição 13065 e o menor MAF obtida foi de 0,05 para a posição 13165 da seqüência referência AY380228.1. O SNP 7 (A>T) com MAF de 0,09 ainda não foi reportado na literatura.

Tabela 1 Freqüências alélicas dos polimorfismos de base única no éxon 4 do gene κ -CN em 96 reprodutores da raça Girolando.

SNP	1	2	3	4	5	6	7*
Varição	C>T	C>T	A>C	A>G	A>G	A>G	A>T
MAF	0,14	0,07	0,08	0,13	0,05	0,07	0,09

* SNP reportada pela primeira vez. MAF – Minor Allele Frequency

Para a inferência dos haplótipos foram utilizados somente os marcadores SNPs já reportados na literatura e que estão relacionadas às diferentes variantes do gene κ -caseína (Carolli *et al.* 2009). A análise dos haplótipos identificou dez diferentes haplótipos e estes foram relacionados as diferentes variantes do gene KCN (Tabela 2). Dois dos haplótipos identificados não estão relacionados a nenhuma variante descrita na literatura, podendo ser novas variantes: o haplótipo 5 mais similar ao haplótipo 1 (correspondente a variante A), e o haplótipo 6 mais similar ao haplótipo 9 (correspondente a variante J). A variante A foi a mais freqüente como descrito na literatura, já as variantes G^1 e D e J, consideradas raras e previamente relatadas em poucas raças de *B. taurus*, foram encontradas em freqüências mais altas que o esperado. A variante B, considerada uma das mais comuns (Prinzenberg *et al.*, 2009) e que possui efeito favorável na concentração de caseínas (Heck *et al.*, 2009) proporcionando maior eficiência na produção de derivados de leite, foi encontrada em uma freqüência muito baixa. O mesmo foi observado por Kemenes e colaboradores (1999), que encontraram a freqüência de 0,07 da variante B em animais da raça Gir de rebanhos brasileiros.

Tabela 2 Haplótipos e Freqüências dos haplótipos do éxon 4 do gene κ -CN em 96 reprodutores da raça Girolando.

Haplótipos	Haplótipos	Freqüências (%)	Variantes
1	CCAAAA	57,5	A
2	TCAAAA	13,2	G^1
3	CCAGAA	8,6	A'
4	CCAAAG	5,7	D
5*	CCAAGA	5,2	-
6*	CTCGAA	4	-
7	TCCAA-	2,3	E
8	CTCAAA	1,7	J
9	CTCAAG	1,1	B
10	CTCAA-	0,6	B/J

* Haplótipos não relacionados a nenhuma das variantes existentes.



As análises de Desequilíbrio de Ligação (LD) mostraram duas regiões com forte LD – D' igual a 1 (100) (Figura 1A). Um alto grau de correlação entre os alelos dos SNPs 2 e 3 ($r^2 = 92$) e 6 e 7 ($r^2 = 84$) foi também observado pelos valores D' (Figura 1B).

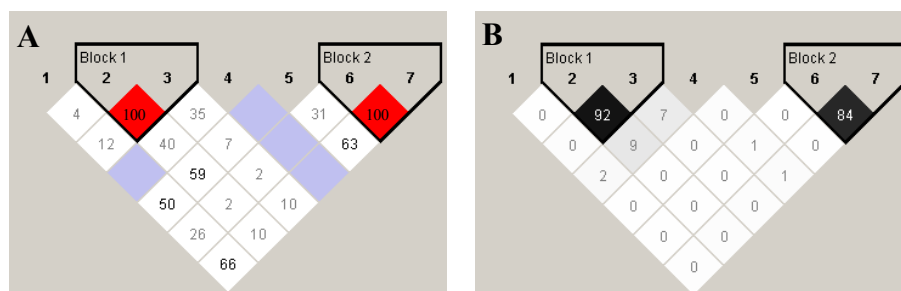


Figura 1 A – Blocos de LD com valores de D' . Figura 1B – Blocos de LD com valores de r^2 .

Conclusões

O ressequenciamento do gene κ -caseína revelou que os animais testados possuem um polimorfismo de base única ainda não relatado neste gene. Dois dos haplótipos inferidos ainda não foram descritos na literatura, o que pode indicar a presença de novas variantes nesta população de animais. A variante B, desejável para indústria de laticínios, foi encontrada em uma frequência muito baixa nestes animais, como já observado em outros animais da raça Gir. Contudo, esta informação é relevante pois estes SNPs podem ser inseridos em painéis de marcadores moleculares que serão usados programas de Seleção Assistida por Marcadores em rebanhos brasileiros.

Literatura citada

- CAROLLI, A. M.; CHESSA, S.; ERHARDT, G. J. Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. **Journal of Dairy Science**. v. 92, p. 5335-5352, 2009.
- HECK, J. M. L. et al. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1192-1202, 2009.
- KEMENES, P. A. et al. K-Casein, β -lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzará, Caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 539-541, 1999.
- PRINZENBERG, E. M.; KRAUSE, I.; ERHARDT, G. SSCP analysis at the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known proteins variants (A, B, C, E, F, G) and 3 new DNA polymorphisms (H, I, A'). **Animal Biotechnology**, v.10, p. 49-62, 1999.
- RINJINKELS, M. Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. **Journal of Mammary Biology Neoplasia**. v. 7, p. 327-345, 2002.