

IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

Polimorfismos no éxon 3 do gene *JY-1* e suas associações com probabilidade de prenhez precoce e características de crescimento em novilhas da raça Nelore¹

Gregório Miguel Ferreira de Camargo², Diércles Francisco Cardoso³, Patrícia Dias da Silva Fonseca³,
Fernando Baldi⁴, Luciana Correia de Almeida Regitano⁵, Humberto Tonhati⁶

¹Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor

²Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/Unesp-Jaboticabal. Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp). e-mail: gregoriocamargo@hotmail.com

³Pós-graduando em Genética e Melhoramento Animal/ FCAV/Unesp-Jaboticabal

⁴Professor do Departamento de Nutrição e Produção Animal – FMVZ/USP-Pirassununga

⁵Pesquisadora científica do CPPSE/Embrapa - São Carlos

⁶Professor Titular do Departamento de Zootecnia - FCAV/Unesp-Jaboticabal

Resumo: A probabilidade de prenhez precoce é uma característica importante devido ao alto valor econômico associado. Marcadores moleculares promovem diminuição do intervalo de gerações e aumento de ganho genético. A proteína *JY-1* é uma proteína específica dos oócitos e atua nas células da granulosa e no desenvolvimento embrionário inicial. Marcadores moleculares foram usados para estudar o gene *JY-1* e foram encontrados quatro polimorfismos do tipo SNP no éxon 3. As posições dos SNPs no referido éxon e as substituições são: 163 (T/C), 281(T/C), 321(T/C) e 679(T/C). O SNP 163 está em região codificante e causa substituição de uma prolina por uma leucina. Os demais SNPs estão em região 3'UTR. Os SNPs foram genotipados em 297 novilhas da raça Nelore. Os SNPs 163, 321 e 679 estavam em desequilíbrio de ligação entre si e em equilíbrio com o 281. Os genótipos foram correlacionados com probabilidade de prenhez precoce e características de crescimento, mas não se apresentaram significativos.

Palavras-chave: *Bos taurus indicus*, marcadores moleculares, SNP, sequenciamento, cromossomo 29.

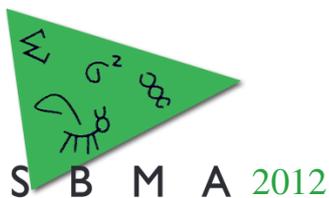
Polymorphisms in exon 3 of *JY-1* gene and their associations with sexual precocity and growth traits in Nelore heifers.

Abstract: In beef cattle breeding, the probability of early pregnancy is an important trait because of its associated high economic value. This trait has high heritability values and there is the possibility of genetic gain due to selection. The use of molecular markers contributes to the genetic evaluation of these animals and promotes a reduction in the generation interval. Protein *JY-1* is a bovine oocyte-specific protein that regulates granulosa cell function and is involved in early embryonic development, influencing the chance of pregnancy. This study investigated molecular markers for the *JY-1* gene. Four SNPs were identified in exon 3 of the gene. The positions of the SNPs in the exon and the respective substitutions are: 163 (T/C), 281 (T/C), 321 (T/C) e 679 (T/C) (GenBank: JN592587 and JF262042.2). SNP 163 is located in a coding region and causes a proline-to-leucine substitution. The other SNPs are located in the 3'UTR region. SNPs were genotyped in 297 Nelore heifers. SNPs 163, 321 and 679 were in linkage disequilibrium with each other and in linkage equilibrium with SNP 281. The genotypes were correlated with early pregnancy probability and growth traits, but the results were not significant ($P < 0.05$).

Keywords: *Bos taurus indicus*, molecular markers, SNP, sequencing, chromosome 29.

Introdução

Dentre as características reprodutivas, a precocidade sexual das fêmeas possui grande importância econômica para a produção (Brumatti et al., 2011). O coeficiente de herdabilidade é alto para probabilidade de prenhez aos 16 meses sendo de 0,45 (Boligon & Albuquerque, 2011) que sugerem possibilidade de ganho genético.



IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

Em se tratando de estudos genômicos, Fortes et al (2010) refletem e discutem que é comum a análise de uma característica quantitativa usando uma medida fenotípica binária, porém isso é limitante em certos aspectos. Assim, os marcadores genético-moleculares podem ser uma ferramenta auxiliar no estudo da característica, indicando pontualmente a fonte de variabilidade e, dessa forma, ajudando a entendê-la.

Assim, escolheu-se para estudo o gene JY-1 que codifica uma proteína específica do oócito, que possui importante papel regulador na camada de células da granulosa em eventos pré-ovulatórios do processo da luteinização (Bettegowda et al. 2007). Objetivou-se encontrar polimorfismos no gene candidato e estabelecer suas associações com a probabilidade de prenhez precoce e características de crescimento em novilhas Nelore.

Material e Métodos

As extrações de DNA foram feitas a partir de fólculo piloso a partir da metodologia de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico. Os *primers* utilizados na amplificação foram 5'CTTCACAGACCACCCAGGTC3' e 5' TCTGCCCTGTTCAGTTTGAT3' que amplificaram uma região de 399pb que compreendia parcialmente a região codificante do éxon 3 e 5'ATCAAACCTGAACAGGGCAGA3' e 5'AAGTATGACAAGAGATACGGTCAGG3' que amplificaram uma região de 373 pb que compreendia uma região 3'UTR do éxon 3.

As reações de amplificação tinham um volume final de 15µL seguindo protocolo da GoTaq Colorless Master Mix (Promega). Os ciclos de amplificação seguiram a programação: 95°C por 5 min, 95°C por 1 min, 57°C (para ambos os pares de *primers*) por 1 min, 72°C por 1 min (35 ciclos) e 72°C por 5 min.

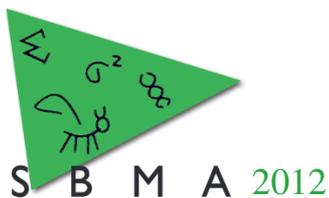
O produto de PCR foi sequenciado a partir de ambos *primers* usando a técnica de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (ddNTPs). Para a análise e identificação dos polimorfismos, as sequências obtidas foram analisadas e visualizadas com os programas CodonCode Aligner.

Para as análises de RFLP, 5 µL de produto PCR foi digerido em um programa do termociclador com tempo e temperatura e descrito no protocolo fornecido pelo fabricante das enzimas (*BsrI* – BioLabs) em um volume final de 15 µL.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando modelos lineares generalizados através do aplicativo PROC GLIMMIX do pacote estatístico do SAS 8.0 (SAS Institute, Inc., 2000), assumindo uma distribuição binomial para os dados. O efeito dos genótipos identificados para o gene JY-1 na PPP foi estimado usando o seguinte modelo estatístico: $Y_{ijklm} = \mu + N_i + C_m + S_j + JY_k + T_l + e_{ijklm}$

Onde Y_{ijklm} = característica PPP para o $ijklm^{\text{ésimo}}$ animal; μ = média da característica na população; N_i = efeito fixo associado ao $i^{\text{ésimo}}$ grupo de manejo ao nascimento; C_m = efeito fixo associado ao $m^{\text{ésimo}}$ grupo de manejo à desmama; S_j = efeito fixo associado ao $j^{\text{ésimo}}$ grupo de manejo ao sobreano; JY_k = efeito fixo associado ao $k^{\text{ésimo}}$ genótipo de JY-1; T = efeito aleatório do $l^{\text{ésimo}}$ touro; e_{ijklm} = erro aleatório associado com a $ijklm^{\text{ésima}}$ observação.

Além da característica de probabilidade de prenhez precoce, foram analisadas as características de ganho médio diário pré e pós desmama e peso ao sobreano. As análises foram realizadas utilizando modelos lineares através do aplicativo PROC MIXED do pacote estatístico do SAS 8.0 (SAS Institute, Inc., 2000), assumindo distribuição normal dos dados. O efeito dos genótipos identificados para o gene JY-1 no ganho pré e pós-desmama foi estimado usando o modelo estatístico com efeitos semelhantes ao de PPP. Para ganho pré-desmama, retirou-se S_j e inclui-se idade do bezerro à desmama como covariável (efeito linear) e para ganho pós-desmama inclui-se idade do bezerro ao sobreano como covariável (efeito linear). Para ambos, inclui-se também o efeito fixo de idade da vaca ao parto. O teste F de Fisher foi utilizado no estudo do efeito dos marcadores sobre as características, considerando valores de $P < 0,05$ como sendo significativos.



IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

Resultados e Discussão

Ambos pares de *primers* amplificaram as regiões específicas do éxon 3 do gene da proteína JY-1. Para os produtos amplificados (3A), foi utilizada a técnica do sequenciamento automático para a identificação e genotipagem dos SNPs. Foram identificados três polimorfismos do tipo SNP (posições 163, 281 e 321 do éxon 3). Um deles está presente em região codificante (posição 163 do éxon 3) e o SNP promove a troca de um sítio de codificação, trocando-se uma prolina por uma leucina; os demais em região 3'UTR. Para os produtos do par de *primers* 3B foi genotipado por RFLP o SNP 679 usando a enzima de restrição *BsrI* (5'...ACTGG↓N...3'). Os genótipos encontrados foram CC (373 pb), TC (373 pb, 298 pb e 75 pb) e TT (298 pb e 75 pb). Todos os SNPs são uma substituição de uma timina por uma citosina.

As 297 novilhas do estudo foram genotipadas por sequenciamento para os SNPs 163, 281 e 321 e por RFLP para o SNP 679. As frequências genotípicas dos SNPs 163, 281 e 321 não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste de χ^2 a 5% e a do SNP 679 encontra-se.

Foram calculados os valores de r^2 entre os quatro SNP genotipados em toda a população. Os SNPs 163, 321 e 679 apresentaram valores r^2 maiores que 0,33 entre si (variando de 0,396 a 0,949), significando que estão em desequilíbrio e são herdados juntos. Esse grupo de SNPs está em equilíbrio com o SNP 281 representado pelos baixos valores de r^2 (variando de 0,008 a 0,052). Portanto, foram utilizados nas análises estatísticas de associação os SNPs 163 e 281.

Os SNPs encontrados foram correlacionados com as características de prenhez precoce aos 16 meses e características de crescimento. Nessas análises, nenhum SNP foi encontrado como significativo ao nível de 5%. Isso indica que os SNPs do éxon 3 do gene JY-1 contribuem pouco para as características analisadas. Como essas são as associações dos primeiros SNPs a serem detectados no gene da proteína JY-1 de bovinos não há como comparar esses resultados com outros.

Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo permitem inferir que foi feita a caracterização parcial do éxon 3 do gene JY-1 em bovinos da raça Nelore com descoberta dos primeiros polimorfismos para o gene na espécie. Há um SNP na posição 163 do éxon 3 que promove uma troca de uma prolina por uma leucina, podendo essa influenciar o papel biológico da proteína. Polimorfismos no éxon 3 do gene da proteína JY-1 não foram associados com probabilidade de prenhez precoce aos 16 meses e ganho médio diário pré-desmama, ganho médio diário pós-desmama e peso ao sobreano em novilhas da raça Nelore. Ressalta-se que estudos posteriores a fim de caracterizar outras regiões de interesse no mesmo gene são importantes bem como a correlação com outras características reprodutivas.

Literatura citada

BETTEGOWDA, A. et al. JY-1, an oocyte-specific gene, regulates granulosa cell function and early embryonic development in cattle. **PNAS**, v.104, p. 17602-17607, 2007.

BOLIGON, A. A.; ALBUQUERQUE, L.G. Genetic parameters and relationships of heifer pregnancy and age at first calving with weight gain, yearling and mature weight in Nelore cattle. **Livestock Science**, v.141, p.12–16, 2011.

BRUMATTI, R. C. et al. Desenvolvimento de índices de seleção em gado de corte sob enfoque de um modelo bioeconômico. **Archivos de Zootecnia**, v.60, p. 205-213, 2011.

FORTES, M. R. S. et al. Association weight matrix for the genetic dissection of puberty in beef cattle. **PNAS**, v.107, p. 13642–13647, 2010.

SAS INSTITUTE. *User's guide. Cary: SAS Institute, 2000*