



VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal São Carlos, SP, 10 e 11 de julho de 2008

Prospecção de marcadores SNP nos genes *GHR*, *GHRHR* e *IGF* em ovinos de corte

Samuel Rezende Paiva¹, Ana Maria Bezerra Oliveira Lobo², Ângela Rosa de Araújo³,
Concepta McManus⁴, Raimundo Nonato Braga Lôbo⁵

¹Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e-mail: samuel@cenargen.embrapa.br

²Estudante doutorado, Universidade Federal de Viçosa, e-mail: oliveiraana@yahoo.com.br

³Estudante de graduação- Biologia, Universidade Paulista, e-mail: angela27rosa@yahoo.com.br

⁴Professora da FAV, Universidade de Brasília, e-mail: concepta@unb.br

⁵Pesquisador da Embrapa Caprinos, e-mail: lobo@cnpq.embrapa.br

Resumo – O uso de polimorfismos em genes candidatos é uma ferramenta alternativa para estudos de associação entre marcadores moleculares e características de importância econômica. Foi realizado o seqüenciamento de regiões de três genes (receptor do hormônio de crescimento, liberador do receptor do hormônio de crescimento e fator de crescimento ligado a insulina) para identificar polimorfismos de base única (SNP) em 14 reprodutores de cinco raças de ovinos que formam a base de uma população multirracial de ovinos de corte. Foram identificados pelo menos nove SNPs polimórficos entre estes reprodutores. A estratégia agora será realizar um estudo de associação entre estes marcadores e características de produção dentro das famílias destes reprodutores.

Palavras-chave: *GHR*, *GHRHR*, *IGF*, marcadores moleculares, *Ovis aries*

SNP identification in *GHR*, *GHRHR*, and *IGF* genes in meat sheep

Abstract – The use of polymorphisms in candidate genes is an alternative tool for association studies between molecular markers and important economic traits. Sequencing of regions of three genes (growth hormone receptor and liberator as well as the receptor of growth factor linked to insulin) was carried out to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) for 14 rams from five sheep breeds which are the base of a multibreed population of a lamb production system. At least nine SNPs were identified between these rams. This information will be used as the basis for an association study between these markers and production traits in the families of these animals.

Keywords: *GHR*, *GHRHR*, *IGF*, molecular markers, *Ovis aries*

Introdução

O aumento da produção pecuária no Brasil, inclusive da ovinocultura, é um impulso de vital importância para que a indústria animal se torne mais competitiva. O nível de aplicação tecnológica disponível na ovinocultura brasileira, de maneira geral, é muito baixo, se comparado com outras espécies, como frangos de corte, suínos e bovinos.

Contudo, este cenário pode ser considerado natural, uma vez que a atividade encontra-se em expansão e reestruturação, buscando primeiramente seu pleno estabelecimento. Dessa forma, são necessários estudos em várias áreas do conhecimento que visem agregar valor a ovinocultura nacional. Dentre as várias áreas, a genética molecular pode auxiliar os programas de conservação e melhoramento, via desenvolvimento de painéis para exclusão de paternidade e certificação racial, bem como na identificação de regiões cromossômicas relacionadas a características produtivas, de forma a potencializar os programas de seleção atuais.

A investigação de genes candidatos é uma forma abrangente de se pesquisar o genoma, uma vez que o gene é escolhido baseado em evidências de que o peptídeo que ele codifica tem efeito biológico ou fisiológico na característica de interesse (Rothschild & Soller, 1999). A associação de genes candidatos com características fenotípicas pode ser realizada com base em apenas um sítio polimórfico, dentro dos próprios genes ou em haplótipos dos genes candidatos (Lagziel et al., 1996).

A utilização de Polimorfismos de Base Única (SNP) em genes candidatos na condução de estudos de associação está diretamente ligada aos padrões de desequilíbrio de ligação na região estudada. Estudos em animais de produção apontam para padrões de desequilíbrio de ligação que se estendem por grandes regiões. Em ovelhas e bovinos estes valores foram estimados em distâncias genéticas superiores a 30 cM (ex., McRae et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi identificar SNPs em três genes relacionados a características de crescimento em reprodutores de cinco raças de ovinos que pertencem a uma população multirracial de ovinos de corte. Tais resultados subsidiarão os trabalhos de associação entre marcadores moleculares e características de produção mensuradas.

Material e Métodos

Este trabalho faz parte de um projeto que visa testar a existência de associação entre marcadores moleculares e características de produção em uma população multirracial de ovinos de corte. A população de estudo em questão foi formada por 600 animais (desenho experimental de meio-irmãos) de uma fazenda em Goiás, associada do Programa de Melhoramento Genético de Caprinos e Ovinos de Corte (GENECOC) da Embrapa Caprinos, Sobral-CE. Foram coletadas amostras de sangue e o DNA foi extraído a partir do protocolo “Salting Out” (Miller et al., 1988). A extração de DNA e a padronização das reações utilizadas foram realizadas no Laboratório de Genética do Núcleo de Biotecnologia de Sobral-CE (NUBIS). Após a extração, o DNA genômico foi quantificado por comparação da intensidade das bandas com fago lambda de concentração conhecida em eletroforese com gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo. Esta amostra faz parte de um banco de DNA que vem sendo formado para o GENECOC. Parte do DNA obtido foi enviada para o Laboratório de Genética Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, onde foram realizadas as demais análises moleculares.

A estratégia de prospecção de polimorfismos adotada foi o sequenciamento de regiões de genes candidatos. Desta forma, três genes relacionados diretamente ao crescimento/ desenvolvimento foram selecionados para resequenciamento nos 14 reprodutores desta população. Estes animais pertencem a cinco grupos genéticos (Dorper, Ile de France, Poll Dorset, Santa Inês e o composto Primera). Foram eles: o receptor do hormônio de crescimento (GHR), o liberador do receptor do hormônio de crescimento (GHRHR) e o fator de crescimento ligado à insulina (IGF). As reações de reação em cadeia

polimerase (PCR) foram feitas em todos os 14 indivíduos para uma região de cada gene a partir dos primers propostos por Pariset et al. (2006).

A visualização dos fragmentos foi realizada em géis de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo. Após a verificação em agarose, os produtos de PCR foram submetidos a uma purificação enzimática (EXOSAP-IT), para eliminação do excesso de iniciadores e dNTPs.

As reações de seqüenciamento foram otimizadas para um volume final de 10µl, contendo 0,5µl BigDye Terminator, 1,75µl BigDye Sequencing Buffer, 2,0µl de primer (1,6 µM), 1,5µl da fita molde de DNA e 4,25µl de água Mili-Q autoclavada. O programa utilizado nas reações de seqüenciamento foi universal para todos os fragmentos: passo inicial de desnaturação a 96°C por um minuto, 25 ciclos com desnaturação a 96°C por 10 segundos; anelamento dos primers a 50°C por cinco segundos; extensão a 60°C por quatro minutos. As reações de seqüenciamento foram submetidas ao protocolo de purificação segundo o manual do BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Após a purificação, as amostras foram resuspendidas em 10µl de formamida Hi-Di, desnaturadas a 95°C por cinco minutos e submetidas a eletroforese capilar em seqüenciador automático ABI3700 (Applied Biosystems).

As seqüências obtidas foram primeiramente alinhadas utilizando o software SeqScape (Applied Biosystems). Nesta análise, todos os fragmentos gerados por seqüenciamento para cada amostra foram colocados juntamente no programa para sobreposição das seqüências, formação da seqüência genômica total e identificação dos SNPs. Para alinhamento, foram usadas as seguintes seqüências de referência do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/): *GHR* (AY292283), *GHRHR* (AY292289) e *IGF* (AY737509).

Resultados e Discussão

Foram seqüenciados, aproximadamente, 350 bases do GHR, 450 bases do GHRHR e 230 bases do IGF. Para os três genes analisados, foi identificado um total de 11 marcadores SNP polimórficos, de maneira que nove foram informativos entre os reprodutores usados (Tabela 1) e dois foram monomórficos entre os reprodutores, mas polimórficos em relação às seqüências de referência retiradas do *GenBank*. Pariset et al (2006) reportaram apenas os SNP2, SNP4 e SNP9 (Tabela 1) em seu estudo de forma que o presente trabalho identificou 6 marcadores SNP adicionais. Estes marcadores podem ser usados tanto em estudos de associação bem como de diversidade genética.

A variabilidade observada será usada para montagem de experimentos para estudos de associação com 13 características de produção já mensuradas nos animais do rebanho. O provável desenho experimental será de famílias de meio-irmãos que poderá levar em consideração tanto contrastes entre raças como dentro da raça Santa Inês. Por exemplo, os SNP3, SNP4 e SNP7 (Tabela 1) são informativos para testar a existência de associações significativas entre reprodutores Dorper e Santa Inês. Estes estudos visam a médio-longo prazo, formar um painel de marcadores altamente informativos que auxiliem o manejo e os programas de melhoramento de ovinos no Brasil.

Tabela 1- Polimorfismos de Base Única (SNP) identificados em três genes candidatos e seus respectivos genótipos em relação a cinco raças de ovinos analisadas. ID corresponde ao código de cada reprodutor analisado e traços são genótipos não identificados por falha no sequenciamento.

Raça	ID	Genótipos								
		Gene <i>GHR</i>		Gene <i>IGF</i>		Gene <i>GHRHR</i>				
		SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6	SNP7	SNP8	SNP9
Dorper	ODO1	-	-	AG	TT	AA	TT	CC	CC	TT
Dorper	ODO2	-	-	AG	TT	AA	TT	CC	CC	TT
Ile de France	OLF1	AG	AA	GG	TT	AA	TT	CC	CC	TT
Poll Dorset	OPD1	GG	AA	GG	TT	GG	CT	TT	TT	GG
Poll Dorset	OPD1	GG	AA	GG	CT	AA	TT	CC	CC	TT
Primera	OPR1	GG	AA	AG	TT	AA	TT	CC	CC	TT
Santa Inês	OSI1	AG	AA	GG	CT	AA	TT	CC	CC	TT
Santa Inês	OSI2	AA	CC	GG	CT	AG	CT	CT	TT	TG
Santa Inês	OSI3	AA	AC	GG	TT	AG	CT	CT	CT	TG
Santa Inês	OSI3	AG	AC	GG	CT	AA	TT	CC	CC	TT
Santa Inês	OSI4	-	-	-	-	AG	TT	CT	CT	TG
Santa Inês	OSI5	AA	CC	GG	CT	AA	TT	CC	CC	TT
Santa Inês	OSI6	AA	AC	GG	CT	AG	TT	TT	TT	TG
Santa Inês	OSI7	AA	CC	GG	-	-	-	-	-	-

Conclusões

Os resultados confirmaram a existência de polimorfismos em genes relacionados ao crescimento entre os reprodutores do rebanho experimental usado. Desta forma será possível realizar um estudo de associação destes SNP polimórficos com as características fenotípicas mensuradas rotineiramente dentro da população.

Literatura Citada

- LAGZIEL, A.; LIPKIN, E.; SOLLER, M. Associations between SSCP haplotypes at the bovine growth hormone gene and milk protein percentage. **Genetics**, v.142, p.945-951, 1996.
- McRAE, A.F.; MCEWAN, J.C.; DODDS, K.G.; WILSON, T.; CRAWFORD, A.M.; SLATE, J. Linkage disequilibrium in domestic sheep. **Genetics**, v.160, p.1113-22, 2002.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.1215, 1988.
- PARISET, L.; CAPPUCCHIO, I.; AJMONE-MARSAN, P. et al. Characterization of 37 breed-specific single-nucleotide polymorphisms in sheep. **Journal of Heredity**, v.97, n.5, p.531-534, 2006.
- ROTHSCHILD, M.F., SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect genes controlling of economic importance in domestic livestock. In: Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento Animal, 1., 1999, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 1999. p.219-242.