

## IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

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

### Caracterização do polimorfismo no gene *FSHR* em três linhas de seleção para crescimento em bovinos Nelore

Marina Mortati Dias<sup>1</sup>, Patrícia Dias da Silva Fonseca<sup>2</sup>, Fábio Ricardo Pablos de Souza<sup>2</sup>, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante<sup>3</sup>, Lúcia Galvão de Albuquerque<sup>4</sup>, Henrique Nunes de Oliveira<sup>4</sup>, Humberto Tonhati<sup>4</sup>

<sup>2</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – UNESP/Jaboticabal, SP. Bolsista da CAPES. e-mail: marina.mortati@gmail.com

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Zootecnia - UNESP/Jaboticabal, SP.

<sup>4</sup>Centro de Pesquisa em Pecuária de Corte/Instituto de Zootecnia – Sertãozinho, SP.

<sup>4</sup>Professor Titular do Departamento de Zootecnia – UNESP/Jaboticabal, SP.

**Resumo:** Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar as frequências do gene *FSHR* em bovinos da raça Nelore pertencentes à três linhas de seleção (NeC, NeS e NeT) para o peso ao sobreano do Programa de Seleção das Raças Zebuínas da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho, e verificar se existe diferença significativa entre as frequências gênicas e genotípicas. Foram utilizadas informações pertencentes a 567 novilhas nascidas entre 2003 e 2009. A genotipagem foi realizada por PCR (Polymerase Chain Reaction). Para a análise estatística das frequências gênicas entre as linhas de seleção foi aplicado o teste exato de Fisher utilizando o módulo de diferenciação de populações do programa GENEPOP versão 3.4. Valores de *P* iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos. O alelo G foi o mais frequente em todas as linhas de seleção. As linhas NeC e NeS não possuem o genótipo CC. O genótipo mais frequente em todas as linhas foi o GG. O teste exato de Fisher indicou que tanto as diferenças nas frequências genotípicas como alélicas são estatisticamente diferentes entre a linha controle (NeC) e as linhas selecionadas (NeS e NeT). Entretanto, não houve diferenças significativas nas frequências entre as linhas selecionadas.

**Palavras-chave:** bovinos de corte, *FSHR*, linha de seleção, PCR, RFLP

### Characterization of *FSHR* gene polymorphism in three lines of Nelore cattle selected for growth

**Abstract:** The aim of the study was to characterize the frequencies of *FSHR* gene polymorphism in three selection lines of Nelore cattle (NeC, NeS, e NeT) from Programa de Seleção das Raças Zebuínas from Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho, and to verify if the three lines have significant differences between the allelic and genotypic frequencies. The sample was constituted of 567 heifers born between 2003 and 2009. PCR was used for the genotyping. For the statistical analyzes was applied the Fisher's exact test using the population differentiation module from GENEPOP 3.4 version. P-values < 0.05 were considered significant. The allele G was the most frequent in all selection lines. The lines NeC e NeS was characterized by the absence of genotype CC. The genotype more frequent was the genotype GG. The Fisher's exact test showed that all these differences between the line NeC and selected lines (NeS and NeT) were significant. No differences were observed between the selected lines.

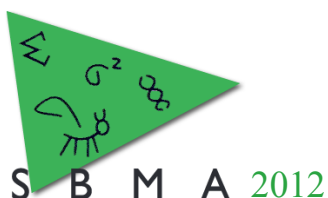
**Keywords:** beef cattle, *FSHR*, line of selection, PCR, RFLP

### Introdução

O *FSHR* (receptor do hormônio folículo-estimulante) é um receptor transmembranar que interage com o hormônio folículo-estimulante (FSH) que por sua vez é responsável pelo desenvolvimento, crescimento, maturação da puberdade e processos reprodutivos. O gene *FSHR* está localizado no cromossomo 11 e é constituído de 2.375pb (genbank NM\_174061).

O objetivo do estudo foi verificar as frequências do gene *FSHR* em bovinos da raça Nelore pertencentes às três linhas de seleção para crescimento do Instituto de Zootecnia e verificar se existe diferença significativa entre as frequências nas diferentes linhas de seleção para um possível estudo de correlação entre características de crescimento e fertilidade.

### Material e Métodos



## IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

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

Foram utilizados dados de 567 novilhas nascidas entre 2003 e 2009, pertencentes a três linhas de seleção realizadas na raça Nelore (NeC, NeS, NeT) da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho. Nas linhas NeS e NeT, os machos são selecionados para maiores pesos padronizados aos 378 dias de idade (P378), após teste de desempenho em confinamento e, as fêmeas para peso são selecionados com base em P378 e P550 próximos da média (diferenciais de seleção nulos). As linhas NeC e NeS são fechadas enquanto a linha NeT diferencia-se do NeS por ter recebido, eventualmente, touros de outros rebanhos, inclusive comerciais.

As amostras foram amplificadas pela reação de PCR para o volume final de 15 $\mu$ L. Para isto utilizou-se 7,5  $\mu$ L de Go Taq Master Mix, 15 pM de cada primer (*forward* e *reverse*), 3,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O e 1 $\mu$ L de DNA na concentração de 100ng/ $\mu$ L para cada amostra. Utilizou-se a seguinte sequência de *primer*: CTG CCT CCC TCA AGG TGC CCC TC, para o *forward* e, AGT TCT TGG CTA AAT GTC TTA GGG GG, para o *reverse*. Para o programa de amplificação utilizou-se: um ciclo para desnaturação 95 $^{\circ}$ C por 5'; 30 ciclos com desnaturação 95 $^{\circ}$ C por 45'', pareamento dos primers 66.1 $^{\circ}$ C por 40'', e extensão a 72 $^{\circ}$  por 45''. O ciclo de extensão final foi de 72 $^{\circ}$ C por 5'.

Em seguida aplicou-se a técnica de PCR-RFLP (Restrictions Fragment Length Polymorphism). Utilizando para reação: 8,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 0,5  $\mu$ L de enzima de restrição *AluI*, 1  $\mu$ L de solução tampão e 5  $\mu$ L de produto de PCR.

Os produtos da digestão foram separados por eletroforese (100V por 2 horas) com uma concentração de 2% e então visualizados em Gel-Doc (Bio-Rad®).

Para a análise estatística das frequências gênicas entre as linhas de seleção foi aplicado o teste exato de Fisher utilizando o módulo de diferenciação de população do programa GENEPOP versão 3.4 (<http://genepop.curtin.edu.au/>). Valores de *P* iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

### Resultados e Discussão

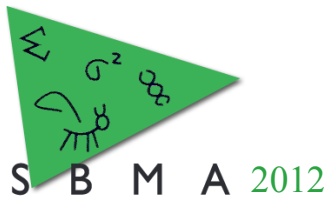
As análises de PCR-RFLP possibilitou a identificação de três genótipos para o gene estudado, sendo os genótipos GG, CG e CC, assim como descrito por Campagnari (2002).

Os genótipos GG e CC foram respectivamente o mais e o menos frequentes nas linhas de seleção (Tabela 1). Consequentemente o alelo G foi o com maior frequência (Tabela 1). Tal resultado sugere que as linhas de seleção estão sob efeito de deriva genética causada pela utilização de touros que contenham maior frequência do alelo G. A perda do alelo C se deve provavelmente a este mesmo efeito. Os resultados encontrados na literatura variam de 0,08 a 0,57; 0,36 a 0,79 e 0,05 a 0,25 para as frequências genotípicas GG GC e CC, respectivamente (MARSON et al, 2008; VALERIANO, 2009). Os resultados são divergentes, provavelmente, pois na literatura consultada a população estudada não se tratava de linhas fechadas e o gene *FSHR* foi relacionado à precocidade sexual, já no presente estudo há linhas fechadas segundo o critério de seleção aplicado pelo Instituto de Zootecnia e o polimorfismo do gene *FSHR* é analisado em animais selecionados para peso ao sobreano.

O teste exato de Fisher indica que tanto as diferenças na frequências gênicas como as genotípicas são estatisticamente significativas entre a linha NeC e as linhas selecionadas (NeS e NeT). Porém, observa-se que não houve diferenças significativas nas frequências entre as linhas selecionadas (Tabela 2).

Tabela 1: Frequências Genotípicas e Alélicas do polimorfismo do gene *FSHR* em cada grupo de seleção para novilhas Nelore

População	Frequência Genotípica			Frequência Alélica	
	f(GG)	f(GC)	f(CC)	f(G)	f(C)
NeC <sup>1</sup>	0.775	0.225	0	0.8875	0.1125
NeT <sup>1</sup>	0.959	0.038	0.003	0.978	0.022
NeS <sup>1</sup>	0.923	0.077	0	0.9615	0.0385



## IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

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

<sup>1</sup> NeC: linha controle, NeT: linha tradicional, NeS: linha seleção

Tabela 2: Valores de P obtidos pelo teste exato de Fisher para comparação das frequências genotípicas e alélicas entre as três linhas de seleção de bovinos Nelore.

Par de Populações <sup>1</sup>	P-value	
	Frequência Genotípica	Frequência Alélica
NeC & NeT	0.00000	0.00000
NeC & NeS	0.00797	0.00947
NeS & NeT	0.21565	0.21243

<sup>1</sup> NeC: linha controle, NeT: linha tradicional, NeS: linha seleção

### Conclusões

Os bovinos da raça Nelore são caracterizados por uma alta frequência do alelo G do polimorfismo no gene *FSHR*. A seleção para crescimento afeta significativamente as frequências dos alelos do gene *FSHR* entre as linhas selecionadas e a linha controle. Mais estudos precisam ser realizados para a compreensão da relação do *FSHR* e o peso ao sobreano.

### Literatura citada

CAMPAGNARI, F. **Novas variantes moleculares dos genes dos receptores do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHR) e do hormônio folículo estimulante (FSHR) em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore)**. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2002. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2002.

MARSON, E.P., et al. Effects of polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a *Bos taurus* x *Bos indicus* beef composite population. **Genectis and Molecular Research**. v.7(1). p. 243-251. 2008.

VALERIANO, A.C.M. **Polimorfismos de DNA nos genes dos receptores de estrogênio e FSHR e associação com resposta superovulatória em bovinos**. Brasília: Universidade de Brasília- Faculdade de Agronomia e Ciências Veterinárias, 2008. Dissertação (Mestrado em Genética), 2008.