

VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 10 e 11 de junho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

Localização no genoma do búfalo de quatro genes das proteínas do leite: caseína α -S1, caseína α -S2, β -caseína e lactoalbumina¹

Nedenia Bonvino Stafuzza², Carolina de Souza Stuchi³, M. Elisabete J. Amaral⁴

¹Parte da tese de doutorado da primeira autora, financiada pela FAPESP (Processo 06/59606-1)

²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV-UNESP/Jaboticabal. Bolsista da FAPESP. e-mail: nedeniabs@gmail.com

³Iniciação Científica do Departamento de Biologia – IBILCE-UNESP/São José do Rio Preto.

⁴Departamento Biologia – IBILCE-UNESP/São José do Rio Preto. e-mail: amaral@ibilce.unesp.br

Resumo: Nas espécies da família Bovidae, seis genes são responsáveis por codificarem 95% das proteínas presentes no leite, as quais são classificadas de acordo com suas características bioquímicas em quatro caseínas (caseína α -S1, caseína α -S2, β -caseína e κ -caseína), a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina. Nos recentes mapas construídos para todos os cromossomos do genoma bubalino por meio da tecnologia de mapeamento BBURH₅₀₀₀, o gene da κ -caseína foi localizado no cromossomo bubalino 7 e o gene da β -lactoglobulina no cromossomo 12. Visando dar continuidade na localização dos demais genes no genoma do búfalo, esse trabalho teve como objetivo mapear os genes das caseínas alfa e beta e da lactoalbumina, utilizando a mesma ferramenta genômica BBURH₅₀₀₀. Os resultados alocaram os três genes das caseínas no cromossomo bubalino 7 e o gene da lactoalbumina no braço curto do cromossomo bubalino 4. Além disso, foram realizadas comparações dos resultados obtidos em búfalo com a mais recente versão da seqüência do genoma bovino, mostrando conservação de homologia nas respectivas regiões do genoma bovino. Os dados apresentados podem contribuir sobremaneira nos estudos envolvendo populações de búfalo, principalmente aqueles relacionados com o melhoramento genético da espécie.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, caseínas, genoma, mapeamento

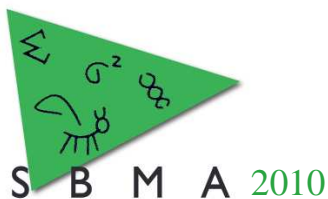
Assignment in the buffalo genome four genes of buffalo milk proteins: casein α -S1, casein α -S2, β -casein and lactalbumin

Abstract: In the Bovidae family, six genes encode 95% of the total proteins present in the milk. These proteins are classified according to their biochemical characteristics in four caseins (α -S1 casein, casein S2- α , β -casein and κ -casein), the α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Recent genome maps constructed for all buffalo chromosomes using the BBURH5000 mapping technology, showed the κ -casein gene on buffalo chromosome 7 and the β -lactoglobulin gene on chromosome 12. With the present study the alpha and beta casein and the lactalbumin genes were mapped on the buffalo genome, using the same RH mapping technology. The casein genes were assigned to buffalo chromosome 7 and the lactalbumin gene to the short arm of chromosome 4. In addition, comparisons with the latest version of the bovine genome sequence, revealed conservation of homology with the respective regions of the bovine genome. This data provide an important source for studies involving populations of buffalo, especially those related with the genetic improvement of this species.

Keywords: *Bubalus bubalis*, caseins, genome, mapping

Introdução

A produção de leite vem sendo explorada pelo homem há aproximadamente 10 mil anos, representando hoje, junto com seus derivados, um dos principais componentes da dieta humana em várias partes do mundo. O leite é constituído por uma combinação de água e diversos elementos sólidos, tais como lipídeos, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas. Entre os elementos sólidos constituintes do leite, as proteínas se destacam pelas suas propriedades que são fundamentais na produção de seus derivados como queijos, iogurtes e manteiga. Seis genes são responsáveis por codificarem 95% do total das proteínas presentes no leite, as quais são classificadas de acordo com suas características bioquímicas



VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 10 e 11 de junho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

em quatro caseínas (caseína α -S1, caseína α -S2, β -caseína e κ -caseína), a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina.

O búfalo representa uma fonte crescente na pecuária devido suas vantagens produtivas e reprodutivas que elevam seu *status* econômico no cenário agropecuário brasileiro e mundial. Dessa forma, o conhecimento do genoma desta espécie torna-se necessário para a identificação e manipulação de genes responsáveis por características economicamente importantes que contribuirão para os estudos de melhoramento genético desses animais.

Para identificar e manipular um gene de interesse econômico é necessário inicialmente localizar sua seqüência no genoma estudado. Este primeiro passo é obtido por meio do mapeamento genômico que, além de localizar qualquer seqüência de DNA em uma região cromossômica específica, determina a ordem linear dessa seqüência em relação a outras encontradas no mesmo cromossomo.

Nos recentes mapas construídos para todos os cromossomos do genoma bubalino por meio da tecnologia de mapeamento BBURH₅₀₀₀ (Amaral et al., 2008), o gene da κ -caseína (CSN3) foi localizado no cromossomo 7 (BBU7) e o gene da β -lactoglobulina (LGB) no cromossomo 12 (BBU12). Diante desse panorama, o presente trabalho teve como objetivo localizar no genoma do búfalo os outros três genes das caseínas denominados caseína α -S1 (CSN1S1), caseína α -S2 (CSN1S2) e β -caseína (CSN2), além do gene da proteína α -lactoalbumina (LALBA).

Material e Métodos

Para o mapeamento dos genes foi utilizada a ferramenta genômica BBURH₅₀₀₀ (Amaral et al., 2007) em associação com a tecnologia de PCR. Os pares de *primers* para PCR dos três genes das caseínas e da lactoalbumina, foram selecionados da literatura e/ou do banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists/>). Os *primers* tiveram sua temperatura de anelamento otimizadas com DNA bubalino, sendo utilizado o DNA bovino como controle.

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 10 μ L, utilizando 50ng de DNA, 0,2 mM de cada *primer*, 100 mM de dNTP, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM de MgCl₂ e 0,5 unidade da enzima polimerase AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems). Os ciclos para amplificação foram: desnaturação inicial de 10 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50-65°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 6 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio e fotodocumentados com câmera digital DC290 KODAK™.

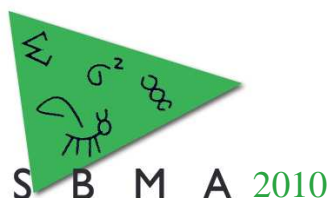
Por fim, os resultados de mapeamento no genoma do búfalo foram comparados com a mais recente seqüência do genoma bovino, UMD 3.1, disponível no endereço eletrônico http://www.cbcb.umd.edu/research/bos_taurus_assembly.shtml.

Resultados e Discussão

Os pares de *primers* para PCR selecionados para os genes CSN1S1, CSN1S2, CSN2 e LALBA tiveram suas temperaturas de anelamento otimizadas em 54°C, 50°C, 65°C e 65°C respectivamente. A Tabela 1 apresenta a seqüência dos *primers* selecionados, o tamanho aproximado do produto de PCR obtido com DNA de búfalo, além dos respectivos cromossomos bubalino e bovino onde esses genes estão mapeados.

Os resultados alocam os três genes das caseínas no cromossomo bubalino 7 e o gene LALBA no braço curto do cromossomo 4 (BBU4q). Esses dados corroboram a homologia cromossômica descrita previamente na literatura entre boi e búfalo, onde o cromossomos bovinos 5 e 6 são homólogos aos cromossomos bubalinos 4q e 7, respectivamente.

O estudo do genoma dos animais de interesse econômico tem permitido gerar conhecimentos sobre a ação dos genes na determinação de características produtivas e reprodutivas, possibilitando a complementação dos métodos tradicionais de melhoramento genético. Para tal, conhecimentos de genética quantitativa e melhoramento animal são utilizados no aprimoramento das estratégias de seleção, visando a incorporação de tecnologias moleculares nos programas de melhoramento, para assim obter o máximo de benefício possível da informação gerada pela genética molecular. Dessa forma, o conhecimento do genoma da espécie mostra-se de extrema valia, uma vez que gera as informações



VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 10 e 11 de junho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

necessárias para a identificação e manipulação de genes responsáveis por características economicamente importantes, contribuindo para um melhoramento genético dos rebanhos.

Tabela 1 Sequência dos pares de *primers* utilizados no mapeamento do genoma bubalino, indicando a localização dos genes nos cromossomos de búfalo (BBU) e seu homólogo em bovino (BTA) e o tamanho do produto de PCR aproximado em búfalo.

Gene	BBU	BTA	Produto de PCR	Sequência dos <i>primers</i>	Referência
CSN1S1	7	6	~220 bp	5'-ccttaccacttcactattgccac-3' 5'-ctttcttaagcatagagcatatcc-3'	UniSTS:253703
CSN1S2	7	6	~200 bp	5'-tctcctcctaggattggaaaga-3' 5'-ttgagacgggttgggaatct-3'	Sazanov et al., 2006
CSN2	7	6	~220 bp	5'-acagcctcccacaaaacatc-3' 5'-agactggagcagaggcagag-3'	Sazanov et al., 2006
LALBA	4q	5	~360 bp	5'-ctctgtgagaagtgtgaacacc-3' 5'-catcgagcaagggtcaaaagtcc-3'	Aleyasin & Barendse 1999

UniSTS refere-se ao número de identificação da respectiva sequência de *primers* do banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists/>)

Conclusões

Com este trabalho, completou-se a localização de todos os genes das caseínas no genoma do búfalo, assim como da lactoglobulina e da lactoalbumina. Os estudos comparativos mostraram uma conservação de homologia das regiões desses genes com o genoma bovino, cujas informações podem ser extrapoladas para estudos funcionais desses genes no genoma do búfalo.

Considerando que os *primers* para PCR selecionados neste estudo geraram produtos de PCR com DNA bubalino, os mesmos poderão ser utilizados em estudos de variabilidade genética em diferentes rebanhos brasileiros.

Literatura citada

- ALEYASIN, A.; BARENDSE, W. Comparative mapping of genes from human chromosome 12 by genetic linkage mapping in cattle. **The Journal of Heredity**, v.90, p.537-542, 1999.
- AMARAL, M.E.J.; OWENS, K.E.; ELLIOT, J.S. et al. Construction of a river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel and preliminary RH mapping of chromosomes 3 and 10. **Animal Genetics**, v.38, p.311-314, 2007.
- AMARAL, M.E.J.; GRANT, J.R.; RIGGS, P.K. et al. A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle. **BMC Genomics**, v. 9, p.1-11, 2008.
- SAZANOV, A.A., MALEWSKI, T., KAMINSKI, S. et al. Characterization of the CHORI-240 BAC clones containing the bovine CSN1S1, CSN2, STATH, CSN1S2 and CSN3 genes. **Journal of Applied Genetics**, v.47, p.243-245, 2006.