

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Identificação de marcadores moleculares do tipo SNP associados à gordura do leite em búfalas¹

Mariana Piatto Berton²; Fernando Baldi³; Guilherme Costa Venturini⁴; Rusbel Raul Aspilcueta-Borquis³; Lúcia Galvão de Albuquerque³; Humberto Tonhati³

¹ Estudo financiado pela FAPESP

² Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP.

³ Professor do Departamento de Zootecnia – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP. e-mail: tonhati@fcav.unesp.br.

⁴ Pós doutorando do Departamento de Zootecnia – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP. Bolsista: CNPq

Resumo: A criação de búfalos no Brasil é direcionada principalmente à produção de leite por à mesma apresentar alto retorno financeiro aos criadores por meio dos produtos derivados. O objetivo do presente estudo foi identificar marcadores moleculares do tipo SNP associados à gordura do leite em búfalas. A base de dados da característica gordura do leite (GORD) foi oriunda de 384 búfalas, pertencentes ao banco de dados do Departamento de Zootecnia FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP. As amostras de DNA foram extraídas no laboratório de Genética Molecular (FCAV/UNESP) e a genotipagem foi realizada utilizando-se o painel BovineHD BeadChip de alta densidade. As análises de associação utilizou um modelo linear que considerou como efeito fixo no modelo o marcador SNP, GC, número da ordenha (2 níveis), além da covariável idade da búfala ao parto (efeito linear e quadrático). A produção de gordura apresentou um total de 194 SNPs significativos a 1 % ($p < 0,01$). Para um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), a quantidade de marcadores SNP significativos aumentou para 800. Os cromossomos 20 e 22 do genoma bovino foram os que apresentaram os maiores números de marcadores SNP significativos ($p < 0,01$) relacionados à GORD (31 SNP). O presente estudo de associação genômica constatou que existem vários SNP significativos que podem afetar a produção de gordura no leite de búfalas. Estes poderiam ser utilizados em programas de melhoramento genético de bubalinos leiteiros por meio da seleção genômica.

Palavras-chave: cromossomos, genômica, polimorfismo.

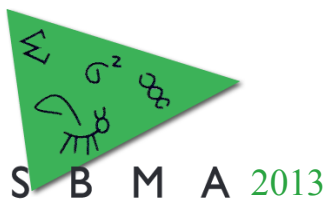
Identification of SNP markers associated with fat yield in the milk in buffaloes

Abstract: The breeding of buffaloes in Brazil is mainly for production of milk to make dairy products, because it provides the best financial return. Thus, the objective of this study was to identify of SNP markers associated with fat yield in the milk in buffaloes. The database feature fat yield (GORD) were from 384 buffaloes belonging to the database of the Department of Zootecnia FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP. DNA samples were extracted in the laboratory of Molecular Genetics (FCAV / UNESP) and genotyping was performed using the panel high density BovineHD BeadChip. The consistency of the data was performed using the SAS statistical program. Association analyzes were performed using a linear model that included as fixed factors the marker SNP, GC, number of milking (2 levels), and the covariate age of dam at calving (linear and quadratic effects). The milk fat showed a total of 194 SNPs significant at the 1% ($p < 0.01$). For a significance level of 5% ($p < 0.05$), the number of SNP markers increased substantially to 800. Chromosomes 20:22 bovine genome were those with the largest numbers of significant SNPs ($p < 0.01$) for the characteristic related to GORD GORD (SNP 31). This genomic association study found that there are several significant SNP that can affect the production of fat in buffalo milk. These potential markers could be used in breeding programs for dairy buffalo through genomic.

Keywords: chromosomes, genomics, polymorphism

Introdução

Existe um grande atrativo da genômica em benefício do melhoramento genético aplicado devido à utilização direta das informações do DNA na seleção, permitindo com isso alta eficiência seletiva, grande rapidez na obtenção de ganhos genéticos e baixo custo, em comparação com a seleção tradicional baseada em dados fenotípicos (SCHAEFFER et al., 2006). Com o descobrimento dos marcadores do tipo



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

SNP (Single Nucleotide Polymorphism), o melhoramento genético iniciou a utilização da seleção genômica para características como produção de leite e seus constituintes.

A produção de gordura é uma característica importante, pois confere qualidade do leite. Dessa forma os estudos genômicos, viabilizaram a realização de trabalhos em búfalos com a finalidade de encontrar marcadores moleculares do tipo SNP associados à componentes do leite. Com isso o presente estudo tem como objetivo identificar polimorfismos em marcadores (SNPs) associados à característica produção de gordura no leite de búfalas.

Material e Métodos

Foram utilizados dados fenotípicos de produção de gordura do leite aos 305 dias de idade (GORD), oriundo de 384 búfalas (*Bubalus bubalis*), pertencentes ao banco de dados mantido pelo Departamento de Zootecnia FCAV-UNESP/ Jaboticabal, SP, Brasil, nascidas entre 2007 e 2008. Os animais foram criados em pasto e suplementados durante os meses de abril a setembro (período seco). A produção média de gordura do rebanho foi de $106,41 \pm 34,04$ kg.

As observações de produção de gordura no leite não foram ajustadas para dias de lactação. As lactações acima de 305 dias foram truncadas e as menores de 90 dias foram excluídas. O primeiro controle de leite foi considerado entre o 5° e 75° dias após o parto. As búfalas primíparas tinham em média $2,78 \pm 0,28$ anos de idade ao parto.

Foram coletados folículos capilares da vassoura da cauda das búfalas e armazenados individualmente em envelopes identificados para cada animal e mantidos a 4°C até a extração do DNA pela técnica de Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Todas as análises laboratoriais foram desenvolvidas no Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Jaboticabal, SP. Para realização da genotipagem destes animais utilizou-se do chip Illumina BovineHD BeadChip, por meio do kit de ensaio Infinium® HD e do sistema Illumina HiScan™ (Illumina Inc., San Diego, CA).

A genotipagem dos animais foi realizada por meio do Illumina BovineHD BeadChip, utilizando o kit de ensaio o Infinium® HD e o sistema Illumina HiScan™ (Illumina Inc., San Diego, CA). O BeadChip BovineHD tem 777.962 marcadores SNP espalhados pelo genoma e uma distância média entre marcadores de 3,43 kb.

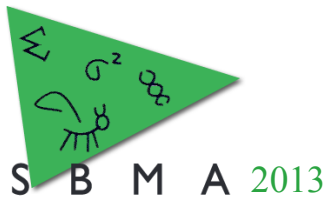
Para a verificação dos efeitos que influenciavam significativamente ($p < 0,05$) a característica GORD, a consistência dos dados foi realizada por meio do programa estatístico SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA) por meio da função PROC MIXED. Os GC foram formados por fazenda por rebanho, ano e estação de parto, sendo época seca (abril-setembro) e chuvosa (outubro-março). Com isso foi gerado um total de 33 GC.

As análises de associação foram realizadas por meio do comando MACRO e o procedimento MIXED do programa SAS (9.2, SAS Institute Inc., NC, USA) considerando apenas um marcador por vez. Foram considerados como efeitos fixos o marcador SNP, GC, número da ordenha (2 níveis), e como covariável a idade da búfala ao parto (efeito linear e quadrático). Para construção do gráfico do tipo Manhattan plot foram considerados níveis de significância para os marcadores de 1% ($p < 0,01$) e 5% ($p < 0,05$), sendo para isso utilizando o pacote de instruções GAP do software R (R Development Core Team, 2012). Também foi aplicado o teste de Bonferroni ao nível de 5% de significância para a característica.

Resultados e Discussão

Na Figura 1, são apresentados os resultados das análises de associação dos 15.745 SNPs que passaram no controle de qualidade com a característica de GORD. Foi observado um total de 194 SNPs, com significância de 1% ($p < 0,01$) e 800 SNPs com um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) associados com GORD.

Pôde-se constatar que os maiores números de marcadores SNPs significativos ($p < 0,01$) para a característica GORD estavam concentrados nos cromossomos 20 e 22 do genoma bovino. Estes cromossomos apresentaram 31 SNPs, relacionados à característica. Também se constatou que os cromossomos com menores quantidades de SNP significativos ($p < 0,01$) foram os 19 e 27, contendo cada um 7 SNPs. Mai et al. (2010) observaram para índices de produções de gordura um total de 50



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

marcadores associados significativamente à característica. Estes totais de marcadores estavam distribuídos em 21 cromossomos (incluindo o cromossomo 20).

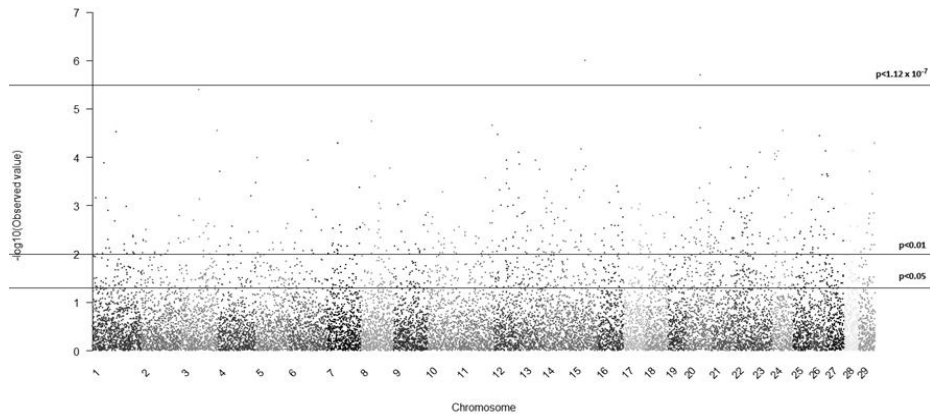


Figura 1. Gráficos de Manhattan dos resultados da associação genômica para produção de gordura em bubalinos. Valores acima de $-\log P > 2$ são equivalentes a $p < 0,01$.

Guo; Jorjani e Carlborg (2012) relataram que em bovinos leiteiros da raça Pardo Suíço, a maior concentração de SNPs significativos pode ser observado no cromossomo 25. Estes autores encontraram neste mesmo cromossomo 5 SNP associados a gordura do leite. Meredith et al. (2012) observaram uma maior quantidade de SNPs associados à produção de gordura (370 SNPs) trabalhando com animais Holstein-Friesian na Irlanda.

Após a correção para testes múltiplos de Bonferroni ($p < 1,12 \times 10^{-7}$), foi constatado dois SNPs significativos (Figura 1), sendo estes SNPs localizados nos cromossomos 15 e 20 do genoma bovino. Os resultados do presente estudo indicam que um grande número de SNPs, detectados significativamente, podem ter influência sobre a característica estudada.

Conclusões

O presente estudo de associação genômica constatou que existem 194 SNPs significativos ($p < 0,01$) que afetam a produção de gordura no leite de búfalas. Estes possíveis marcadores poderiam ser utilizados em programas de melhoramento genético de bubalinos leiteiros por meio da seleção genômica visando melhorar a qualidade do leite.

Literatura citada

AHAMAD, S.; GAUCHER, I.; ROUSSEAU, F.; BEAUCHER, E.; PIOT, M.; GRONGNET, J.F.; GAUCHERON, F. Effects of acidification on physic-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. **Food Chemist.**, v.106, p.11-17, 2008.

GUO, J.; JORJANI, H.; CARLBORG, Ö. A genome-wide association study using international breeding-evaluation data identifies major loci affecting production traits and stature in the Brown Swiss cattle breed. **BMC Genomics**, 13:82, 2012.

ILLUMINA. **BovineHD Genotyping BeadChip**. Disponível em: http://www.illumina.com/Documents/5Cproducts/5Cdatasheets/5Cdatasheet_bovineHD.pdf. Acessado em: 15 de outubro de 2010.

MAI, M.D.; SAHANA, G.; CHRISTIANSEN, F.B.; GULDBRANDTSEN, B. A genome-wide association study for milk production traits in Danish Jersey cattle using a 50K single nucleotide polymorphism chip. **J. Anim. Sci.**, v.88, p.3522-3528, 2010.

MEREDITH, B.K.; KEARNEY, F.J.; FINLAY, E.K.; BRADLEY, D.G.; et al. Genome-wide associations for milk production and somatic cell score in Holstein-Friesian cattle in Ireland. **BMC Genet.**, 13(1):21, 2012.

SCHAEFFER, L. R. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. **J. Anim. Breed. Genet.**, v.123, p.218-223, 2006.