

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

Estudo de associação genômica de polimorfismos de base única com a produção de proteína do leite de búfalas¹

Mariana Piatto Berton²; Guilherme Costa Venturini³; Fernando Baldi³; Rusbel Raul Aspilcueta-Borquis³; Gregório Miguel Ferreira de Camargo²; Humberto Tonhati³

¹ Estudo financiado pela FAPESP.

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

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

Resumo: Programas de melhoramento genético vêm buscando alternativas para identificar SNP responsáveis pela variação fenotípica de características de importância econômica. O objetivo do trabalho foi estudar a associação genômica de polimorfismos de base única com a produção de proteína do leite de búfalas. Os dados fenotípicos da produção de proteína (PROT) foram provenientes de 384 búfalas, pertencentes ao banco de dados do Departamento de Zootecnia FCAV-UNESP/ Jaboticabal, SP. As amostras de DNA foram coletadas de folículos capilares e as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular da FCAV/UNESP sendo a genotipagem realizada por meio do BovineHD BeadChip. A consistência dos dados foi realizada por meio do programa estatístico SAS. As análises de associação foram realizadas utilizando 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). Os gráficos Manhattan foram construídos considerando níveis de significância para os marcadores de 5 e 1%, além de utilizar do teste de Bonferroni ao nível de 5% de significância para todas as características. Dos 15.745 SNPs, 431 e 1430 SNP foram associados significativamente ao nível de 1% e 5%, respectivamente. O presente estudo de associação genômica em bubalinos constatou que existem SNP significativos que afetam a produção de proteína do leite de búfalas.

Palavras-chave: bubalinos leiteiros, SNP, seleção

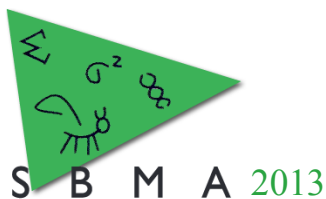
Genomic association study of single nucleotide polymorphism with milk protein of buffaloes

Abstract: Breeding programs have been seeking alternatives to identify SNP responsible for the phenotypic variation of these economically important traits. The objective was genomic association study of single nucleotide polymorphisms with milk protein of buffalo. The phenotypic data of the milk protein (PROT) were from 384 buffaloes belonging to the database of the Department of Zootecnia FCAV-UNESP / Jaboticabal, SP. DNA samples were collected from follicles and laboratory analyzes were performed at the Laboratory of Molecular Genetics FCAV / UNESP genotyping being performed through 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 graphs were constructed considering Manhattan significance levels for markers of 5 and 1%, in addition to using the Bonferroni test at 5% significance level for all traits. Of 15,745 SNP, 431 and 1430 SNP were significantly associated with levels of 1% and 5% respectively. This genome association study in buffalo found that there are significant SNPs that affect protein production of buffalo milk.

Keywords: milking buffaloes, SNP, selection

Introdução

O leite de búfalas comparado ao de vacas apresenta uma melhor constituição, devido ter maiores teores de gordura, proteína e sólidos totais (AHMAD et al., 2008). Estes constituintes juntamente com a quantidade de leite produzida determinam o valor econômico deste leite considerado de alta qualidade.



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Segundo Tonhati et al. (2008), os favoráveis atributos do leite bubalino somado à grande demanda de queijo “mozzarella” tem permitido aos laticínios praticarem preços remuneradores aos produtores.

Visando selecionar animais com alto valor genético para características de importância econômica, os programas de melhoramento genético vêm buscando alternativas para identificar QTLs responsáveis pela variação fenotípica para características de interesse. A utilização da seleção genômica, que utiliza de plataformas de alta densidade de marcadores espalhados em todo o genoma, é uma das alternativas, ultimamente empregada, para encontrar, com base nos valores genômicos preditos, marcadores do tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) que afetam principalmente as características medidas em um só sexo e de alto custo de mensuração, como é o caso da produção de leite e seus constituintes. Com isso presente trabalho teve como objetivo estudar a associação genômica de polimorfismos de base única com a produção de proteína do leite de búfalas.

Material e Métodos

A base de dados utilizada foi oriunda de 384 búfalas (*Bubalus bubalis*), nascidas entre 2007 e 2008, pertencentes a duas importantes fazendas leiteira do estado do Rio Grande do Norte e São Paulo, Brasil, que integram o banco de dados mantido pelo Departamento de Zootecnia da FCAV-UNESP/Jaboticabal, SP, Brasil. Os animais foram criados em pasto e suplementados durante o período seco (abril a setembro). A produção média de proteína do rebanho foi de $67,16 \pm 21,86$ kg.

A PROT não foi ajustada 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.

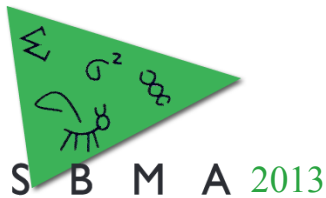
As amostras de DNA foram coletadas de folículos capilares, armazenados individualmente em envelopes identificados para cada animal e mantidos a 4°C até sua extração pela técnica de Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal, SP. Em seguida foi realizada a genotipagem dos animais 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.

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.

Para realização das análises de associação, foi considerando apenas um marcador por vez utilizando do comando MACRO e do procedimento MIXED do programa SAS (9.2, SAS Institute Inc., NC, USA). Foi considerado 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). Foram construídos gráficos do tipo Manhattan por meio do pacote de instruções GAP do software R (R Development Core Team, 2012), considerando 1% e 5% de significância para os marcadores. Também foi utilizado o teste múltiplo de Bonferroni ($p < 1,12 \times 10^{-7}$) ao nível de 5% para a característica.

Resultados e Discussão

Do total de 15,745 SNPs que passaram no controle de qualidade, 431 SNPs foram associados significativamente ($p < 0,01$) com a produção de proteína do leite. Para um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), a quantidade de marcadores SNPs aumentou substancialmente para 1430 (Figura 1). Segundo Womack (2005), é possível encontrar no genoma bubalino, marcadores do tipo SNP significativos utilizando de um chip de SNP bovino pelo fato de serem espécies animais altamente relacionadas.



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

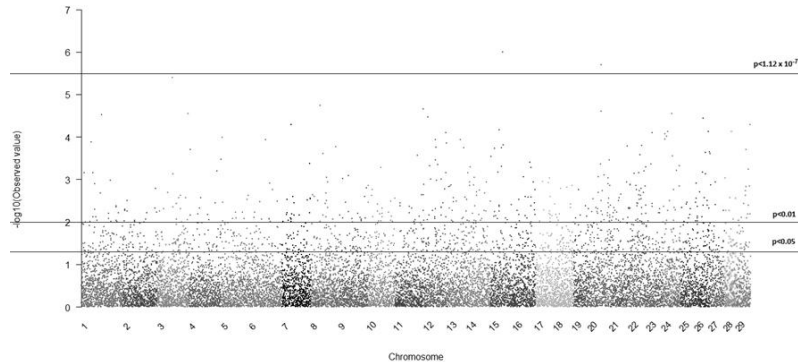


Figura 1. Gráficos de Manhattan dos resultados da associação genômica para produção de proteína em bubalinos. Valores acima de $-\log P > 2$ são equivalentes a $p < 0,01$.

Os cromossomos 20 e 22 do genoma bovino foram os que apresentaram os maiores números de marcadores SNP significativos ($p < 0,01$) para a característica de produção de proteína. Estes dois cromossomos apresentaram um total de 30 SNP cada (Figura 1). Meredith et al. (2012) trabalhando com um total de 1,529 SNP de animais Holstein-Friesian na Irlanda observaram para produção proteína 385 SNP associados significativamente com a característica em questão.

Em bovinos leiteiros da raça Pardo Suíço, Guo; Jorjani e Carlborg (2012) relataram um total de 74 SNP significativos espalhados dentro de 12 cromossomos (1, 5, 6, 8, 11, 12, 17, 20, 24, 25, 28 e 29) que afetam características de produção e estatura dos animais. Estes autores encontraram maior concentração de SNP significativos no cromossomo 25, sendo 3 SNP para produção de proteína. Mai et al. (2010) observaram para índices de produção de proteína um total de 18 marcadores.

Conclusões

O presente estudo de associação genômica em bubalinos constatou que existem 431 SNPs foram associados significativamente ($p < 0,01$) que afetam a produção de proteína de búfalas.

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.
- 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.
- TONHATI, H., CERÓN-MUÑOZ, M.F., OLIVEIRA, J.A., EL FARO, L., FERREIRA, A.L., ALBUQUERQUE, L.G. Test-day milk yield as a selection criterion for dairy buffaloes (*Bubalus bubalis* Artiodactyla, Bovidae). **Genet. Molec. Biol.**, v.31, p.674-679, 2008.
- WOMACK, J.E. Advances in livestock genomics: Opening the barn door. **Genome Res.**, v.15, p.1699-1705, 2005.