

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

Polimorfismos no gene JY-1 e suas associações com ocorrência de prenhez precoce e idade ao primeiro parto em fêmeas bovinas¹

Gregório Miguel Ferreira de Camargo², Raphael Bermal Costa², Lucia Galvão de Albuquerque³, Luciana Correia de Almeida Regitano⁴, Fernando Baldi³, Humberto Tonhati³

¹Parte da tese de doutorado do primeiro autor. Financiado pela Fapesp

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/Unesp Jaboticabal-SP. Bolsista Fapesp. E-mail: gregoriocamargo@hotmail.com

³Departamento de Zootecnia – FCAV/Unesp-Jaboticabal-SP

⁴Empraba Pecuária Sudeste – São Carlos-SP

Resumo: Características reprodutivas possuem alto valor econômico e são interessantes de serem incluídas nos objetivos de seleção. Marcadores moleculares podem ser inseridos na avaliação genética a fim de melhorar a acurácia de predição. A proteína JY-1 tem sua expressão no óvulo e está associada à foliculogênese e ao desenvolvimento inicial do embrião, podendo afetar as características reprodutivas. 385 fêmeas bovinas da raça Nelore foram estudadas para as regiões dos éxons um e dois do gene JY-1 pela técnica de PCR-sequenciamento. Foram descobertos 17 polimorfismos. Após as análises de desequilíbrio de ligação, foram feitos testes de associação com oito SNPs com as características de ocorrência de prenhez precoce e idade ao primeiro parto. Quatro SNPs foram significativos para cada uma das características, sendo que o mais significativo para ocorrência de prenhez precoce, o SNP 12.999 ($p=0,003$) pode estar relacionado ao silenciamento do gene, pois afeta o códon da metionina inicial. O gene JY-1 mostrou influenciar as características reprodutivas, sendo que o estudo de outras regiões e a influência em outras características são interessantes de serem feitos.

Palavras-chave: PCR-sequenciamento, metionina inicial, Nelore, SNP

Polymorphisms in JY-1 gene and their association with sexual precocity and age at first calving in cattle

Abstract: Reproductive traits have a high economic value and are interesting to be included in the selection aims. Molecular markers may be included in the genetic evaluation in order to improve the prediction of accuracy. The JY-1 protein is expressed in the ovum and it is associated to the folliculogenesis and to the initial development of the embryo, it may affect the reproductive traits. A total of 385 Nelore females were studied to the regions of exon 1 and 2 of JY-1 gene by PCR-sequencing. A total of 17 polymorphisms were detected. After the disequilibrium linkage analyses association tests were done with eight SNPs with sexual precocity and age at first calving. Four SNPs were significant for each of the traits. The most significant to sexual precocity, the SNP 12,999 ($p=0.003$) may be related to the gene silencing, because it affects the codon of the initial methionine. The gene JY-1 influences the reproductive traits, so the study of other regions and the influence in other traits are interesting to be done.

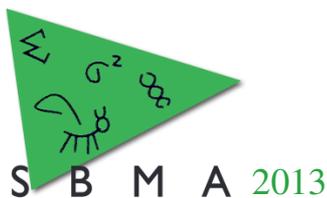
Keywords: PCR-sequencing, initial methionine, Nelore, SNP

Introdução

As características reprodutivas têm elevado valor econômico associado em sistemas de produção de bovinos de corte de origem zebuína (Brumatti et al., 2011) sendo interessante inseri-las nos objetivos de seleção como forma de aumentar a lucratividade da produção.

Análises genômicas utilizam informações na forma de SNP distribuídas por todo o genoma como forma de melhorar a avaliação genética. Todavia, é difícil ponderar entre um modelo mais ou menos conservador. O modelo mais conversador possui poucos SNPs, mas muito significativos; e o menos, mais SNPs, mas que são potencialmente falsos (Fortes et al., 2010). Assim, o conhecimento dos genes candidatos por ser incorporado em estratégias de seleção genômica futuras (Fortes et al., 2010).

A proteína JY-1, descrita por Bettegowda et al. (2007), é de origem materna e está associada à foliculogênese e ao desenvolvimento inicial do embrião. de Camargo et al. (2013) fizeram um estudo de



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

busca por polimorfismos nos éxons do gene JY-1 em novilhas da raça Nelore e encontraram 18 polimorfismos.

Assim, o objetivo desse estudo foi verificar a influência de alguns polimorfismos previamente detectados para o gene JY-1 em idade ao primeiro parto (IPP) e ocorrência de prenhez precoce (OPP) em fêmeas bovinas da raça Nelore.

Material e Métodos

As extrações de DNA das amostras de fôculo piloso coletadas foram realizadas pela metodologia de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico de 385 fêmeas da raça Nelore nascidas no ano de 2008.

Foram utilizados dois pares de *primers* para amplificar as regiões dos éxons um e dois do gene JY-1 como descrito em de Camargo et al. (2013).

As reações de amplificação tinham um volume final de 15µL, contendo 1,5µL de DNA (105 ng), 1,5µL de cada um dos *primers* (15 pM), 7,5µL de GoTaq Colorless Master Mix e 4,0 de água (nuclease free). Os ciclos de amplificação seguiram em termociclador MasterCycler Gradient 5331 (Eppendorf®, Alemanha, 2005) sob a programação: desnaturação a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, paremanto a temperatura descrita em de Camargo et al. 2013 por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min.

O produto de PCR foi sequenciado a partir de um dos *primers* (*forward* ou *reverse*) usando a técnica de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (ddNTPs) utilizando o ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems).

Para a análise e identificação dos polimorfismos, as sequências obtidas foram analisadas e visualizadas com os programas CodonCode Aligner disponível no site (<http://www.codoncode.com/aligner/download.htm>).

O desequilíbrio de ligação entre os SNPs foi estimado com o uso do programa computacional Plink (disponível no site <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>).

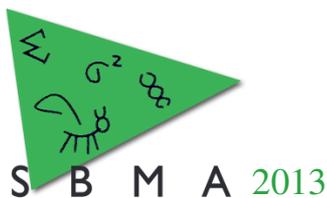
Para as análises de variância da característica de ocorrência de prenhez precoce e de idade ao primeiro parto foram utilizados os aplicativos PROC GLIMMIX e PROC MIXED do aplicativo do pacote estatístico SAS 9.2 respectivamente para as características e usados 298 (OPP) e 212 (IPP) animais. O modelo estatístico usado continha os fixos de grupo de contemporâneo (definido como grupo de manejo de nascimento, desmama e sobreano para OPP; para IPP foi inserido também estação de nascimento além dos anteriores), touro (efeitos fixo para OPP e aleatório para IPP) e dos oito SNPs estudados ao mesmo tempo (efeitos fixos).

Resultados e Discussão

Foram encontrados 17 polimorfismos nos fragmentos amplificados das 385 fêmeas, sendo que 14 desses polimorfismos haviam sido descritos por de Camargo et al. (2013) na caracterização das regiões exônicas do gene (-107, -91, -45, 1, 202, 12.972, 12.999, 13.038, 13.043, 13.048, 13.084, 13.135, 13.136 e 13.149) e três são novos (130, 392 e 13050).

As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas por contagem. O desequilíbrio de ligação foi feito a fim de avaliar quais polimorfismos segregavam juntos (dados não mostrados). Após a construção dos grupos de SNPs em desequilíbrio, escolheu-se o de melhor frequência genotípica do grupo para associação com as características. Assim, usaram-se oito SNPs como efeitos fixos concomitantemente no modelo estatístico.

Os dados mostram que quatro SNPs foram significativos para cada uma das características (Tabela 1). Para a característica OPP, foram significativos ($p < 0,05$) quatro SNPs (-91, 12.999, 13.043 e 13.050) e para IPP também houve também quatro SNPs significativos ($p < 0,05$) (-91, 392, 13.043 e 13.084) (Tabela 1).



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

Tabela 1. Valores de p dos SNPs para as características estudadas.

SNPs/características	OPP	IPP
-91	0,03	0,03
1	0,94	0,30
130	0,23	0,80
392	0,07	0,03
12.999	0,003	0,37
13.043	0,02	0,02
13.050	0,04	0,27
13.084	0,18	0,03

Esses SNPs estão localizados na região promotora (-91), íntrons (392 e 13.084) e éxons (12.999, 13.043 e 13.050), sendo que os três localizados em éxons causam trocas de aminoácidos. O SNP 12.999 troca uma metionina por uma lisina, o SNP 13.043, uma leucina por uma isoleucina e o SNP 13.050, uma serina por uma asparagina. O mais significativo dos SNPs foi o 12.999 ($p=0,003$), ele troca a metionina inicial por uma lisina, podendo ser um indício de o gene ser silenciado. Ou seja, o ribossomo torna-se incapaz de reconhecer o códon inicial de transcrição do RNAm pela ausência do códon da metionina e a proteína JY-1 não é sintetizada, afetando a expressão do fenótipo.

Outros estudos de associação de polimorfismos do mesmo gene com OPP foram apresentados por de Camargo et al. (2012) para SNPs presentes no éxon 3 significativos a 8%. Esses resultados já sinalizavam a influência do gene em características reprodutivas.

Para IPP, esses são os primeiros resultados de associação de polimorfismos nesse gene.

Conclusões

Foram encontrados SNPs no gene JY-1 significativos para as características de ocorrência de prenhez precoce e idade ao primeiro parto em fêmeas da raça Nelore. Esse estudo preliminar indica que esse gene influencia a reprodução em bovinos, assim mais estudos com outras regiões do gene e outras características devem ser feitos a fim de quantificar a influência e verificar a possibilidade de inclusão dessas informações na avaliação dos animais.

Agradecimentos

Agradece-se à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo auxílio regular e bolsa de estudos do primeiro autor.

Literatura citada

BETTEGOWDA, A. et al JY-1, an oocyte-specific gene, regulates granulosa cell function and early embryonic development in cattle **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p.17602-17607, 2007.

BRUMATTI, R. C. FERRAZ, R. C., ELER, J. P. Desenvolvimento de índices de seleção em gado de corte sob enfoque de um modelo bioeconômico. **Archivos de Zootecnia.**, v.60, p. 205-213, 2011.

DE CAMARGO, G.M.F. et al. Characterization of the exonic regions of the JY-1 gene in zebu cattle and buffaloes. **Reproduction in Domestic Animals**, p.1-5, 2013

DE CAMARGO, G.M.F. et al. First polymorphisms in JY-1 gene in cattle (*Bos taurus indicus*) and their association with sexual precocity and growth traits. **Molecular Biology Reports**, v.39, p.10105–10109, 2012.

FORTES, M. R. S. et al. Association weight matrix for the genetic dissection of puberty in beef cattle. **PNAS**, v.107, p. 13642–13647, 2010.