

POLIMORFISMO LISINA-232/ALANINA NO GENE *DGAT1* EM RAÇAS BOVINAS CRIADAS NO BRASIL

Andréa A. Egito¹

Maria do Socorro M. Albuquerque²

Marília C. R Pappas³

Samuel R. Paiva⁴

Dário Grattapaglia⁵

Concepta McManus⁶

Silvia Ribeiro Castro⁷

Leonardo Daniel de Almeida⁸

Paloma André Cunha⁹

Arthur da Silva Mariante¹⁰

Resumo

Está se realizando a caracterização genética de raças bovinas criadas no Brasil para genes candidatos conhecidos e associados a fenótipos de interesse econômico. A substituição K232A (AAG→GCG) no gene *DGAT1* foi relacionada à variação na porcentagem de gordura no leite e com o grau de marmoreio na avaliação da qualidade da carne. A frequência, para duas variantes alélicas conhecidas, do loco *DGAT1* por PCR-*Cfr1*RFLP foi estimada pela genotipagem de um total de 332 animais, *Bos taurus* e *B. indicus*, não aparentados, das seguintes raças brasileiras naturalizadas: Caracu

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

⁴ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

⁵ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

⁶ Universidade de Brasília, Brasília, DF

⁷ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

⁸ Bolsista iniciação Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁹ Bolsista iniciação Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

¹⁰ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

(CA), Crioulo Lageano (CL), Curraleiro (CU), Mocho Nacional (MN), Pantaneiro (P), Guzerá (GU), Gir (GI), e Nelore (N), assim como para as raças Holandesa (Hol) e Jersey (J). O alelo selvagem, associado ao alto teor de gordura no leite e que codifica a lisina (DGAT1^K), teve uma frequência de 100% nas raças *Bos indicus* N e GU e de 92% na GI, com o alelo DGAT1^A aparecendo somente em heterozigose. Nas raças taurinas, por outro lado, a frequência do alelo DGAT1^K foi de 67% no MN, 55% no J, 50% no CL, P e CU e de 30% no CA e Hol. A alta frequência para o DGAT1^K em *B. indicus*, quando comparado com *B. taurus*, está de acordo com as expectativas em relação ao conteúdo de gordura no leite. Entretanto, este resultado não dá respaldo à hipótese que este mesmo alelo esteja associado ao alto grau de marmoreio da carne nesta espécie. Estes resultados também sugerem que o baixo teor de marmoreio observado em raças zebuínas é controlado provavelmente por outros genes e não pelo DGAT1.

Palavras chave: conteúdo de gordura no leite, marmoreio, raças naturalizadas, PCR-RFLP.

LYSINE-232/ALANINE POLYMORPHISM AT THE DGAT1 GENE IN BOVINE BREEDS RAISED IN BRAZIL

ABSTRACT

Genetic characterization of a number of bovine breeds raised in Brazil for known candidate genes associated with economically interesting phenotypes are carrying out. The K232A substitution (AAG→GCG) in the gene DGAT1 has been fully described as involved both in milk fat content variation and marbling score in meat quality assessment. We estimated the frequency of the two

known allelic variants at the DGAT1 locus by PCR-Cfr1RFLP genotyping a total of 332 unrelated animals of *Bos taurus* and *B. indicus* of the following naturalized Brazilian breeds Caracu (CA), Crioulo Lageano (CL), Curraleiro (CU), Mocho nacional (MN), Pantaneiro (P), Guzerá (GU), Gir (GI), and Nelore (N) as well as the common breeds Frisian (F) and Jersey (J). The wild-type high milk fat content associated lysine encoding allele (DGAT1^K) had 100% frequency in *Bos indicus* N and GU breeds, 92% in GI with the DGAT1^A allele appearing only in heterozygosity. In *B. taurus* breeds, on the other hand, the DGAT1^K frequency was 67% in MN, 55% in J, 50% in CL, P and CU and 30% in CA and F. The results of higher allele frequency for (DGAT1^K) in *B. indicus* as compared to *B. taurus* comply with expectations in relation to milk fat content. However they do not support the hypothesis that this same allele is associated with higher marbling scores in this species. These results also suggest that the very limited variation for marbling score observed in *B. indicus* is most likely controlled by genes other than DGAT.

Key words: Milk fat content, Marbling, native breeds, PCR-RFLP

INTRODUÇÃO

A manutenção das raças naturalizadas depende de sua inserção nos sistemas de produção existentes. Animais das raças naturalizadas apresentam uma carne macia, com sabor diferenciado, e, embora isto nunca tenha sido cientificamente provado, pode estar relacionado ao fato destes animais serem oriundos de raças taurinas. Vários fatores estão envolvidos nas características relacionadas à qualidade da carcaça.

A gordura intramuscular analisada subjetivamente como marmoreio da

carne, varia entre indivíduos e raças com herdabilidade de até 0,65 e está correlacionado com características como a suculência, sabor e maciez da carne (MARSCHALL, 1999). Diversos estudos demonstraram menor maciez da carne em raças zebuínas (SHACKELFORD et al., 1991; FRIES e RUVINSKY, 1999) e sabe-se que raças desta origem possuem um menor teor de marmoreio (FRIES e RUVINSKY, 1999; MARSCHALL, 1999).

A substituição de uma lisina por uma alanina (K232A) no gene *DGAT1* que codifica a enzima diacilglicerol *O*-aciltransferase, que catalisa a última etapa da síntese de triglicérides (CASES et al., 1998), foi associada ao conteúdo de gordura de leite (GRISART et al., 2004; WINTER et al. 2002). O alelo considerado ancestral, denominado $DGAT^k$ (lisina) leva a um aumento da quantidade de gordura e a diminuição do conteúdo protéico e volume do leite (SPELMAN et al., 2002). Thaller et al. (2003) sugere que este polimorfismo também possa estar associado ao marmoreio da carne em animais da raça Holandesa e Charolesa.

Como parte do programa de caracterização genética de raças bovinas criadas no Brasil, além das análises da estrutura populacional realizadas com diferentes marcadores moleculares, estão sendo genotipadas diferentes raças quanto à variação alélica para genes candidatos de importância econômica. Neste estudo, foi estimada a frequência do polimorfismo lisina/alanina do gene *DGAT1*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram genotipados 332 indivíduos das seguintes raças bovinas: Caracu (41), Crioulo Lageano (36), Curraleiro (35), Mocho Nacional (33),

Pantaneiro (35), raças naturalizadas de origem taurina; Holandês (25) e Jersey (29), raças taurinas e; Gir (30), Guzera (35) e Nelore (32), raças zebuínas.

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras sanguíneas previamente extraídas e armazenadas no Banco de DNA do Laboratório de Genética Animal (LGA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A genotipagem foi feita pela técnica PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism). Um fragmento de 411pb do gene *DGAT1*, onde se localiza a substituição K232A, foi amplificado com o *primer* descrito por Winter et al. (2002). As reações de PCR foram feitas com um volume final de 13µl, utilizando-se 9 ng de DNA genômico; tampão 1x; 1,0 mM de $MgCl_2$, 200uM de cada dNTP, 0,12µM de *primer*, 8% de BSA e 1,0UI de Taq DNA polimerase.

Para a detecção das variantes alélicas, 5µl do DNA amplificado foram digeridos com 1,5 UI da enzima de restrição *CfrI* por 1h a 37°C, seguido de inativação a 65° C por 20 minutos. A separação dos produtos digeridos foi feita em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (fig.1).

Amostras de três indivíduos de genótipos distintos foram seqüenciadas (fig.2) visando auxiliar a identificação dos fragmentos digeridos observados no gel de agarose.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Pela digestão enzimática do fragmento de 411bp com a enzima de restrição *CfrI*, que caracteriza o alelo $DGAT^A$, foi possível identificar os homozigotos para a variante lisina (não há digestão), homozigotos para a variante alanina (fragmentos de 203 e

208 pb) e os indivíduos heterozigotos (fig. 1). A digestão enzimática parcial observada nos indivíduos homozigotos para a variante alanina (DGAT^A) foi confirmada pelo sequenciamento de alelos de diferentes indivíduos com genótipos distintos (fig. 2).

O gráfico da figura 4 apresenta a frequência alélica observada nas 10 raças analisadas. O alelo selvagem, associado ao alto teor de gordura no leite e que codifica a lisina (DGAT^K), teve uma frequência de 100% nas raças *Bos indicus* Nelore e Guzerá e de 92% na raça Gir, com o alelo DGAT^A aparecendo somente em heterozigose. Nas raças taurinas, por outro lado, a frequência do alelo DGAT^K foi de 67% na raça Mocho Nacional, 55% na raça Jersey, 50% no Crioulo Lageano, Pantaneiro e Curraleiro e de 30% na raça Caracu e Holandesa. Os índices de heterozigosidade observados podem ser visualizados na Tabela 1 sendo que o maior nível foi observado na raça Crioulo Lageano (0,57). Na raça Caracu a frequência elevada do alelo DGAT^A pode ser explicada pela inclusão, na amostra analisada, de um rebanho selecionado para produção leiteira.

A alta frequência para o DGAT^K em *B. indicus*, quando comparado com *B. taurus*, está de acordo com as expectativas em relação ao conteúdo de gordura no leite nestas populações. Raças zebuínas embora produzam pouco leite quando comparadas às raças taurinas, possuem teor de gordura superior (JARDIM, 1973). Desta forma, os dados aqui observados condizem com estas informações, uma vez que o alelo selvagem (DGAT^K) está associado com uma menor produção leiteira e uma maior porcentagem de gordura no leite (SPELMAN et al., 2002) como pode ser observado nas raças zebuínas como a raça Nelore.

Nas raças taurinas especializadas, a diferença observada entre as raças Jersey e Holandesa (45% e 70%, respectivamente, para o alelo DGAT^A) também dão o respaldo necessário para a comprovação da relação destes alelos com a produção leiteira. A maior frequência para o alelo DGAT^A na raça Holandesa quando comparada com a raça Jersey condiz com os níveis de produção leiteira destas duas raças, uma vez que a raça Holandesa tem uma maior produção leiteira, mas com um menor teor de gordura (ao redor de 3,5%) quando comparada com a raça Jersey, que possui uma aptidão manteigueira com teores de gordura no leite alcançando uma média de 5,3% e uma produção leiteira mediana.

Sabidamente, raças zebuínas possuem um grau de marmoreio médio menor que raças taurinas (FRIES e RUVINSKY, 1999; MARSCHALL, 1999). Desta forma, os resultados observados neste trabalho não dão respaldos à hipótese que o alelo DGAT^K esteja associado ao alto grau de marmoreio da carne, nesta espécie, conforme sugere Thaller et al. (2003). Este alelo está praticamente fixado nas raças Nelore e Guzerá e ocorre em alta frequência na raça Gir, onde o alelo DGAT^A aparece em apenas 8% dos animais e em heterozigose (figura 4). Estes resultados sugerem que o teor de marmoreio da carne na espécie bovina é controlado provavelmente por outros genes e não pelo DGAT1.

Kaupe et al. (2004), ao estudar diferentes raças bovinas observaram resultados semelhantes aos obtidos em nosso estudo. O alelo DGAT^A está fixado em algumas raças taurinas enquanto que o DGAT^K parece estar fixado em determinadas raças zebuínas, o que levou o autor a sugerir que a substituição K232A no alelo DGAT^K tenha ocorrido, provavelmente,

após a divergência das subespécies taurina e zebuína.

que outros genes devem, provavelmente, controlar esta característica.

CONCLUSÕES

Embora a enzima DGAT1 exerça uma função fisiológica, ao catalisar a reação final da síntese de triglicérides, que pudesse ser compatível com a deposição de gordura intramuscular, os resultados observados sugerem que o alelo $DGAT1^K$, relacionado com o aumento de gordura, diminuição do volume e conteúdo protéico no leite; não está relacionado ao alto teor de marmoreio na espécie bovina, sendo

As raças naturalizadas, como a raça Pantaneira, possuem quando comparadas com as raças especializadas uma grande variabilidade genética o que evidencia o potencial enorme para o melhoramento genético. A partir da utilização de animais que possuam o alelo $DGAT^A$ em sistemas de cruzamento preferencial, por exemplo, seria possível incrementar a produção leiteira desta raça.

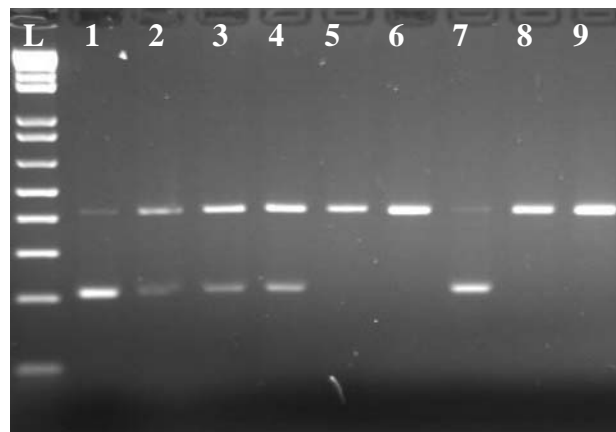


Figura 1. Digestão enzimática do fragmento de 411 bp do gene $DGAT1$ com a enzima de restrição $CfrI$. L – Ladder 1Kb plus; pistas 1 e 7 – homozigotos $DGAT^A/DGAT^A$; pistas 2, 3 e 4 – heterozigoto; 5, 6 e 8 – homozigoto $DGAT^K/DGAT^K$; 9 – controle de fragmento não digerido

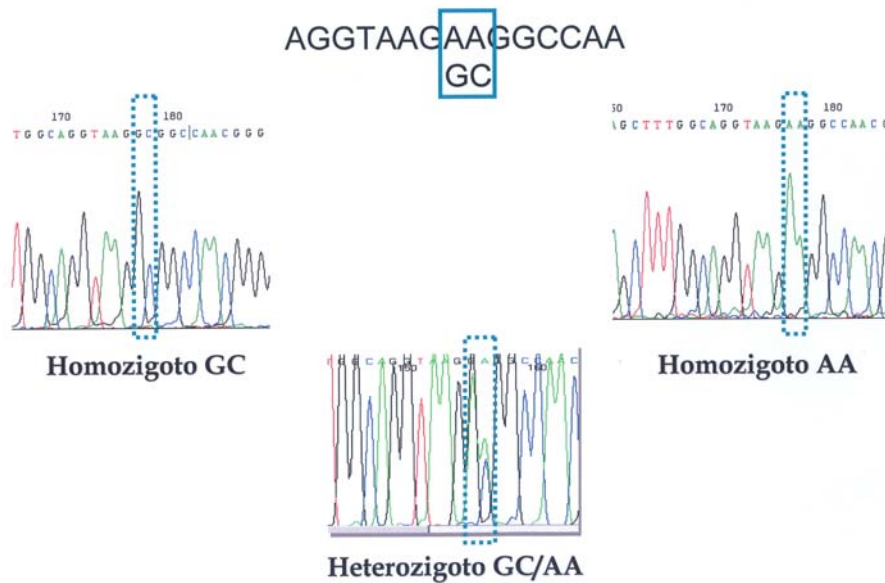


Figura 2. Sequenciamento de genótipos distintos do gene *DGAT1*. Homozigoto GC – $DGAT^A/DGAT^A$; Homozigoto AA – $DGAT^K/DGAT^K$ e Heterozigoto GC/AA – $DGAT^A/DGAT^K$.

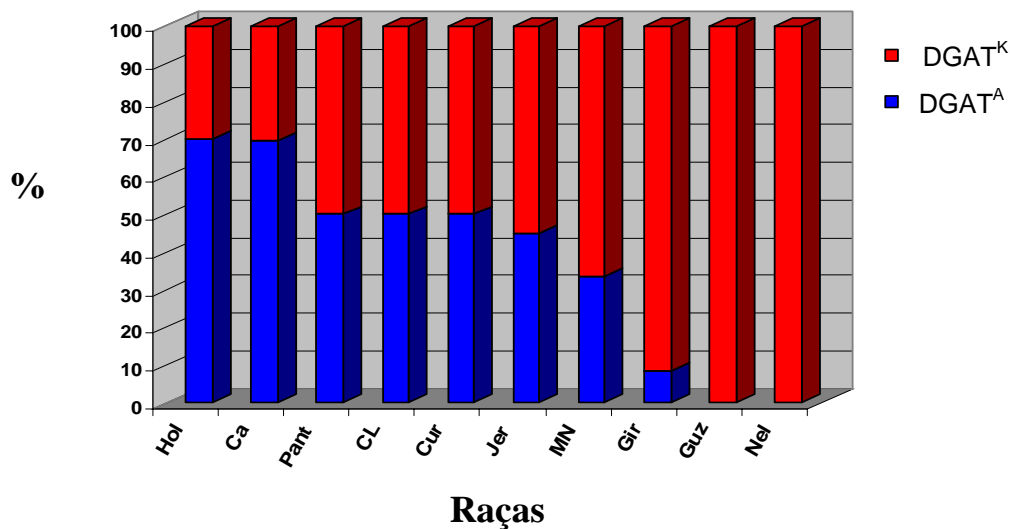


Figura 3. Distribuição de freqüências alélicas ao gene *DGAT1* em 10 raças bovinas analisadas. (Hol – Holandesa; Ca – Caracu; Pant – Pantaneiro; CL – Crioulo Lageano; Cur – Curraleiro; Jer – Jersey; MN – Mocho Nacional; Gir – Gir; Guz – Guzerá; Nel – Nelore)

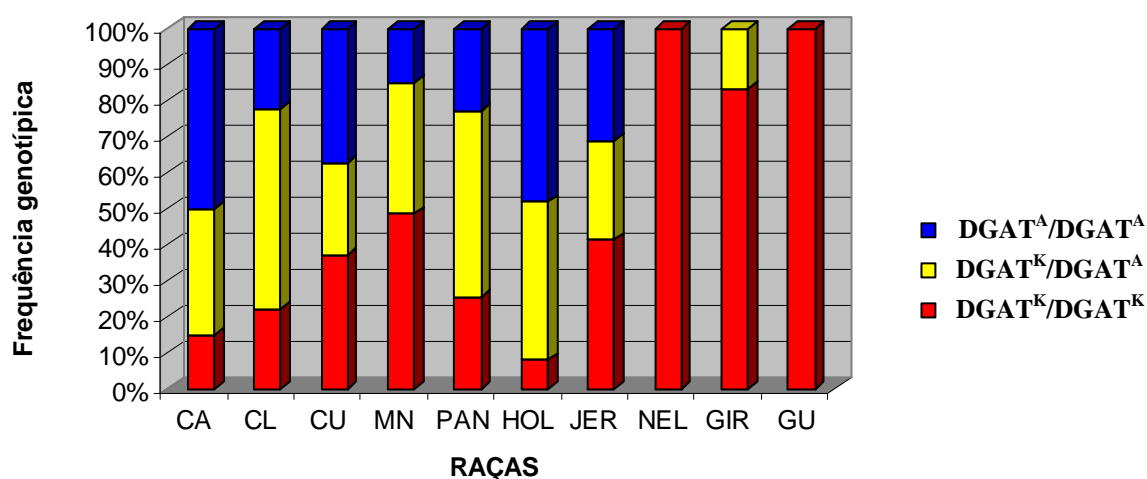


Figura 4. Distribuição de frequências genotípicas do gene DGAT1 nas 10 raças bovinas analisadas. (Hol – Holandesa; Ca – Caracu; Pant – Pantaneiro; CL – Crioulo Lageano; Cur – Curraleiro; Jer – Jersey; MN – Mocho Nacional; Gir – Gir; Guz – Guzerá; Nel – Nelore)

Tabela 1. Heterozigosidade observada nas raças estudadas. (N – número de indivíduos analisados)

Raça	N	Heterozigosidade observada	Desvio Padrão
Caracu	41	0,37	0,07
Crioulo Lageano	36	0,55	0,08
Curraleiro	35	0,26	0,07
Gir	30	0,17	0,07
Guzerá	35	0,00	0,00
Holandês	25	0,44	0,09
Jersey	29	0,28	0,08
Mocho Nacional	33	0,36	0,08
Nelore	32	0,00	0,00
Pantaneiro	35	0,49	0,08

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASES, S.; SMITH, S. J.; ZHENG, Y. W.; MYERS, H. M.; LEAR, S. R.; SANDE, E.; NOVAK, S.; COLLINS, C.; WELCH, C. B.; LUSIS, A. J.; ERICKSON, S. K.; FARESE JUNIOR, R. V. Identification of gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 95, p. 13018-13023, 1998.

FRIES, R.; RUVINSKY, A. **The genetics of cattle**. [S. l.]: CABI Publishing, 1999. 710p.

GRISART, B.; FARNIR, F.; KARIM, L.; CAMBISANO, N.; KIM, J. J.; KVASZ, A.; MNI, M.; SIMON, P.; FRERE, J. M.; COPPIETERS, W.; GEORGES, M. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 101, n. 8, p. 2398-2403, 2004.

JARDIM, V. R. **Curso de Bovinocultura**. 4. ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1973. 518 p.

KAUPE, B.; WINTER, A.; FRIES, R.; ERHARDT, G. *DGAT1* polymorphism in *Bos indicus* and *Bos Taurus* cattle breeds. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 71, p. 182-187, 2004.

MARSCHALL, D. M. Genetics of meat quality. In: FRIES, R.; RUVINSKY, A. **The Genetics of Cattle**. Wallingford: CABI Publishing, 1999. p. 605-636.

SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M. F.; CROUSE, J. D.; REAGAN, J. O. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 171, 1991.

SPELMAN, R. J.; FORD, C. A.; MCELHINNEY, P.; GREGORY, G. C.; SNELL, R. G. Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. **Journal of Dairy Science**, Savoy, USA, v. 85, p. 3514-3517, 2002.

THALLER, G.; KÜHN, C.; WINTER, A.; EWALD, G.; BELLMANN, O.; WEGNER, J.; ZÜHLKE, H.; FRIES, R. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. **Animal Genetics**, Oxford, v. 34, p. 354-357, 2003.

WINTER, A.; KRÄMER, W.; WERNER, F. A. O.; KOLLERS, S.; KATA, S.; DURSTEWITZ, G.; BUITKAMP, J.; WOMACK, J. E.; THALLER, G.; FRIES, R. Association of a lysine-232_alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 99, p. 9300-9305, 2002.

<p>Comunicado Técnico, 134</p> <p>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</p>	<p>Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Serviço de Atendimento ao Cidadão Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624 http://www.cenargen.embrapa.br e.mail:sac@cenargen.embrapa.br</p> <p>1ª edição 1ª impressão (2005):</p>	<p>Comitê de Publicações</p> <p>Expediente</p>	<p>Presidente: <i>Maria Isabel de Oliveira Penteado</i></p> <p>Secretário-Executivo: <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i></p> <p>Membros: Arthur da Silva Mariante Maria Alice Bianchi Maria da Graça S. P. Negrão Maria de Fátima Batista Maria Isabel de O. Penteado Maurício Machain Franco Regina Maria Dechechi Carneiro Sueli Correa Marques de Mello Vera Tavares de Campos Carneiro</p> <p>Supervisor editorial: <i>Maria da Graça S. P. Negrão</i></p> <p>Normalização Bibliográfica: <i>Maria Iara Pereira Machado</i></p> <p>Editoreção eletrônica: <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i></p>
---	---	--	--