

35

**Circular  
Técnica**Brasília, DF  
Dezembro, 2004**Autores**Marília C.R. Pappas  
Embrapa Recursos Genéticos  
e BiotecnologiaIsabela T. Lourenço  
Embrapa Recursos Genéticos  
e BiotecnologiaLuciana C. de A. Regitano  
Embrapa Pecuária Sudeste  
Bolsista CNPqMaurício M. De Alencar  
Embrapa Pecuária Sudeste  
Bolsista CNPqMarco A. Machado  
Embrapa Gado de LeiteAna L. Campos  
Embrapa Gado de LeiteMário L. Martinez  
Embrapa Gado de LeiteDario Grattapaglia  
Embrapa Recursos Genéticos  
e Biotecnologia**INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO K232A DO GENE *DGAT1* EM  
RAÇAS DE *BOS INDICUS* E SEUS CRUZAMENTOS**

A utilização de marcadores moleculares tem sido proposta para o aprimoramento da seleção direcional de animais domésticos. A utilização de genes e/ou marcadores em desequilíbrio de ligação com genes que controlam características de interesse econômico pode permitir a seleção de animais em idade precoce e com maior acurácia quando integrada à seleção baseada em marcadores morfométricos. Uma forma direcionada de se trabalhar com este tipo de marcadores na busca de resultados, com maior possibilidade de aplicação a curto prazo, é o estudo de polimorfismos diretamente em genes candidatos que desempenhem alguma função biológica de interesse. Vários são os genes conhecidos que apresentam funções de interesse comercial e alguns deles possuem polimorfismos já descritos. Lidando com genes de seqüências nucleotídicas conhecidas, é possível a detecção de alelos para este loco de modo a aplicá-los em estudos de associação com características fenotípicas apresentadas pelos animais. Desta forma, pode-se utilizar um polimorfismo em um determinado gene como marcador molecular para a característica desejada. Um exemplo interessante é o estudo de genes envolvidos na produção de leite. Em 1995, foi descrito um QTL (quantitative trait loci) para conteúdo de gordura no leite em bovinos (GEORGES et al., 1995) que foi, posteriormente, mapeado no cromossomo 14 de *Bos taurus* (BTA14) (RIQUET et al., 1999). Estudos de comparação de mapas físicos e genéticos na região da extremidade centromérica do cromossomo 14, onde está localizado o QTL, revelaram a presença de alguns genes candidatos, entre eles o *dgat1* (GRISART et al., 2002; WINTER et al., 2002). Esse gene codifica a enzima diacilglicerol aciltransferase (DGAT1) que catalisa a reação final da síntese de triglicerídeos (CASES et al., 1998), principais componentes da gordura de depósito, inclusive do leite. Uma alteração no resíduo de aminoácido 232 desta proteína está altamente associada ao conteúdo de gordura no leite. A substituição não conservativa de uma lisina, a condição ancestral, por uma alanina nesta posição leva à redução da gordura no leite (GRISART et al., 2002; WINTER et al., 2002). Acredita-se que este resíduo faça parte, juntamente com outros dois resíduos conservados de lisina, do sítio de

ligação da enzima ao substrato e, por isso, teria influência direta na eficiência da atividade enzimática e, conseqüentemente, na determinação da característica (WINTER et al., 2002). É sugerido que esta substituição (K232A) seja o QTN (*quantitative trait nucleotide*) diretamente responsável pela maior parte da variação fenotípica observada (GRISART et al., 2004). Experimentos com algumas raças taurinas leiteiras analisaram este polimorfismo e associações significativas foram identificadas para o aumento do conteúdo de gordura e diminuição do conteúdo proteico e do volume de leite produzido (SPELMAN et al., 2002). Pela função fisiológica da enzima DGAT1, sugere-se que o polimorfismo K232A possa ter relação também com a deposição de gordura, intramuscular (marmoreio) e subcutânea na carcaça. Estas são características de interesse em raças de bovinos de corte por terem relação com maciez e palatabilidade da carne. Contudo, poucos estudos foram desenvolvidos neste sentido, sem resultados conclusivos (THALLER et al., 2003). Da mesma forma, existem poucos estudos envolvendo este polimorfismo em raças de *Bos indicus* (KAUPE et al., 2004; CASAS et al., 2005). Neste trabalho, um total de 142 animais das raças Gir Leiteiro, Nelore e seus cruzamentos foram genotipados para o SNP K232A utilizando o seqüenciamento direto de um fragmento de 411 pb no gene DGAT1. O objetivo deste estudo foi estimar a frequência desta mutação em zebuínos visando avaliar o possível uso deste polimorfismo como marcador para características de produtividade de leite em raças zebuínas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de sangue periférico de 84 animais da raça Gir Leiteiro do rebanho da Embrapa Gado de Leite; 18 animais da raça Nelore, 14 animais F1 de cruzamentos de vacas Nelore com touros Canchim e 26 F1 de cruzamentos Nelore com Angus do rebanho da Embrapa Pecuária Sudeste (Figura 1). A partir destas amostras, foram amplificados fragmentos de 411 pb contendo o exon VIII do gene DGAT1, região onde está localizado o polimorfismo K232A, por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* descritos na literatura (WINTER et al., 2002). Os produtos da PCR, após purificação por precipitação com isopropanol 65% e etanol 60%, foram seqüenciados na plataforma ABI 3100 utilizando o Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems). A genotipagem dos animais para o polimorfismo foi feita por análise das seqüências geradas em duplicata para cada indivíduo para confirmação do genótipo, afastando a possibilidade de erros de seqüenciamento. A inspeção das seqüências foi feita utilizando os programas Sequencing Analysis v 5.1 (Applied Biosystems) e SeqScape v 2.1 (Applied Biosystems).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As seqüências geradas para os 142 animais em estudo foram inspecionadas para a genotipagem do polimorfismo K232A (Figura 2). Os animais F1 resultantes de cruzamentos de touros Angus ou Canchim com vacas Nelore apresentaram alta heterozigosidade observada ( $H_o = 0,88$  e  $0,86$ , respectivamente) (Tabela 1). De 26 animais F1 de cruzamentos Angus x Nelore, 23 são heterozigotos, e de 14 F1 provenientes de Canchim x Nelore, 12 são heterozigotos. Estes resultados sugerem alta freqüência do alelo codificante para alanina na posição 232 (232A) nos touros Canchim e Angus utilizados nos cruzamentos. A alta freqüência do alelo 232A em Angus foi relatada recentemente (KAUPE et al., 2004) e corrobora os primeiros resultados obtidos no presente projeto. No caso da raça Canchim – 3/8 Charolês, 5/8 Zebuino –, a herança da raça taurina parece ter contribuído gerando alta freqüência do alelo para alanina, tendo em vista os genótipos observados nos animais F1 genotipados.

Os resultados obtidos para os animais Gir Leiteiro revelaram alta freqüência do alelo codificante para lisina na posição 232 (232K) ( $0,96$ ). Apenas 6 indivíduos de um total de 84 são heterozigotos ( $H_o = 0,07$ ). Os genótipos dos 18 animais Nelore sugerem fixação do alelo 232K na raça embora o tamanho amostral deste estudo tenha sido relativamente limitado. Todos os indivíduos são homozigotos para o alelo, o que está em concordância com Winter et al. (2002) que não observaram o alelo 232A em *Bos indicus*, embora não tenham mencionado quais as raças estudadas nem o número de animais genotipados. Casas et al. (2005) observaram 1,1 % de animais homozigotos para o alelo 232A e 17,5% de heterozigotos na raça Brahman.

Sugere-se que o alelo codificante para lisina, 232K, seja o alelo ancestral, já que foi encontrado também em *Bos grunniens* (yak) e *Bubalus bubalus*. Acredita-se que a mutação que levou à alteração de um resíduo de lisina para alanina, na proteína DGAT1, tenha ocorrido após a diferenciação entre as espécies *B. taurus* e *B. indicus*, o que explicaria uma suposta fixação do alelo 232K nos zebuínos (GRISART et al., 2002; WINTER et al., 2002). Contudo, Kaupe et al. (2004) desenvolveram um estudo com 38 raças de bovinos incluindo 34 de *B. taurus*, três de *B. indicus* e uma *B. taurus indicus*. Foi observada a fixação do alelo 232A em cinco das 35 raças de *Bos taurus* e a fixação do alelo 232K em uma única raça de *Bos indicus*, a raça Nelore. Dos 46 animais Nelore genotipados, todos se revelaram homozigotos para o alelo 232K. As outras duas raças de *B. indicus* estudadas, os zebuínos africanos Banyo Gudali e White Fulani, apresentaram altas freqüências do alelo lisina (88–92%, respectivamente), porém não fixado como em Nelore.

Se, de fato, o alelo 232K está fixado em *B. indicus*, as hipóteses que poderiam explicar a observação, neste trabalho, do alelo 232A em baixa freqüência em zebuínos da raça Gir Leiteiro seriam: 1) não existe fixação do alelo 232K em *B. indicus* embora sua freqüência seja muito mais alta que a do alelo 232A; 2) na

população estudada, houve introgressão ancestral com *B. taurus* durante o processo de seleção e melhoramento. A segunda hipótese é corroborada pelo trabalho de Meirelles et al. (1999) que descreve a presença de grande proporção de DNA mitocondrial de origem taurina em animais das raças Gir e Nelore. Contudo, os resultados ainda preliminares disponíveis sobre o polimorfismo K232A no gene DGAT1 não permitem afirmar com segurança, qual a razão desta observação.

Raças zebuínas produzem leite rico em gordura e em menor volume que as tradicionais raças taurinas leiteiras. A alta frequência do alelo 232K observada em raças zebuínas, é, portanto, condizente com os resultados obtidos em estudos de associação desenvolvidos para raças taurinas. O efeito de substituição do alelo 232A pelo alelo 232K, observado em populações de Holstein-Friesian e Jersey da Nova Zelândia, foi um aumento de 5,76 e 3,30 kg de gordura presente no leite, respectivamente (SPELMAN et al., 2002); e de 5,23 Kg na população holandesa de Holstein-Friesian (GRISART et al., 2002). Winter et al. (2002) sugerem que o efeito desta substituição alélica explique 10% da variação fenotípica em uma população da raça Fleckvieh com baixa frequência do alelo 232K (0,07). Por outro lado, a presença do alelo 232A está fortemente associada com maior produção total de leite, conforme demonstrado em vários estudos (SPELMAN et al., 2002; GRISART et al., 2002; WINTER et al., 2002; THALLER et al., 2003; WELLER et al., 2003; FISHER e SPELMAN, 2004).

A alta frequência do alelo 232K existente em *B. indicus* sugere que a genotipagem deste polimorfismo terá utilidade limitada para seleção direcional visando maior teor de gordura no leite em zebuínos. Entretanto, assumindo que a associação entre a presença do alelo 232A e maior volume de leite seja válida em *B. indicus*, assim como amplamente descrito em *B. taurus*, a seleção direcional para a presença do alelo 232A em heterozigose poderia ser utilizada com sucesso, de uma forma inovadora, para a seleção de animais zebuínos para uma maior produção de leite. Os resultados deste trabalho, indicando a presença de animais heterozigotos para o alelo 232A em Gir leiteiro, sugerem que este pode ser um caminho interessante, servindo como base para a condução de experimentos de validação desta associação em raças de zebuínos leiteiros.

## BIBLIOGRAFIA

CASAS, E.; WHITE, S.; RILEY, D.; SMITH, T.; BRENNEMAN, R.; OLSON, T.; JOHNSON, D.; COLEMAN, S.; BENNETT, G.; CHASE, C. J. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 13-19, 2005.

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 a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, p. 13018-13023, 1998.

FISHER, P. J.; SPELMAN, R. J. Verification of selective DNA pooling methodology through identification and estimation of the DGAT1 effect. **Animal Genetics**, Oxford, Inglaterra, v. 35, p. 201-205, 2004.

GEORGES, M.; NIELSEN, D.; MACKINNON, M.; MISHRA, A.; OKIMOTO, R.; PASQUINO, A. T.; SARGEANT, L. S.; SORENSEN, A.; STEELE, M. R.; ZHAO, X. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. **Genetics**, Maryland, TX, v. 139, p. 907-920, 1995.

GRISART, B.; COPPIETERS, W.; FARNIR, F.; KARIM, L.; FORD, C.; BERZI, P.; CAMBISANO, N.; MNI, M.; REID, S.; SIMON, P.; SPELMAN, R.; GEORGES, M.; SNELL, R. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 12, p. 222-231, 2002.

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**, Washington, v. 101, p. 2398-2403, 2004.

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

MEIRELLES, F. V.; ROSA, A. J. M.; LÔBO, R. B.; GARCIA, J. M.; SMITH, L. C.; DUARTE, F. A. M. Is the american zebu really Bos indicus? **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 543-546, 1999.

RIQUET, J.; COPPIETERS, W.; CAMBISANO, N.; ARRANZ, J. J.; BERZI, P.; DAVIS, S. K.; GRISART, B.; FARNIR, F.; KARIM, L.; MNI, M.; SIMON, P.; TAYLOR, J. F.; VANMANSHOVEN, P.; WAGENAAR, D.; WOMACK, J. E.; GEORGES, M. Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: application to milk production in dairy cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 96, p. 9252-9257, 1999.

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**, Champaign, IL, v. 85, p. 3514-3517, 2002.

THALLER, G.; KRAMER, W.; WINTER, A.; KAUPPE, B.; ERHARDT, G.; FRIES, R. Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. **Journal of the Animal Science**, Champaign, IL, v. 81, p. 1911-1918, 2003.

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

WELLER, J. I.; GOLIK, M.; SEROUSSI, E.; EZRA, E.; RON, M. Population-wide analysis of a QTL affecting milk-fat production in the Israeli Holstein population. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 86, p. 2219-2227, 2003.

WINTER, A.; KRAMER, W.; WERNER, F. A.; 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**, Washington, v. 99, p. 9300-9305, 2002.



FIG. A



FIG. B

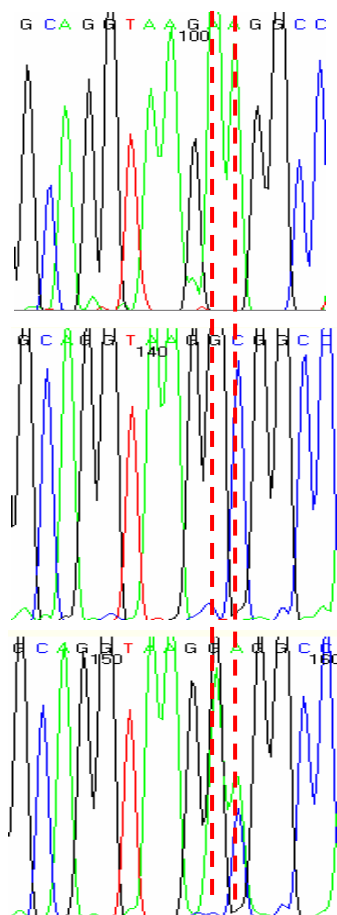


FIG. C



FIG. D

**Figura 1:** *Bos indicus*: vaca e bezerro Nelore (A), vaca Gir leiteiro (B). *Bos taurus*: touro Angus (C). *B. taurus* x *B.indicus*: touro Canchim.



**Figura 2:** Eletroferogramas de fragmentos de PCR na região do polimorfismo K232A de animais: homozigoto para lisina (GAA), homozigoto para alanina (GGC) e heterozigoto, respectivamente.

**Tabela 1:** Número de animais genotipados (n), frequências dos alelos lisina (K), alanina (A) e heterozigosidade (h) do polimorfismo K232A em indivíduos das raças Gir Leiteiro, Nelore, Nelore x Angus e Nelore x Canchim. O número de indivíduos heterozigotos é mostrado entre parênteses.

|                         | n  | f (K) | f (A) | h         |
|-------------------------|----|-------|-------|-----------|
| <b>Gir leiteiro</b>     | 84 | 0,96  | 0,04  | 0,07 (6)  |
| <b>Nelore x Angus</b>   | 26 | 0,55  | 0,45  | 0,88 (23) |
| <b>Nelore x Canchim</b> | 14 | 0,56  | 0,44  | 0,86 (12) |
| <b>Nelore</b>           | 18 | 1     | 0     | 0         |

|                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>CircularTécnica, 35</b></p> <p>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</p> | <p>Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia<br/>Serviço de Atendimento ao Cidadão<br/>Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3666<br/><a href="http://www.cenargen.embrapa.br">http://www.cenargen.embrapa.br</a><br/>e.mail:sac@cenargen.embrapa.br</p> <p>1ª edição<br/>1ª impressão (2004): 150 unidades</p> | <p>Comitê de Publicações</p> <p>Expediente</p> | <p><b>Presidente:</b> <i>Maria Isabel de Oliveira Penteado</i><br/><b>Secretário-Executivo:</b> <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i><br/><b>Membros:</b> Arthur da Silva Mariante<br/>Maria Alice Bianchi<br/>Maria da Graça S. P. Negrão<br/>Maria de Fátima Batista<br/>Maria Isabel de O. Penteado<br/>Maurício Machain Franco<br/>Regina Maria Dechechi Carneiro<br/>Sueli Correa Marques de Mello<br/>Vera Tavares de Campos Carneiro<br/><b>Supervisor editorial:</b> <i>Maria da Graça S. P. Negrão</i><br/>Normalização Bibliográfica: <i>Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado</i><br/><b>Editoração eletrônica:</b> <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i></p> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|