

## VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

São Carlos, SP, 10 e 11 de julho de 2008

### Ocorrência de polimorfismos no gene *DGATI* em novilhas da raça Nelore de um experimento de seleção\*

Inaê Cristina Regatieri<sup>1</sup>, Lucia Galvão de Albuquerque<sup>2</sup>, Leopoldo Andrade de Figueiredo<sup>3</sup>, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante<sup>4</sup>, Fabio Ricardo Pablos de Souza<sup>5</sup>, Humberto Tonhati<sup>6</sup>, Denise Rocha Ayres<sup>7</sup>, Larissa Fernanda Simielli Fonseca<sup>8</sup>, Livia Maria Soares Ferreira<sup>9</sup>, Maria Eliane Verchetini<sup>10</sup>

\*Financiado pela FAPESP

<sup>1</sup>Graduanda em Zootecnia FCAV-UNESP, e-mail: shibinga@hotmail.com, bolsista CNPq

<sup>2</sup>Professor Adjunto FCAV-UNESP, e-mail: lgalb@fcav.unesp.br

<sup>3</sup>Pesquisador da EEZS, IZ/APTA/SAA, e-mail: figueiredo@iz.sp.gov.br

<sup>4</sup>Pesquisador da EEZS, IZ/APTA/SAA, e-mail: mercadante@iz.sp.gov.br

<sup>5</sup>Pós-doutorando FCAV-UNESP, e-mail: fabiopablos@yahoo.com.br

<sup>6</sup>Professor Adjunto FCAV-UNESP, e-mail: tonhati@fcav.unesp.br

<sup>7</sup>Mestranda FCAV-UNESP, e-mail: d.ayres@ig.com.br, bolsista CAPES

<sup>8</sup>Graduanda em Zootecnia FCAV-UNESP, e-mail: la\_simielli@yahoo.com.br, bolsista FAPESP

<sup>9</sup>Graduanda em Zootecnia FCAV-UNESP, e-mail: livinha\_msf@yahoo.com.br, bolsista CNPq

<sup>10</sup>Mestranda FCAV-UNESP, e-mail: mariavechetini@hotmail.com, bolsista CAPES

**Resumo** – Este estudo objetiva analisar polimorfismos (PCR-RFLP) no gene *DGATI* em fêmeas da raça Nelore pertencentes a três linhas de seleção (uma controle e duas seleção) para peso ao sobreano da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho, Instituto de Zootecnia. Para tanto, foi extraído DNA genômico do sangue de 348 animais seguido de amplificação do fragmento correspondente ao íntron 8 deste gene. Foram observados 3 padrões de digestão com a utilização da enzima de restrição *Cfr*I. O alelo K (lisina) foi o mais freqüente em todas as linhas de seleção. As freqüências alélicas diferiram entre o controle e as linhas seleção, sugerindo que este gene possa estar associado ao peso ao sobreano.

**Palavras-chave:** *DGATI*, marcadores moleculares, PCR-RFLP.

### Occurrence of polymorphism in *DGATI* gene in Nelore heifers from a selection experiment

**Abstract:** This study has the objective of analyzing *DGATI* polymorphism (PCR-RFLP) in Nelore females from three selection lines (control and two selected) for yearling weight from the Experimental Station of Sertãozinho, SP. Blood genomic DNA was extracted from 348 animals. After that, the fragment corresponding to intron 8 was amplified. With the use of the restriction enzyme *Cfr*I, 3 patterns were observed. The K allele (lysine) was the most frequent in all selection lines. The allele frequencies were significantly different between the control and the selection lines, suggesting that this gene could be associated to yearling weight.

**Keywords:** *DGATI*, molecular markers, PCR-RFLP.

## Introdução

Polimorfismos do gene *DGATI* têm sido associados a diversas características de importância econômica em *Bos taurus* (CASAS et al., 2003 e 2005). Pelo fato deste gene estar diretamente envolvido com a síntese de triglicerídeos, Casas et al. (2003) apontam como um gene candidato funcional e posicional para deposição de gordura.

O Instituto de Zootecnia mantém, desde 1978, um programa de melhoramento na raça Nelore, incluindo três linhas selecionadas com base no peso ao sobreano, caracterizando um experimento de seleção. É mantida uma linha controle, onde os animais são selecionados para a média de peso ao sobreano e cujo desempenho atual é representativo daquele da população existente na década de 1970 e, duas outras linhas de seleção, nas quais os animais são selecionados para maior peso ao sobreano. Estas linhas constituem um material genético único no Zebu, interessante para a busca de polimorfismos de genes anteriormente associados a características de produção em bovinos de corte.

Assim, este trabalho tem como objetivo verificar a ocorrência de polimorfismos do tipo PCR-RFLP no gene *DGATI* nas três linhas de seleção, e verificar se existem diferenças de frequências genotípicas entre elas.

## Material e Métodos

Foram genotipadas 348 novilhas Nelores nascidas entre 2003 e 2005 na Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho, Instituto de Zootecnia - SP. Desde 1980 os animais estão separados em três linhas, sendo duas delas selecionadas para peso ao sobreano (NeS e NeT), e uma linha controle (NeC), em que os animais mantidos para reprodução estão na média desse peso. Os animais genotipados neste estudo representam, em média, a quinta geração de seleção.

Foram coletados cerca de 5mL de sangue de cada animal, por punção da veia jugular, utilizando-se de tubos vacutainer contendo 7,5 mg de EDTA. Após a coleta, os tubos foram mantidos sob refrigeração até o momento da realização das análises laboratoriais que ocorreram no Departamento de Zootecnia da Unesp de Jaboticabal.

O DNA genômico foi extraído seguindo-se o protocolo de MIRETTI (1998). Os primers utilizados foram: Forward: 5'-CAC CAT CCT CTT CCT CAA G-3' e Reverse: 5'- AAG GAA GCA AGC GGA CAG -3'. As reações de amplificação do gene *DGATI* foram realizadas em uma solução com volume final de 25 µL, contendo 100 ng de DNA, 1,5 pM de cada primer, tampão de PCR na concentração de 1X (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 4,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 50 mM KCl), 100 µM de dNTPs, 0,5 U de enzima Taq DNA polimerase. O programa de amplificação do termociclador consistiu de um ciclo para desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 45 segundos, pareamento dos primers a 57°C por 45 segundos, e extensão a 72°C por 45 segundos, finalizando com um ciclo de 72°C por 5 minutos. Logo em seguida, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e fotografados em transiluminador ultravioleta.

Os PCR-RFLPs (Polimorfismos no Comprimento do Fragmento de Restrição) foram detectados nos fragmentos utilizando a enzima de restrição *Cfr*I. Para tanto, foi utilizado 5 µL de DNA amplificado, tampão de reação na concentração de 1 X e 1 U de enzima, para um volume final de reação de 15 microlitros. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese (100 V por 2 horas) em géis de agarose 3%, corados com brometo de etídeo, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados para identificação dos tamanhos dos fragmentos resultantes, comparando-se com o padrão de peso molecular de 1Kb (Invitrogen).

Foram estimadas as freqüências alélicas e genotípicas, e teste do  $\chi^2$  para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. A diferenciação gênica entre os rebanhos foi avaliada por um teste exato de probabilidade, assumindo uma distribuição qui-quadrado e nível de significância de 0,05, utilizando o *software* GENEPOP (ROUSSET, 2007).

### Resultados e Discussão

Foram observados três padrões de digestão (Figura 1). O primeiro padrão caracterizado pelo fragmento de 519 pb, não digerido, que corresponde ao homozigoto lisina-lisina (K/K). O segundo padrão apresentou uma banda formada pelo fragmento não digerido de 519 pb do alelo K e duas bandas do alelo alanina (A), formada pelos fragmentos de 174 e 317 pb gerados pela digestão do sítio GC do fragmento, pela enzima *Cfr*I, correspondente ao heterozigoto A/K. O terceiro apresentou os fragmentos de 174 e 317 pb, correspondendo ao homozigoto A/A.

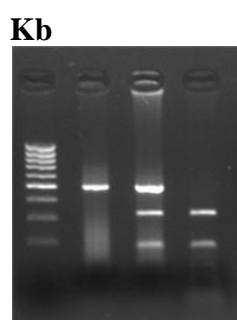


Figura 1 - Genótipos *DGATI*. Linha 1: marcador 1Kb; linha 2: Homozigoto K/K; linha 3: heterozigoto A/K; e linha 4: homozigoto A/A

As freqüências alélicas e genotípicas estão descritas na Tabela 1. Maiores freqüências para o alelo K também já haviam sido descritas por PAPPAS *et al.* (2004), KAUPÉ *et al.* (2004) e LACORTE *et al.* (2006) em animais de raças zebuínas. CASAS *et al.* (2005), com animais da raça Brahman, relataram freqüência de 0,01 para este alelo. Este resultado é o contrário do que acontece em *Bos taurus* onde o alelo A é o mais freqüente (PAPPAS *et al.*, 2004; KAUPÉ *et al.*, 2004; LACORTE *et al.*, 2006). LACORTE *et al.* (2006) trabalhando com animais das raças Nelore e Guzará observaram 100% de homozigose para a variante lisina, sugerindo que houve fixação deste alelo nestas raças. A ocorrência do alelo A em populações zebuínas, mesmo em baixas freqüências, é rara. PAPPAS *et al.* (2004), analisando animais da raça Gir, sugeriram que a presença da variante alanina (A) nesses animais pode ser devido a uma introgressão de genes *Bos taurus* durante o processo de seleção e melhoramento desta raça. No caso do presente trabalho, a maior freqüência desta variante (A) ocorreu na linha controle, o que pode sugerir um efeito de fundador uma vez que se pode esperar que esta linha mantenha uma maior proporção dos genes da população inicial, ou seja, o Nelore da década de 1970.

A freqüência do alelo A na linha controle (0,15) foi superior e, estatisticamente, diferente ( $p < 0,01$ ), quando comparada às linhas selecionadas (Tradicional = 0,01, e Seleção = 0,02), que não diferiram estatisticamente entre si ( $p > 0,01$ ). Este resultado sugere que a seleção para crescimento que vem sendo praticada esteja atuando sobre este loco.

Tabela 1 - Número observado e frequência genotípica e alélica do gene *DGATI* bovino nas três linhas de seleção.

Genótipos	Linha Seleção		Linha Tradicional		Linha Controle	
	N	Freq.	N	Freq.	N	Freq.
K/K	115	0,95	171	0,99	40	0,74
K/A	6	0,05	2	0,01	12	0,22
A/A	0	0	0	0	2	0,04
Alelos						
K		0,98		0,99		0,85
A		0,02		0,01		0,15
Total	121	1,0	173	1,0	54	1,0

### Conclusões

Foi encontrado polimorfismo para o gene *DGATI*, sendo o alelo K (lisina) o mais freqüente em todas as linhas de seleção. As freqüências alélicas diferem entre o controle e as linhas seleção, sugerindo que este gene possa estar associado ao peso ao sobreano.

### Literatura Citada

- CASAS, E.; SHACKELFORD, S.D.; KEELE, J.W.; KOOHMARAIE, M.; SMITH T.P.L.; STONE, T.R. Detection of QTL for growth and carcass composition in cattle. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2976-2983, 2003.
- CASAS, E.; WHITE, S.N.; RILEY, D.G.; SMITH, T.P.L.; BRENNEMAN, R.A.; OLSON, T.A.; JOHNSON, D.D.; COLEMAN, S.W.; BENNETT, G.L.; CHASE Jr., C.C. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.83, p.13-19, 2005.
- KAUPE, B.; WINTER, A.; FRIES, R.; ERHARDT, G. *DGATI* polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. **Animal Genetics**, v.71, p.182-187, 2004.
- LACORTE, G.A.; MACHADO, M.A. ; MARTINEZ, M.L. ; CAMPOS, A.L.; MACIEL, R.P. ; VERNEQUE, R.S. ; TEODORO, R.L.; PEIXOTO, M.G.C.D.; CARVALHO, M.R.S.; FONSECA, C.G. *DGATI* K232A polymorphism in Brazilian Cattle Breeds. **Genetics and Molecular Research**, v.5, n.3, p.475-482, 2006.
- PAPPAS, M.C.R.; LOURENÇO, I.T.; REGITANO, L.C.A.; ALENCAR, M.M.; MACHADO, M.; MARTINEZ, M.L.; CAMPOS, A.L.; GRATTAPAGLIA, D. Investigação do polimorfismo K232A do gene *DGATI* em raças de *Bos indicus* e seus cruzamentos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 50., 2004, Florianópolis. **Anais ... Florianópolis**, 2004.
- ROUSSET, F. GENEPOP'007: A complete reimplementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.103-106, 2008.