



## Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *CAST/XmnI* em bovinos de corte<sup>1</sup>

Isabella Maiumi Zaidan Blecha<sup>2</sup>, Camila de Oliveira Freitas Machado<sup>3</sup>, Thiago Dutra de Carvalho<sup>4</sup>, Fabiane Siqueira<sup>5</sup>, Roberto Augusto de Almeida Torres Junior<sup>5</sup>, Luciana Correia de Almeida Regitano<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Fonte financiadora: EMBRAPA, FUNDECT

<sup>2</sup>Graduanda do curso de Ciências Biológicas da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal

<sup>3</sup>Graduanda do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

<sup>4</sup>Mestrando em Ciência Animal da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

<sup>5</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Corte. email: fabiane@cnpqc.embrapa.br

<sup>6</sup>Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste

**Resumo:** A identificação precoce de animais que apresentam potencial para produção de carne de qualidade, pela utilização de testes de DNA, constitui uma importante ferramenta para viabilizar a seleção dos reprodutores que possuem estas características, aumentando, assim, a qualidade da carne do rebanho comercial. O gene *CAST* codifica a proteína calpastatina que é responsável pela inativação das enzimas calpaínas (amaciadoras da carne), contribuindo para que a carne endureça no processo *post-mortem*. Neste trabalho, foram avaliadas as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *CAST/XmnI* entre as raças Bonsmara, Caracu e Senepol (taurinas adaptadas), Nelore (zebuína) e Angus (taurina não adaptada) em 111 touros escolhidos de acordo com o menor grau de parentesco possível. A genotipagem foi realizada por PCR-RFLP e as frequências alélicas e genóticas foram comparadas utilizando o teste de Qui-quadrado. Houve diferença significativa nas frequências alélicas e genóticas entre as raças ( $p < 0,05$ ), sendo que as raças Angus e Bonsmara apresentaram os maiores valores de frequência para o alelo A (88,6%). A raça Nelore foi a que apresentou maior frequência para o alelo B (54,2%), seguida pela Caracu (36,4%) e pela Senepol (28,6%). Esse marcador mostrou-se viável para seleção de bovinos, já que a alta frequência do alelo A, observada na população em estudo, permite que o teste seja aplicado, desde que confirmada a associação desse polimorfismo com a maciez da carne.

**Palavras-chave:** bovinos, cruzamentos, raças taurinas adaptadas, seleção assistida por marcadores

### Allelic and genotypic frequencies of the *CAST/XmnI* polymorphism in beef cattle

**Abstract:** The early identification of animals that present a potential for the production meat tenderness, by DNA tests, is an important tool to make the selection of bulls that have these characteristics, increasing, thus, the meat quality of the commercial herd. The *CAST* gene codifies the calpastatin protein, that is responsible for the inactivation of the calpain enzymes and influences *post-mortem* tenderness of meat. In this paper, the differences of allelic and genotypic frequencies of polymorphism *CAST/XmnI* in Bonsmara, Caracu and Senepol (tropically adapted taurine), Nelore (zebu) and Angus (non-adapted taurine) breeds were evaluated. Bulls were chosen with the smallest possible level of relationship among them. The genotyping was carried out by PCR-RFLP and the allelic and genotypic frequencies were compared using chi-square tests. Significant differences were observed in allelic and genotypic frequencies between the breeds ( $p < 0,05$ ), where the Angus and Bonsmara breeds presented a higher frequency of the allele A (88,6%). The Nelore breed presented a higher frequency the B allele (54,2%), followed by Caracu (36,4%) and Senepol (28,6%) breeds. This marker will be useful in the selection of bovinos, as the high frequency of the A allele observed in the studied population, allows this test to be applied with effectiveness, as long as the association of this allele with the meat tenderness is confirmed.

**Keywords:** tropically adapted taurine breeds, bovine, crossbreeding, marker assisted selection

### Introdução

O Brasil possui o maior rebanho bovino mundial, sendo o segundo maior produtor de carne e o segundo em número de abates. Entretanto, o País não exporta para os mercados de maior valor agregado, pois a carne brasileira não é considerada de boa qualidade em relação a fatores como maciez, marmoreio e deposição de gordura na carcaça. Dentre as variações de maciez observadas entre as raças, sabe-se que quanto maior a proporção de sangue zebuino no rebanho, menores são os valores encontrados. Grande parte desta variação deve-se a diferenças no complexo enzimático calpaína-calpastatina que atua na carne após o abate do animal (Rubensam et al., 1998).

Segundo Burrow (2006), em programas de cruzamento em ambientes tropicais é possível utilizar raças de bovinos *Bos indicus* e raças taurinas adaptadas (*Bos taurus*) para otimizar a heterose e maximizar a produtividade. As raças taurinas adaptadas são usadas em programas que visam melhorar a qualidade da carne, o rendimento de carcaça, a taxa de fertilidade e o temperamento, sem comprometer a adaptação do animal ao ambiente. Desse modo, a utilização de diferentes raças em sistemas de cruzamentos planejados é um caminho rápido e simples para aumentar a lucratividade e a produtividade do rebanho comercial.

Vários genes relacionados com a qualidade da carne bovina já foram identificados, sendo um deles o gene *CAST*, que codifica a enzima calpastatina. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as diferenças de frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *CAST/XmnI* em touros das raças Bonsmara, Caracu e Senepol (taurinas adaptadas), Nelore (zebuína) e Angus (taurina não-adaptada), visando orientar a escolha de uma raça taurina adaptada para produção de carne de qualidade em sistemas de cruzamento.

### Material e Métodos

Para a determinação das frequências alélicas e genotípicas do gene *CAST* foram obtidas amostras de sêmen e de sangue de 111 touros das raças Bonsmara (22 animais), Caracu (22), Senepol (21), Angus (22) e Nelore (24) de centrais de inseminação, de associações de raças e de criadores. Essas amostras foram escolhidas de acordo com o menor grau de parentesco possível entre os animais, levando-se em consideração a genealogia dos touros. Os DNAs genômicos foram extraídos de acordo com o método descrito por Regitano & Coutinho (2001) e quantificados em espectrofotômetro *Ultrospec 2000* (Pharmacia Biotech).

Para a determinação dos alelos A e B do gene *CAST*, um segmento de aproximadamente 1.500 pares de bases (pb) foi amplificado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e, em seguida, digerido com a enzima de restrição *XmnI* segundo a metodologia descrita por Chung et al. (2001). Cada PCR foi realizada em volume final de 25 µL e a mistura para amplificação constituiu-se de: 50 ng de DNA genômico, 0,2 µM de cada *primer*, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM de KCl, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP e 1,0 unidade (UI) de *Taq* DNA polimerase.

As condições da PCR foram: cinco minutos para denaturação inicial a 94°C, um minuto para denaturação a 94°C, um minuto a 60°C para anelamento dos *primers*, um minuto a 72°C para extensão e cinco minutos a 72°C para extensão final. Os passos dois (denaturação), três (anelamento) e quatro (extensão) correspondem a um ciclo, o qual foi repetido 29 vezes. O *primer forward* utilizado foi 5'-AGCAGCCACCATCAGAGAAA-3' e o *primer reverse* 5'-TCAGCTGGTTCGGCAGAT-3'.

Os fragmentos amplificados foram digeridos em meio de reação contendo 8 µL de produto de PCR e três unidades da enzima de restrição. A reação de digestão foi incubada a 37°C por 4 horas. Os fragmentos digeridos foram separados em gel de agarose 2% e visualizados por meio de coloração com SybrGold e exposição à luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos de restrição foi determinado pela comparação com um marcador de padrão de peso molecular de 100 pb. Após a digestão, o alelo A é caracterizado pela presença de dois fragmentos de restrição, com 950 e 550 pb e o alelo B produz um fragmento de aproximadamente 1.500 pb.

As frequências alélicas e genotípicas foram determinadas contando o número de cada alelo e de cada genótipo e dividindo pelo número de alelos e genótipos avaliados em cada raça. Estas frequências foram comparadas utilizando o teste de Qui-quadrado (Tabela 1).

### Resultados e Discussão

O polimorfismo do gene da calpastatina, gerado pela enzima de restrição *XmnI*, está localizado no íntron 6 e consiste de duas formas alélicas denominadas de A e B. Sabe-se que grande parte da responsabilidade da variação na maciez da carne de bovinos deve-se às diferenças encontradas no complexo enzimático “calpaína-calpastatina”, que atua na carne após o abate do animal. A calpastatina é responsável pela inativação das enzimas calpaínas (amaciadoras da carne) sendo, assim, em sua plena atividade, potencial inibidora da maciez da carne. De acordo com a literatura (Chung et al., 2001), a presença do alelo A está relacionada à produção de carnes macias e a maior frequência do alelo B indica a produção de carne com maciez comprometida.

Conforme pode ser observado na Tabela 1, constata-se que os animais das raças Angus e Bonsmara apresentaram os maiores valores de frequência para o alelo A (88,6%). Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Chung et al. (2001) e por Sugisawa (2005) cuja frequência do alelo A para a raça Angus foi de 0,75 e 0,85, respectivamente. A raça Nelore foi a que apresentou maior frequência para o alelo B (54,2%), seguida pela raça Caracu (36,4%) e pela raça Senepol (28,6%). Apesar de dados da literatura mostrarem a superioridade do alelo A para maciez de carne, tanto Chung et al. (2001) quanto Sugisawa (2005) não observaram nenhum efeito significativo deste polimorfismo com características relacionadas à qualidade da carne, não existindo nenhum efeito dos alelos A ou B na força de cisalhamento e nos cortes cárneos comerciais da carcaça.

Tabela 1. Frequências genotípicas e alélicas para o gene da calpastatina em animais das raças Nelore, Caracu, Senepol, Bonsmara e Angus.

Raças	Genótipos *			Total	Alelos **		Total
	AA	AB	BB		A	B	
Frequência Relativa							
Nelore	20,8	50,0	29,2	100,0	45,8	54,2	100,0
Caracu	54,5	18,2	27,3	100,0	63,6	36,4	100,0
Senepol	47,6	47,6	4,8	100,0	71,4	28,6	100,0
Bonsmara	86,4	4,5	9,1	100,0	88,6	11,4	100,0
Angus	81,8	13,6	4,5	100,0	88,6	11,4	100,0
Geral	57,7	27,0	15,3	100,0	71,2	28,8	100,0
Frequência Absoluta							
Nelore	5	12	7	24	22	26	48
Caracu	12	4	6	22	28	16	44
Senepol	10	10	1	21	30	12	42
Bonsmara	19	1	2	22	39	5	44
Angus	18	3	1	22	39	5	44
Geral	64	30	17	111	158	64	222

\* Presença de diferenças significativas ( $P = 0,000077$ ) entre raças para as frequências genotípicas, pelo teste de Qui-quadrado.

\*\* Presença de diferenças significativas ( $P = 0,000002$ ) entre raças para as frequências alélicas, pelo teste de Qui-quadrado.

### Conclusões

O marcador *CAST/XmnI* apresentou-se viável como ferramenta para seleção de bovinos, já que a alta frequência do alelo favorável para maciez, observada na população em estudo, permite que esse teste seja aplicado, desde que confirmada a associação desse polimorfismo com a característica. Essas informações poderão contribuir para o melhoramento genético de bovinos de corte e para a seleção de animais com potencial para produção de carne de maior qualidade.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT– Processo N° 23/200.164/2007) e ao Sistema Embrapa de Gestão (Macroprograma 3 03.07.05.008.00.00) pelo apoio financeiro concedido, bem como à Associação dos Criadores de Bonsmara, Associação Brasileira de Criadores de Caracu, Alta Genetics, Lagoa da Serra, ABS Pecplan, Sr. Lício Isfer, Sr. Diomário Faustino de Barros, Sr. Sebastião Fogaça, Sr. Aguiar de Almeida Pereira, Sr. José Neves Ferreira e Sr. Flávio Fioravanti Júnior que nos auxiliaram na obtenção das amostras de sêmen.

### Literatura citada

- BURROW, H.M. Utilization of diverse breed resources for tropical beef production. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., 2006, Belo Horizonte/MG. **Anais...Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2006, CD ROM.**
- CHUNG, H.Y; DAVIS, M.E; HINES, H.C. Relationship of two PCR-RFLP in the bovine calpastatin gene with calpastatin activity, meat tenderness and carcass traits. *International Society for Animal Genetics, Animal genetics*,32,40-53, 2001.
- REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, 215 p.
- RUBENSAM, J.M.; FELÍCIO, P.E.; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 405-409, 1998.
- SUGISAWA, L. **Identificação de genótipos superiores para crescimento e qualidade de carcaça em bovinos de corte submetidos ao modelo biológico superprecoce.** 2005, 105f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.