

ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DE POLIMORFISMOS NOS GENES DA CALPAÍNA E DA CALPASTATINA EM BOVINOS DE CORTE

Isabella Maiumi Zaidan Blecha¹; Fabiane Siqueira²; Roberto Augusto de Almeida Torres Junior²; Gelson Luís Dias Feijó²

¹Curso de Ciências Biológicas, Universidade Anhanguera-Uniderp, campo Grande/MS. isablecha@hotmail.com

² Embrapa Gado de Corte, campo Grande/MS.

RESUMO

Há inúmeros fatores que afetam a maciez da carne bovina, compreendendo desde a raça, até manejos pré e pós abate. No entanto, mesmo existindo diferentes padrões de maciez entre as raças, a variação mais importante é aquela que ocorre dentro de uma mesma raça. Assim, a identificação precoce de animais que apresentam potencial para produção de carne mais macia, por meio de testes de DNA, constitui uma ferramenta importante para viabilizar a seleção dos reprodutores que possuam esta característica, aumentando, assim, a qualidade da carne do rebanho comercial. Neste trabalho, objetivou-se avaliar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *CAPN530/Psyl* e *CAST/Ddel* em touros das raças Bonsmara, Caracu e Senepol (taurinas adaptadas), Nelore (zebuína) e Angus (taurina não adaptada) escolhidos com o menor grau de parentesco possível, levando-se em consideração a genealogia dos mesmos. A genotipagem foi realizada por PCR-RFLP e as frequências gênicas foram comparadas utilizando o teste de Qui-quadrado. Para as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *CAPN530/Psyl* não foram observadas diferenças significativas entre as raças ($p > 0,05$). A raça Nelore apresentou maior frequência para o alelo G considerado favorável para maciez de carne (86,5%), seguida pelas raças Angus e Caracu (ambas com 84%), Bonsmara (78%) e Senepol (72%). Para o polimorfismo *CAST/Ddel* foram observadas diferenças significativas entre as raças para as frequências genotípicas e alélicas ($p < 0,01$). A raça Bonsmara apresentou 100% de frequência para o alelo favorável denominado de A, seguida pelas raças Angus (94%), Senepol (76%), Caracu (68%) e Nelore (60%). Os resultados obtidos mostram que, se confirmada a associação desses polimorfismos com maciez de carne, estes dois marcadores poderão ser úteis na seleção de animais com potencial para produção de carne de melhor qualidade, por apresentarem frequências altas na população em estudo.

Palavras-chave: maciez de carne; melhoramento genético; PCR-RFLP; testes de DNA.

ABSTRACT

There are several factors affecting the beef tenderness and they extend from animal breed to any animal handling and post slaughter management practices. Although average breed differences are largely recognized as source of beef tenderness variation, the deviation inside a given breed is also of particular interest. Under this assumption, the early identification of animals with potential for producing tender meat using DNA tests is crucial for selecting improving bulls and obtaining meat quality improvement in commercial herds. In this paper, the objective was to evaluate the genotypic and allelic frequencies of polymorphisms CAPN530/Psyl and CAST/Ddel in bulls of Bonsmara, Caracu Senepol (adapted taurine) and Nellore (Zebu) and Angus (not adapted taurine) chosen with the lowest degree of relatedness possible. Genotyping was performed by PCR-RFLP and allele frequencies were compared using Chi-square tests. For genotype frequency and allelic polymorphism CAPN530/Psyl no significant differences were found between breeds ($p>0.05$). The Nellore breed had a higher frequency for the allele G considered favorable for beef tenderness (86.5%), followed by Angus and Caracu (both 84%), Bonsmara (78%) and Senepol (72%). For the polymorphism CAST/Ddel significant differences between breeds for the genotypic and allelic frequencies were found ($p<0.01$). Bonsmara breed showed 100% of frequency for the allele considered favorable denominated A followed by Angus (94%), Senepol (76%), Caracu (68%) and Nellore (60%). The results obtained indicate, since confirmed the association of these polymorphisms with beef tenderness, this two markers may be useful in selecting animals with potential for production meat of better quality, for present high frequency in the studied population.

Keywords: beef tenderness; DNA tests; genetic improvement; PCR-RFLP.

INTRODUÇÃO

No cenário mundial, o Brasil apresenta o maior rebanho comercial de gado bovino (aproximadamente 174 milhões de cabeças), é o segundo maior produtor de carne bovina e o segundo em número de abates (40 milhões de cabeças) (ANUALPEC, 2009). Entretanto, não exporta para os mercados de maior valor agregado devido sua carne ser considerada de baixa qualidade.

Para tornar a carne bovina mais competitiva nos mercados interno e externo, além do aumento de produtividade, é indispensável melhorar a qualidade, agregar valor, diversificar, diferenciar produtos e reduzir preços, sem comprometer a rentabilidade. A constatação de empresários do setor é de que há uma exigência cada vez maior por qualidade e um interesse crescente pela carne de bovinos criados e engordados a pasto (CORRÊA, 2000).

Dentre os fatores que influenciam a maciez da carne bovina, destacam-se: a genética, a raça, a idade ao abate, o sexo, a alimentação, o uso de agentes hormonais (β -adrenérgicos) e os tratamentos post-mortem (ALVES *et al.*, 2005). Dentre os fatores *post-mortem*, ou extrínsecos, isto é, aqueles que estão fora do controle do pecuarista, destacam-se o resfriamento, a estimulação elétrica das carcaças, a maturação e o método de cocção da carne. Exceto por esse último, os demais exercem influência nas propriedades físicas da carne bovina durante ou após o desenvolvimento do *rigor mortis* (FELÍCIO, 1997).

Aproximadamente 46% das variações na maciez da carne bovina se devem à genética do animal e 54% das variações se explicam pela influência ambiental quando são comparadas diferentes raças. Dentro de uma mesma raça a genética explica cerca de 30% da variabilidade observada na maciez da carne (KOOHMARAIE, 2003).

Segundo Burrow (2006) é possível utilizar raças de bovinos *Bos taurus indicus* e raças taurinas adaptadas (*Bos taurus taurus*) para otimizar a heterose e maximizar a produtividade em programas de cruzamento em ambientes tropicais. 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.

Outra alternativa cada vez mais promissora para uso em programas de melhoramento genético de bovinos de corte é a utilização de testes de DNA que identificam o genótipo dos indivíduos para genes ligados a algumas características de interesse econômico, por meio do uso de marcadores moleculares. Estas informações permitem a comparação de frequências gênicas e alélicas entre populações e revelam diferenças nas composições genéticas que podem contribuir para as variações fenotípicas observadas, por exemplo, entre animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* (MOODY *et al.*, 1993).

A informação sobre o genótipo dos animais para marcadores associados a genes que controlam características de interesse econômico permite a seleção de animais em idade precoce, para características que apresentam baixa herdabilidade, nas que são difíceis e/ou onerosas para se mensurar e nas que não podem ser medidas antes que o animal chegue a idade adulta ou reprodutiva (VAN EENENNAAM, 2007).

Recentemente, alguns marcadores no gene da calpaína (*CAPN1*) e da calpastatina (*CAST*) denominados de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) foram analisados e associados favoravelmente com maciez da carne bovina. Os SNPs correspondem a variações em uma única base nucleotídica de DNA com frequência considerável em uma dada população (acima de 1%), tendo vantagem em relação a outros marcadores genéticos devido à sua baixa taxa de mutação e facilidade de genotipagem (RESENDE *et al.*, 2008).

Devido ao fato do sistema enzimático calpaína/calpastatina atuar na carne após o abate do animal e da calpastatina ser responsável pela inativação das enzimas calpaínas (amaciadoras da carne), acredita-se que estas enzimas estejam envolvidas no processo de maciez. Os genes codificadores da calpaína (*CAPN1*) e da calpastatina (*CAST*) estão localizados, respectivamente, nos cromossomos bovinos 29 (SMITH *et al.*, 2000) e 7 (BISHOP *et al.*, 1993).

Um aumento post-mortem da atividade da calpastatina tem sido correlacionado com uma redução na maciez da carne de bovinos (RUBENSAM *et al.*, 1998). Lonergan *et al.* (1995) analisaram um polimorfismo de restrição no gene *CAST* e não encontraram nenhuma associação da atividade da calpastatina com maciez de carne. Morris *et al.* (2006) analisaram SNPs nos genes *CAPN1* e *CAST* para determinar seus efeitos na maciez da carne em bovinos *Bos taurus taurus* e observaram uma fraca associação entre os genótipos *CAPN1* e *CAST* analisados.

O gene *CAPN1* também foi avaliado por Page *et al.* (2002) e por Page *et al.* (2004). Análises genotípicas e de valores de força de cisalhamento revelaram diferenças entre os alelos, sendo que os alelos que codificam isoleucina na posição 530 (I530) e glicina na posição 316 (G316) estão associados com aumento na força de cisalhamento e, conseqüentemente, com diminuição na maciez da carne, quando comparados com os alelos que codificam valina na posição 530 (V530) e alanina na posição 316 (A316) ($p < 0,05$). Esses resultados fornecem fortes evidências que o *CAPN530* e o *CAPN316* são marcadores informativos para detectar variações na maciez da carne de bovinos e poderão ser usados em testes de DNA para determinação de mérito genético diretamente relacionado com esta característica.

Atualmente, mais de 38 polimorfismos do tipo SNP foram encontrados no gene da calpaína (CASAS *et al.*, 2005; PAGE *et al.*, 2002; PAGE *et al.*, 2004; WHITE *et al.*, 2005). O polimorfismo de nucleotídeo único CAPN530/PSyl está localizado no éxon 14 do gene *CAPN1* (RINCON; MEDRANO, 2006). Nesse SNP ocorre a troca de uma guanina por uma adenina e, conseqüentemente, de uma valina (codificada pelo alelo G) por uma isoleucina (codificada pelo alelo A) (PAGE *et al.*, 2002).

Lonergan *et al.* (1995) e Chung *et al.* (1999) descreveram pela primeira vez polimorfismos no gene *CAST* e depois outros marcadores neste mesmo gene foram patenteados (BARENDSE, 2002) e/ou são comercializados em painéis por empresas especializadas em análises moleculares (VAN EENENNAAM *et al.*, 2007).

O polimorfismo no gene *CAST* patenteados por Barendse *et al.* (2002) equivale ao SNP que faz a troca de uma guanina por uma adenina na região 3' não traduzida do gene. Este SNP foi pesquisado por Casas *et al.* (2006) em mais de 1.100 animais *Bos taurus taurus* e mais de 500 *Bos taurus indicus* (Brahman). Associações entre os genótipos de *CAST* e maciez, suculência e sabor da carne foram encontradas para animais *Bos taurus*, mas o efeito do gene sobre essas características fenotípicas não foi significativo para animais *Bos taurus indicus* (CASAS *et al.*, 2006).

Ainda com relação à atividade da calpastatina, Pringle *et al.* (1997) observaram o aumento da atividade da calpastatina e redução da atividade da calpaína com o aumento da proporção de sangue de animais *Bos taurus indicus* (Brahman) usada nos cruzamentos.

Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar, por meio da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*), as frequências genotípicas e alélicas de polimorfismos nos genes da calpaína (*CAPN1*) e calpastatina (*CAST*) entre raças taurinas adaptadas (Bonsmara, Caracu e Senepol), Nelore (zebuína) e Angus (taurina não-adaptada).

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular Animal da Embrapa Gado de Corte em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Para a determinação das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *CAPN530/Psyl*, localizado no gene da calpaína (*CAPN1*), foram obtidas amostras de sangue e de sêmen de 126 touros e para o polimorfismo *CAST/Ddel*, localizado no gene da calpastatina (*CAST*), foram obtidas amostras de sangue e de sêmen de 125 touros.

Para ambos os polimorfismos, os touros genotipados foram das raças Angus (Aberdeen e Red), Bonsmara, Caracu, Senepol e Nelore, sendo a raça Angus escolhida como referencial de boa qualidade de carne e a raça Nelore como referencial de carne de qualidade inferior. As amostras de sangue e de sêmen foram obtidas em centrais de inseminação, em associações de raças e com criadores. Os touros foram escolhidos de acordo com o menor grau de parentesco possível entre eles, levando-se em consideração a genealogia dos mesmos. Para obtenção dos coeficientes de consanguinidade e parentesco foram utilizadas rotinas desenvolvidas no programa MATLAB (LITTLE; MOLER, 2002).

2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Para a extração de DNA genômico a partir de leucócitos, foi utilizado o método descrito por Olerup e Zetterquist (1992) e adaptado por Regitano e Coutinho (2001). Para a extração de DNA genômico a partir de amostras de sêmen, o método utilizado foi descrito por Zadworny e Kuhnlein (1990) e também adaptado por Regitano e Coutinho (2001).

Os DNAs genômicos extraídos foram quantificados em gel de agarose a 0,8%, por meio de comparação com padrões de DNA de concentrações conhecidas (100 e 200 ng/ μ L) e em espectrofotômetro. Em seguida, foram diluídos em alíquotas contendo 40 ng de DNA/ μ L de solução de TE (10 mM Tris HCl pH 7,6; 1 mM EDTA).

3. AMPLIFICAÇÃO DO DNA E GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP

3.1 GENE DA CALPAÍNA (CAPN530/PSYI):

Para a determinação dos alelos A e G do polimorfismo *CAPN530/Psyl* (AF248054:A4558G), um fragmento de 341 pares de bases (pb), localizado no éxon 14, foi amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) e digerido com a enzima de restrição *Psyl* (RINCON; MEDRANO, 2006).

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas em um aparelho termociclador Mastercycler Personal (Eppendorff) a partir de 40 ng de DNA genômico em um volume final de reação de 20 μ L contendo 1X PCR Buffer (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2,0 mM $MgCl_2$, 0,24 mM de cada dNTP, 0,2 μ M de cada primer e 1,0 unidade de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A reação de amplificação constou de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os 30 ciclos, o fragmento amplificado foi submetido à extensão final por 5 minutos a 72°C.

Para a verificação de amplificação foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8%. Para isso, utilizou-se tampão TBE 1 X (90 mM Tris base; 90 mM ácido bórico; 2 mM EDTA pH 8,0) e foi submetida a uma voltagem de 100 V por 1 hora e 30 minutos. Um volume de 5 μ L de cada produto de amplificação foi aplicado no gel, acrescido de 2 μ L de loading buffer (glicerol; TBE 10 X; azul de bromofenol 1%; água deionizada) e 3 μ L de água pura. Ao término da eletroforese, o gel foi corado com SYBR® Gold (1:100.000) (Invitrogen) e os produtos de amplificação foram visualizados sob iluminação ultravioleta e fotografados com câmera digital (Cânon Power Shot A640).

Após a verificação de resultados satisfatórios com a amplificação do DNA, o produto de amplificação do gene *CAPN1* foi digerido com a enzima *Psyl*, que reconhece o sítio de restrição 5'-GACN'NNGTC-3' (Fermentas). O volume final da reação de digestão foi de 10 μ L, sendo 8 μ L do produto de PCR e 2,0 do mix de digestão (2U *Psyl*; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM $MgCl_2$; 0,1 mg/mL BSA). A reação de digestão foi incubada a 37°C por 5 horas no termociclador.

Para análise dos genótipos, os produtos da digestão foram separados em gel de agarose 3%. Esse procedimento foi realizado com tampão de eletroforese TBE 1 X, submetido à voltagem de 100 V por 1 hora e 30 minutos. Foram aplicados no gel 8 μ L do produto de digestão acrescidos de 2,0 μ L de *loading buffer* (4:1). No primeiro poço de cada fileira do gel foi aplicada uma amostra de padrão de tamanho de DNA de 100 pb (Invitrogen) acrescida de *loading buffer* na mesma proporção citada acima. Ao término da eletroforese, o gel foi corado com SYBR® Gold (1:100.000) e os fragmentos foram detectados sob iluminação ultravioleta e fotografados com câmera digital.

3.2. GENE DA CALPASTATINA (CAST/DDEI):

Os alelos A e G do gene CAST (AF159246:A2959G) foram identificados a partir da amplificação de um fragmento de 486 pb, localizado na região 3'UTR, seguida de digestão com a enzima de restrição Ddel (MORRIS *et al.*, 2006; CURI *et al.*, 2008).

As reações de PCR foram realizadas no mesmo termociclador descrito acima a partir de 40 ng de DNA genômico em um volume final de reação de 25 μ L contendo 1 X PCR *Buffer*, 1,5 mM MgCl₂, 0,20 mM de cada dNTP, 0,2 μ M de cada *primer* e 1,0 unidade de Taq DNA Polimerase. A reação de amplificação constou de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os 30 ciclos, o produto amplificado foi submetido à extensão final por 5 minutos a 72°C.

Para a verificação de amplificação foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8%. Para isso, utilizou-se tampão TBE 1 X e foi submetida à voltagem de 100 V por 1 hora e 30 minutos. Um volume de 5 μ L de cada produto de amplificação foi aplicado no gel, acrescido de 2 μ L de *loading buffer* e 3 μ L de água pura. Ao término da eletroforese, o gel foi corado com SYBR® Gold (1:100.000) e os produtos de amplificação foram visualizados sob iluminação ultravioleta e fotografados com câmera digital.

Após a verificação de resultados satisfatórios com a amplificação do DNA, o produto de amplificação do gene CAST foi digerido com a enzima Ddel, que reconhece o sítio de restrição 5'-C' TNAG-3' (Invitrogen). O volume final da reação de digestão foi de 10 μ L, sendo 7 μ L do produto de PCR e 3,0 do mix de digestão (1U Ddel; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl₂). A reação de digestão foi incubada a 37°C por 4 horas no termociclador.

Para análise dos genótipos, os produtos da digestão foram separados em gel de agarose 3%. Esse procedimento foi realizado com tampão de eletroforese TBE 1 X, submetido à voltagem de 100 V por 1 hora e 30 minutos. Foram aplicados no gel 8 μ L do produto de digestão acrescidos de 2,0 μ L de *loading buffer* (4:1).

No primeiro poço de cada fileira do gel foi aplicada uma amostra de padrão de tamanho de DNA de 100 pb (Invitrogen) acrescida de *loading buffer* na mesma proporção citada acima. Ao término da eletroforese, o gel foi corado com SYBR® Gold (1:100.000) e os fragmentos foram detectados sob iluminação ultravioleta e fotografados com câmera digital.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e genótípicas 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 (X^2), com nível de significância de 1%.

Para verificar se as raças estudadas se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, realizou-se o teste de Qui-quadrado (X^2), utilizando p^2 , $2pq$ e q^2 para calcular as frequências genótípicas esperadas, sendo p e q as frequências alélicas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. POLIMORFISMO *CAPN530/PSYI*

Após as reações em cadeia da polimerase (PCR), o gene *CAPN1* foi identificado pela amplificação de um fragmento de 341 pb (Figura 1).

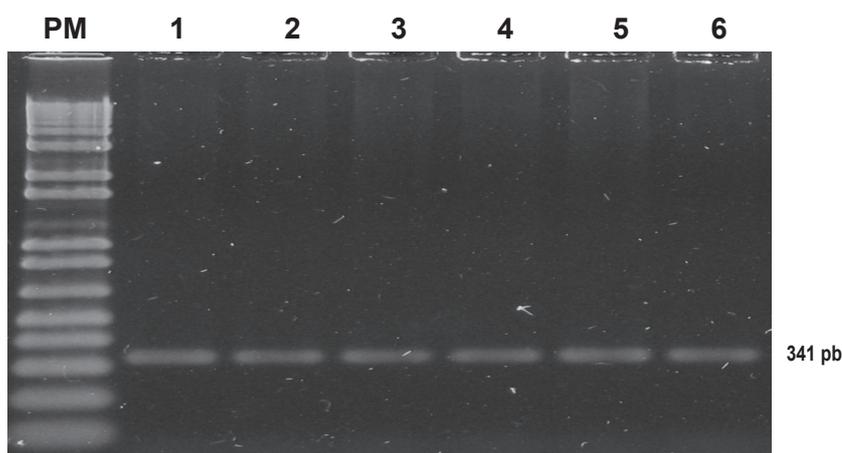


Figura 1. Gel de agarose 1% com produto de amplificação de um segmento de 341 pb do gene da calpaína (*CAPN1*). PM. Padrão molecular de tamanho de 1Kb. 1-6 - Amostras.

Identificado por Page *et al.* (2002), o polimorfismo *CAPN530/Psyl* é representado pela troca de um nucleotídeo de base guanina (alelo G) por um de base adenina (alelo A). Tal substituição corresponde a troca de valina por isoleucina no códon 530 do Domínio III da enzima calpaína, a qual pode alterar o arranjo e a estabilidade da proteína e, como consequência, ocasionar mudanças fenotípicas. Posteriormente, Rincón e Medrano (2006) descreveram o método PCR/RFLP para detectar este polimorfismo inferindo à análise repetibilidade e menor custo.

Neste trabalho, foram analisadas as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *CAPN530/Psyl* em 126 touros das raças Bonsmara (25 animais), Caracu (25) e Senepol (25), Nelore (26) e Angus (25).

As duas variantes alélicas (A e G) deste gene foram observadas nas cinco raças analisadas. O genótipo AA foi caracterizado pela presença de um único fragmento de 341 pb, enquanto o genótipo GG foi determinado pela presença de dois fragmentos de restrição com 195 e 146 pb. Indivíduos AG apresentaram fragmentos com os três tamanhos 341, 195 e 146 pb (Figura 2). O alelo considerado favorável para maciez de carne foi designado de G e o alelo considerado desfavorável para esta característica foi designado de A por Page *et al.* (2002).

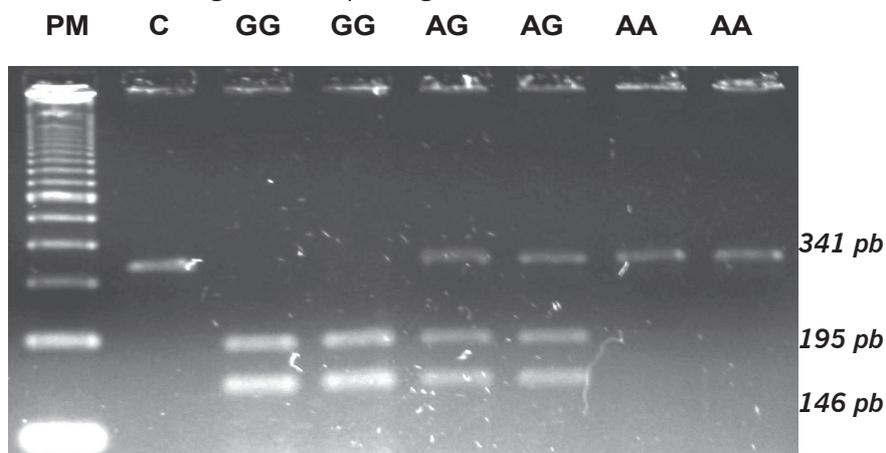


Figura 2. Gel de agarose 3% com produto de amplificação (C) e fragmentos do gene da calpaína após digestão com enzima de restrição *Psyl*. PM - Padrão molecular de tamanho de 100 pb. GG - animais homocigotos para o alelo G. AG - heterocigotos. AA - homocigotos para o alelo A.

As frequências genotípicas e alélicas foram comparadas utilizando o teste de Qui-quadrado, com nível de significância de 1% e, estas podem ser observadas na Tabela 1.

As frequências alélicas variaram entre as raças, de 13,5% a 28% para o alelo A e de 72% a 86,5% para o alelo G, não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). A raça Nelore foi a raça que apresentou maior frequência para o alelo G (86,5%), seguida pelas raças Angus e Caracu (ambas com 84%), Bonsmara (78%) e Senepol (72%).

Tabela 1. Frequências genótípicas e alélicas para o gene da calpaína em animais das raças Bonsmara, Caracu, Senepol (taurinas adaptadas), Angus (taurina não-adaptada) e Nelore (zebuína).

Raças	Genótipos *				Alelos **		
	AA	AG	GG	Total	A	G	Total
Frequência Relativa							
Bonsmara	0,0	44,0	56,0	100,0	22,0	78,0	100,0
Caracu	0,0	32,0	68,0	100,0	16,0	84,0	100,0
Senepol	12,0	32,0	56,0	100,0	28,0	72,0	100,0
Angus	0,0	32,0	68,0	100,0	16,0	84,0	100,0
Nelore	0,0	26,9	73,1	100,0	13,5	86,5	100,0
Geral	2,4	33,3	64,3	100,0	19,0	81,0	100,0
Frequência Absoluta							
Bonsmara	0	11	14	25	11	39	50
Caracu	0	8	17	25	8	42	50
Senepol	3	8	14	25	14	36	50
Angus	0	8	17	25	8	42	50
Nelore	0	7	19	26	7	45	52
Geral	3	42	81	126	48	204	252

* Não foram observadas diferenças significativas ($P=0,6143$) entre raças para as frequências genótípicas, pelo teste de Qui-quadrado.

** Não foram observadas diferenças significativas ($P=0,3383$) entre raças para as frequências alélicas, pelo teste de Qui-quadrado.

Fortes (2007) analisando esse mesmo polimorfismo em animais da raça Nelore e Canchim, além de cruzamentos que utilizaram matrizes Nelore na base de formação observou para o alelo G frequência de 75,2% para a amostra de animais como um todo. Page *et al.* (2002) encontraram resultados semelhantes, ou seja, 70,0% de frequência para este alelo em animais *Bos taurus taurus*. Dois anos depois esses achados foram confirmados por Page *et al.* (2004) em um estudo com 926 animais *Bos taurus taurus* (cruzamentos de várias raças, representando duas populações) no qual as frequências do alelo G foram 63% e 72%.

Page *et al.* (2004) avaliaram a influência dos marcadores *CAPN316* e *CAPN530* na maciez de carne bovina em populações comerciais de origem taurina e observaram que ambos os marcadores revelaram associação significativa com a força de cisalhamento. Casas *et al.* (2005) analisando 460 animais da raça Brahman (*Bos taurus indicus*) verificaram que o alelo G estava fixado nesta população.

Pinto *et al.* (2010) realizaram um trabalho com 638 animais da raça Nelore e encontraram alta frequência para o alelo G (92%). Já Curi *et al.* (2010) em seu trabalho com diferentes grupos genéticos, encontraram uma frequência de 78% para o alelo G em 114 animais Nelore, 66% em 67 animais Angus X Nelore e 78% em 41 animais da raça Canchim. Analisando este mesmo polimorfismo, Corva *et al.* (2007) realizaram um estudo com as raças taurinas Angus, Hereford e Limousin cruzadas entre si e encontraram frequências para o alelo G variando de 85% a 98% entre os cruzamentos.

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os trabalhos citados acima, pois foram observadas frequências altas para o alelo G, variando de 72% a 86,5%, considerando tanto animais taurinos, adaptados ou não, quanto animais zebuínos.

Os resultados do teste do X^2 demonstraram que todas as raças analisadas estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$), indicando que as frequências genotípicas se mantêm constantes de geração a geração, não ocorrendo pressão de seleção para o gene da calpaína.

2. POLIMORFISMO *CAST/DDEI*

Após as reações de PCR, o gene *CAST* foi identificado pela amplificação de um fragmento de 486 pb (Figura 3).

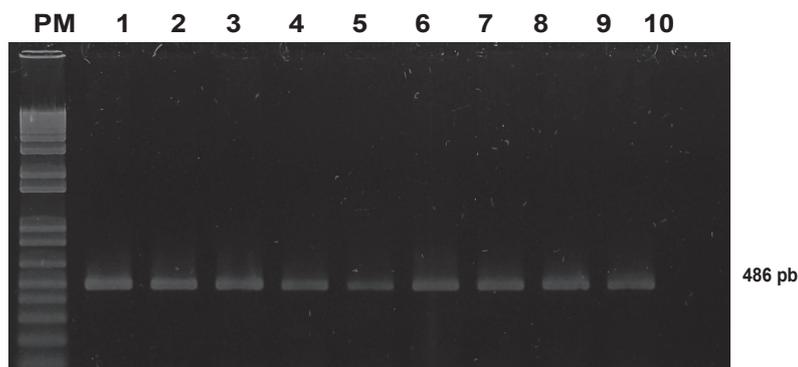


Figura 3. Gel de agarose 1% com produto de amplificação de um segmento de 486 pb do gene da calpastatina (*CAST*). PM - Padrão molecular de tamanho de 1Kb. 1-9 - Amostras. 10 - Branco.

Para o polimorfismo *CAST/Ddel*, o fragmento amplificado foi digerido com a enzima de restrição *Ddel*, o que resultou na formação de quatro fragmentos de restrição com 195, 191, 68 e 32 pb para o alelo A, favorável a maciez da carne em bovinos, e de três fragmentos de restrição com 386, 68 e 32 pb para o alelo G (Figura 4). Sendo que os fragmentos de 68 e 32 pb que aparecem em todos os genótipos são considerados fragmentos controles, ou seja, a presença desses fragmentos assegura que o fragmento de PCR tenha sido realmente clivado pela enzima de restrição, reduzindo, assim, artifícios da técnica.

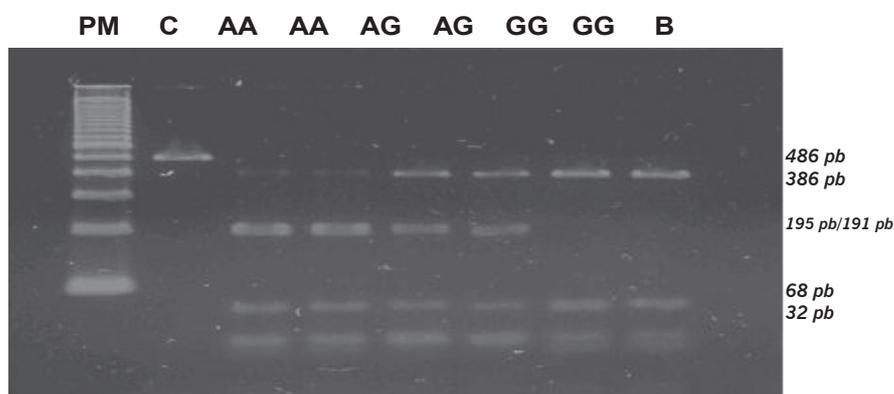


Figura 4. Gel de agarose 3% com produto de amplificação (C) e fragmentos do gene da calpastatina após digestão com enzima de restrição *Ddel*. PM. Padrão molecular de 100 pb. AA - animais homocigotos para o alelo A. AG - heterocigotos. GG - homocigotos para o alelo G. B - Branco.

Como podem ser observado na Tabela 2, as frequências alélicas variaram entre as raças, de 60% a 100% para o alelo A e de 6% a 40% para o alelo G, sendo que a raça Bonsmara foi a raça que apresentou maior frequência para o alelo A (100%), seguida pelas raças Angus (94%), Senepol (76%), Caracu (68%) e Nelore (60%).

Tabela 2. Frequências genotípicas e alélicas para o gene da calpastatina em animais das raças Bonsmara, Caracu, Senepol (taurinas adaptadas), Angus (taurina não-adaptada) e Nelore (zebuína).

Genótipos *					Alelos **		
Raças	AA	AG	GG	Total	A	G	Total
Frequência Relativa							
Bonsmara	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0 a	0,0	100,0
Caracu	56,0	24,0	20,0	100,0	68,0 b	32,0	100,0
Senepol	64,0	24,0	12,0	100,0	76,0 b	24,0	100,0
Angus	88,0	12,0	0,0	100,0	94,0 a	6,0	100,0
Nelore	31,0	58,0	12,0	100,0	60,0 b	40,0	100,0
Geral	67,5	23,8	8,7	100,0	79,4	20,6	100,0
Frequência Absoluta							
Bonsmara	25	0	0	25	50	0	50
Caracu	14	6	5	25	34	16	50
Senepol	16	6	3	25	38	12	50
Angus	22	3	0	25	47	3	50
Nelore	8	15	3	26	31	21	52
Geral	85	30	11	126	200	52	252

* Presença de diferenças significativas ($p < 0,01$) entre raças para as frequências genotípicas, pelo teste de Qui-quadrado.

** Presença de diferenças significativas ($p < 0,01$) entre raças para as frequências alélicas, pelo teste de Qui-quadrado.

Letras diferentes para frequências alélicas para o alelo A diferem estatisticamente de acordo com o teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$).

A menor frequência do alelo A observada em animais Nelore vem sendo documentada na literatura. Curi *et al.* (2009) amostraram 300 animais e obtiveram frequências alélicas mais baixas para Nelore (55,7%) e Canchim (69,5%) do que para Braunvieh three-cross (73,3%), Rubia Gallega X Nelore (82,9%), Brangus three-cross (84,2%) e Angus X Nelore (89,5%).

Morris *et al.* (2006), trabalhando com populações de animais *Bos taurus taurus*, obtiveram para o alelo A frequências variando entre 84,0% e 99,5%. Casas *et al.* (2006) também observaram uma maior frequência do alelo A em animais *Bos taurus taurus* (80,0%), *Bos taurus taurus* X *Bos taurus indicus* (83,0%) e menor em *Bos taurus indicus* (72,0%). Segundo Rubensam *et al.* (1998), os animais das raças *Bos taurus indicus* produzem carne menos macia, quando comparados

com animais das raças *Bos taurus taurus* e com cruzados *Bos taurus taurus* X *Bos taurus indicus*, devido a maior atividade da calpastatina quando ocorre aumento da proporção de sangue *Bos taurus indicus* em cruzamentos.

Conforme pode ser observado na Tabela 2, houve diferença significativa para as frequências genotípicas e alélicas entre as raças para o SNP *CAST/Ddel*. Considerando as raças duas a duas, as raças Bonsmara e Caracu, Bonsmara e Senepol e Bonsmara e Nelore apresentaram diferenças significativas entre si para esse marcador ($p < 0,05$). Entretanto, as raças Bonsmara e Angus, Caracu e Senepol, Caracu e Nelore e Senepol e Nelore não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$).

As diferenças estatísticas observadas entre a raça Nelore (zebuína) e as raças Angus e Bonsmara (taurinas) apresenta-se de acordo com o disposto na literatura, indicando que o marcador *CAST/Ddel* pode ser utilizado na seleção de animais com potencial para a produção de carne de melhor qualidade, já que a frequência de média a alta do alelo favorável permite que esse teste seja aplicado, desde que confirmada sua associação com a característica.

Os resultados do teste do X^2 para o polimorfismo *CAST/Ddel* demonstraram que as raças Angus, Caracu, Nelore e Senepol estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$), indicando que as frequências genotípicas se mantêm constantes de geração a geração, não ocorrendo pressão de seleção para o gene da calpastatina.

Entretanto, para a raça Bonsmara a frequência dos animais heterozigotos (AG) e dos animais homozigotos (GG) é menor do que a esperada, indicando que essa população não se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$). Mesmo tendo se tomado todos os cuidados necessários para a escolha dos animais que fizeram parte da população analisada, isto pode ter ocorrido devido ao fato dos animais amostrados apresentarem um grau de parentesco maior do que o desejado, superestimando o tamanho da amostra. A introdução da raça Bonsmara no Brasil ainda é recente e foi feita, predominantemente, via transferência de embriões, assim como são os touros com sêmen em centrais de inseminação utilizados na amostra, resultando em um parentesco mais próximo, tanto paterno quanto materno.

CONCLUSÕES

Os dois marcadores analisados (*CAPN530/PsyI* e *CAST/Ddel*) apresentaram-se viáveis na seleção de animais que apresentam aptidão para produção de carne com maciez satisfatória, devido a frequência alta dos alelos favoráveis observada na população em estudo. Esses testes poderão ser aplicados em programas de melhoramento genético animal, desde que confirmada a associação desses polimorfismos com a maciez da carne bovina.

Para que o Brasil mantenha sua competitividade no setor de pecuária bovina, principalmente, quanto ao mercado mundial da carne, é extremamente importante que essas novas tecnologias sejam incorporadas aos programas de melhoramento genético animal, a fim de gerar informações e conhecimentos que irão garantir novos avanços qualitativos e quantitativos a médio e longo prazos nos rebanhos zebuínos e cruzados.

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 sangue e de sêmen.

REFERÊNCIAS

ALVES, D.D.; GOES, R.H.T.B.; MANCIO, A.B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, p.135-149, 2005.

ANUALPEC 2009. Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Instituto FNP, p. 360, 2009.

BARENDSE, W.J. **DNA: markers for meat tenderness**. International patent application PTC/AUC02/00122 [International patent application WO 02/064820 A1], World International Property Organization, 2002.

BISHOP, M.D.; KOOHMARAIE, M.; KILLEFER, J.; KAPPES, S. Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatin gene. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 2277, 1993.

BURROW, H.M. Utilization of diverse breed resources for tropical beef production. In: **World congress on genetics applied to livestock production**. Belo Horizonte/MG.: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, CD ROM, 2006.

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 composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.83, p.13-19, 2005.

CASAS, E.; WHITE, S.N.; WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D.G.; CHASE JR, C.C.; JOHNSON, D.D.; SMITH, T.P.L. Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v.84, p.520-525, 2006.

CHUNG, H.Y.; DAVIS, M.E.; HINES, H.C. A DNA polymorphism of the bovine calpastatina gene detected by SSCP analysis. **Animal Genetics**, v.30, p.80, 1999.

CORRÊA, A. N. S. Análise retrospectiva e tendências da pecuária de corte no Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 37., 2000, Viçosa/MG. Palestras... Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p. 181- 205. 2000.

CORVA, P.; SORIA, L.; SCHOR, A.; VILLARREAL, E.; CENCI, M.P.; MOTTER, M.; MEZZADRA, C.; MELUCCI, L.; MIQUEL, C.; PAVÁN, E.; DEPETRIS, G.; SANTINI, F.; NAÓN, J.G. Association of CAPN1 and CAST gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle from Argentina. **Genetics and Molecular Biology**, 30, 4, 1064-1069. 2007.

CURI, R.A.; CHARDULO, L.A.L.; SILVEIRA, A.C. Alternative genotyping method for the single nucleotide polymorphism A2959G (AF159246) of the bovine CAST gene. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.43, p.657-659, 2008.

CURI, R.A.; CHARDULO, L.A.L.; MASON, M.C.; ARRIGONI, M.D.B.; SILVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, H.N. Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. **Animal Genetics**, p. 456-462, 2009.

FELICIO, P.E. de. Fatores que Influenciam na Qualidade da Carne Bovina. In: A. M. Peixoto; J. C. Moura; V. P. de Faria. (Org.). **Produção de Novilho de Corte**. 1.ed. Piracicaba: FEALQ, v. Único, p.79-97,1997.

FORTES, M.R.S.; CURI, R.A.; CHARDULO, L.A.L.; SILVEIRA, A.C.; ASSUMPCAO, M.E.O.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, H.N. Bovine gene polymorphisms related to fat deposition and meat tenderness. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, p.75-82, 2007.

KOOHMARAIE, M. Understanding and Managing Variation in Meat Tenderness. In: 40 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Santa Maria. Santa Maria:UFSM, 1 CD-ROM. 2003

LITTLE, J.; MOLER, C., Matlab: the language of technical computing. release 13 (Matlab 6.5. Product Family). The MathWorks, Inc. Natick, MA, USA. Conjunto de programas. 3 CD-ROM. 2002.

LONERGAN, S.M.; ERNEST, C.W.; BISHOP, M.D.; CALKINS, C.R.; KOOHMARAIE, M. Relationship of restriction fragment length polymorphisms (RFLP) at the bovine *calpastatina* locus to calpastatina activity and meat tenderness. **Journal of Animal Science**, v.73, p.3608-3612, 1995.

MOODY SS, LI C, BASARAB J, SNELLIG WM, KNEELAND J, MURDOCH B, HANSEN C, BENKEL B. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes for brackfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos taurus*. **Journal of Animal Science**, v.71, p.71-1471, 1993.

MORRIS, C.A.; CULLEN, N.G.; HICKEY, S.M.; DOBBIE, P.M.; VEENVLIET, B.A.; MANLEY, T.R.; PITCHFORD, W.S.; KRUK, Z.A.; BOTTEMA, C.D.K.; WILSON, T. Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of cooked M. *longissimus dorsi* steaks from Jersey X Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. **Animal Genetics**, v.37, p.411-414. 2006.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSCP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, Huddinge, v.39, p.225-235, 1992.

PAGE, B. T.; CASAS, E.; HEATON, M. P; CULLENT, N. G.; HYNDMAN, D. L.; MORRIS, C. A.; CRAWFORD A. M.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. Evaluation of Single-nucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v.80, p. 3077-3085, 2002.

PAGE, B.T.; CASAS, E.; QUAAS, R.L.; THALLMAN R.M.; WHEELER, T.L.; SHACKELFORD S.D.; KOOHMARAIE, M.; WHITE, S.N.; BENNETT, G.L.; KEELE, J.W.; DIKEMAN, M.E.; SMITH, T.P.L. Association of markers in the bovine *CAPN1* gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal of Animal Science*, v.82, p.3474-3481, 2004.

PINTO, L.F.B.; FERRAZ, J.B.S.; MEIRELLES F.V.; ELER, J.P.; REZENDE, F.M. CARVALHO, M.E.; ALMEIDA, H.B.; SILVA, R.C.G. Association of SNPs on *CAPN1* and *CAST* genes with tenderness in Nelore cattle. **Genetic Molecular Research**, p.1431-1442, 2010.

PRINGLE, T.D.; WILLIAMS, S.E.; LAMB, B.S.; JOHNSON, D.D.; WEST, R.L. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2955-2961, 1997.

REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. Biologia molecular aplicada à produção animal. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, p.215, 2001.

RESENDE, M.D.V.; LOPES, P.S.; SILVA, R.L.; PIRES, I.E.P. Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.56, p.63-77, jan./jun. 2008.

RINCON, G.; MEDRANO, J.F. Assays for genotyping single nucleotide polymorphism in the bovine *CAPN1* gene. **Animal Genetics**, brief note. 2006.

RUBENSAM, J.M.; FELICIO, 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, p.405-409, 1998.

SMITH, T. P. L.; CASAS, E.; REXROAD III, C. E.; KAPPES, S. M.; KEELE, J. W. Bovine *CAPN1* maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait *locus* for meat tenderness. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 78, p. 2589–2594, 2000.

VAN EENENNAAM, A.L.; LI, J.; THALLMAN, R.M.; QUAAS, R.L.; DIKEMAN, M.E.; GILL, C.A.; FRANKE, D.E.; THOMAS, M.G. Marked assisted selection in beef cattle. 2007 Disponível em: <http://animalscience.ucdavis.edu/anim_albiotech/Outreach/Marker_Assisted_Selection_in_Beef_Cattle.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2010.

WHITE, S. N.; CASAS, E.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D. G.; CHASE, JR. C. C.; JOHNSON, D. D.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. L. A new single nucleotide polymorphism in *CAPN1* extends to current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus* and crossbred descent. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 83, p. 2001-2008, 2005.

ZADWORNY, D.; KUHNLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.631-634, 1990.