

Genotipagem por PCR-RFLP de um polimorfismo no gene CAST em bovinos da raça Canchim

Isadora Inácio Sousa¹, Isabella Maiumi Zaidan Blecha², Sallene da Silva Maciel³, Anna Beatriz Robottom Ferreira⁴, Gelson Luís Dias Feijó⁵, Gustavo Garcia Santiago⁶, Ricardo Favero⁷, Fabiane Siqueira⁸

1 - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

2 - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

3 - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

4 - Embrapa Gado de Corte

5 - Embrapa Gado de Corte

6 - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

7 - Universidade Estadual de Londrina - UEL

8 - Embrapa Gado de Corte

RESUMO - Objetivou-se avaliar o marcador molecular do tipo SNP (Single-nucleotide Polymorphism) A2959G (AF159246) do gene bovino da calpastatina (CAST) em animais da raça Canchim provenientes das Provas Canchim de Avaliação de Desempenho dos anos de 2011 e 2012. As genotipagens foram realizadas por PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism). As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas pelo teste Qui-quadrado. Os desvios de frequências observadas em relação às esperadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram analisados a 5% de significância e os dados obtidos foram submetidos à ANOVA utilizando o PROC GLM (SAS). Não foram encontradas associações significativas do marcador com as características área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS) e marmoreio (MAR). Sendo assim, este marcador não apresenta potencial para ser incluído em painéis de SNPs customizados que visem o melhoramento genético de bovinos da raça Canchim.

Palavras-chave: bovino de corte, gene candidato, SNP

Genotyping by PCR-RFLP of one polymorphism on the CAST gene in Canchim cattle

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate the SNP type (Single-nucleotide Polymorphism) molecular marker A2959G (AF159246) of the calpastatin bovine gene (CAST) in Canchim breed animals from the Canchim Performance Evaluation Tests performed in 2011 and 2012. The genotyping were realized by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism). The allele and genotype frequencies were compared by chi-square test. The observed frequency deviations from those expected for the Hardy-Weinberg Equilibrium were analyzed at 5% significance and the data obtained were submitted to ANOVA using PROC GLM (SAS). No significant associations of the marker with ribeye area (REA), backfat thickness (BFT) and marbling (MAR) were found. Therefore, this marker does not present potential to be included in panels of customized SNP's that aim at the genetic improvement of Canchim cattle.

Keywords: beef cattle, candidate gene, SNP

Introdução

Um dos maiores desafios dos produtores brasileiros é a melhoria das características determinantes da qualidade da carne e das carcaças bovinas, como a maciez da carne, a quantidade de gordura entremeada, a cobertura de gordura da carcaça e a área do músculo *Longissimus dorsi*, sendo estes fatores relevantes na procura por qualidade e padronização. A maciez é uma característica considerada pelos consumidores como uma das mais importantes para avaliação da qualidade da carne, sendo influenciada por aspectos pré-abate, como raça, idade, manejo e nutrição, e aspectos pós-abate, como velocidade de resfriamento das câmaras frigoríficas e quantidade de gordura subcutânea da carcaça (KOOHMARAIE, 2003). Como ferramenta para o melhoramento de atributos da qualidade de carne, a Seleção Assistida por Marcadores (MAS) pode ser utilizada por meio da análise de polimorfismos localizados em genes candidatos responsáveis pela expressão de funções biológicas que manifestam alguma característica econômica de interesse. Desta forma, objetivou-se realizar estudo de associação entre o marcador *CAST/DdeI* (BLECHA et al., 2010) com características as características área de olho de lombo, espessura de gordura subcutânea e marmoreio em animais Canchim, com o intuito de contribuir para o melhoramento genético desta raça.

Revisão Bibliográfica

Os marcadores moleculares são variações herdáveis no genoma que caracterizam as diferenças fenotípicas entre dois ou mais indivíduos (VIGNAL, 2002). Uma forma de se trabalhar com marcadores é a Seleção Assistida por Marcadores (SAM), a qual apresenta um impacto positivo no melhoramento animal, principalmente, em características de mensuração tardia, difícil e/ou onerosa para o pecuarista (FORTES, 2007). Entretanto, a SAM apresentou algumas limitações, pois pelo fato das características quantitativas envolverem grande quantidade de genes para sua expressão, somente uma proporção pequena da variância genética total é capturada pelo pequeno número de marcadores moleculares utilizados, o que limita o progresso ou ganho genético (Solberg et al. 2008). Concretizou-se então a metodologia de seleção genômica (SG) e iniciou-se a comercialização, à custos acessíveis, de painéis com milhares de marcadores do tipo SNP espalhados pelo genoma bovino (Van Tassel, 2008), possibilitando assim envolver todo o genoma para a análise de uma ou várias características de interesse econômico, o que pode explicar os efeitos genéticos totais (Meuwissen; Hayes; Goddard, 2001). Porém, é necessário que os SNPs estejam diretamente localizados em genes candidatos que desempenham alguma função biológica de interesse. Até o momento, foram descritos alguns genes candidatos que estão relacionados com características de qualidade de carne em bovinos, como o *CAST* (MORRIS et al., 2006). No entanto, a magnitude relativa aos efeitos e a importância do gene no controle de variações fenotípicas ainda permanecem desconhecidas. O gene *CAST*, localizado no cromossomo 7, codifica a proteína calpastatina que é responsável pela inativação das enzimas calpaínas (BISHOP et al., 1993). As sequências helicoidais da calpastatina impedem as calpaínas de se ligarem às membranas, afetando negativamente a maciez no músculo vivo, e a ação elevada da calpastatina resulta na redução da degradação das proteínas musculares (MORGAN et al., 1993). Curi et al. (2009) avaliaram o mesmo SNP em 300 animais Nelore (*Bos taurus indicus*) e cruzamentos de *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* e observaram menor frequência do alelo A, considerado favorável à maciez da carne, para os animais *Bos taurus indicus*, assim como foi relatado em estudos anteriores (CASAS et al., 2006; SCHENKEL et al., 2006; CURI et al., 2008).

Materiais e Métodos

Foram genotipados por PCR-RFLP 203 animais para o marcador *CAST/DdeI*, sendo estes animais provenientes das PCADs realizadas nos anos de 2011 e 2012. As características do presente estudo (AOL, EGS e MAR) foram avaliadas por ultrassonografia em carcaça. As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em um aparelho termociclador *MyCycler* (BioRad®) em um volume final de 25 µL. Para amplificar um fragmento com 486 pares de bases (pb) foram utilizados os *primers forward* 5'-TGAATTTGTCTGGTTCACCT-3' e *reverse* e 5'-GACAAGGTGCGGAAGTCCTA-3'. O programa foi de 30 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por um minuto, anelamento de 58°C por um minuto, e um passo de extensão a 72°C por um minuto. Em seguida, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose à 1%, corados com SybrGold® e fotografados em luz ultravioleta. As reações de digestão também foram realizadas em termociclador *MyCycler* (BioRad®). O produto de PCR foi clivado com enzima de restrição *DdeI* ([10U/ul]) à temperatura de 37°C. O tempo de incubação em termociclador foi de quatro horas e a quantidade de enzima utilizada nas reações foi de 0,1 ul por amostra. Em seguida, os produtos das reações de digestão foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose à 3% corados com SybrGold® e fotografados em luz ultravioleta, onde foi possível observar pelos padrões de corte dos fragmentos os genótipos GG (68 e 386 pb), AG (68, 191, 195 e 386 pb) e AA (68, 191 e 195 pb). As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas utilizando o teste de Qui-quadrado e os desvios das frequências observadas em relação às esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram analisados a 5% de significância. Os dados fenotípicos e genotípicos obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando o PROC GLM do SAS.

Resultados e Discussão

As frequências genotípicas mais observadas foram de 69,46% para o genótipo AA e em relação aos alelos mais frequentemente observados foram de 83% para o alelo A (Tabela 1). Não foi observado efeito significativo ($P < 0,05$) entre o marcador *CAST/DdeI* e as características estudadas (AOL, EGS e MAR). Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 2. Os resultados obtidos corroboram com outros estudos que analisaram a associação entre marcadores no gene *CAST* e características relacionadas ao crescimento e composição de carcaça em bovinos, os quais também não obtiveram resultados significativos (Chung et al., 2001; Li et al., 2010). No entanto, Dutra et al. (2011) estudando o mesmo

SNP em bovinos cruzados encontrou associação significativa ($P = 0,038$) entre o marcador *CAST/DdeI* e área de olho de lombo, com efeito médio de substituição para o alelo G de $-2,4797 \pm 0,9831$ cm e diferenças entre os genótipos AA e AG (AA-AG) e AA e GG (AA-GG) de $+1,99$ cm e $+5,72$ cm para AOL, respectivamente. Contudo, a associação deste marcador com AOL não era esperada, pois aparentemente o produto do gene *CAST* não participa da fisiologia desta característica.

Conclusões

O marcador *CAST/DdeI* não apresenta potencial para ser incluído em painéis de SNPs de baixa densidade para bovinos da raça Canchim.

Gráficos e Tabelas

Tabela 1. Frequências alélicas e genotípicas encontradas para o marcador *CAST/DdeI*

Frequências alélicas e genotípicas (%)					
<i>CAST/DdeI</i>	A	G	AA	AG	GG
	83	17	69,5	27,1	3,5

Tabela 2. Médias e erro padrão das características fenotípicas analisadas para os genótipos do marcador *CAST/DdeI*.

	<i>CAST/DdeI</i>			
	P>F	AA	AG	GG
AOL	0,7759	76,90±0,77	76,03±1,16	77,19±3,06
EGS	0,8593	2,43±0,06	2,48±0,09	2,44±0,25
MAR	0,4114	2,45±0,04	2,54±0,06	2,40±0,17

Referências

- BLECHA, I. M. Z.; SIQUEIRA, F.; FEIJÓ, G.L.D. et al. Método alternativo de genotipagem dopolimorfismo *CAST/DdeI* localizado no gene bovino da calpastatina. In: Congresso Brasileiro de Genética, 56., 2010, Anais 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010. BISHOP, M. D.; KOOHMARAIE, M.; KILLEFER, J.; KAPPES, S. Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatina gene. *Journal of Animal Science*, v. 71, p. 2277, 1993. CARVALHO, T. D.; SIQUEIRA, F.; SOARES, C. O.; TORRES JUNIOR, R. A.; MEDEIROS, S.R.; SOUZA JUNIOR, M. D.; BLECHA, I. M. Z.; FLORES, R. S.; MACHADO, C. O. F. Avaliação de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em genes relacionados às características de qualidade de carne em bovinos de corte. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Departamento de Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2009.
- 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 u-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science*, v. 84, p. 520-525, 2006. CURTI, R. A.; CHARDULO, L. A. L.; MASON, M. C.; ARRIGONI, M. D. B.; SILVEIRA, A. C.; DE 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*, v. 40, p. 456-462, 2009. FORTES, M. R. S. Polimorfismos dos genes *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* e *DGAT1* como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem. 2007. 84f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Departamento de Reprodução Animal, Universidade Federal de São Paulo, 2007.
- KOOHMARAIE, M.; VEISETH, E.; KENT, M. P.; SHACKELFORD, S. D. Understanding and managing meat tenderness. In: 40ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA (CD Room), 2003. LI, J.; ZHANG, L.; GAN, Q.; LI, J.; GAO, H.; YUAN, Z. Association of *CAST* Gene Polymorphisms with Carcass and Meat Quality Traits in Chinese Commercial Cattle Herds. *The Asian-Australasian Journal of Animal Science*, v. 23, n. 11, p. 1405-1411, 2010. 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. Meuwissen, T. H. E.; Hayes, B. J.; Goddard, M. E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, Bethesda, v. 157, n. 4, p. 1819-1829, 2001. Solberg, T. R.; Sonesson, A. K.; Woolliams, J. A.; Meuwissen, T. H. E. Genomic selection using different marker types and densities. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 86, n. 10, p. 2447-2454, 2008.