



Caracterização do genótipo mitocondrial de um rebanho da raça bovina Canchim

Simone Cristina Méo¹, Christina Ramires Ferreira², Marcos Roberto Chiaratti², Flávio Vieira Meirelles²,
Luciana Correia de Almeida Regitano¹, Maurício Mello de Alencar¹, Pedro Franklin Barbosa¹

¹Pesquisador(a) da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos-SP. e-mail: simone@cnpse.embrapa.br

²Departamento de Ciências Básicas, FZEA – USP/Pirassununga-SP. e-mail: meirelff@usp.br

Resumo: A formação da raça bovina Canchim, 5/8 Charolês + 3/8 Zebu, cuja base genética foi ampliada pelo desenvolvimento de três linhagens (antiga, nova e cruzada), buscou aproveitar o vigor híbrido e complementar a alta velocidade de crescimento e boa qualidade de carne do Charolês (Europeu) à adaptação aos trópicos do Zebu. O genótipo mitocondrial (mtDNA) é controlado por herança materna e suas variações podem levar a diferenças fenotípicas para características produtivas. No Canchim, o tipo de mtDNA (Europeu/taurus ou Zebu/indicus) não era conhecido. Neste trabalho, animais da raça Canchim do rebanho da Embrapa Pecuária Sudeste foram caracterizados por meio da genotipagem do mtDNA por PCR alelo-específico. Pela avaliação genealógica, foram determinadas as 173 matriarcas Zebu (62 Indubrasil, 3 Guzerá e 108 Nelore) formadoras da raça e seus 6.749 descendentes. Nos animais com material genético disponível (n=6.404), descendentes de 144 matriarcas, e nos animais vivos em dezembro de 2007 (n=689), descendentes de 107 dessas matriarcas e distribuídos nas três linhagens (25,3% antiga, 45,7% nova e 29,0% cruzada), a frequência de mtDNA indicus variou de 1,15 a 2,05%. Assim, nesse rebanho Canchim há predominância de animais com mtDNA taurus, apesar de fêmeas Zebus terem sido utilizadas na formação da raça. A caracterização do mtDNA pode ser utilizada para a seleção de animais com o genótipo mitocondrial de interesse. Entretanto, a baixa frequência de mtDNA indicus não permite a avaliação de efeitos do mtDNA sobre características de produção em Canchim.

Palavras-chave: bovinos, DNA mitocondrial, herança materna, PCR alelo-específico

Mitochondrial genotype characterization in a herd of Canchim cattle breed

Abstract: The Canchim bovine breed, a 5/8 Charolais + 3/8 Zebu composite, was constituted to take advantage of hybrid vigor and to complement characteristics of higher growth rates and beef quality from Charolais (European) with tropical adaptation from Zebu. Further, the development of three lineages (old, new, and crossed) has increased its genetic basis. The mitochondrial genotype (mtDNA) is subjected to maternal inheritance and its polymorphisms can lead to phenotypic variation in production traits. The mtDNA type (European/taurus or Zebu/indicus) was not known in Canchim. In this work, animals of Canchim breed from Embrapa Southeast Cattle were characterized by mtDNA genotyping using allele-specific PCR. The genealogical evaluation identified the 173 Zebu founding females (62 Indubrazil, 3 Guzera, and 108 Nelore) that formed the breed and their 6,749 offsprings. The mtDNA indicus frequency ranged from 1.15 to 2.05% in animals with available genetic material (n=6,404) and descendants of 144 females, and in animals alive in December, 2007 (n=689), descendants of 107 of those females and distributed in the lineages (25.3% old, 45.7% new, and 29.0% crossed). Thus, in Canchim animals of this herd the mtDNA taurus prevails even though the founding females were Zebu. The mtDNA characterization can direct animal selection to the mitochondrial genotype of interest. However the low proportion of animals with mtDNA indicus does not allow the evaluation of mtDNA effects on production traits in Canchim.

Keywords: allele-specific PCR, bovine, maternal inheritance, mitochondrial DNA

Introdução

A raça bovina Canchim, 5/8 Charolês + 3/8 Zebu, foi desenvolvida na atual Embrapa Pecuária Sudeste com o objetivo de aproveitar os efeitos favoráveis da heterose e complementar as características desejáveis do Charolês (alta velocidade de crescimento e boa qualidade de carne) às do Zebu (adaptação aos trópicos). A raça tem sido usada com sucesso no Brasil para a produção de carne, principalmente em cruzamento terminal com fêmeas Zebu, buscando maior velocidade de crescimento e peso de carcaça. Existem três linhagens da raça Canchim: a antiga, mantida na Embrapa Pecuária Sudeste como rebanho fechado desde 1953; a nova, formada a partir de 1986 pelo esquema UEPAE (fêmeas cruzadas Canchim

x Nelore são acasaladas com touros Charolês para obtenção de descendentes machos e fêmeas que, registrados e acasalados entre si, produzem o bimestiço Canchim); e a cruzada, obtida a partir de 1998 por meio do cruzamento entre animais da linhagem antiga e da linhagem nova.

A raça Canchim já foi caracterizada por vários estudos de genética quantitativa e molecular. Entretanto, além do genoma nuclear, os mamíferos possuem um genoma citoplasmático, presente nas mitocôndrias: o DNA mitocondrial (mtDNA), que é de herança exclusivamente materna. Sabe-se que polimorfismos no mtDNA podem alterar a taxa de síntese protéica mitocondrial, afetar a adaptação das raças bovinas a condições ambientais distintas e produzir efeitos sobre a produção animal. Assim, uma vez que na formação da raça Canchim foram utilizadas fêmeas Zebus de diferentes raças e que a maioria das fêmeas Zebus brasileiras, formadas a partir de cruzamentos absorventes de fêmeas nativas com touros Zebus, apresenta mtDNA de origem Européia (*taurus*) (Meirelles et al., 1999), é bem provável que a composição mtDNA do Canchim, esperadamente Zebu (*indicus*), seja bastante variável e que ocorra predominância de mtDNA *taurus*. Por esse motivo, este trabalho busca caracterizar o genótipo mitocondrial (*taurus* ou *indicus*) dos animais e das linhagens (antiga, nova e cruzada) da raça Canchim do rebanho da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

Material e Métodos

Foram avaliados animais da raça bovina Canchim das linhagens antiga, nova e cruzada do rebanho da Embrapa Pecuária Sudeste. Vale ressaltar que na formação da linhagem antiga, a partir de 1940, e da linhagem nova, a partir da década de 1980, foram utilizadas fêmeas de diferentes raças Zebus. Por meio de análise genealógica, foram identificadas as matriarcas formadoras da raça Canchim e seus descendentes. A partir da observação da concordância do genótipo de dois descendentes de cada matriarca, foi possível inferir o genótipo mitocondrial de todos os animais da raça Canchim do rebanho da Embrapa Pecuária Sudeste. Em casos duvidosos, foram analisados mais cinco animais.

Para a extração de DNA total, amostras de sangue foram coletadas em tubo a vácuo com EDTA. As células vermelhas foram desintegradas em tampão de hemólise (10 mM de Tris, 5 mM de MgCl₂ e 10 mM de NaCl) e centrifugadas a 700 xg por 10 min até a obtenção de precipitado limpo. As células brancas obtidas foram incubadas a 55°C por cerca de 12 horas em tampão de lise (10 mM de Tris, 100 de mM NaCl, 10 mM de EDTA, 0,5% de SDS e 50 µg de Proteinase K). Posteriormente, as proteínas foram precipitadas em altas concentrações de sal (1,2 M de NaCl) e o sobrenadante, recuperado após centrifugação a 16.000 xg por 15 min, foi lavado com etanol absoluto e etanol 70%, ressuscitado em TE (10 mM de Tris e 1 mM de EDTA), tratado com RNase A (10 µg/mL) e avaliado quanto à concentração do DNA em espectrofotômetro.

O genótipo mtDNA (*taurus* ou *indicus*) foi avaliado por reação em cadeia da polimerase (PCR) alelo-específica para amplificação de região de 366 bp do gene rRNA 16S de mtDNA *Bos taurus* e *B. indicus*. Em reações separadas, foram usados *primers forward* específicos para mtDNA *taurus* (5'-CCAATGATAACATCTCAACTG-3') ou *indicus* (5'-CCAATGACAGCATCTCAATCA-3'). O *primer reverse* não-específico (5'-GAGCTATGATGGGTGCTAGG-3') anela-se tanto a mtDNA *taurus* quanto a *indicus*. A reação de PCR, em volume de 12,5 µL, com 0,2 µM de um dos *primers forward*, 0,2 µM do *primer reverse*, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP e 0,25 U de *Taq* DNA polimerase, foi iniciada com um ciclo de 95°C por 2 min, seguido por 36 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 seg, anelamento a 58°C por 55 seg e extensão a 72°C por 120 seg, e um ciclo final a 72°C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%), corados com brometo de etídeo e avaliados em transiluminador UV.

Resultados e Discussão

Na avaliação genealógica foram identificadas as matriarcas formadoras da raça Canchim do rebanho da Embrapa Pecuária Sudeste e seus descendentes. Segundo Barbosa (2000), na formação do Canchim (linhagem antiga) foram utilizadas 145 fêmeas Zebus de três raças: 127 Indubrasil (IB), nove Guzerá (GU) e nove Nelore antiga (N1). Entretanto, observou-se que somente 71 dessas fêmeas (62 IB, 3 GU e 6 N1) deixaram descendentes e que só havia material genético disponível, estocado no banco de DNA, de descendentes de 46 fêmeas (43 IB, 1 GU e 2 N1). Na formação da linhagem nova, 101 fêmeas Nelore (NE) e uma Nelore nascida fora da Embrapa (N2) deixaram descendentes, das quais 98 apresentaram material genético disponível (97 NE e 1 N2). Assim, das 173 matriarcas com 6.749 descendentes Canchim (nascidos até novembro de 2007), foi possível definir o genótipo mitocondrial de 144 matriarcas e dos seus 6.404 descendentes.

Das 144 matriarcas, somente 3 matriarcas (1 IB e 2 NE) apresentaram mtDNA *indicus*. Assim, da população de 6.404 animais, 6.273 (97,95%) apresentaram mtDNA *taurus* e 131 (2,05%) apresentaram mtDNA *indicus*. A discordância de genótipo mitocondrial entre descendentes só foi encontrada para um

animal, o que pode indicar erro de registro ou troca de amostras. Em nenhum animal foi observada amplificação dos dois tipos de mtDNA.

Os animais da raça Canchim vivos em dezembro de 2007 no rebanho da Embrapa Pecuária Sudeste (n=689) descendentes de 107 matriarcas (32 IB, 1 N1, 73 NE e 1 N2) foram agrupados nas linhagens antiga (25,3% dos animais), nova (45,7%) e cruzada (29,0%) de acordo com o genótipo mtDNA (taurus ou indicus; Tabela 1). Dentre esses animais, a proporção de mtDNA taurus foi de 98,26% e de mtDNA indicus de 1,74%. Nas linhagens antiga, nova e cruzada, respectivamente, a frequência de mtDNA taurus foi 98,85, 98,10 e 98,0% e de mtDNA indicus de 1,15, 1,90 e 2,0% (Tabela 1).

Tabela 1 Animais da raça Canchim do rebanho da Embrapa Pecuária Sudeste distribuídos nas linhagens antiga, nova e cruzada de acordo com o genótipo mitocondrial (mtDNA) taurus ou indicus.

Linhagem	N (%) mtDNA taurus	N (%) mtDNA indicus	N (%) Total
Antiga	172 (98,85%)	2 (1,15%)	174 (25,3%)
Nova	308 (98,10%)	6 (1,90%)	315 (45,7%)
Cruzada	196 (98,0%)	4 (2,0%)	200 (29,0%)
Total	677 (98,26%)	12 (1,74%)	689 (100%)

Esse predomínio de mtDNA taurus em descendentes de fêmeas Zebus, esperadamente de mtDNA indicus, confirma que no Brasil as raças Zebus foram formadas a partir de cruzamentos absorventes de fêmeas nativas, que possuem mtDNA taurus, com touros Zebus. Uma vez que o mtDNA é de herança exclusivamente materna, a frequência de mtDNA taurus em animais Zebus é elevada, como observado para as raças Nelore, Gir e Brahman (Meirelles et al., 1999). Além disso, na raça Canchim, a predominância de mtDNA indicus foi independente da linhagem analisada.

Vários estudos relataram efeitos de polimorfismos de DNA mitocondrial, inclusive do gene rRNA 16S (Mannen et al., 2003), sobre características produtivas. Devido à baixa frequência de mtDNA indicus na população Canchim do rebanho da Embrapa Pecuária Sudeste, não foi possível realizar análises estatísticas para associar o genótipo mitocondrial taurus ou indicus às características de produção. A baixa frequência de mtDNA indicus pode ser um dos motivos que explica a ausência do efeito de origem citoplasmática sobre pesos ao nascimento, à desmama e aos 12 meses nos descendentes de matriarcas da raça Indubrasil, avaliado por Alencar et al. (1997).

Conclusões

Na raça bovina Canchim, formada a partir de matriarcas das raças Zebus Guzerá, Indubrasil e Nelore, há predominância (acima de 97,95%) de animais com mtDNA taurus, independentemente da linhagem (antiga, nova ou cruzada) avaliada, no rebanho da Embrapa Pecuária Sudeste.

A caracterização do mtDNA da raça Canchim pode ser utilizada para a seleção de animais com o genótipo mitocondrial de interesse e estudos de herança citoplasmática. Entretanto, para que os efeitos do mtDNA sobre características de produção possam ser avaliados, será necessário produzir uma população experimental com maior proporção de animais com mtDNA indicus, por meio da orientação de acasalamentos ou por técnicas da reprodução, como a transferência de embriões.

Literatura citada

- ALENCAR, M.M.; TREMATORE, R.L.; BARBOSA, P.F. et al. Estudo da influência da linhagem citoplasmática sobre pesos em bovinos da raça Canchim. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1997. p.230-232.
- BARBOSA, P.F. O Canchim na Embrapa Pecuária Sudeste. In: CONVENÇÃO NACIONAL DA RAÇA CANCHIM, 4., 2000, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: EMBRAPA-CPPSE; São Paulo: ABCCAN, 2000. p.55-68.
- MANNEN, H.; MORIMOTO, M.L.; OYAMA, K. et al. Identification of mitochondrial DNA substitutions related to meat quality in Japanese Black cattle. **Journal of Animal Science**, v.81, n.1, p.68-73, 2003.
- MEIRELLES, F.V.; ROSA, A.J.M.; LÔBO, R.B. et al. M. Is the american Zebu really *Bos indicus*? **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n.4, p.543-546, 1999.