



47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

Salvador, BA – UFBA, 27 a 30 de julho de 2010

Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia  
Brasileira de Vanguarda



### Frequências genotípicas e alélicas do Gene *DGAT1* em Bovinos da Raça Girolando<sup>1,2</sup>

Tatiane Ribeiro de Siqueira<sup>3</sup>, Daisyléa de Souza Paiva<sup>4</sup>, Larissa Helena da Rocha Meira<sup>5</sup>, Isabela Fonseca<sup>6</sup>,  
Raquel Marinho Alvino<sup>5</sup>, Alexandre Rodrigues Caetano<sup>7</sup>, Samuel Rezende Paiva<sup>7</sup>, Wagner Arbex<sup>8</sup>,  
Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva<sup>8</sup>, Marta Fonseca Martins Guimarães<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Parte do trabalho financiado pela FAPEMIG

<sup>2</sup>Projeto Financiado pela Embrapa

<sup>3</sup>Graduanda do Curso em Ciências Biológicas - Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora. e-mail: [tatirsiqueira@yahoo.com.br](mailto:tatirsiqueira@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Graduanda do curso de Farmácia e Bioquímica - Universidade Federal de Juiz de Fora. e-mail: [daisyufjf@gmail.com](mailto:daisyufjf@gmail.com)

<sup>5</sup>Graduandas do Curso de Biomedicina - Universidade Antônio Carlos/ Juiz de Fora. e-mail: [laribiomedicina@hotmail.com](mailto:laribiomedicina@hotmail.com),  
[raquelmabiomed@yahoo.com.br](mailto:raquelmabiomed@yahoo.com.br)

<sup>6</sup>Bolsista de Apoio Técnico à Pesquisa - BAT II - FAPEMIG. e-mail: [isabela\\_fonseca@yahoo.com.br](mailto:isabela_fonseca@yahoo.com.br)

<sup>7</sup>Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. e-mail: [acaetano@cenargen.embrapa.br](mailto:acaetano@cenargen.embrapa.br),  
[samuel@cenargen.embrapa.br](mailto:samuel@cenargen.embrapa.br)

<sup>8</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite. e-mail: [arbex@cnpgl.embrapa.br](mailto:arbex@cnpgl.embrapa.br), [marcos@cnpgl.embrapa.br](mailto:marcos@cnpgl.embrapa.br),  
[mmartins@cnpgl.embrapa.br](mailto:mmartins@cnpgl.embrapa.br)

**Resumo:** O gene *DGAT1* possui papel essencial no metabolismo celular, pois codifica a enzima diacilglicerol aciltransferase que catalisa a etapa final da síntese de triglicérides. Vários trabalhos têm demonstrado que polimorfismos neste gene estão fortemente associados à porcentagem de gordura no leite. Tais estudos identificaram dois alelos (A e K) com efeito maior para essa característica. O alelo A, fixado na maioria das raças europeias, está associado ao aumento da produção de leite e de proteína e o alelo K, com alta frequência em raças zebuínas, está associado à diminuição da produção de proteína e ao aumento na produção de gordura no leite. Neste trabalho, foram genotipados 93 touros e 386 vacas da raça Girolando participantes do programa de melhoramento dessa raça. O DNA dos animais foi extraído e amplificado pela técnica de PCR e o produto foi digerido com a enzima de restrição *Eae I*. As frequências dos genótipos AA, AK e KK na população foram de 3,75%, 34,65% e 61,58%, respectivamente. As frequências dos alelos A e K nessa população foram iguais a 21,09% e 78,91%, respectivamente, e estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P = 0,7668$ ). Esse resultado sugere que não está sendo praticada a seleção para nenhum dos alelos do gene *DGAT1*.

**Palavras-chave:** características de produção, marcador molecular, SNP

Genotypic and allelic frequencies of the *DGAT1* Gene in Cattle Breed Girolando

**Abstract:** *DGAT1* has an essential role in cellular metabolism, this gene encoding diacylglycerol acyltransferase that catalyzes the final step in triglycerides synthesis. Several studies have shown that polymorphisms in this gene are strongly associated with milk fat content. Studies have identified two alleles with greater effect for the trait, the allele A, which is fixed in European breeds, and it is associated with increasing level in protein and milk yields and decreasing in fat yield. K allele has high frequency in Zebu breeds, and it is associated with decreasing in protein and milk yields, and increasing in fat yield. This study was performed using data from Girolando breeding program, including genotypic information from 93 bulls and 386 cows. DNA was extracted and amplified by PCR, and the product was digested with restriction enzyme *Eae I*. The frequency of genotypes AA, AK and KK in the population were 3.75%; 34.65%; and 61.58%, respectively. The frequencies of the A and K alleles in this population were 21.09% and 78.91%, respectively, in accordance with the probability test of Hardy-Weinberg equilibrium ( $P = 0.7668$ ), suggesting there is no selection for the alleles A and K of the *DGAT1* gene in this population.

**Keywords:** production traits, molecular marker, SNP

### Introdução

O gene *DGAT1* possui papel essencial no metabolismo celular, codificando a enzima microsossomal AcilCoa- diacilglicerol aciltransferase, a qual regula a taxa de triglicérides nos adipócitos, sendo também



associada a homeostase energética. Por meio do mapeamento híbrido radioativo, mapeou-se o gene *DGAT1* próximo ao microssatélite CSSM66 no cromossomo 14 de bovinos (BTA 14), onde foram localizados polimorfismos fortemente associados com características de produção (Grisart et al. 2001, Winter et al. 2002). O polimorfismo com maior efeito na característica é a substituição de uma lisina por uma alanina (K232A), resultando na substituição de dois nucleotídeos (AA/GC), ocorrida no início do éxon VIII do gene *DGAT1*. Grisart et al. (2004) demonstraram que esse polimorfismo estava envolvido na deposição de gordura e que o alelo K estava associado à composição e ao alto teor de gordura do leite. Grisart et al. (2004) observaram também que aumento na produção de proteínas e a diminuição de gordura estavam relacionados ao alelo A. Esse polimorfismo apresenta elevado efeito sobre a produção do leite, entretanto, outros polimorfismos associados a essas características também têm sido descritos, mas com efeito menor (Grisart et al. 2004, Schennink et al. 2007). Considerando que *DGAT1* foi o primeiro gene candidato, em bovinos, com efeito comprovado para características de produção em raças leiteiras, objetivou-se, no presente trabalho, genotipar touros e vacas da raça Girolando, participantes do programa de melhoramento da raça, para o polimorfismo K232A de *DGAT1*, bem como estimar suas frequências alélicas e genotípicas e verificar se este gene encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

#### Material e Métodos

Amostras de sangue e sêmen, respectivamente, foram obtidas de 386 vacas e 93 touros Girolando participantes do Programa de Melhoramento da Raça Girolando conduzido pela Embrapa Gado de Leite e pela Associação Brasileira dos Criadores de Girolando (Girolando). O DNA foi extraído utilizando-se o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) conforme recomendações do fabricante. A quantificação e a avaliação da qualidade das amostras foram obtidas por meio de espectrofotometria (Nanodrop®1000 Technologies, Wilmington, DE, EUA). Os genótipos foram determinados pela técnica de PCR-RFLP. Para a amplificação da região de interesse do gene *DGAT1* foram utilizados *primers* já descritos por Kaupe et al. (2004) e as condições da reação da PCR foram otimizadas para as condições do laboratório. A digestão dos produtos da PCR foi realizada com a enzima de restrição *Eae I* e o padrão de bandas observado em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo. A digestão com essa enzima permitiu a distinção do polimorfismo K232A, localizado no éxon VIII do gene *DGAT1*. O alelo K é detectado por um fragmento de 411 pb, correspondendo ao produto não digerido da reação de PCR, enquanto o alelo A é distinguido pela presença de dois fragmentos de 208 e 203 pb produzidos pela restrição do *amplicon*. Os indivíduos heterozigotos são identificados pela presença de fragmento com três tamanhos 411, 208 e 203 pb. As frequências alélicas e genotípicas, bem como o teste de probabilidade de EHW foram obtidas por meio do uso do programa GENEPOP *web version* 4.0.10. A probabilidade de EHW associado às frequências genotípicas observadas foi testada pelo teste  $\chi^2$  ao nível de significância de 1%.

#### Resultados e Discussão

As frequências genotípicas, alélicas e o teste de EHW para os alelos A e K do gene *DGAT1* são apresentados na Tabela 1. As frequências genotípicas observadas são semelhantes às esperadas, estando em Equilíbrio. Conforme dados da Tabela 1, os alelos A (0, 2109) e K (0, 7891) não estão igualmente distribuídos, apresentando maior frequência para o alelo K, como também descrito por Kaupe et al. (2004) para raças zebuínas. Fisher et al. (2004) sugerem que a conservação evolutiva do aminoácido lisina na posição 232 esteja diretamente ligada à importância dessa enzima na via metabólica de ácidos graxos.

Tabela 1- Frequências genotípicas, alélicas e probabilidades de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Genótipo	Número de Animais		Frequência		Equilíbrio de Hardy-Weinberg
	Observado	Esperado	Genotípica	Alélica	
KK	295	298,2	0,6158	(K) 0,7891	0,7668
AK	166	159,5	0,3465		
AA	18	21,2	0,0375	(A) 0,2109	



47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

Salvador, BA – UFBA, 27 a 30 de julho de 2010

*Empreendedorismo e Progresso Científicos na Zootecnia  
Brasileira de Vanguarda*



### Conclusões

Por meio dos resultados das genotipagens para o alelo A e K do gene *DGAT1* foi possível verificar que a população analisada de animais da raça Girolando, participantes do Programa de Melhoramento, está em EHW, não havendo seleção nesta população para nenhum dos alelos do gene estudado.

### Literatura citada

- FISHER, P.J.; SPELMAN, R.J. Verification of selective DNA pooling methodology through identification and estimation of the *DGAT1* effect. **International Society for Animal Genetics**, v.35, p.201-205, 2004.
- GRISART, B.; COPPIETERS, W.; FARNIR, F. et al. Positional Candidate Cloning of a QTL in Dairy Cattle: Identification of a Missense Mutation in the Bovine *DGAT1* Gene with Major Effect on Milk Yield and Composition. **Genome Research**, v.12, p.222-231, 2001.
- GRISART, B.; FARNIR, F.; KARIM, L. et al. Genetic and functional confirmation of the causality of the *DGAT1* K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v.101, p.2398-2403, 2004.
- KAUPE, B.; WINTER, A.; FRIES, R. et al. *DGAT1* polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.182-18, 2004.
- SCHENNINK, A.; STOOP, W.M.; VISKER, M.H. et al. *DGAT1* underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. **Animal Genetics**, v.38, p.467-73, 2007.
- WINTER, A.; KRAMER, W.; WERNER, F.A. et al. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v.99, p.9300-9305, 2002.