

CARACTERIZAÇÃO DO HAPLÓTIPO MITOCONDRIAL DE UMA AMOSTRA DE TOUROS DA RAÇA NELORE, REPRESENTATIVA DAS PRINCIPAIS LINHAGENS COMERCIALIZADAS NO BRASIL

(Mitochondrial haplotype characterization of one sample of Nelore bulls representing the main lines marketed in Brazil).

Polyana Cristine TIZIOTO¹; Simone Cristina Méo NICIURA^{2*}; Adriana Mércia Guaratini IBELLI¹; Gisele Batista VENERONI¹; Fabiane SIQUEIRA³; Antonio do Nascimento ROSA³; Luiz Otavio Campos da SILVA³; Roberto Augusto de Almeida TORRES JÚNIOR³; Mauricio Mello de ALENCAR²; Luciana Correia de Almeida REGITANO²

1. Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução – UFSCAR, São Carlos/SP; 2. Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos/SP; 3. Embrapa Gado de Corte - Campo Grande/MS.

RESUMO

Os bovinos podem ser classificados em dois grandes grupos de acordo com sua origem e distribuição geográfica: o grupo *Bos taurus*, representado pelos bovinos europeus, e o *Bos indicus* ou zebuino, que vive nas regiões tropicais. O rebanho brasileiro é constituído principalmente por raças zebuínas, das quais predomina a raça Nelore. Os mamíferos possuem, além do genoma nuclear, um genoma citoplasmático encontrado nas mitocôndrias, o DNA mitocondrial (mtDNA), que apresenta herança exclusivamente materna. Há relatos que os polimorfismos no mtDNA podem afetar a adaptação das raças bovinas a condições ambientais distintas bem como a produção animal. Provavelmente a maioria da população brasileira de animais da raça Nelore foi obtida por retrocruzamentos de vacas nativas com touros zebuínos e, portanto, abrigam mtDNA de origem *Bos taurus*. O objetivo deste estudo foi caracterizar o haplótipo do mtDNA de uma amostra de touros cujas genealogias são representativas das principais linhagens da raça Nelore. A investigação do haplótipo do mtDNA (*Bos taurus* ou *Bos indicus*) foi realizada por meio de PCR alelo-específica para amplificação de uma região 366 pb do gene rRNA 16S de mtDNA, no qual um polimorfismo diferencia mtDNA *Bos taurus* e *Bos indicus*. Observou-se, nesta amostragem, 76,66% dos animais com mtDNA de origem *Bos taurus*. Estes resultados reforçam a hipótese de que a formação da raça Nelore no Brasil provavelmente resultou do cruzamento absorvente de touros *Bos indicus* com matrizes *Bos taurus*. **PALAVRAS-CHAVE:** haplótipo mitocondrial; *Bos indicus*; *Bos taurus*.

ABSTRACT

The cattle can be classified into two groups according to their origin and geographic distribution: *Bos taurus*, represented by the European cattle, and *Bos indicus*, originated in Asia. The Brazilian herd consists mainly of Zebu cattle, mainly consisted of Nelore breed animals. Mammals have in addition to the nuclear genome, a cytoplasmic genome found in mitochondria, the mitochondrial DNA (mtDNA), which shows exclusively maternal inheritance. There are reports that polymorphisms in mtDNA can affect the adaptation of breeds to different environmental conditions and the animal production. Probably the majority of the Brazilian population of Nelore cattle was obtained by

*Endereço para correspondência:
Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos/SP.
e.mail: simone@cppse.embrapa.br

backcrossing of native cows with Zebu bulls and therefore harbors mtDNA of *Bos taurus* origin. The aim of this study was to characterize the mtDNA haplotype in a sample of bulls whose pedigrees are representative of the main lines of Nelore. The investigation of mtDNA haplotype (*Bos taurus* and *Bos indicus*) was performed by allele-specific PCR to amplify a 366 bp region of 16S rRNA gene of mtDNA, in which a mtDNA polymorphism differentiates *Bos taurus* from *Bos indicus*. In this sample, 76.66% of all animals presented mtDNA of *Bos taurus* origin. These results support the hypothesis that the establishment of Nelore breed in Brazil probably resulted from backcrossing of *Bos indicus* bulls to *Bos taurus* females.

KEY WORDS: mitochondrial haplotype; *Bos indicus*; *Bos taurus*.

INTRODUÇÃO

O rebanho brasileiro é constituído principalmente por raças zebuínas, sendo a raça Nelore a que apresenta maior destaque, devido a seu papel fundamental para a pecuária nacional. A raça Nelore constitui um grande patrimônio genético para a bovinocultura brasileira como produtora de carne, principalmente devido aos índices notáveis de desempenho econômicos (COSTA et al., 2002).

Estima-se que o número de zebuínos importados da Índia para o Brasil não ultrapassou 7.000 cabeças de animais, dos quais seis reprodutores das linhagens Karvadi, Taj Mahal, Kurupathy, Golias, Godhavari e Rastã contribuíram significativamente com cerca de 20% dos genes na formação do rebanho de Nelore nacional (MAGNABOSCO et al., 1997; MARCONDES et al., 2007).

Embora algumas fêmeas zebuínas tenham sido importadas para o Brasil, a maioria dos animais trazidos da Índia foram machos que foram cruzados com fêmeas “nativas” *Bos taurus* de origem européia. Assim, a população brasileira de zebuínos pode ser subdividida principalmente em animais puros de origem importada e animais produzidos no Brasil devido ao cruzamento absorvente de machos zebuínos com fêmeas *Bos taurus* (MEIRELLES et al., 1999).

O DNA mitocondrial (mtDNA), herdado maternamente, contém aproximadamente

16.600 pb, que codificam 13 polipeptídios que fazem parte da cadeia respiratória mitocondrial juntamente com 22 tRNA e 2 rRNA (LARSSON & CLAYTON, 1995). Polimorfismos no mtDNA podem afetar a síntese de proteínas codificadas pelo DNA citoplasmático e possivelmente a adaptação de bovinos a diferentes ambientes, podendo assim influenciar a produção animal (MEIRELLES et al., 2001).

É sabido que há grande participação de matriarcas de origem *Bos taurus* na formação da população brasileira de bovinos zebuínos. A quantificação da contribuição de fêmeas *Bos taurus* na formação da população da raça Nelore brasileira pode contribuir para conhecer a influência de polimorfismos presentes no mtDNA na adaptação de bovinos (MEIRELLES et al., 1999; RIPAMONTE, 2002; CURI et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi caracterizar o haplótipo do mtDNA (*Bos taurus* ou *Bos indicus*) de uma amostra de touros cujas genealogias são representativas das principais linhagens da raça Nelore no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

A seleção dos touros foi realizada a partir de consultas aos catálogos das principais centrais de inseminação do país. A partir de um número total de 616 touros Nelore das variedades mocha

e aspada foram eleitos para a composição dessa amostra 20 touros ativos na população, ou seja, touros que têm sêmen disponível no mercado, cujo valor não excede R\$ 50,00 e cujas genealogias são representativas das principais linhagens que compõem a raça Nelore e de uso comercial mais frequente dentro da raça. A escolha foi feita de maneira a minimizar o grau de parentesco entre os animais.

Extração do DNA

As amostras utilizadas para obtenção de DNA dos touros foram palhetas de sêmen congelado, provenientes de centrais de inseminação. Para extração do DNA, foi utilizado o método de desproteínação com solvente orgânico.

Para lavagem do sêmen, a palheta foi descongelada à temperatura ambiente, e o conteúdo, transferido para um microtubo. A seguir, foi adicionado tampão de digestão contendo 10 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, 50 mM de NaCl e 2% de SDS, seguido pela homogeneização da amostra em vórtex e centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos para a recuperação do pellet de espermatozoides. Para a lise dos espermatozoides adicionou-se ao pellet, tampão de digestão, 40 mM de DTT e 0,4 mg/mL de proteinase K, e o conteúdo foi incubado *overnight* a 56°C. O DNA foi extraído com a adição de fenol: clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), seguida por centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos. A seguir, a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo e destinada à precipitação do DNA com isopropanol 100% e centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos. Após descarte do sobrenadante, o DNA foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Após a secagem do pellet, o DNA foi ressuscitado com TE (Tris-EDTA) e RNase.

Caracterização molecular do haplótipo do mtDNA

Para a caracterização molecular, o haplótipo do mtDNA foi identificado como de origem *Bos taurus* (GenBank AY526085) ou *Bos indicus* (GenBank AY126697) pela amplificação de um fragmento de 366 pb do gene rRNA 16S de mtDNA, no qual um polimorfismo diferencia mtDNA *Bos taurus* e *Bos indicus*, de acordo com o descrito por Ferreira et al., (2007). As condições utilizadas na PCR alelo-específica foram descritas por Méo et al., (2009).

A amplificação dos fragmentos foi observada por eletroforese horizontal utilizando gel de agarose 1,5 % corado com 0,025 µg/mL de brometo de etídio e observados em transiluminador UV 302 nm. Os genótipos foram determinados com base na amplificação do fragmento de *Bos taurus* ou *Bos indicus*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na amostragem deste estudo, foram encontrados 23 touros com mtDNA de origem *Bos taurus* e 7 touros com mtDNA de origem *Bos indicus* (Figura 1). Dessa maneira, houve predominância de mtDNA de origem *Bos taurus* em aproximadamente 76,66% dos animais amostrados, representativos das principais linhagens da raça Nelore no Brasil. A amplificação simultânea dos dois fragmentos de mtDNA não foi observada.

Neste trabalho foi possível observar a predominância de mtDNA de origem *Bos taurus* em animais da raça Nelore. Esses dados são corroborados pelos dados de Meirelles et al. (1999), que também encontraram proporções semelhantes de mtDNA em gado Gyr e Nelore de elite (> 70%). Ripamonte (2002) também encontrou apenas 37% de mtDNA proveniente de *Bos indicus* em uma população de 104 animais

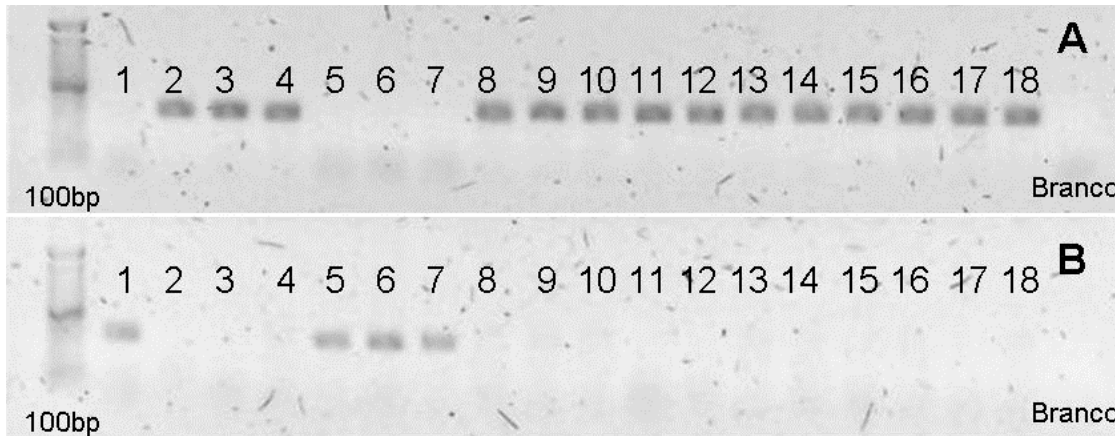


Figura 1. Imagem digitalizada do gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo (0,025 µg/mL) após eletroforese para a determinação do haplótipo do DNA mitocondrial (mtDNA) como de origem *Bos taurus* ou *Bos indicus*. Para cada amostra (1 a 18), na fileira superior foi aplicado o produto de amplificação de mtDNA *Bos taurus* (A) e na fileira inferior, de mtDNA *Bos indicus* (B). No primeiro poço foi aplicado o padrão de 100 bp (0,5 µg) e no último poço, o controle da reação (produto de PCR sem DNA). Amostras 2 a 4 e 8 a 18: mtDNA *Bos taurus*; amostras 1, 5, 6 e 7: mtDNA *Bos indicus*.

Nelores analisados, sendo que 6% dos animais registrados como Nelore PO ou POI possuíam mtDNA de *Bos taurus*. Em gado Canchim, tradicionalmente produzido com fêmeas de raças Zebu (Indubrasil, Guzará e Nelore) foram observados mais de 97% de mtDNA de origem *Bos taurus*, reforçando a contribuição da linhagem materna de gado europeu na formação do gado Zebu americano e seus cruzamentos (MEIRELLES et al. 2007; MÉO et al., 2009). Isso demonstra a existência de cruzamento absorvente e a participação majoritária de matriarcas de origem *Bos taurus* na formação do rebanho zebuino brasileiro, principalmente da raça Nelore. O perfil de mtDNA encontrado pode também ser explicado pelo pequeno número efetivo da população Nelore, já que dos animais com genealogia conhecida, aproximadamente 35% possuem linhagem materna ou paterna vindas dos animais Godhavari IMP, via Kurupathy e Neofito (MARCONDES et al., 2007).

O conhecimento da formação das raças zebuínas é de suma importância, pois pode

auxiliar na escolha de posteriores estratégias de seleção e cruzamentos (MÉO et al., 2009). Além disso, variações em sequências de mtDNA já foram associadas a características fenotípicas de interesse, como por exemplo, qualidade da carne (MANNEM et. al, 2003), fertilidade (SUTARNO et al, 2002) e crescimento (ZHANG et al., 2008) tanto em bovinos de leite, quanto em bovinos de carne, evidenciando que o conhecimento do mtDNA pode auxiliar nos programas de melhoramento genético animal.

CONCLUSÃO

As principais linhagens bovinas representativas da raça Nelore no Brasil foram formadas por meio do cruzamento absorvente de touros *Bos indicus* com matrizes *Bos taurus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA, E. C. da; RESTLE, J.; VAZ, F. N.; ALVES FILHO, D. C.; BARNARDES, R. A. L. C.; KUSS, F. Características da carcaça de novilhos Red Angus

- superprecoces abatidos com diferentes eesos. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 31, n. 1, p. 119-128, 2002.
- CURI, R. A.; MOTA, L. S. L. S da; SILVEIRA, A. C. Mitochondrial DNA of Nellore and European x Nellore crossing cattle of high performance. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 42, n. 8, p. 1203-1205, 2007.
- LARSSON, N. G.; CLAYTON, D. A. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. **Annu. Rev. Genet.**, v. 29, p. 151-178, 1995.
- MAGNABOSCO, C. U.; CORDEIRO, C. M. T.; TROVO, J. B. F.; MARIANTE, A. da S.; LÔBO, R. B.; JOSAHKIAN, L. A. **Catálogo de linhagens do germoplasma zebuino: raça Nelore**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1997.
- MARCONDES, C.R.; VOZZI, P.A.; ARAÚJO, R.O.; GLÓRIA, W.P.; LÔBO; R.B. Contribuição dos efeitos de genearcas e de famílias sobre a probabilidade de permanência em rebanhos da raça Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.4, p.977-982, 2007.
- MANNEN, H.; MORIMOTO, M.; OYAMA, K.; MUKAI, F.; TSUJI, S. Identification of mitochondrial DNA substitutions related to meat quality in Japanese Black cattle. **J. Anim. Sci.** 81, 68–73, 2003.
- MEIRELLES, F. V.; ROSA, A. J. M.; LÔBO, R. B.; GARCIA, J. M.; SMITH, L. C.; DUARTE, F. A. M. Is the american zebu really *Bos indicus*? **Genet. Mol. Biol.**, v. 22, n. 4, p. 543-546, 1999.
- MEIRELLES, F. V.; BORDIGNON, V.; WATANABE, Y.; WATANABE, M.; DAYAN, A.; LÔBO, R. B.; GARCIA, J. M.; SMITH, L. C. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. **Genetics**, v. 158, p. 351-356, 2001.
- MÉO, S. C.; FERREIRA, C. R.; CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F. V.; REGITANO, L. C. A.; ALENCAR, M. M.; BARBOSA, P. F. Characterization of mitochondrial genotypes in the foundation herd of the Canchim beef cattle breed. **Genet. Mol. Res.**, v. 8. n. 1, p. 261-267, 2009.
- RIPAMONTE, P. **Estimativa da participação do genoma de *Bos taurus* no rebanho Nelore**. 2002, 75 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- SUTARNO; CUMMINS, J.M. ; GREEFFC, J; LYMBERYA, A.J. Mitochondrial DNA polymorphisms and fertility in beef cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 6, 1603-1610, 2002.
- ZHANG, B.; CHEN, H; HUA, L.; ZHANG, C.; KANG, X.; WANG, X.; PAN, C.; LAN, X.; LEI, C. Novel SNPs of the mtDNA ND5 Gene and Their Associations with Several Growth Traits in the Nanyang Cattle Breed. **Biochem Genet**, v. 46, 362–368, 2008.