

NOTA CIENTÍFICA

CARACTERIZAÇÃO DE UM REBANHO GIR LEITEIRO QUANTO À ORIGEM DO DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)¹

ANIBAL EUGÊNIO VERCESI FILHO², ANDRÉ LIMA DIAS³, VERA LÚCIA CARDOSO⁴, LENIRA EL FARO⁴, GIOVANA KREMPEL FONSECA MERINGUE⁵, FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES⁵

¹Recebido para publicação em 10/08/09. Aceito para publicação em 07/07/10.

²Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Nordeste Paulista (PRDTA), Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA), Av. Presidente Castelo Branco, s/nº, Caixa postal 58, CEP 13730-970, Mococa, SP, Brasil. E-mail: pop.aevf@apta.sp.gov.br

³Prefeitura Municipipl de Mococa, Praça Marechal Deodoro, Mococa, SP, Brasil.

⁴PRDTA do Centro Leste, APTA, SAA,

⁵Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP), Av. Duque de Caxias Norte, 225, Caixa postal 23, CEP 13630-970, Pirassununga, SP, Brasil.

RESUMO: As raças zebuínas entraram no Brasil principalmente no século passado através de importações do continente indiano. Com a chegada do gado zebu, o rebanho nacional sofreu profunda modificação pelo processo de cruzamento absorvente e foi sendo gradativamente "azebuado" com a utilização de touros das raças zebuínas. Com isso, criou-se um polimorfismo quanto à origem do DNA mitocondrial (mtDNA) nos animais zebuínos visto grande parte serem oriundos de cruzamentos absorventes a partir de vacas taurinas. Para verificação da origem materna das matrizes do rebanho Gir Leiteiro da APTA, Mococa foram analisadas 60 fêmeas sendo que, 33 apresentaram mtDNA de origem *Bos taurus* enquanto 27 apresentaram mtDNA de origem *Bos indicus*. Nenhum animal apresentou os dois genótipos, comprovando assim a ausência de heteroplasmia para este marcador.

Palavras Chave: mtDNA, Gir Leiteiro, bovinos

CHARACTERIZATION OF A DAIRY GYR HERD WITH RESPECT TO ITS MITOCHONDRIAL DNA (mtDNA) ORIGIN

ABSTRACT: The Zebu breeds were introduced in Brazil mainly in the last century by imports from the Indian subcontinent. When the Zebu cattle arrived, the national herd suffered a significant change by backcrossing the national cows of taurine origin with Zebu sires. These processes created a polymorphism in the mitochondrial DNA (mtDNA) in the Zebu animals with are in a major part derived from backcrossing and sharing mtDNA of taurine origin. To verify the maternal origin of cows belonging to the Dairy Gyr herd of APTA, Mococa 60 females were analyzed and 33 presented mtDNA from *Bos taurus* origin and 27 presented mtDNA from *Bos indicus* origin. None of these animals presented patterns of both mtDNA origins, indicating absence of heteroplasmly for these mitochondrial genotypes.

Key words: mtDNA, dairy Gyr, cattle

INTRODUÇÃO

No Brasil, o rebanho bovino foi formado originalmente pelo gado de origem taurina trazido da Península Ibérica na época da colonização. Com a entrada do gado zebuino, grande parte do rebanho nacional passou por um processo de substituição através de cruzamentos absorventes com touros zebuinos (SANTIAGO, 1986). Diferentemente do DNA nuclear, o mtDNA é herdado de maneira quase exclusiva pela linhagem materna em mamíferos (GILES *et al.*, 1980); e como a maioria dos animais zebuinos trazidos nas importações eram machos (MAGNABOSCO, 1997), os produtos resultantes do processo de cruzamentos absorventes por touros zebuinos nas vacas de origem taurina nacional, conservaram ao longo do tempo e com o passar das gerações o mtDNA de origem taurina. Este processo foi confirmado por MEIRELLES *et al.* (1999) que identificaram 79; 73 e 100% dos animais analisados das raças Nelore, Gir e Brahman puros de origem, respectivamente, como portadores de mtDNA de origem *Bos taurus*.

O DNA mitocondrial (mtDNA) está localizado na membrana interna da mitocôndria, organela presente no citoplasma das células eucariotas, cuja principal função é a fosforilação oxidativa. O estudo do mtDNA, por ser este transmitido apenas através da linhagem materna, permite distinguir a origem da linhagem.

Vários trabalhos têm sido realizados em populações bovinas de leite e corte procurando evidenciar a herança mitocondrial como fonte de variação genética para características de importância econômica, porém os resultados ainda são controversos. Enquanto alguns autores encontraram influência significativa da herança mitocondrial (ROUGHSEGE *et al.*, 1999, SCHNITZENLEHNER e ESSL, 1999), outros concluíram que este efeito é negligenciável (ALBUQUERQUE *et al.*, 1998, RORATO *et al.*, 1999, MEZZADRA *et al.*, 2005).

A raça Gir entrou no Brasil provavelmente no ano de 1906, porém as importações mais importantes aconteceram em 1930, 1960 e 1962 com grande contribuição para a formação do *pool* gênico da raça nos dias atuais. A raça é nativa da Índia onde é explorada para leite e é predominante na região da península de Kathiawar (SANTIAGO, 1986). No Brasil a raça foi utilizada inicialmente para corte, porém a seleção visando à produção de leite foi iniciada já na década de 1930. Nos dias atuais, a raça Gir é utilizada principalmente para produção de leite, embora haja um gru-

po de criadores que a utilizem também para produção de carne.

O rebanho Gir Leiteiro da Estação Experimental de Zootecnia de Ribeirão Preto, do Instituto de Zootecnia (atual Polo Regional Centro Leste) foi formado no início da década de 1960 por 50 matrizes registradas e pelo reprodutor Xopotó, oriundo do rebanho da Fazenda Experimental Getúlio Vargas (EPAMIG). Este rebanho foi mantido sob seleção leiteira no referido Polo até 1998, quando foi deslocado para o Polo de Pindamonhangaba e o programa de seleção interrompido. A partir do ano de 2006 o rebanho foi transferido para o Polo Regional do Nordeste Paulista, APTA, Mococa, SP, onde está sendo reestruturado visando a retomada do programa de melhoramento genético para fins de produção de leite.

O objetivo deste trabalho foi analisar a origem materna de matrizes Gir Leiteiro pertencentes ao rebanho leiteiro do Polo Regional do Nordeste Paulista, APTA, SP.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração do DNA

Foram utilizadas 60 fêmeas da raça Gir Leiteiro pertencentes ao rebanho da APTA, Mococa. Foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubos a vácuo, contendo 54 µL de EDTA e mantidos sob refrigeração até serem processados. A extração do DNA foi realizada a partir de 1 mL de sangue como descrito por SAMBROOK e RUSSEL (2001). As hemácias foram lisadas com uma solução de Lise de Hemácias (12mM Tris-HCL pH 8.2; 0,32M Sacarose; 5mM EDTA e 1% de Triton 100X) e os glóbulos brancos foram digeridos com proteinase K por 3 horas. As proteínas foram então precipitadas com solução de NaCl 5M e o sobrenadante transferido para outro tubo. O DNA total foi precipitado com adição de 3 volumes de etanol absoluto, desidratado e rediluído em 50 µL de H₂O ultrafiltrada.

DNA Mitocondrial (mtDNA)

A amplificação do mtDNA foi realizada utilizando-se os primers BosmtF1 5'- cccaacgaggaaaataacc-3' e BosmtR1 5'-aaccgcaacaacctctcc-3', sintetizados para amplificar uma região do gene ND5 do genoma

mitocondrial dos nucleotídeos 11.770 ao 12.525 de acordo com ANDERSON *et al* (1982). Para a reação de PCR utilizaram-se 100ng de DNA para uma reação de 50 μ L, em condições de tampão determinadas pelo fabricante, 200 μ M de dATP; dTTP; dCTP; Dgtp; 1,25U de Taq DNA polimerase e 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador (primer) em 35 ciclos de 30 segundos à 94°C, 45 segundos à 58°C e 45 segundos à 72°C. O mtDNA amplificado foi então digerido com a enzima de restrição *Hind III*, corado com Brometo de etídeo e submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 1X.

O mtDNA foi analisado e, de acordo com a presença ou ausência do sítio de restrição da enzima *Hind III*, os indivíduos foram classificados como portadores de mtDNA de *B. taurus* ou portadores de mtDNA de *B. indicus*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 60 fêmeas analisadas, 33 (55%) apresentaram mtDNA de origem *Bos taurus* enquanto 27 (45%) apresentaram mtDNA de origem *Bos indicus*. Nenhum animal apresentou os dois genótipos, comprovando assim a ausência de heteroplasmia para este marcador no rebanho estudado.

Na Figura 1 são mostrados os fragmentos de DNA mitocondrial amplificados por PCR e digeridos com a enzima de restrição *Hind III*, corados com brometo de etídeo e visualizados em gel de agarose 1,5% de animais com mtDNA *Bos indicus* e com mtDNA *Bos taurus*.

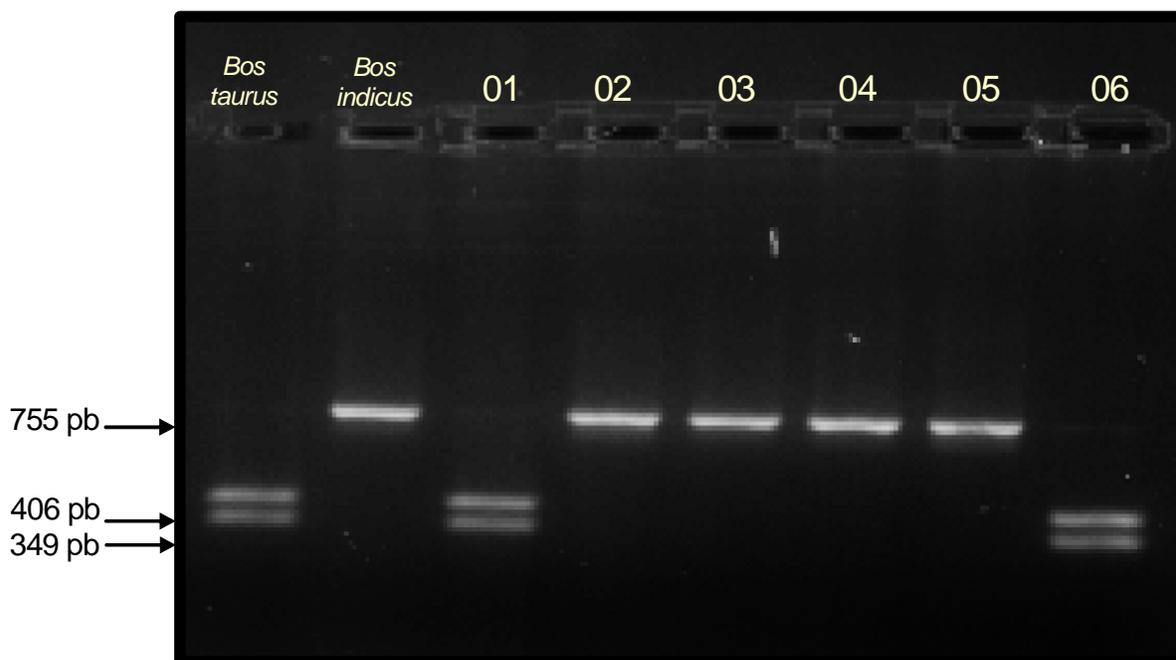


Figura 1. Fragmentos de DNA mitocondrial amplificados por PCR e digeridos com a enzima de restrição *Hind III*, corados com brometo de etídeo e visualizados em gel de agarose 1,5%. As duas primeiras linhas mostram mtDNA amplificado de animais previamente conhecidos; linhas 1, 2, 3 e 5 mostram animais com mtDNA *Bos indicus*; linhas 4 e 6 mostram animais com mtDNA *Bos taurus*

A presença de 55% de matrizes com mtDNA de origem taurina corrobora com a hipótese do rebanho zebuínico nacional ter sido formado principalmente através do cruzamento absorvente de touros zebus em fêmeas de origem taurina. MEIRELLES *et al.* (1999) apresentaram resultados semelhantes, encontrando,

em média, 58% de animais das raças Gir e Nelore com mtDNA de origem taurina. No referido trabalho, os autores relataram ainda que 25% dos animais POI (puros de origem importada) de ambas as raças também apresentaram mtDNA de origem taurina, o que pode refletir erros de pedigree desses animais. Nos

animais da raça Brahman (23 animais), os autores encontraram 100% dos animais com mtDNA de origem taurina e também reportaram a ausência de animais com os dois genótipos de mtDNA.

Vários estudos têm sido realizados no intuito de se verificar a existência de efeito da linhagem materna em características de importância econômica tanto em gado de leite quanto em gado de corte. Embora os resultados ainda sejam controversos, alguns achados são bastante interessantes. BOETTCHER *et al* (1996) concluíram que o efeito citoplasmático está mais associado com a composição do leite do que com o volume. Os autores argumentam que a gordura é o componente com maior densidade energética no leite e que praticamente toda energia proveniente dos alimentos é transformada em ATP nas mitocôndrias. Sendo assim, seria bastante racional se esperar uma relação mais forte entre gordura, energia do leite e mtDNA.

SCHULTZ *et al* (1993) agruparam vacas leiteiras da raça Holandesa em linhagens maternas de acordo com seqüências específicas de mtDNA e observaram que os grupos diferiram significativamente para produção e porcentagem de gordura e para a quantidade de energia estimada no leite.

BIASE *et al*, (2008) estudando polimorfismos no mtDNA em animais da raça Nelore, concluíram que os mesmos afetam características ponderais e que podem ser uma fonte de variação genética em características quantitativas. Os autores comentaram ainda que o efeito da variação do genoma do mtDNA na produção de leite e carne pode ser uma consequência de alterações de rotas metabólicas ou de energia disponível para produção de leite e desenvolvimento do tecido muscular.

CONCLUSÕES

Existe no rebanho Gir Leiteiro da APTA, Mococa polimorfismo quanto à origem do mtDNA, sendo que 55% das matrizes são de origem *Bos taurus*, o que auxilia na comprovação da tese de que o rebanho zebuino nacional têm na sua formação importante influência de cruzamentos absorventes de touros zebuinos em matrizes de origem taurina.

Estudos necessitam ser realizados para identificação de possível influência do mtDNA em características de produção de leite na raça Gir.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, L.G.; KEOWN, J.F.; VAN VLECK, L.D. Variances of direct genetic effects, maternal genetic effects and cytoplasmic inheritance effects for milk yield, fat yield and fat percentage. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 554-549, 1998.

ANDERSON, S. *et al.* The complete sequence of bovine mitochondrial DNA: conserved features of the mitochondrial genome. **Journal Molecular Biology**, v. 156, p. 683-717, 1982.

BIASE, F.H. *et al.* Mitochondrial DNA single nucleotide polymorphism associated with weight estimated breeding values in Nelore cattle (*Bos indicus*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n.4, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572007000600005&lng=in&nrm=iso&tlng=in. Acesso em 15/09/2009.

BOETTCHER, P.J. *et al.* Multiple herd evaluation of effects of maternal lineage on yields traits of Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 655-662, 1996.

GILES, R.E. *et al.* Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p.6715-6719, 1980.

MAGNABOSCO, A.U. *et al.* Catálogo de linhagens do germoplasma zebuino: Raça Nelore. **Cenargen**, Brasília, p. 11-52, 1997.

MEIRELLES, F.V. *et al.* Is the american zebu really *Bos indicus*? **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n.4, p.543-546, 1999.

MEZZADRA, C.A. *et al.* Effects of cytoplasmic inheritance on preweaning traits of Hereford cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n.3, p.357-362, 2005.

RORATO, P.R. *et al.* Variance caused by cytoplasmic line and sire by herd interections effects for milk yield considering estimation bias. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p.1574-1580, 1999.

ROUGHSEGE, T. *et al.* Estimation of variance of maternal lineage effects at the Langhill dairy herd. **Animal Science**, v. 68, p.79-86, 1999.

SANTIAGO, A.A. **O Zebu na Índia, no Brasil e no mundo**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986. 745p.

SCHNITZENLEHNER, S. and ESSL, A. Field data analysis of cytoplasmic inheritance of dairy and fitness-related traits in cattle. **Animal Science**, v. 68, p. 459-466, 1999.

SCHUTZ, M.M.; et al. Effects of maternal lineages grouped by mitochondrial genotypes on milk yield and composition. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p.621-629, 1993.