

CARACTERIZAÇÃO DA RAÇA NELORE E TESTE DE PATERNIDADE POR MARCADORES MOLECULARES¹

ARTUR J. DE M. ROSA², IRINEU U. PACKER,³ LUCIANA C. A. REGITANO⁴, ALEXANDER RAZOOK⁵, L.G.FIGUEIREDO⁵, LUIZ L. COUTINHO⁵

¹ Parte de dissertação de Mestrado em Ciência Animal e Pastagens, ESALQ, USP, Dep. de Zootecnia, CNPq, FAPESP

² Pós-graduação em Genética, Dep. De Genética, FMRP, S.P.

³ Professores ESALQ-USP-Dep de Zootecnia, Laboratório de Biotecnologia Animal, Piracicaba-SP; ⁴ Pesquisadora do CPPSE-EMBRAPA- São Carlos-SP; ⁵ Pesquisadores Instituto de Zootecnia-Sertãozinho-SP.

RESUMO: As frequências gênicas para os marcadores genéticos RFLP Kapa-caseína (KpCn), β -lactoglobulina (β LG) e hormônio de crescimento (GH) e os microssatélites IGF I, INRA-006, CSFM-50 e BM-1224 foram estimadas em um total de 63 animais da raça Nelore. A probabilidade de exclusão combinada para todos os marcadores alcançou 0,9089. Os resultados do teste de paternidade efetuados em 13 famílias acusaram erro de identificação em duas ($\approx 15\%$). A paternidade foi negada para três sistemas genéticos (CSFM-50, BM-1224 e INRA-006) em uma das famílias e em um (BM-1224) para a outra. Os testes de paternidade apresentaram probabilidade de paternidade variando entre 0,6115 e 0,9987 com média igual a 0,8814.

PALAVRAS-CHAVES: Bovino, marcador molecular, microssatélite, Nelore, RFLP, teste de paternidade.

NELORE BREED CHARACTERIZATION AND PATERNITY TEST BY MOLECULAR MARKERS

ABSTRACT: Gene frequencies for RFLP (Kappa-Casein, β -Lactoglobulin and Growth Hormone) and microsatellites (IGF I, INRA-006, CSFM-50 and BM-1224) were estimated in a sample of 63 Nelore bulls. Combined exclusion probability for all markers was around 0,9089. The paternity test results conducted in 13 families indicated misidentification in two families ($\approx 15\%$). Misidentification were verified in three genetics systems (CSFM-50, BM-1224 and INRA-006) in one family and in one (BM-1224) for the other. The paternity probability were in the range of 0,6115 and 0,9978, with average of 0,8814.

KEYWORDS: Bovine, molecular marker, microsatellites, Nelore breed, paternity test, RFLP.

INTRODUÇÃO

Vários programas de melhoramento genético na raça Nelore utilizam os modelos mistos para obter estimativas do valor genético (DEP) de características de importância econômica. A metodologia de Henderson (1973) para a solução dos modelos mistos utiliza a matriz de parentesco dos animais e permite obter estimativas do valor genético com propriedades BLUP. Portanto, os erros de identificação de paternidade tem efeito prejudicial sobre as estimativas das DEP e dos parâmetros genéticos (VAN VLECK, 1970). Erros de paternidade podem atingir até 20 % dos registros de animais em vários países (RON et al. 1995), reduzindo marcadamente o ganho genético anual da população. A técnica de manejo reprodutivo, denominada reprodutor múltiplo, usada na maioria dos programas de seleção na raça Nelore causa grande prejuízo para a identificação e avaliação dos animais (TROVO et al., 1996), justificando assim a realização de teste de paternidade. As relações de parentesco entre indivíduos podem ser verificadas por meio de várias categorias de

marcadores genéticos e moleculares. Dentre os últimos, destacam-se: RFLP, DNA-fingerprinting e mais recentemente os microssatélites loco específico por serem codominantes, de boa distribuição no genoma, alto polimorfismo e facilmente obtidos por PCR. Estas características facilitam a determinação da origem dos alelos paternos e permitem atingir a probabilidade de exclusão combinada superior a 0,99 sugerida por GJERTSON et al. (1988). O teste só pode ser feito em animais pertencentes à populações caracterizadas para os sistemas genéticos que se pretende utilizar. Isto significa que a probabilidade de paternidade é dependente da frequência gênica dos alelos herdados do pai (BALDING e NICHOLS, 1995). O presente trabalho tem por objetivo estimar as frequências gênicas para os marcadores genéticos RFLP kapa-caseína, β -lactoglobulina e hormônio do crescimento e os microssatélites IGF I, INRA-006, CSFM-50 e BM-1224 na raça Nelore e desenvolver um teste de paternidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O polimorfismo dos marcadores foi avaliado em uma amostra de 63 animais da

raça Nelore, não aparentados em primeiro grau, provenientes de 23 rebanhos, dentre os participantes da "Prova de Ganho de Peso" de 1995 do Instituto de Zootecnia de Sertãozinho-SP. O DNA foi extraído a partir de sangue periférico. As regiões de interesse do DNA foram amplificadas pela PCR em tubos eppendorf de 0,5 ml, com volume final de reação foi 25 µl contendo, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris-HCl pH 8,4 10 mM, dNTP (cada) 0,20 µM, iniciador (cada) 0,2 µM, Taq DNA polimerase 0,5 u, DNA genômico 100 ng. A sequência de temperaturas empregada foi 1- desnaturalização inicial 95 °C (3 minutos), 2- desnaturalização 95 °C 1 minuto, 3- anelamento temperatura de anelamento (TA) 30 segundos, 4- extensão 73 °C (1 minuto), 5- repetir 2,3 e 4 29 vezes, 6- extensão final 73 °C (3 minutos) e 7- resfriamento 4 °C (indeterminado). A TA para GH, Schlee et al. (1994), foi 58 °C; KpCn, MEDRANO e CORDOVA (1990a), 55 °C; βLG, MEDRANO e CORDOVA (1990b), 55 °C; CSFM-50, MOORE et al. (1994), 55 °C; INRA-006, VAIMAN et al. (1994), 58 °C; BM-1224, BISHOPP et al. (1994), 54 °C e IGF I, BISHOPP (1994), 58 °C. O fragmento amplificado de cada RFLP foi digerido com as enzimas de restrição *Alu* I (1,0 u), *Hinf* I (2,5 unidades), *Hae* III (12,5 unidades) para hormônio de crescimento, Kapa-caseína e β-lactoglobulina, respectivamente. O produto da digestão foi separado em gel de agarose 3 % e os fragmentos detectados em brometo de etídio. A eletroforese dos microssatélites foi efetuada em sistema PAGE desnaturante. A detecção foi realizada pela marcação radioativa dos *primers* UP com γ³²P-ATP. As frequências gênicas e genotípicas foram estimadas por contagem simples. A probabilidade de exclusão foi calculada utilizando a fórmula descrita por DODDS et al. (1996), probabilidade de exclusão combinada (PEC), RON et al. (1995) e probabilidade de paternidade, DODDS et al. (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frequências gênicas obtidas para os alelos 1 e 2 respectivamente dos RFLP foram: Kapa-caseína 0,913 e 0,087; β-lactoglobulina 0,405 e 0,595; hormônio do crescimento não apresentou polimorfismo de substituição de leucina por valina. Os microssatélites apresentaram as seguintes frequências: IGF I, dois alelos com frequências 0,262 e 0,738; BM-1224, sete alelos (0,008; 0,048; 0,46; 0,278; 0,119; 0,079; 0,008), CSFM-50, cinco alelos (0,016; 0,270; 0,246; 0,151 e 0,317) e INRA-006 com sete alelos (0,115; 0,008; 0,016; 0,19;

0,429; 0,087 e 0,119). Os resultados da probabilidade de exclusão (PE) estão apresentados na Quadro 1. Os valores de PE obtidos para os microssatélites INRA-006, BM-1224 e CSFM-50 foram satisfatórios, o mesmo não pode ser afirmado para o IGF I ou para os RFLP. A PEC (0,9089) entretanto, esteve aquém do ideal (0,99). Ainda assim, a análise dos genótipos de 13 famílias touro/vaca/progênie participantes do teste de paternidade, possibilitou a exclusão de paternidade em duas famílias em três sistemas genéticos (BM-1224, CSFM-50 e INRA-006) e um sistema (BM-1224), respectivamente. Os resultados do teste de paternidade, descritos na Quadro 2, apresentaram probabilidade de paternidade entre 0,6115 e 0,9987, com média 0,8814. Somente 3 famílias atingiram os 0,99 recomendados. Ainda assim esta frequência de erro na identificação atingiu 15% (2/13), semelhante ao obtido em outros países (RON et al., 1996). Se este valor for representativo para da raça Nelore evidencia-se a necessidade de um controle mais eficiente sobre os registros genealógicos. O teste de paternidade poderia ser aplicado na avaliação de touros em fazendas que utilizam reprodutores múltiplos (TROVO et al., 1996), ou em um programa de avaliação de touros jovens, objetivando aprimorar a predição do valor genético, realizando o teste em um número pré determinado de animais para se atingir a acurácia desejada.

CONCLUSÕES

As frequências encontradas para os locos KpCn e βLG são concordantes com os valores descritos na literatura, sugerindo que a amostra é representativa da raça Nelore. Os microssatélites CSFM-50, BM-1224 e o INRA-006 apresentaram polimorfismo satisfatório, e conseqüentemente probabilidade de exclusão (PE) adequados para se proceder a um teste de paternidade. O mesmo, não ocorreu para os marcadores RFLP KpCn, GH, βLG e do microssatélite IGF I.

O valor de 0,9089 para a PEC (Probabilidade de Exclusão Combinada) foi menor que 0,99 recomendado para fins de teste de paternidade. Portanto outros marcadores microssatélite devem ser adicionados para se atingir a PE pretendida. Outras técnicas de análise (p. ex multiplex) são necessárias para aumentar a rapidez do teste e diminuir os custos relativos a genotipagem dos animais, viabilizando o uso comercial de teste de paternidade. A amostragem deverá ser ampliada para caracterizar as diferentes linhagens existentes na raça e melhorar a confiabilidade do teste de paternidade, uma vez

os animais seriam testados de acordo com as frequências alélicas da linhagem a que pertencem.

O erro de identificação igual a 15% obtido neste trabalho justifica o uso do teste de paternidade em programas de melhoramento genético. O teste de paternidade deveria ser aplicado em varias situações práticas: (1) - em uma porcentagem dos animais registrados a cada ano na associação, para verificar a validade e consistência das informações fornecidas pelos produtores; (2)- nos programas de seleção que utilizam da técnica dos reprodutores múltiplos, sempre que os custos do teste forem inferiores aos benefícios atuais e futuros; (3)- nos programas de avaliação de touros jovens, objetivando aprimorar a estimação do valor genético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-BALDING, D. J. E NICHOLS, R.A. A method for quantifying differentiation between populations at multi-allelic loci and its implications for investigating identity and paternity. **Genética**, 96: 3-12, 1995.
- 2-BISHOPP, M, D.; KAPPES, S, M.; KEELE, J,W. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, 136: 619-639, 1994.
- 3-DODDS, K. G.; TATE, M. L.; MCEWAN, J.C. Exclusion probabilities for pedigree testing farm animals. **Theor. Appl. Genetics**, 92: 966-975, 1996.
- 4-GJERTSON, D. W.; MICKEY, M. R.; HOPFIELD, J. Calculation of Probability of Paternity using DNA sequences. **Am. J. Human Genet.**, 43: 860-869, 1988.
- 5-HENDERSON, C.R. Sire evaluation and genetic trends. **Proc.Anim. Breed.**

Symp.in honor of Dr. J.L.Lush. ASAS and ADSA . Champaign. Illinois. 1973, p:10-41

- 6-MEDRANO, J. F. E CORDOBA, E.A. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. **Biotechnology**, 8: 144-146, 1990 a.
- 7-MEDRANO, J. F. E CORDOBA, E.A. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomics sequences and identificatoin of genetics variants by RFLP analysis. **Animal Biotechnology**, 1: 73-77, 1990 b.
- 8-MOORE, S. S.; BYRNE, K. T; BARENDSE, W. Characterization of 65 bovine microsatellite. **Mammalian Genome**, 5: 84-90, 1994.
- 9-RON, M.; BLANC, Y.; BAND, M. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. **J. Dairy Science**, 79: 676-681, 1995.
- 10-TROVO, J. B. F.; RAZOOK, A. G.; LÔBO, R.B. Avaliações genéticas em bovinos de corte utilizando estruturas de dados não-convencionais. **Em elaboração**. 1997.
- 11-VAIMAN, D.; MERCIER, D.; MOAZAM, I. A set of 99 cattle microsatélite: characterization, synteny mapping and polymorphism. **Mammalian Genome**, 5: 288-297, 1994
- 12-VAN VLECK, L. D. Misidentification and sire evaluation. **J. of Dairy Science**, 53: 1697-1703, 1970.

QUADRO 1-Probabilidade de exclusão (PE) para cada marcador genético e probabilidade de exclusão combinada (PEC) para todos os marcadores.

	KpCs	β -lact	GH	IGF I	CSFM-50	BM-1224	INRA-006	PEC
PE	0,0731	0,175999	0	0,156	0,5077	0,4406	0,521	0,9089

QUADRO 2- Probabilidade de paternidade (PP) para cada família.

Família	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
PP	0,9944	0,9818	0,9368	0,7478	0,9906	0,9987	0,9224	0,6115	0,6985	0,9309	0,882