

TESTE DE PATERNIDADE NA RAÇA NELORE POR MEIO DE EXAME DO DNA

ARTUR J. DE M. ROSA; IRINEU U. PACKER; LUCIANA C. A. REGITANO;
ALEXANDER G. RAZOOK; LEOPOLDO G. FIGUEIREDO; LUIZ L. COUTINHO

INTRODUÇÃO

Vários programas de melhoramento genético na raça Nelore empregam a matriz de parentesco dos animais para obter predições do valor genético com propriedades BLUP. Portanto, os erros de identificação de paternidade tem efeito prejudicial sobre as predições das DEPs e dos parâmetros genéticos. Erros de paternidade podem atingir até 20% dos registros de animais em diversos países (RON et al. 1995). As relações de parentesco entre indivíduos podem ser verificadas por meio de várias categorias de marcadores genéticos e moleculares. Os marcadores moleculares microssatélites destacam-se por serem codominantes, bem distribuídos e alto polimorfismo, características que permitem atingir a probabilidade de exclusão combinada superior a 0,99 sugerida por GJERTSON et al. (1988). O teste só pode ser efetuado em animais pertencentes a populações caracterizadas para os sistemas genéticos que se pretendem utilizar, isso significa que a probabilidade de paternidade é dependente da frequência gênica dos alelos herdados dos progenitores (BALDING & NICHOLS, 1995).

OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo estimar as frequências gênicas para os marcadores RFLP Kapa-caseína (KpCn), β -lactoglobulina (β LG) e hormônio do crescimento (GH) e os microssatélites IGF I, INRA- 006, CSFM- 50 e BM- 1224, desenvolver um teste de paternidade, analisar a eficiência das diferentes categorias de marcadores moleculares na exclusão de paternidade e avaliar a frequência de erros de identificação em alguns rebanhos da raça Nelore.

MATERIAL E MÉTODOS

O polimorfismo dos marcadores foi avaliado em um a 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 uma amostra de sangue periférico. Os genótipos foram determinados a partir da amplificação de regiões de interesse do DNA utilizando-se da técnica da PCR e iniciadores descritos por SCHLEE et al. (1994) para GH; MEDRANO e CORDOBA (1990a) para KpCn; MEDRANO e CORDOBA (1990b) para β LG; MOORE et al. (1994) para CSFM- 50; VAIMAN et al. (1994) para INRA-006; BISHOP et al. (1994) para BM- 1224; BISHOP et al. (1994) para IGF I. O fragmento amplificado de cada RFLP foi digerido com as enzimas de restrição *Alu* I, *Hinf* I e *Hae* III para GH, KpCn e β LG, respectivamente. Os RFLP foram detectados em brometo de etídio e os microssatélites por marcação isotópica dos iniciadores 1 com γ^{32} P- ATP. As frequências gênicas e genotípicas foram estimadas por contagem simples. A probabilidade de exclusão e probabilidade de paternidade foram calculadas utilizando as fórmulas descritas por DODDS et al. (1996) e probabilidade de exclusão combinada (PEC) descrita por RON et al. (1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As freqüências gênicas obtidas para o alelo 1 dos marcadores RFLP foram: KpCn 0,91; β LG 0,41 e GH não apresentou polimorfismo de substituição de leucina por valina. Os microssatélites apresentaram alelos com as seguintes freqüências: *IGF I* (0,26 e 0,74); BM- 1224 (0,01; 0,04; 0,46; 0,28; 0,12; 0,08 e 0,08); CSFM- 50 (0,02; 0,27; 0,25; 0,15; 0,32) e INRA (0,12; 0,08; 0,02; 0,19; 0,43; 0,09 e 0,12). Os resultados da probabilidade de exclusão (PE) estão apresentadas no 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, 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, sistemas genéticos (BM- 1224, CSFM- 50 e INRA- 006) em uma e um sistema (BM- 1224) na outra, atingindo aproximadamente 15% (2/13), semelhante ao obtido em outros países (RON et al. 1996). Os resultados do teste de paternidade, descritos no Quadro 2, apresentaram probabilidade de paternidade entre 0,6115 e 0,9987, com média 0,8814. somente 3 famílias atingiram os 0,99 recomendados. Se este valor for representativo da raça Nelore evidencia-se a necessidade de um controle mais eficiente sobre os registros genealógicos.

CONCLUSÕES

As freqüências encontradas para os locos KpCn e β LG 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 paternidade. O mesmo não ocorreu para os marcadores RFLP KpCn, GH, β LG e o microssatélite *IGF I*.

O valor de 0,9089 para a PEC (probabilidade de exclusão combinada) foi menor do que 0,99, valor este recomendado para fins de teste de paternidade. Portanto outros marcadores microssatélite devem ser adicionados para se atingir a PE pretendida. Outras técnicas de análise, por exemplo, PCR- multiplex, são necessárias para aumentar a rapidez do teste.

O erro de identificação próxima a 15% obtida neste trabalho justifica o uso do teste de paternidade em programas de melhoramento genético em várias situações práticas: 1) Em uma porcentagem dos animais registrados a cada ano na associação, para verificar a validade e consistência das informações fornecidas pelos criadores; 2) Nos programas de avaliação de touros jovens objetivando a predição do valor genético 3) Na identificação da paternidade de animais gerados com a técnica reprodutores múltiplos.

A amostragem deverá ser ampliada para caracterizar as diferentes linhagens familiares existentes na raça e melhorar a confiabilidade do teste de paternidade uma vez que os animais seriam testados de acordo com as freqüências alélicas da linhagem familiar a qual pertencem.

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

Marcador	KpCn	β LG	GH	<i>IGF I</i>	CSF M- 50	BM- 1224	INRA- 006
PE	0,073	0,176	0	0,156	0,508	0,441	0,521

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDING, D. J.; NICHOLS, R. A. A method for quantifying differentiation between populations at multi-allelic loci and its implications for investigating identity paternity. **Genética**, v. 96, p. 3-12, 1995.
- BISHOP, M. D.; KAPPES, S. M.; KEELE, J. W. et al. A genetic linkage map for **Genetics**, v. 136, p. 619-639, 1994.
- DODDS, K. G.; TATE, M. L.; MCEWAN, J. C. et al. Exclusion probabilities for paternity testing farm animals. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 966-975, 1996.
- GJERTSON, D. W.; MICKEY, M. R.; HOPFIELD, J. et al. Calculation of probability of paternity using DNA sequences. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 860-869, 1988.
- MEDRANO, J. F.; CORDOBA, E. A. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. **Biotechnology**, v. 8, p. 144-146, 1990a.
- MEDRANO, J. F.; CORDOBA, E. A. Polymerase chain reaction amplification of β -lactoglobulin genomics sequences and identification of genetics variants by analysis. **Animal Biotechnology**, v. 1, p. 73-77, 1990b.
- MOORE, S. S.; BYRNE, K.; BERGER, K. T. et al., Characterization of 65 microsatellite. **Mammalian Genome**, v. 5, p. 84-90, 1994.
- RON, M.; BLANC, Y.; BAND, M. et al. Misidentification rate in the Israeli dairy population and its implications for genetic improvement. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 676-681, 1995.
- SCHLEE, P.; GRAML, R.; SCHALENBERGER, E. et al. Growth hormone and insulin-like growth factor I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 497-500, 1994.
- VAIMAN, D.; MERCIER, D.; MOAZAMI-GOUDARZI, K. et al. A set of 99 microsatellite: characterization, synteny mapping and polymorphism. **Mammalian Genome**, v. 5, p. 288-297, 1994.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frequências gênicas obtidas para o alelo 1 dos marcadores RFLP foram: KpCn 0,91; β LG 0,41 e GH não apresentou polimorfismo de substituição de leucina por valina. Os microssatélites apresentaram alelos com as seguintes frequências: *IGF I* (0,26 e 0,74); BM- 1224 (0,01; 0,04; 0,46; 0,28; 0,12; 0,08 e 0,08); CSFM- 50 (0,02; 0,27; 0,25; 0,15; 0,32) e INRA (0,12; 0,08; 0,02; 0,19; 0,43; 0,09 e 0,12). Os resultados da probabilidade de exclusão (PE) estão apresentadas no 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, 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, sistemas genéticos (BM- 1224, CSFM- 50 e INRA- 006) em uma e um sistema (BM- 1224) na outra, atingindo aproximadamente 15% (2/13), semelhante ao obtido em outros países (RON et al. 1996). Os resultados do teste de paternidade, descritos no Quadro 2, apresentaram probabilidade de paternidade entre 0,6115 e 0,9987, com média 0,8814. somente 3 famílias atingiram os 0,99 recomendados. Se este valor for representativo da raça Nelore evidencia-se a necessidade de um controle mais eficiente sobre os registros genealógicos.

CONCLUSÕES

As frequências encontradas para os locos KpCn e β LG 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 paternidade. O mesmo não ocorreu para os marcadores RFLP KpCn, GH, β LG e o microssatélite *IGF I*.

O valor de 0,9089 para a PEC (probabilidade de exclusão combinada) foi menor do que 0,99, valor este recomendado para fins de teste de paternidade. Portanto outros marcadores microssatélite devem ser adicionados para se atingir a PE pretendida. Outras técnicas de análise, por exemplo, PCR- multiplex, são necessárias para aumentar a rapidez do teste.

O erro de identificação próxima a 15% obtida neste trabalho justifica o uso do teste de paternidade em programas de melhoramento genético em várias situações práticas: 1) Em uma porcentagem dos animais registrados a cada ano na associação, para verificar a validade e consistência das informações fornecidas pelos criadores; 2) Nos programas de avaliação de touros jovens objetivando a predição do valor genético 3) Na identificação da paternidade de animais gerados com a técnica reprodutores múltiplos.

A amostragem deverá ser ampliada para caracterizar as diferentes linhagens familiares existentes na raça e melhorar a confiabilidade do teste de paternidade uma vez que os animais seriam testados de acordo com as frequências alélicas da linhagem familiar a qual pertencem.

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

Marcador	KpCn	β LG	GH	<i>IGF I</i>	CSF M- 50	BM- 1224	INRA- 006	PEC
PE	0,073	0,176	0	0,156	0,508	0,441	0,521	0,901

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	0,8823

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDING, D. J.; NICHOLS, R. A. A method for quantifying differentiation between populations at multi-allelic loci and its implications for investigating identity and paternity. *Genética*, v. 96, p. 3-12, 1995.
- BISHOP, M. D.; KAPPES, S. M.; KEELE, J. W. et al. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, v. 136, p. 619-639, 1994.
- DODDS, K. G.; TATE, M. L.; MCEWAN, J. C. et al. Exclusion probabilities for pedigree testing farm animals. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 92, p. 966-975, 1996.
- GJERTSON, D. W.; MICKEY, M. R.; HOPFIELD, J. et al. Calculation of probability of paternity using DNA sequences. *American Journal of Human Genetics*, v. 43, p. 860-869, 1988.
- MEDRANO, J. F.; CORDOBA, E. A. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Biotechnology*, v. 8, p. 144-146, 1990a.
- MEDRANO, J. F.; CORDOBA, E. A. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomics sequences and identificatoin of genetics variants by RFLP analysis. *Animal Biotechnology*, v. 1, p. 73-77, 1990b.
- MOORE, S. S.; BYRNE, K.; BERGER, K. T. et al., Characterization of 65 bovine microsatellite. *Mammalian Genome*, v. 5, p. 84-90, 1994.
- RON, M.; BLANC, Y.; BAND, M. et al. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. *Journal of Dairy Science*, v. 79, p. 676-681, 1995.
- SCHLEE, P.; GRAML, R.; SCHALENBERGER, E. et al. Growth hormone and insulin-like growth factor I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 88, p. 497-500, 1994.
- VAIMAN, D.; MERCIER, D.; MOAZAMI-GOUDARZI, K. et al. A set of 99 cattle microsatellite: characterization, synteny mapping and polymorphism. *Mammalian Genome*, v. 5, p. 288-297, 1994.