

MEL-026-CARACTERIZAÇÃO DA RAÇA NELORE COM BASE EM SEIS MARCADORES MOLECULARES

DANIELLA D. TAMBASCO(1), MAURÍCIO M. DE ALENCAR(2), LUIZ L. COUTINHO(3), ANTONIO J. TAMBASCO(2), MARINA D. TAMBASCO(1), LUCIANA C. A. REGITANO(2)

(1)Departamento de Genética e Evolução – UFSCar, São Carlos, SP.

(2)Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste, Caixa Postal 339, CEP: 13560-970, São Carlos, SP.

(3)Departamento de Zootecnia – ESALQ/ USP, Piracicaba, SP.

RESUMO: No presente trabalho, 180 fêmeas da raça Nelore, provenientes de 8 rebanhos, foram analisadas quanto aos marcadores microssatélites TEXAN15, BM1224 e CSFM50 e quanto aos polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP) nos locos κ -caseína, β -lactoglobulina e hormônio de crescimento (GH). Com exceção de GH, todos os marcadores foram polimórficos na amostra estudada. Os valores de heterozigosidade, diversidade gênica, conteúdo de informação polimórfica (PIC) e probabilidade de exclusão de paternidade (PE) foram estimados. Os maiores valores de PIC (0,685) e PE (0,521) foram obtidos para o marcador BM1224.

PALAVRAS-CHAVE: bovino, DNA, marcador, microssatélite, Nelore, RFLP.

NELORE BREED CHARACTERIZATION BASED ON SIX MOLECULAR MARKERS

ABSTRACT: In the present work, 180 Nelore females from 8 herds were analyzed for microsatellites TEXAN15, BM1224 and CSFM50 and for the RFLPs at κ -casein, β -lactoglobulin and growth hormone (GH). With the exception of GH, all markers were polymorphic for the sample studied. Heterozygosity, gene diversity, polymorphic information content (PIC) and paternity exclusion probability (PE) were estimated. The higher values of PIC (0.685) and PE (0.521) were obtained for microsatellite BM1224.

KEYWORDS: bovine, DNA, marker, microsatellite, Nelore, RFLP.

INTRODUÇÃO

Dada a sua importância econômica e cultural, estudos das relações genéticas entre rebanhos bovinos, tem sido, historicamente, uma área ativa da sistemática biológica. A caracterização de uma determinada raça pode se dar por suas propriedades morfológicas, fisiológicas, origem, habitat, distribuição geográfica, produção e parâmetros genéticos. A caracterização genética de populações, raças e espécies diferentes permite o estudo da variabilidade genética. O conhecimento da variabilidade, por sua vez, é fundamental para os programas de conservação genética de rebanhos em situação de risco bem como para a definição de estratégias de melhoramento. Além disso, vários programas de melhoramento se utilizam de informações de parentesco, e seu sucesso depende, entre outros, da precisão na determinação dessas relações. A utilização de marcadores em testes de parentesco é limitada aos animais pertencentes a populações caracterizadas para os marcadores genéticos que se pretende utilizar (DODDS et al., 1996). O

objetivo deste trabalho foi caracterizar animais Nelore quanto aos marcadores TEXAN15, BM1224 e CSFM50, CSN3, LGB e GH.

MATERIAL E MÉTODOS

Os marcadores microssatélite TEXAN15, BM1224, e CSFM50, e os polimorfismos de restrição do Hormônio de Crescimento (GH), CSN3 (K-caseína) e LGB (β -lactoglobulina) foram analisados em 180 fêmeas da raça Nelore, provenientes de 8 rebanhos. O DNA foi obtido a partir de células brancas de sangue periférico.

As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador Perkin-Elmer, modelo PE2400. Cada reação foi constituída de aproximadamente 200 ng de DNA genômico em solução de PCR (20 mM Tris-HCl, pH8,4; 50 mM KCl) acrescida de 1,5 mM MgCl₂, 0,2 μ M de cada dNTP, 0,4 μ M de cada primer e 0,5 unidades de *Taq* DNA polimerase, em um volume final de 25 μ l. Os primers e condições de amplificação dos polimorfismos GH, CSN3 e LGB foram de acordo com SCHLEE et al. (1994), MEDRANO e CORDOVA (1990) e RON et al. (1994), respectivamente.

Os marcadores microssatélite TEXAN15 (BURNS et al., 1995) e BM1224 (BISHOP et al., 1994) foram analisados em equipamento sequenciador automático A.L.F. (Pharmacia Biotech). O microssatélite CSFM50 (MOORE et al., 1994) foi analisado em géis de poliacrilamida 6,0% corados com prata.

As freqüências alélicas e genótípicas em cada loco foram estimadas por contagem. Foram calculadas as medidas de variabilidade populacional: heterozigosidade (H) e diversidade gênica (D) bem como o conteúdo de polimorfismo informativo (PIC) e a probabilidade de exclusão (PE), de acordo com DODDS et al. (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As freqüências alélicas, valores de H, D, PIC e PE são sumarizados no [Quadro 1](#). O loco GH apresentou-se monomórfico. A fixação do alelo L observada na amostra da raça Nelore estudada está de acordo com outros estudos de rebanhos zebuínos brasileiros (ROSA, 1997). As freqüências estimadas para os alelos de CSN3 e LGB foram semelhantes às obtidas por DEL LAMA & ZAGO (1996). No presente trabalho, o alelo 4 foi o mais freqüente entre os 10 alelos observados no loco BM1224, seguido dos alelos 2, 8, 1 e 6. Este resultado difere do obtido por ROSA (1997) que verificou o predomínio do alelo 2 em uma amostra de 63 animais da raça Nelore. Para o marcador TEXAN15, o alelo mais freqüente foi o alelo 8, correspondente ao produto de PCR de 203 pares de nucleotídeos, como verificado por MERZEL (1998). No loco CSFM50 o alelo mais freqüente foi o 6, enquanto ROSA (1997) observou maior freqüência do alelo 8.

Os valores de D e H estimados por loco foram inferiores aos obtidos por ROSA (1997) para os mesmos marcadores, particularmente para o segundo parâmetro, sugerindo que a endogamia acumulada na amostra do presente trabalho seja superior à presente na amostra estudada por aquele autor. Análises de segregação do marcador BM1224 em cruzamentos dessas fêmeas Nelore com touros de três raças diferentes sugerem que o excesso de homozigotos observado para esse loco está relacionado à presença de alelos nulos, ou seja, à não amplificação de um determinado alelo, que leva a um falso genótipo homozigoto. A presença de alelos nulos pode ser um fator de complicação em estudos de paternidade. Em casos de exclusão baseado em apenas um microssatélite, deve ser dada especial atenção se a prole e os parentais são homozigotos, a fim de evitar um falso diagnóstico. Os valores de PIC encontrados para os cinco

marcadores polimórficos estão de acordo com o esperado. Marcadores dialélicos como os RFLPs estudados possuem menor conteúdo de polimorfismo informativo quando comparados à marcadores multialélicos. Dentre esses últimos, o que apresentou maior PIC foi o BM1224. Esse resultado mostra que o parâmetro não deve ser considerado isoladamente, pois a presença de alelos nulos reduziria sua utilidade em análises de ligação.

Apesar de terem sido observados valores satisfatórios de PE em três dos seis marcadores analisados ([Quadro 1](#)), a probabilidade de exclusão combinada (PEC) foi 0,876, abaixo do valor ideal (0,99). ROSA (1997) verificou valores de PE maiores do que os encontrados no presente trabalho, para os locos CSN3, LGB, CSFM50 e BM1224 (0,0731, 0,1759, 0,5077 e 0,4406, respectivamente).

CONCLUSÕES

As freqüências alélicas para os marcadores BM1224 e CSFM50 diferem das descritas para outras amostras da raça Nelore, confirmando a necessidade de caracterização de diferentes rebanhos de uma raça na determinação de freqüências alélicas.

Os valores de PIC e PE demonstram a superioridade dos marcadores microsatélites para o mapeamento genético e análise de parentesco. Entretanto, para essas aplicações, tais marcadores devem ser investigados quanto à ocorrência de alelos nulos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BISHOP, M. D., KAPPES, S. M., KEELE, J. W. et al., 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136: 619-639.
2. BURNS, B.M., TAYLOR, J.F., HERRING, A.D. et al., 1995. Bovine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the TEXAN11, TEXAN12, TEXAN13, TEXAN14 and TEXAN15 loci. *Anim.Genet.*, 26: 201-202.
3. DEL LAMA, S. N., ZAGO, M. A., 1996. Identification of the κ -casein and β -lactoglobulin genotypes in Brazilian Bos indicus and Bubalus bubalis populations. *Bras. J. Genetics*, 19: 73-77.
4. DODDS, K. G., TATE, M. L., MCEWAN, J. C. et al., 1996. Exclusion probabilities for pedigree testing farm animals. *Theor. App. Gen.*, 92: 966-975.
5. MEDRANO, J. F., CORDOBA, E. A., 1990. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Biotechnology*, 8: 144-146.
6. MERZEL, M., ETCHEGARAY, M.A.L., SILVA, N.A. et al. Changes in allelic frequency of eight microsatellites in a Nelore herd selected for weight gain. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 44, 1998, águas de Lindóia. *Anais...: SBG*, 1998, p. 91.
- MOORE, S.S., BYRNE, K., BERGER, K.T. et al., 1994. Characterization of 65 bovine microsatellites. *Mamm- Genome*, 5: 84-90.
- RON, M., YOFFE, O., EZRA, E. et al. ,1994 Determination of effects of milk protein genotype on production of Israeli Holstein. *J. Dairy Sci.*, 77:1106-113.
- ROSA, A. J. M. *Caracterização da raça Nelore e teste de paternidade por marcadores moleculares*: Piracicaba, SP: ESALQ, 1997, 114p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – ESALQ – USP.
- SCHLEE, P., GRAML, R., SCHALENBERGER, E. et al., 1994. Growth hormone and insuline-like growth factor I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. *Theor. App. Gen.*, 88: 497-500.

Quadro I. Frequências alélicas, número de alelos observados (NA) e estimativas de heterozigiosidade (H), diversidade gênica (D), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e probabilidade de exclusão (PE) para os seis marcadores na raça Nelore.

Loco	Alelos ^a	Frequência ± EP	NA	D	H	PIC	PE
CSN3	A	0,944 ± 0,012					
	B	0,066 ± 0,012	2	0,105	0,111	0,101	0,051
LGB	A	0,239 ± 0,022					
	B	0,761 ± 0,022	2	0,365	0,244	0,298	0,165
GH	L	1,000	1	0,000	0,000	0,000	0,000
BM1224	4 (177)	0,375 ± 0,025					
	2 (181)	0,322 ± 0,025					
	8 (169)	0,133 ± 0,018					
	1 (183)	0,089 ± 0,015					
	6 (173)	0,047 ± 0,011					
	outros	0,034	10	0,729	0,311	0,685	0,521
TEXAN15	8 (203)	0,606 ± 0,026					
	6 (207)	0,164 ± 0,019					
	-1 (219)	0,122 ± 0,017					
	outros	0,108	9	0,589	0,577	0,554	0,389
CSFM50	6 (172)	0,379 ± 0,026					
	8 (168)	0,342 ± 0,025					
	4 (176)	0,189 ± 0,021					
	outros	0,09	5	0,661	0,669	0,641	0,466
Média (EP)			4,83 (1,58)	0,413 (0,126)	0,318 (0,106)	-	0,876*

^aO tamanho de cada alelo de microssatélite, em pares de nucleotídeos, é indicado entre parêntesis, EP = Erro padrão, *Probabilidade de exclusão combinada