

ASSOCIAÇÃO ENTRE O MARCADOR MICROSSATÉLITE ILSTS011 E PESO AO NASCIMENTO NO CROMOSSOMO 14 (BTA14) DE BOVINOS¹

MARCELO MIYATA², GUSTAVO GASPARIN³, LUIZ LEHMANN COUTINHO⁴, MÁRIO LUIZ MARTINEZ⁵, MARCO ANTÔNIO MACHADO⁵, MARCOS VINICIUS G. BARBOSA DA SILVA⁵, ANA LÚCIA CAMPOS⁵, LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO⁶

¹ Apoio financeiro: CNPQ – Embrapa/Prodetab

² Mestrando no Departamento de Genética e Evolução: UFSCar Rod. Washington Luiz Km 234 - São Carlos, Bolsista CNPQ

³ Mestrando no Departamento de Genética e Evolução: UFSCar Rod. Washington Luiz Km 234 - São Carlos

⁴ Professor: Universidade de São Paulo - ESALQ - Departamento de Produção Animal - Piracicaba - SP

⁵ Pesquisador: Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora - MG

⁶ Pesquisadora: Embrapa Pecuária Sudeste - Rod. Washington Luis Km 234 - São Carlos – SP, Bolsista CNPQ

RESUMO - A identificação de QTLs (Quantitative trait locus) visa auxiliar os programas de melhoramento permitindo a seleção de características economicamente importantes. Neste trabalho a associação entre o marcador ILSTS011 do cromossomo 14 de bovinos e a característica peso ao nascimento (PN), foi investigada em uma população de 294 animais provenientes dos cruzamentos entre as raças Gir e Holandês, produzidos na Embrapa Gado de Leite. A genotipagem do marcador ILSTS011 foi feita através do sequenciador automático. Os resultados da análise de substituição de alelos deste marcador sobre PN sugerem efeito negativo de um alelo que originou-se nesta população da raça Gir.

PALAVRAS-CHAVE: QTL, bovinos, cromossomo 14, peso ao nascimento, ILSTS011

ASSOCIATION BETWEEN MICROSATELITE MARKER ILSTS011 WITH BIRTH WEIGHT IN CHROMOSOME 14 (BTA14) IN BOVINES

ABSTRACT - The identification of QTLs aims to assist breeding programs allowing the selection of economically important characteristics. In this work the association between the marker ILSTS011 of bovine chromosome 14 and the characteristic birth weight (PN) was investigated in a population of 294 animals obtained from crossings between Gir and Holstein breeds, produced at Embrapa Gado de Leite. Genotyping of marker ILSTS011 was made through automatic DNA sequencer. The results of the analysis of allele substitution of this marker on PN suggest negative effect of an allele originated in the Gir breed in this population.

KEYWORDS: QTL, bovines, chromosome 14, birth weight, ILSTS011

INTRODUÇÃO

Os bovinos domésticos pertencem ao gênero *Bos*, onde a espécie *Bos indicus* é composta pelos bovinos provenientes da Índia, denominados de zebuínos, e a espécie *Bos taurus* é composta pelos bovinos domésticos denominados de taurinos. Um aspecto interessante é o fato dos bovinos se reproduzirem entre si sem redução da sua fertilidade, que, do ponto de vista do melhoramento genético, permite a combinação de características de produção da segunda espécie e a rusticidade da primeira espécie. O componente genético de características de produção pode ser estudado através de um marcador molecular, que é definido como sendo todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento de DNA não codificante. Um marcador molecular só é definido como marcador genético se apresenta segregação mendeliana. Exemplos de marcadores genéticos são os polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismo de DNA amplificado randomicamente (RAPD), polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e marcadores baseados em seqüências de DNA repetitivo, como os microssatélites. O polimorfismo dos marcadores microssatélites baseia-se na variação do número de repetições, podendo ser analisado através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e, como são altamente polimórficos e numerosos, são apropriados para o estudo de associação entre marcadores e locos que controlam características quantitativas.

A detecção de QTLs (Quantitative Trait Locus) pode ser feita através da abordagem posicional, que se baseia nos estudos de ligação, onde as regiões cromossômicas que contém o QTL são saturadas através do uso de marcadores microssatélites até que o gene responsável pela variação fenotípica seja identificado. Entretanto o sucesso dessa estratégia depende de mapas de

ligação, como os mapas genéticos de bovinos apresentados por Bishop *et al.* (1994) e Kappes *et al.* (1997).

A presença de QTLs no cromossomo 14 para características de produção de leite e de carne tem sido descrita na literatura. Recentemente dois genes com efeito sobre o metabolismo de lipídios foram mapeados na região centromérica do BTA14. Um alelo do gene da tiroglobulina (TG) foi identificado como tendo uma associação significativa sobre escore de marmoreio (Barendse, 1999). Um QTL para quantidade de gordura e porcentagem no leite foi mapeado em uma região similar do BTA14 (Coppieters *et al.* 1998) e uma mutação no gene diacilglicerol aciltransferase 1 (*DGAT1*) foi proposta como a causadora da variação fenotípica atribuída à este QTL (Grisart *et al.* 2002). Farnir *et al.* (2002) demonstraram que é possível extrair informações a partir do desequilíbrio de ligação usando os mapas de densidade média disponíveis e descrevem uma forte evidência de que o QTL no BTA14 pode ser encontrado através da informação tanto da ligação como do desequilíbrio de ligação. Morris *et al.* (2002) encontraram dois QTLs no BTA14 que foram significativamente ligados a uma série de características de crescimento, tendo sido demonstrados efeitos aditivos entre os dois QTLs para ganho precoce de peso. Hetzel *et al.* (1997) encontrou uma região significativa no cromossomo 14 para duas características, peso ao nascimento e dos seis aos 12 meses. Embora haja algum efeito de relação parcial ou completa entre as características, os resultados indicam que há relativamente poucas regiões cromossômicas que são responsáveis por uma grande proporção da variação no crescimento observada nos cruzamentos. Devido a este fato, o objetivo deste trabalho foi investigar a associação entre a característica peso ao nascimento e o marcador microssatélite ILSTS011, situado em um intervalo ao qual estes QTLs acima relacionados haviam sido mapeados.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento, 294 animais F2 foram obtidos do cruzamento de animais das raças Gir e Holandesa, produzidos na Embrapa Gado de Leite. Amostras de sangue ou sêmen foram coletadas para a extração do DNA de todos os animais. O marcador foi escolhido de acordo com os mapas disponíveis, principalmente do mapa genético produzido pelo Painel de Referência Internacional de Bovinos (Barendse *et al.*, 1997). As amplificações foram feitas em um termociclador e seus produtos foram analisados no seqüenciador ABI Prism 3100 Avant (Applied Biosystems). Depois de obter os dados genotípicos do marcador e os dados fenotípicos do peso ao nascimento, foi feita a análise de associação.

Nesta análise de associação, observa-se que os efeitos de um gene sobre características quantitativas podem ser confundidos com efeitos genéticos não-aleatórios devido ao parentesco entre indivíduos, compartilhando determinado alelo. Desta forma, para estimar o efeito direto de cada alelo, os registros de PN foram analisados por meio de um modelo de substituição gênica, o qual considera o efeito aditivo de um alelo do marcador ILSTS011. Tal modelo pode ser representado matricialmente, como: $y = Xh + Mm + Za + \varepsilon$, onde y = vetor de registro de produções; X e Z = matrizes incidência relativas aos efeitos fixos e aleatórios, respectivamente; e h , a e ε = vetores de soluções para os efeitos fixos, genético aditivo e residual, respectivamente. Ainda considera-se, m o vetor incluindo os efeitos fixos de substituição gênica para diferentes alelos do marcador ILSTS011 representados por coeficientes de regressão sendo que M = matriz contendo 0, 1 ou 2, representando o número de cópias de determinado alelo do marcador ILSTS011 presente em cada indivíduo. Os efeitos de ano-estação de nascimento e sexo do animal foram assumidos como fixos e os efeitos genético aditivo e residual foram assumidos como aleatórios, tendo distribuição normal, médias iguais a zero e variâncias σ_a^2 e σ_e^2 , respectivamente.

Todas as análises foram realizadas por meio do PROC MIXED do sistema SAS (SAS, 2000), resultando em maior flexibilidade na modelagem não somente das médias, como também das covariâncias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Incluindo-se o PN como variável dependente, observou-se um efeito significativo a 5% para os genótipos de ILSTS011 ($P \leq 0,0168$). As médias de PN em relação aos genótipos são observadas na Tabela 1. As médias dos genótipos que possuem o alelo 261 foram significativamente inferiores às dos demais genótipos ($P < 0,05$).

Para verificar se o alelo 261 contribuía para a diminuição das médias de PN nas progênes, foi feita uma análise de regressão, fixando o alelo 261 e o substituindo pelos alelos 266 e 268 (Tabela 2). Nesta análise, foi obtido um efeito altamente significativo para a variável sexo ($P < 0,0001$) e para a

substituição do alelo 261 pelo alelo 266 ($P < 0,0332$), com estimativa de efeito de substituição de 1,23 kg. Um efeito significativo a nível de significância de 10% foi obtido na substituição do alelo 261 pelo alelo 268 ($P < 0,0505$), onde a estimativa de efeito de substituição foi de 1,27 kg. A análise da origem do alelo 261 permitiu identificá-lo como sendo da raça Gir, que geralmente produzem bezerros mais leves ao nascer, se comparados aos animais da raça Holandesa, causando um efeito negativo nas médias das progênes.

TABELA 1. Médias dos PN em relação aos genótipos observados no marcador ILSTS011

Genótipos de ILSTS011	Médias de PN (\pm erro padrão)
261261	29,09 ($\pm 1,20$) ^a
261266	29,36 ($\pm 1,01$) ^a
261268	28,60 ($\pm 0,87$) ^a
266266	31,59 ($\pm 1,63$) ^{ab}
266268	30,32 ($\pm 0,90$) ^{ab}
268268	33,35 ($\pm 1,49$) ^b

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente ($P < 0,05$)

TABELA 2. Análise de regressão utilizando grupos contemporâneos na substituição do alelo 261 pelos alelos 266 e 268

Efeito	GL	Valor de F	P
GC	10	0,61	0,80
Sexo	1	22,74	< ,0001
G22	1	4,58	0,03
G33	1	3,86	0,05

CONCLUSÕES

A associação entre o marcador ILSTS011 com peso ao nascimento pode refletir a presença de pelo menos um QTL afetando o desenvolvimento pré-natal de bovinos. As substituições do alelo 261 pelos alelos 266 e 268 foram significativas para o aumento das médias dos PN. Estudos posteriores serão realizados com o uso de mais marcadores moleculares nessa região avaliando-se outras características de produção para investigar a aplicação do marcador na seleção assistida por marcadores em programas melhoramento genético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARENDSE, W. J.; VAIMAN, D.; KEMP, S. J. *et al.* A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. **Mammalian Genome**, v.8, p.29-36, 1997.
- BARENDSE, W. J. Assessing lipid metabolism. International patent application PCT/AU98/00882, **International Patent Publication WO 99/23248**, 1999.
- BISHOP, M. D.; KAPPES, S. M.; KEELE, J. W. *et al.* A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, v. 136, p. 619. 1994.
- COPPIETERS, W.; RIQUET, J.; ARRANZ, J. *et al.* A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. **Mammalian Genome**, v.9, p.540-544, 1998.
- FARNIR, F.; COPPIETERS, J.; ARRANZ, J. *et al.* Extensive genome-wide linkage disequilibrium in cattle. **Genome Research**, v.10, p.220-227, 2000.
- GRISART, B.; COPPIETERS, W.; FARNIR, F. *et al.* Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research**, v.12, p.222-231, 2002.
- HETZEL, J.; DAVIS, G.; CORBET, N. *et al.* Localisation of quantitative trait loci (QTL) for growth traits in *Bos taurus* X *Bos indicus* cattle. In: **PLANT & ANIMAL GENOME V CONFERENCE**, p.12-16, 1997.
- KAPPES, S. M.; KEELE, J. W.; STONE, R. T. *et al.* A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genomic Research**, v.7, p.235-249, 1997.