



Validação de marcadores moleculares IGENITY® em bovinos de leite da raça Gir

Rui da Silva Verneque¹, Marco Antonio Machado¹, Marcos Vinícius G.B. da Silva¹, Maria Gabriela C.D. Peixoto¹, Roberto Luiz Teodoro¹, Ana Lúcia Campos¹, Henry Berger², Brent W. Woodward³, Donald J. Nkrumah³

¹Embrapa Gado de Leite, Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro, Embrapa/ABCGIL. E-mail: rui@cnppl.embrapa.br

²Merial Brasil, Divisão de Serviços Genéticos IGENITY. E-mail: henry.berger@merial.com

³Merial Limited, Duluth, Georgia, USA. E-mail: brent.woodward@merial.com, donald.nkrumah@merial.com

Resumo: Uma unidade comercial da Merial - IGENITY® - oferece serviços de identificação molecular de genes de interesse à bovinocultura de leite como uma ferramenta para melhorar a precisão na seleção de animais de alto mérito genético. Os marcadores genéticos utilizados pela IGENITY® foram originados de descobertas científicas, conduzidas em instituições de pesquisa acadêmicas e governamentais, em todo o mundo. A maioria das descobertas científicas envolveu a utilização de raças bovinas Européias (*Bos taurus*), portanto, é necessário verificar o efeito desses genes identificados em animais de raças Zebuínas (*Bos indicus*) e suas cruzas, para utilização desta tecnologia nos rebanhos bovinos no Brasil. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi validar marcadores moleculares IGENITY® em bovinos da raça Gir Leiteiro. Um total de 1615 vacas Gir foram genotipadas para marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) da IGENITY®. Foram analisados dados de produção de leite, produção e porcentagem de gordura e proteína, idade ao primeiro parto e intervalo de partos. Os estudos de associação visaram estimar o efeito direto de cada alelo, por meio de um modelo de substituição gênica. Os resultados deste estudo possibilitaram desenvolver um painel de marcadores moleculares, que explicam grande parte da variância fenotípica para as características avaliadas, e que estão sendo comercializados pela Merial/IGENITY® no Brasil para seleção na raça Gir.

Palavras-chave: *Bos indicus*, marcadores genéticos, seleção assistida por marcadores, SNPs

Validation of IGENITY® markers in Gyr dairy cattle

Abstract: A business unit within Merial – IGENITY® – offers genetic profiling of genes of economic importance to the bovine dairy industry as a tool to improve the accuracy of selecting high genetic merit animals. The genetic markers utilized by IGENITY® originate from discovery research conducted at academic and government research facilities worldwide. A total of 1,615 Gyr cows were genotyped for IGENITY® SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) markers. Phenotype data for milk production, fat yield and percent, protein yield and percent, age at first calving, and calving interval were analyzed. Association studies aimed to estimate the direct effect of each allele through a gene substitution model. Our results were able to develop a marker panel that explains an important amount of the phenotypic variance for these traits and are being marketed by Merial/IGENITY in Brazil for selection in the Gyr breed.

Keywords: *Bos indicus*, Genetic markers, marker-assisted selection, SNPs

Introdução

O melhoramento genético de bovinos para características de interesse econômico vem sendo realizado há décadas, obtendo sucesso a partir do desenvolvimento de metodologias de genética quantitativa. No entanto, o desenvolvimento de novas tecnologias tem revolucionado o setor agropecuário (Basur e King, 2005). Mais recentemente, o desenvolvimento de marcadores moleculares, e a implementação desses no processo de seleção assistida por marcadores (MAS) surgem como alternativa para acelerar o ganho genético dos programas de melhoramento, pois permitem aumentar a precisão e a intensidade na seleção e diminuir o intervalo de gerações.

A raça Gir é originária da Índia e foi introduzida no Brasil no início do Século 20. Sua aceitação nos criatórios deveu-se à sua rusticidade, docilidade e adaptação às condições ambientes tropicais dos sistemas de produção do país. Há 23 anos, a raça vem sendo selecionada para características de interesse

à produção de leite, pelo Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro, sob coordenação da Embrapa Gado de Leite. O sucesso do programa de melhoramento da raça se faz notar na participação expressiva das vendas de sêmen de touros provados, embriões e animais Gir Leiteiro para o mercado interno e externo (Asbia, 2008).

Uma unidade comercial da Merial - IGENITY® - oferece serviços de identificação molecular de genes de interesse à bovinocultura de leite como uma ferramenta para melhorar a precisão na seleção de animais de alto mérito genético. Os marcadores genéticos utilizados pela IGENITY® foram originados de descobertas científicas, conduzidas em instituições de pesquisa acadêmicas e governamentais, em todo o mundo. A maioria das descobertas científicas envolveu a utilização de raças bovinas Européias (*Bos taurus*), portanto, é necessário verificar o efeito desses genes identificados em animais de raças Zebuínas (*Bos indicus*) e suas cruzas, para utilização desta tecnologia nos rebanhos bovinos no Brasil. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi validar marcadores moleculares IGENITY® em bovinos da raça Gir Leiteiro.

Material e Métodos

Um total de 1615 vacas da raça Gir Leiteiro, contendo dados de produção de leite e constituintes foram selecionadas para o estudo. Amostras do Banco de DNA de Bovinos de Leite da Embrapa Gado de Leite foram genotipadas para marcadores SNP IGENITY®, localizados na sequência dos genes selecionados. Os genótipos dos SNPs foram obtidos por meio de uma plataforma de espectrometria de massa (*Sequenom iPLEX™ Mass Spec*) pela IGENITY® e enviados à Embrapa Gado de Leite para as análises estatísticas.

Para os estudos de associação, foram eliminados, do arquivo de dados de produção e reprodução, os animais que apresentaram encerramento de lactações por causas anormais. Dentre as principais causas da eliminação podem ser citadas: morte do bezerro, morte e/ou doença da vaca, intervalo de controles leiteiros superior a 75 dias. Além disso, todas as lactações em que foram utilizados hormônios também foram eliminadas. O arquivo utilizado para as análises genéticas totalizou informações de 1.300 vacas Gir Leiteiro. As características analisadas foram: produção de leite, produção e porcentagem de gordura e proteína, idade ao primeiro parto e intervalo de partos. Foram também utilizados dados de valor genético dos animais, estimados a partir de um arquivo genealógico com informações de 47.165 animais.

A seguir, foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas para cada marcador, eliminando das análises de associação os marcadores que apresentaram alelos fixados (frequência > 99 % para um dos alelos). Para estimar o efeito direto de cada alelo, os registros foram analisados por meio de um modelo de substituição gênica, que estima o efeito de um alelo em particular após a remoção dos efeitos aditivos de outros alelos do animal. Matricialmente, este modelo pode ser representado como $y = Xh + Za + Zp + Mm + \varepsilon$, em que y : vetor de registros de produção e reprodução; X e Z : respectivas matrizes de incidência relativas aos efeitos fixos e aleatórios; h , a , p e ε : vetores de soluções para os efeitos fixos, genético aditivo, ambiente permanente e residual, respectivamente; m : vetor incluindo os efeitos fixos de substituição gênica para os genes estudados, representados por coeficientes de regressão e M : matriz contendo 0, 1 ou 2, representando o número de cópias de determinado alelo dos genes presentes em cada indivíduo. Os efeitos de rebanho-ano e estação do parto foram assumidos como fixos, a idade da vaca ao parto, como covariável (termos linear e quadrático), e os efeitos genético-aditivo, de ambiente permanente e residual, como aleatórios ($N \sim 0, \sigma_a^2; \sigma_{ep}^2; \sigma_e^2$, respectivamente). Para a obtenção das médias dos quadrados-mínimos de cada genótipo, foi utilizado o modelo $y = Xh + Za + Zp + \varepsilon$, em que y : vetor de registros de produção e reprodução; X e Z : respectivas matrizes de incidência relativas aos efeitos fixos (incluindo as classes de genótipos) e aleatórios; h , a , p e ε : vetores de soluções para os efeitos fixos: genético-aditivo, ambiente permanente e residual, respectivamente. Para o estudo das combinações de classes de genótipos, usou-se modelo semelhante ao anterior, incluindo-se as combinações de genótipos dos genes como efeito classificatório. Todas as análises foram realizadas utilizando procedimentos *FREQ* e *MIXED* do pacote estatístico *SAS*® (*SAS Institute*). Para todas as características, exceto idade ao primeiro parto, utilizou o modelo de repetibilidade.

Em resumo, foram realizados estudos de associação para cada marcador (*single marker analysis*), sendo que os marcadores que se mostraram significativamente associados ($P < 0.05$) foram incluídos nas análises de combinação de genótipos (*combined analysis*). Foram testadas todas as possíveis combinações de genótipos, para que ao final fosse determinado os marcadores significativamente associados à cada característica fenotípica. Foram calculados os coeficientes de regressão para os efeitos de substituição alélica para todas as possíveis combinações genotípicas. Os marcadores, com efeito significativo ($P < 0,01$) nestas análises, constituíram os painéis finais para cada característica. Uma vez obtidos os painéis para cada característica, foram gerados escores de 1 a 10 (usados comercialmente), por característica, de acordo com a combinação dos genótipos. O escore 1 foi atribuído à combinação em que todos os alelos dos marcadores incluídos no painel eram desfavoráveis, ou seja, nenhum alelo associado

foi substituído (animal com escore 1 possui cópia desfavorável dos alelos para todos os marcadores associados com as características). O escore 10 significa que todos os alelos associados foram substituídos, ou seja, o animal possui a melhor combinação genotípica possível para o painel de marcadores.

Resultados e Discussão

Os painéis de marcadores moleculares explicaram uma proporção importante das variâncias fenotípica e genética, e os efeitos foram bastante expressivos, com impacto expressivo sobre as características, especialmente sobre a produção de leite (Tabela 1). Uma causa provável para obtenção de efeitos bastante pronunciados na raça Gir é a baixa frequência dos alelos significativamente associados às características de produção de leite, produção de gordura e produção de proteína. Esta baixa frequência de genótipos favoráveis indica uma considerável oportunidade para seleção assistida por marcadores nesta raça.

Tabela 1 - Níveis de significância e estimativas para o efeito de substituição alélica para as características de produção de leite e constituintes. Estatísticas descritivas e valor da variância explicada pelo painel de marcadores IGENITY® para cada característica avaliada na raça Gir.

Característica	Prod. Leite (VG)		Prod. Proteína (VG)		Prod. Gordura (VG)	
	Prob.	Est. (kg)	Prob.	Est. (kg)	Prob.	Est. (kg)
Total das Estimativas	<0,0001	631,9	<0,0001	22,7	<0,0001	25,37
Média	2723		110		129	
Desvio-Padrão	1167		54		55	
Mínimo	127		7		6	
Máximo	9692		326		553	
Variância Explicada	23,21%		20,64%		19,65%	

Para as características idade ao primeiro parto e intervalo entre partos não foram detectados marcadores significativamente associados neste estudo. Os marcadores encontrados para as características porcentagem de gordura e porcentagem de proteína explicam uma menor porcentagem da variância fenotípica e, portanto não foram incluídos no painel final da IGENITY®.

Conclusões

Os resultados deste estudo de validação levaram ao desenvolvimento de painéis de marcadores moleculares especificamente identificados e validados para a raça Gir. Estes marcadores compõem o painel que está sendo utilizado pela IGENITY® (Merial Brasil) em bovinos da raça Gir.

Agradecimentos

Aos técnicos da Embrapa Gado de Leite e ABCGIL (Associação Brasileira de Criadores de Gir Leiteiro) pela compilação dos dados de produção de leite e aos associados da ABCGIL pela disponibilização dos animais utilizados neste estudo.

Literatura citada

- ASBIA, 2007. Disponível em <http://www.asbia.org.br/?mercado/index> (Acessado em 03 de janeiro de 2008).
- Basrur, P. K., King, W. A. Genetics then and now: breeding the best and biotechnology. Rev.sci.tech.off.int.epiz., v.24, p.31-49, 2005
- SAS Institute Inc., SAS Users Guide: Statistics, Version 9.1, Cary, NC, SAS Institute Inc., 2002.