



## VIABILIDADE DE *LOC*/MICROSSATÉLITES PARA EXCLUSÃO DE PATERNIDADE EM RAÇAS DE OVINOS

SAMUEL REZENDE PAIVA<sup>2,9</sup>, DANIELLE ASSIS DE FARIA<sup>3</sup>, VANESSA CHAVES SILVÉRIO<sup>4</sup>, BRUNA PENA SOLLERO<sup>5</sup>, DÉBORA MARTINS PAIXÃO<sup>5</sup>, CONCEPTA MCMANUS<sup>6</sup>, ANDREA ALVES DO EGITO<sup>2</sup>, JORGE ABDALA DERGAM<sup>7</sup>, SIMONE ELISA FACIONI GUIMARÃES<sup>8</sup>, SILVIA TEREZA RIBEIRO CASTRO<sup>2</sup>, MARIA DO SOCORRO MAUÉS ALBUQUERQUE<sup>2</sup>, ARTHUR DA SILVA MARIANTE<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Financiamento: EMBRAPA, CNPq, UFV, UnB

<sup>2</sup> Pesquisador Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília – DF

<sup>3</sup> Estudante de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG

<sup>4</sup> Estudante de Graduação, Universidade Católica Brasília, bolsista da Embrapa CENARGEN, Brasília – DF

<sup>5</sup> Estudante de Graduação, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG

<sup>6</sup> Professora da Universidade de Brasília, Brasília - DF

<sup>7</sup> Professor Orientador do Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG

<sup>8</sup> Professora do Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG

<sup>9</sup> Estudante de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG

**RESUMO** - O objetivo do presente trabalho foi verificar a viabilidade dos *loci* de microssatélites para estimação de probabilidades de exclusão de paternidade e auxiliar no melhoramento e conservação das raças localmente adaptadas e comerciais de ovinos no Brasil. Após a análise de 18 *loci* em oito raças de ovinos (N=297), foi possível obter probabilidades de exclusão de paternidade de 99,99% para seis das oito raças avaliadas. Dessa maneira, o painel aqui descrito poderá, no futuro, ser utilizado para auxiliar na redução dos erros de pedigree dos rebanhos e conseqüentemente, aumentar os ganhos genéticos estimados pelos programas de melhoramento genético clássico.

**PALAVRAS-CHAVE:** conservação recursos genéticos animais, *Ovis aries*, teste paternidade

### USE OF MICROSATELLITE MARKERS FOR PARENTAGE TESTING IN SHEEP BREEDS

**ABSTRACT** -The feasibility of microsatellite loci for parentage exclusion and as tools for management and conservation of commercial and local ovine breeds in Brazil was investigated. Analysis in variability patterns of 18 loci in eight breeds (N=297) allowed parental exclusion levels of 99.99% in six breeds. Application of this setting could, in the future, help in the reduction of pedigree errors and consequently increase genetic gain estimated in classic animal breeding studies.

**KEYWORDS:** conservation genetics of livestock breeds, *Ovis aries*, parentage testing

### INTRODUÇÃO

A utilização de marcadores moleculares como auxiliar do melhoramento animal clássico é uma realidade, principalmente após o estabelecimento de metodologias de replicação específica do DNA como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o aumento da capacidade de processamento dos computadores. Dentre os vários marcadores moleculares identificados, destacam-se os *loci* de microssatélites, que geralmente são neutros e polimórficos. Tais marcadores podem ser aplicados para estimação de distâncias genéticas (Arranz *et al.*, 2001), estruturação populacional (Diéz-Tascón *et al.*, 2000), implementação de testes de paternidade (Luikart *et al.*, 1999) e identificação racial (Maudet *et al.*, 2002;).

A existência de erros de pedigree em um programa de melhoramento animal pode comprometer todo o ganho genético estimado para a progênie de um rebanho (Carneiro *et al.*, 1999). Tal fato poderá implicar em grandes perdas econômicas que variam de acordo com a magnitude do empreendimento. Ultimamente, os marcadores microssatélites têm sido empregados para avaliar os erros de pedigree pelos métodos tradicionais assim como, para auxiliar na redução dos mesmos (Visscher *et al.*, 2002). Dessa forma, o presente trabalho visou testar a viabilidade do emprego de marcadores microssatélites para testes de exclusão de paternidade em ovinos de raças localmente adaptadas e comerciais do Brasil.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 297 animais pertencentes às seguintes raças de ovinos: Santa Inês, Bergamácia, Rabo Largo, Morada Nova, Somalis, Hampshire, Ile de France e Corriedale. O DNA foi extraído de linfócitos, dividido em duas alíquotas, uma de trabalho e outra depositada no Banco de

DNA do Laboratório de Genética Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF. Para as reações de PCR foram utilizados 18 *loci* de microssatélites (Tabela 1) recomendados pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) e ISAG (*International Society of Animal Genetics*) em todos os indivíduos. As genotipagens foram realizadas em Seqüenciador Automático ABI *Prism 310* e analisadas a partir do software Genescan (*Applied Biosystems*). Obtido os genótipos para todas as raças, foi utilizado o programa Cervus (Marshall *et al.*, 1998) para estimar as freqüências alélicas e parâmetros genéticos populacionais para cada raça e *locus*. Foram estimadas duas probabilidades de exclusão de paternidade (PE): a primeira (PE1), foi estimada a chance de exclusão quando se conhece o genótipo do filho e de um possível progenitor, enquanto a segunda (PE2), além dos genótipos acima, sabe-se o genótipo de um dos verdadeiros pais. Este último caso é considerado o mais comum dentre os animais domésticos.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A lista dos *loci* de microssatélites usados, a caracterização dos mesmos para vários parâmetros populacionais e o poder de exclusão de paternidade pode ser observados na Tabela 1. A probabilidade de exclusão combinada para todas as oito raças foi de 0,999946 (PE1) e 0,999999 (PE2). Esses resultados sugerem, com um alto grau de confiança, a possibilidade de exclusão de paternidade para qualquer cruzamento entre essas raças de ovelhas no Brasil. Foi realizado um teste adicional com nove *loci* de maior valor de conteúdo de informação polimórfica (PIC) no qual foi estimada uma probabilidade de exclusão de 0,99993 para PE2. Esse resultado é importante, pois, quando se tiver conhecimento do genótipo da mãe, será possível obter uma correta exclusão de paternidade a um menor custo e com maior rapidez.

TABELA 1. Número de alelos por *locus* (N), heterozigosidade observada (Het.Obs), heterozigosidade esperada (Het.Esp.), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e probabilidades de exclusão 1 e 2 para 18 *loci* de microssatélites estudados em oito raças de ovinos no Brasil

Lócus	N	Het. Obs	Het. Esp.	PIC	PE 1	PE 2
OarFCB20	13	0,716	0,836	0,820	0,523	0,691
ILSTS05	06	0,621	0,746	0,711	0,349	0,531
Oar48	14	0,585	0,693	0,665	0,308	0,494
ILSTS11	10	0,679	0,771	0,735	0,377	0,556
ILSTS87	16	0,804	0,844	0,825	0,526	0,692
INRA35	11	0,666	0,767	0,729	0,372	0,549
INRA05	17	0,582	0,843	0,830	0,546	0,709
INRA63	13	0,741	0,819	0,793	0,468	0,642
OarAE129	07	0,350	0,625	0,560	0,212	0,363
OarFCB304	14	0,649	0,785	0,757	0,422	0,598
OHMC1	12	0,767	0,821	0,802	0,490	0,663
OarHH35	12	0,652	0,817	0,796	0,476	0,651
OarJMP29	18	0,734	0,809	0,784	0,461	0,635
INRA23	10	0,647	0,861	0,844	0,557	0,718
MAF65	08	0,711	0,775	0,737	0,378	0,556
MAF214	12	0,565	0,614	0,546	0,207	0,353
BM827	07	0,590	0,773	0,739	0,390	0,568
HUJ616	16	0,614	0,737	0,709	0,359	0,543

Na Tabela 2, são mostrados alguns índices populacionais descritivos e de exclusão de paternidade para cada raça estudada. Como pode ser visto, para seis das oito raças estudadas, foi conseguida uma significativa PE2, de forma que os maiores valores de PE2 foram relativamente proporcionais aos maiores valores de heterozigosidade e de PIC. Até o momento, painéis com alta probabilidade de exclusão de paternidade já foram publicados para bovinos (Heyen *et al.*, 1997), e caprinos (Luikart *et al.*, 1999). No caso de ovinos, o ISAG disponibilizou (<http://www.isag.org.uk>) um painel para exclusão de paternidade baseados em sete raças italianas, embora o mesmo não informe as probabilidades de exclusão atingidas. Os resultados obtidos por esse trabalho foram muito significativos e com grande potencial de aplicação, visto que poderão ser utilizados para: 1) verificação de pedigrees em programas de melhoramento; 2) identificação individual e racial de

animais duvidosos; 3) manutenção da variabilidade genética dos estoques em programas de conservação.

TABELA 2. Número de indivíduos analisados (N.I), heterozigiosidade observada (Het.Obs), conteúdo de informação polimórfica (PIC), número médio de alelos por raça e probabilidades de exclusão 1 e 2 para 18 *loci* de microssatélites estudados em oito raças de ovinos no Brasil. Os valores em negrito indicam as raças que atingiram a probabilidade mínima para uma exclusão de paternidade desejável

Raça	N.I	Het. Obs.	PIC	Nº médio alelos	PE 1	PE 2
Santa Inês	48	0,7203	0,717	8,39	0,999819	<b>0,999999</b>
Bergamácia	46	0,6711	0,677	7,11	0,999437	<b>0,999998</b>
Rabo Largo	48	0,6272	0,602	6,28	0,996519	<b>0,999970</b>
Morada Nova	48	0,6592	0,670	7,33	0,999308	<b>0,999997</b>
Somalis	48	0,5687	0,527	5,50	0,990337	0,999831
Hampshire	24	0,6282	0,655	7,06	0,999463	<b>0,999998</b>
Ile de France	24	0,6822	0,658	5,94	0,999304	<b>0,999997</b>
Corriedale	11	0,6031	0,523	4,22	0,983875	0,999659

### CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu verificar a possibilidade da implementação de um painel de *loci* de microssatélites para auxiliar tanto no melhoramento como na conservação de raças localmente adaptadas e comerciais de ovinos no Brasil.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRANZ J.J.; BAYÓN Y.; SAN PRIMITIVO F. Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. **Genet. Sel. Evol.** v.33, p.529-542, 2001.
- CARNEIRO P.L.S.; EUCLYDES R.F.; ALMEIDA E SILVA M.; LOPES P.S.; TORRES R.A.; CARNEIRO A.P.S.; TORRES FILHO R.A. Efeito de Erros de Pedigree na Seleção. **Rev. Bras. Zootec.**, v.28, n.2, p.269-274, 1999.
- DIÉZ-TASCÓN C.; LITTLEJOHN R.P.; ALMEIDA P.A.R.; CRAWFORD A.M. Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. **Animal Genetics**, v.31, p.243-251, 2000.
- HEYEN D.W.; BEEVER J.E.; DA Y.; EVERT R.E.; GREEN C.; BATES S.R.E.; ZIEGLE J.S.; LEWIN H.A. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite in fluorescent multiplexes for semi-automated parentage testing. **Animal Genetics**, v.28, p.21-27, 1997.
- LUIKART G.; BIJU-DUVAL M-P.; ERTUGRUL O.; ZAGDSUREN Y.; MAUDET C.; TARBELET P. Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). **Animal Genetics**, v.30, p.431-438, 1999.
- MARSHALL T.C.; SLATE J.; KRUK L & PEMBERTON J.M. Statistical Confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v.7 n. 5, p.639-655, 1998.
- MAUDET C.; LUIKART G.; TABERLET P. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. **J. Anim. Sci.**, v.80, p.942-950, 2002.
- VISSCHER P.M.; WOOLLIAMS J.A.; SMITH D.; WILLIAMS J.L. Estimation of Pedigree Errors in the UK Dairy Population using Microsatellite Markers and the Impact on Selection. **J. Dairy Sci.**, v.85, p.2368-2375, 2002.