

XII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
Ribeirão Preto, SP – 12 e 13 de junho de 2017

Incorporação de marcadores SNPs na verificação de conflitos de paternidade em animais das raças Hereford e Braford

Helena Brocardo Comin^{1*}, Bruna Pena Sollero², Fernando Flores Cardoso³

¹ Mestranda – Programa de Pós Graduação em Zootecnia – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

² Pesquisadora Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, Brasil.

³ Orientador e Pesquisador Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, Brasil.

*Autor correspondente: helenacomin.92@hotmail.com

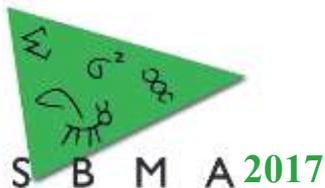
Resumo: Com a utilização de testes de paternidade nos programas de melhoramento genético, o potencial para ganho genético pode ser maior devido à possibilidade de correção de parentesco daqueles animais com pais erroneamente identificados ou exclusão destes da matriz de parentesco ou das avaliações. O objetivo deste trabalho foi verificar os parâmetros de diversidade genética de uma lista de marcadores SNPs em uma população de bovinos de corte das raças Hereford e Braford e testar sua viabilidade na verificação de parentesco neste rebanho. Após controle de qualidade dos marcadores e amostras, 95 marcadores recomendados pelo ISAG (International Society for Animal Genetics) para teste de paternidade em 3.461 bovinos foram utilizados nas análises de paternidade por meio do programa CERVUS 3.0. O valor médio de Heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) foi de 0,456 ($\pm 0,051$) e 0,467 ($\pm 0,053$), respectivamente, sendo o conteúdo de informação polimórfica (PIC) médio dos 95 marcadores igual a 0,360 ($\pm 0,034$) e seis locos apresentaram desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Apesar da incerteza na definição do verdadeiro pai entre os dois sugeridos para cada animal pelo programa, a comparação entre os primeiros pais propostos e a designação de pais do pedigree, resultou numa porcentagem de conflitos de paternidade igual a 24,15%. Sugere-se a investigação de diferentes combinações de SNP para a padronização de um painel de paternidade em bovinos.

Palavras-chave: genotipagem, teste de paternidade, conteúdo de informação polimórfica

Incorporation of SNP genetic markers for paternity verification conflicts in Hereford and Braford animal breeds

Abstract: With the use of paternity testing in genetic breeding programs, the potential for genetic gain can be greater due to the possibility of kinship correction of those animals with mistakenly identified parents or even exclusion of those from the relationship matrix or from the evaluations. The objective of this work was to verify the genetic diversity parameters of a SNP markers list proposed in a population of Hereford and Braford animal breeds and to test its viability for paternity testing. After quality control procedure of markers and samples, 95 markers recommended by ISAG (International Society for Animal Genetics) for paternity testing 3,461 animals were used in the paternity analysis through the CERVUS 3.0 program. The mean values of observed (H_o) and expected (H_e) Heterozygosity were 0.456 (± 0.051) and 0.467 (± 0.053) respectively, with the mean polymorphism information content (PIC) of these 95 markers equal to 0.360 (± 0.034). Six markers showed significant deviations ($p < 0.05$) in the HWE tests. Despite the uncertainty in the definition of the true father between the two ones suggested by the program, the comparison between the first proposed father and the one designated in the pedigree resulted in a percentage of paternity conflicts equal to 24.15%. It is suggested the investigation of different combinations of SNPs for the standardization of a panel for paternity testing in cattle.

Keywords: genotyping, paternity testing, polymorphism information content



Introdução

Para que a eficiência de um programa de melhoramento genético seja comprovada, faz-se necessário a identificação correta do parentesco entre os indivíduos de uma população. Com o avanço da genômica, os marcadores genéticos do tipo Polimorfismo de Base Única (SNP- *Single Nucleotide Polymorphism*) vêm se destacando e dentre outras aplicações, também têm sido testados para detectar e corrigir erros de paternidade e consequentemente melhorar as informações baseadas no pedigree (Junqueira et al., 2017). Contudo, sabe-se que o uso de marcadores SNPs para verificação de paternidade ainda não foi oficializado. O objetivo deste trabalho foi verificar os parâmetros de diversidade genética de uma lista de 95 marcadores SNPs em uma população de bovinos de corte das raças Hereford e Braford e testar sua viabilidade na verificação de parentesco neste rebanho.

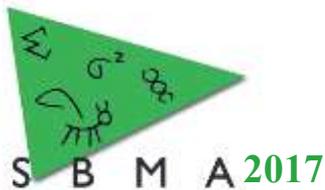
Material e Métodos

No presente trabalho, foram utilizados 3.551 animais genotipados com o painel Illumina BovineSNP50 (54.609 SNPs) (50K) e outros 131 touros (pais) genotipados com o painel de alta densidade (BovineHD - Illumina® bead chip – 777.962 SNPs) (777K). Após controle de qualidade dos marcadores e amostras, 95 marcadores recomendados pelo ISAG (<http://www.isag.us/committees.asp>) para teste de paternidade em bovinos foram utilizados nas análises. Por meio do programa CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007), as estimativas de diversidade genética (Heterozigosidade observada (H_o); esperada (H_e); conteúdo de informação polimórfica- PIC ; probabilidade de ocorrência de alelos nulos e teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg- HWE), referentes aos 95 marcadores utilizados, foram apresentadas e o percentual de conflito de paternidade foi calculado utilizando o programa R (R Development Core Team, 2006). A eficiência do método de razão de verossimilhança para a designação de parentesco foi observada pelo número de pais candidatos que apresentaram o maior LOD score (logaritmo da probabilidade) e que não correspondiam aos machos apontados como verdadeiros pais nos registros genealógicos, ou pedigree (% de conflito). Os parâmetros utilizados na simulação de paternidade basearam-se em 100.000 simulações, com 100% dos candidatos a pais amostrados, confiança relaxada de 80% e restrita de 95%.

Resultados e Discussão

A lista de 95 SNPs proposta foi testada nos animais listados após controle de qualidade (3.461 progênies e 131 touros pais). Vale ressaltar que todos estes marcadores apresentaram MAF (*Minor Allele Frequency*) maior que 3%. De acordo com a Tabela 1, o valor médio de Heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) foi de 0,456 ($\pm 0,051$) e 0,467 ($\pm 0,053$), respectivamente. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) médio foi igual a 0,360 ($\pm 0,034$) (Tabela 1) e variaram de 0,199 a 0,435 entre os locos analisados. Marcadores considerados mais informativos são aqueles com maior PIC e, consequentemente, maiores valores de Heterozigosidade (entre 0,223 a 0,541). Somente dois marcadores mostraram valores de H_e inferior a 0,3 e seis apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$). Heyen et al., (1997), obtiveram conteúdo de informação polimórfica médio de 0,59, utilizando em multiplex 22 marcadores do tipo microssatélite. Entretanto, considera-se que os marcadores SNP apresentam menos informação polimórfica (bialélica) em comparação com marcadores microssatélites, que podem ter muitos alelos. Por outro lado, isto pode facilmente ser superado e substituído por múltiplos marcadores de SNP utilizados simultaneamente em um teste de paternidade (Clarke et al., 2014). Estes autores encontraram valores de PIC entre 0,23-0,38 para SNPs testados em análises de paternidade em ovinos. Assim, consideramos que os marcadores analisados no presente estudo apresentaram níveis consideráveis de polimorfismo. A frequência média de alelos nulos calculada pelo programa foi igual a 0,010 ($\pm 0,014$). A taxa de erro admitida por Marshall et al. (1998) foi de cerca de 1%, sendo este parâmetro importante para não comprometer as taxas de erros das aferições de paternidade.

Os testes de paternidade realizados pelo programa CERVUS aferiram dois pais para cada um dos indivíduos (95% de confiança), com valores de LOD score similares, ou seja, valores de delta (LOD1 - LOD2) próximos a zero. Este resultado sugere incerteza na definição do verdadeiro pai. Entretanto, considerando a comparação entre os primeiros pais propostos pelo programa e a designação de pais do pedigree, a porcentagem de conflitos de paternidade foi de 24,15%. Esta porcentagem de conflitos de



paternidade foi similar (24%) à encontrada num estudo prévio utilizando um painel de alta densidade de marcadores SNPs (41.045) (Cardoso et al., 2015).

Tabela 1 - Valores médios encontrados de Heterozigosidade observada (Ho), Heterozigosidade esperada (He), Conteúdo de informação polimórfica (PIC) e Frequência de alelos nulos (F(Null)) para lista de 95 marcadores proposta.

Características avaliadas	Lista - 95 Marcadores
Ho	0,456 ($\pm 0,051$)
He	0,467 ($\pm 0,053$)
PIC	0,360 ($\pm 0,034$)
F(Null)	0,010 ($\pm 0,014$)

Conclusão

De acordo com o programa CERVUS e os parâmetros de diversidade genética calculados, os 95 marcadores SNPs recomendados pelo ISAG e utilizados nas análises, apresentaram-se informativos para discriminação de parentesco, observando-se 24,15% de conflitos de paternidade em comparação com os dados de pedigree. Uma das vantagens deste programa é que o método indica um provável pai dentro dos candidatos genotipados, e não simplesmente exclui a paternidade do suporte pai (pai do pedigree). Dada a importância do controle de paternidade nos rebanhos participantes dos programas de melhoramento genético e a modernidade das técnicas moleculares, sugere-se a investigação de diferentes combinações de SNPs para a padronização de um painel para testes de paternidade em bovinos.

Literatura citada

CARDOSO, F. F.; GOMES, C. C. G.; SOLLERO, B. P.; OLIVEIRA, M. M.; ROSO, M. V.; PICCOLI, M. L.; HIGA, R. H.; YOKOO, M. J.; CAETANO, A. R.; AGUILAR, I. Genomic prediction for tick resistance in Braford and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**. 2015.

CLARKE, S. M.; HENRY, H. M.; DODDS, K. G.; JOWETT, T. W. D.; MANLEY, T. R.; ANDERSON, R. M.; MCEWAN, J. C. A High Throughput Single Nucleotide Polymorphism Multiplex Assay for Parentage Assignment in New Zealand Sheep. **Ed. Claire Wade. PLoS ONE 9.4**. 2014

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 markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. **Anim Genet**. 1997.

JUNQUEIRA, V. S. Qualidade das informações de parentesco na avaliação genética de bovinos de corte. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Viçosa – UFV. 2014.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology** v.16, p. 1099-1106, set. 2007.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L. E. B; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**. 1998.