Painel de marcadores de microssatélites para teste de paternidade em raças caprinas

Elizabete Cristina da Silva[1], Maria Pia Souza Lima Mattos de Paiva Guimarães[2], Aurora Maria Guimaraes Gouveia[3], Olivardo Facó[4], Alexandre Rodrigues Caetano*[5], Samuel Rezende Paiva*[6]

1Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da UnB, Brasília, DF, e-mail: bete_zootec@hotmail.com
2Caprileite/ACCOMIG (Associação dos Criadores de Caprinos e Ovinos de Minas Gerais). e-mail: cleiteirompia@caprileite.com.br
3 Professora da Escola de Veterinaria da UFMG, Belo Horizonte-MG, e-mail: auroragouveia@terra.com.br
4 Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE. e-mail: faco@cnpc.embrapa.br
5 Pesquisador da Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, e-mail:acaetano@cenargen.embrapa.br
6 Pesquisador da Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, *Bolsistas de Prod. em Pesquisa do CNPq. e-mail:samuel@cenargen.embrapa.br

Resumo: O presente trabalho teve o objetivo de validar um painel de 12 locos de microssatélites para exclusão de paternidade em oito raças de caprinos especializadas para produção de leite e localmente adaptadas no Brasil (N=117). O referido painel apresentou altas probabilidades de exclusão combinada de 0,9866 e 0,9998 (PE1 e PE2), sendo mais informativo nas raças Mambrina (PIC= 0,73; PE2=0,9999) e Marota (PIC=0,70; PE2=0,9999). O painel de microssatélites avaliado foi efetivo para exclusão de paternidade em raças caprinas especializadas e localmente adaptadas no Brasil de forma que será implantado tanto para avaliação de pedigrees em Programas de Melhoramento em andamento quanto para manejo de Núcleos de Conservação.

Palavras chave: *Capra hircus*, melhoramento caprinos leiteiros, marcadores moleculares, recursos genéticos animais

Panel of microsatellite markers for paternity testing in goat breeds

Abstract: This study aimed to validate a panel of microsatellites suitable for paternity exclusion in eight specialized goat breeds for milk production and local goat breeds in Brazil (N=117). The 12 microsatellites showed high exclusion combined probabilities (PE1=0.9866 and PE2=0.9998), being more informative in Mambrina (PIC=0.73; PE2=0,9999) and Marota (PIC=0.70; PE2=0,9999) goat breeds. This panel of microsatellites was effective for paternity exclusion in specialized and local goat breeds in Brazil in a manner that both will be implanted to evaluate pedigrees in breeding programs and for ongoing management of Conservation Nuclei.

Keywords: *Capra hircus*, breeding dairy goats, molecular markers, animal genetic resources

Introdução

Os programas de melhoramento genético de pequenos ruminantes do Brasil são fortemente afetados pela falta de avaliações e registro sistemáticos de dados zootécnicos, assim como pela inexistência de um programa nacional que permita a determinação correta do pedigree dos rebanhos. Informações genealógicas corretas são de extrema importância para o processo de avaliação genética dos rebanhos e pedigrees incorretos acarretam em estimativas incorretas e de baixa acurácia.

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), através de uma portaria implementada em 2004, passou a exigir testes de verificação de parentesco para controle genealógico em espécies pecuárias como caprinos, ovinos, bovinos e eqüinos. Painéis de marcadores do tipo microsatélite são utilizados amplamente para esse fim em diferentes países e são a ferramenta recomendada pela *International Society for Animal Genetics* (ISAG) por serem altamente informativos e gerar resultados satisfatórios como os relatados por Luikart et al. (1999) e Carneiro et al. (2007).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo validar um painel complementar de 12 microssatélites para compor um teste de exclusão de paternidade para caprinos de raças localmente adaptadas no Brasil e de raças especializadas para produção de leite, visando gerar uma ferramenta útil para os programas nacionais de conservação e de melhoramento genético da espécie.

Material e Métodos

Um total de 117 amostras de DNA genômico de animais pertencentes a quatro raças caprinas brasileiras localmente adaptadas (Canindé, N=16; Marota, N=23; Moxotó, N=22 e Repartida, N=16), e quatro especializadas (Saanen, N=14; Alpina, N=6; Anglo Nubiano, N=4 e Mambrina, N=16) foram utilizadas no estudo. Dessas amostras, 102 foram obtidas do Banco de DNA e Tecidos do Laboratório de Genética Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, e 15 da Associação dos Criadores de Caprinos e Ovinos de Minas Gerais.

As amplificações para os 12 locos de microssatélites (ILSTS11, ILSTS87, OMHC1, TCRVB6, INRA005, INRA63, SPS0113, SRCRSP5, MCM527, INRABERN172, D5S2 e OARCP49) foram feitas em termocicladores (*Applied Biosystems*) em um volume final de 5 µL, utilizando o *Kit Qiagen Master Mix* para PCR-*multiplex*, segundo as recomendações do fabricante, 4,5ng de DNA genômico, 0,05-0,15 µM de cada *primer*.

Os fragmentos amplificados foram separados em seqüenciador automático, ABI *Prism* 3100 (*Applied Biosystems*) e os dados foram analisados com os *softwares GenScan* v. 3.1 e *Genotyper* v. 3.7.0.1 (*Applied Biosystems*) para identificação dos genótipos de cada indivíduo. Com o programa Cervus v. 3.0.3 (Marshall et al., 1998) foram obtidos o número de alelos (K), heterozigosidades observada (Ho) e esperada (He), conteúdo de informação polimórfica (PIC), duas probabilidades de exclusão (PE1 e PE2) para cada loco e raça, assim como para o conjunto de microssatélites e população global. A PE1 é a probabilidade de exclusão estimada quando a análise é realizada com dois genótipos (produto e suposto pai) enquanto que a PE2 é estimada quando além desses genótipos tem-se também o genótipo de um dos verdadeiros progenitores (em geral a mãe).

Resultados e Discussão

Todos os 12 locos amplificaram fragmentos polimórficos nas oito raças avaliadas, sendo que desses, quatro são locos recomendados pela ISAG (ILSTS87, INRA005, INRA63 e MCM527) e quatro pela IN nº 74 de 2004 do MAPA (OMHC1, SPS113, D5S2 e OarCP49) para teste de paternidade em caprinos no Brasil. Em algumas raças, os locos SPS0113 (Alpina), OarCP49 (Moxotó, Anglo Nubiana, Marota e Mambrina), ILSTS11 (Repartida), e D5S2 (Marota e Mambrina) apresentaram problemas de amplificação.

O número de alelos variou de 4 (D5S2 e SPS0113) a 11 (TCRVB6) e a He oscilou entre 0,05 (D5S2) e 0,83 (TCRVB6 e INRA05) (Tabela 1). Os maiores valores de PIC foram para os locos OMHC1 (0,81; PE=67) e TCRVB6 (0,80; PE=0,66) que também apresentaram as maiores probabilidades de exclusão. Para os locos recomendados pelo MAPA (D5S2 e OarCP49) os valores destes mesmos parâmetros foram muito inferiores, embora estes contribuíram para aumentar as probabilidades de exclusão combinada (PE1 e PE2), uma vez que a retirada dos mesmos ocasionou uma diminuição nos valores de PE (informações não mostradas neste trabalho). Uma alternativa para aprimorar os resultados obtidos seria substituir esses locos por locos mais informativos ou ainda analisar um maior número de indivíduos para esses locos.

O painel de 12 microssatélites proposto neste trabalho apresentou probabilidade de exclusão combinada de 0,9866 e 0,9998 (PE1 e PE2) e está composto de oito microssatélites altamente informativos com PIC superior a 0,6. A PE2, que considera a presença do genótipo da mãe, foi considerada alta e satisfatória para os valores mínimos de exclusão de parentesco (99,9%) obtidos com microssatélites (Weimer, 2003).

A Tabela 2 apresenta os parâmetros analisados para o conjunto de microssatélites por raça. Observa-se que o painel foi mais informativo na raça especializada Mambrina (PIC= 0,73) e na localmente adaptada, Marota (0,70), sendo que as PE2 mais elevadas (0,9999) foram também observadas nessas raças. Luikart et al. (1999) relataram probabilidades de exclusão superior a 0,99999 utilizando 22 locos de microssatélites em diferentes raças caprinas, dentre elas, a raça Saanen.

Tabela 1- Quantidade de indivíduos genotipados (N), número de alelos (K), heterozigosidades observada (Ho) e esperada (He), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e probabilidades de exclusão (PE1 e PE2) por loco considerando o total de amostras testadas de diferentes raças.

Locos	N	k	Ho	He	PIC	PE1	PE2
ILSTS11	91	7	0,52	0,69	0,66	0,29	0,48
ILSTS87	107	7	0,70	0,77	0,73	0,38	0,56
OMHC1	112	10	0,85	0,83	0,81	0,50	0,67
TCRVB6	92	11	0,71	0,83	0,80	0,49	0,66
INRA05	95	5	0,89	0,63	0,56	0,21	0,36
INRA63	106	7	0,55	0,68	0,62	0,27	0,43
SPS0113	106	4	0,52	0,59	0,54	0,19	0,35
SRCRSP9	111	8	0,86	0,73	0,68	0,31	0,49
MCM527	110	7	0,73	0,77	0,73	0,38	0,56
INRA172	92	6	0,61	0,74	0,69	0,33	0,51
D5S2	109	4	0,05	0,05	0,05	0,00	0,02
OARCP49	99	5	0,95	0,52	0,40	0,13	0,21
Média	-	6,75	0,66	0,65	0,61	*0,9866	**0,9995

*Probabilidade de exclusão combinada 1 e ** Probabilidade de exclusão combinada 2.

Tabela 2 - Quantidade de indivíduos genotipados (N), número médio de alelos (A_M), heteromzigosidades observada (Ho) e esperada (He), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e probabilidades de exclusão combinada (PE1 e PE2) por raça caprina para o painel de microssatélites.

Raças	N	A_M	Ho	He	PIC	PE1	PE2
Alpina	6	3,33	0,61	0,58	0,48	0,9155	0,9904
Anglo	4	3,75	0,63	0,70	0,56	0,9745	0,9985
Mambrina	16	7,42	0,69	0,80	0,73	0,9990	0,9999
Saanen	14	4,33	0,65	0,59	0,52	0,9464	0,9958
Canidé	16	4,42	0,71	0,62	0,55	0,9712	0,9982
Marota	23	7,42	0,63	0,76	0,70	0,9973	0,9999
Moxotó	22	6,17	0,64	0,68	0,61	0,9811	0,9992
Repartida	16	4,58	0,65	0,61	0,53	0,9535	0,9966

Conclusões

A alta probabilidade de exclusão para o painel de 12 locos de microssatélites indicou sua efetividade para exclusão de paternidade em raças caprinas especializadas e localmente adaptadas no Brasil, constituindo uma ferramenta efetiva para os programas de melhoramento e conservação da espécie.

Literatura Citada

CARNEIRO, T.X.; GONÇALVES, E.C.; SCHNEIDER, M.P.C. et al. Diversidade genética e eficiência de DNA microssatélites para o controle genealógico da raça Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., v.59, n.5, p.1257-1262, 2007.

LUIKART, G.; BIJU-DUVAL, M.P.; ERTUGRU, O. et al. Power of 22 microssatelite marker in fluorescent multiplex for parentage testing in goats (*Capra hircus*). **Animal Genetics**. v. 30, pp. 431-438, 1999.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUUK, L. et al. Statistical confidence for likelihood – based paternity inference in natural populations**. Molecular Ecology**, v.7, n.5, pp. 639-655, 1998.

WEIMER, T.A. Importância dos marcadores moleculares na seleção animal. **O Embrião**: SBTE, n.15, abr/mai/jun, 2003.