

DESCRIÇÃO DE CINCO LOCI DE MICROSATÉLITE EM UMA POPULAÇÃO DE CAPRINOS DA RAÇA ALPINA E SUA UTILIZAÇÃO EM TESTES DE CONFIRMAÇÃO DE PATERNIDADE EM CASOS ONDE O GENÓTIPO MATERNO É OU NÃO INFORMADO¹

AUTORES

ADRIANA M.ARAÚJO 2,3 , SIMONE E.F.GUIMARÃES 4, VIRGÍNIA S. COLUMBIANO 5,6, MARCELO R. TEIXEIRA 4, PAULO S. LOPES 4

¹ Financiamento Fapemig, Capes e CNPq

² Estudante de Doutorado do Curso de Genética e Melhoramento da UFV. Departamento de Zootecnia da UFV. Viçosa-MG, 36571-000 e-mail:melloarau@terra.com.br

³ Pesquisadora da Embrapa Caprinos

⁴ Professores do Departamento de Zootecnia da UFV. Viçosa-MG, 36571-000

⁵ Estudante de Zootecnia da UFV

⁶ Bolsista de Iniciação Científica da Fapemig

7

8

9

RESUMO

Os sistemas atuais de avaliação genética são baseados em informações produtivas de parentes. Para que tais métodos possuam a eficiência desejada é imprescindível o registro acurado de paternidade. Este trabalho tem o objetivo de testar a utilização de um painel de microssatélites de DNA para verificação de paternidade em caprinos no Brasil, nos casos onde o genótipo materno é conhecido ou desconhecido. Foram utilizados cinco loci para a genotipagem de 120 animais. Os fragmentos gerados por amplificação em PCR foram analisados em sistema multiplex automático (ABI 310, PE). Foram descritos o número de alelos, o tamanho de fragmentos e as frequências obtidas em cada locus. De todos os marcadores analisados, o que apresentou maior PIC foi o INRA006, sendo também o de maior heterozigosidade. Quando o genótipo materno é considerado, o PIC foi superior ao obtido quando este é desconhecido. A probabilidade de exclusão combinada obtida foi de 0,967 e 0,860, considerando respectivamente o genótipo materno ou não. A probabilidade de exclusão do teste foi maior quando a mãe tem o genótipo conhecido, porém a exclusão de paternidade geralmente só envolve o conhecimento do genótipo do pai e da progênie. Mais loci deverão ser estudados para compor o painel, buscando aumentar a informatividade do teste.

PALAVRAS-CHAVE

análise automática, DNA, frequência alélica, informatividade, multiplex, PIC

TITLE

(DESCRIPTION OF FIVE MICROSATELLITE LOCI IN A ALPINE GOAT POPULATION AND THEIR UTILIZATION FOR PATERNITY VERIFICATION IN CASES WHERE THE MOTHER GENOTYPE WAS INFORMED OR NOT) 1

ABSTRACT

The genetic evaluation systems used now a days are based in relative production information. For the desired efficiency of the, the accuracy of parentage report is essential. This work has the aim to test the utilization of a panel based in DNA microsatellites, for parentage verification in goats from Brazil, in cases where the mother genotype was known or unknown. Five loci were utilized for to genotype 120 goats. The PCR amplified fragments were analyzed in only one multiplex automated system (ABI 310, PE). The allele number, the fragment size and the allele frequency for every locus were reported. Among all analyzed markers, INRA006 demonstrated the higher PIC, and higher heterozygosity. When the mother genotype was considered, the PIC was higher that when its not considered. The exclusion probability combined was .967 and .860, in the case where mother genotype was considered or not. The exclusion probability was higher when the mother genotype was known, but the paternity exclusion usually involve only the pair father-progeny. More loci have

to be studied for the panel composition, to enhance the test information.

KEYWORDS

automated analyze, DNA, allele frequency, informatively, multiplex, PIC

INTRODUÇÃO

O teste de progênie, principal ferramenta para o melhoramento animal, se baseia em avaliações genéticas com base no desempenho de filhas. A acurácia do teste depende, em parte, da precisão das anotações de paternidade. Segundo RON et al. (1996), erros de paternidade podem atingir até 20% dos registros, reduzindo drasticamente o ganho genético obtido na população.

Atualmente existem no banco de dados da espécie caprina (<http://locus.jouy.inra.fr>) 727 loci descritos, sendo 303 genes e 424 loci de microsátélites. O mapa genético cobre 2737 cM, compreendendo >88% do genoma da espécie (SCHIBLER et al., 1998). Entretanto, as informações disponíveis sobre os loci descritos são poucas. O locus BETACAP é pertencente ao cluster gênico da caseína (RIJUKELS et al. unpublished). O locus ILSTS087 e os loci INRA005 e INRA006 foram descritos em caprinos por homologia em bovinos (PÉPIN et al., 1995). O INRABERN172 foi descrito por SCHIBLER et al. (1998) em caprinos.

Este trabalho teve o objetivo de estudar cinco loci de microsátélites e sua utilização para a verificação de paternidade em dois casos: (1) quando além do genótipo do suposto pai e da progênie, o genótipo da mãe é conhecido (2) apenas o genótipo do suposto pai e da progênie são conhecidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 120 caprinos da raça Alpina, pertencentes a cinco famílias de meio-irmãos paternos do rebanho da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais. As amostras de sangue para extração de material genético foram colhidas na veia jugular pelo sistema de vácuo. Depois de colhido, o sangue foi acondicionado em geladeira (4 °C) por 12 horas antes de iniciar a extração de DNA, segundo protocolo do fenol:clorofórmio de SAMBROOK et al. (1998).

Foram utilizados cinco primers de microsátélites marcados fluorescentemente: BETACAP (Tet/verde), ILSTS087 (6-Fam/azul), INRA005 (6-Fam/azul), INRA006 (Hex/amarelo) e INRABERN172 (Hex/amarelo), localizados nos cromossomos 6, 7, 12, 3 e 26, pertencentes ao painel francês (em colaboração com o LABOGENE, INRA).

As reações de PCR foram feitas em multiplex para todos os primers, exceto o INRA006, que mostrou otimização da reação em maior concentração de Mg^{2+} . Cada 20 μ l de reação de PCR contém 25 ng de DNA genômico, 20 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM de KCl, 0,2mM de dNTP, 1,25mM a 2,5mM de $MgCl_2$ e 1 U Taq polimerase. A concentração dos primers ficaram entre 0,12 μ M e 0,20 μ M. Após o período de ativação de 94°C/ 3 min., foram realizados 27 ciclos de 94°C/ 1min, 56°C/ 1min, 72°C/ 1min, seguidos por uma extensão final de 72°C/ 20 min. A eletroforese capilar foi realizada a 15 kV, 60°C, por 20 minutos no Genetic Analyzer ABI 310, da Applied Biosystem TM, e analisados utilizando o software Genescan®.

Os genótipos foram analisados pelo Statistical Analysis Software (SAS, 1998), obtendo-se as frequências gênicas de cada alelo e a heterozigosidade não viesada (Hu), conforme descrito por OTT (1992). O conteúdo de informação polimórfica de cada locus foi calculado conforme descrito por BOTSTEIN et al. (1980), assumindo que o genótipo do pai alegado, da progênie e da mãe confirmada são conhecidos (PIC1); e conforme JAMIESON e TAYLOR (1997), assumindo o conhecimento apenas do genótipo pai-progênie (PIC2). A probabilidade de exclusão, definida com a probabilidade de excluir um indivíduo ao acaso da paternidade, foi calculada segundo JAMIESON (1994), sendo conhecido o genótipo do pai alegado, da mãe confirmada e da progênie (PE1) e segundo JAMIESON e TAYLOR (1997), quando apenas o genótipo pai-progênie é conhecido (PE2). A probabilidade de exclusão combinada para todos os loci analisados foi calculada pelo produto da probabilidade de inclusão em cada loci $PI=1-PE$, pois uma exclusão é conclusiva. Assim, a probabilidade PI é a probabilidade daquele pai não ser excluído em nenhum dos loci.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na TABELA 1 são dados a frequência e os tamanhos dos alelos obtidos na população. Dos cinco loci estudados, a combinação de dyes/cores possibilitou o uso da análise em multiplex, o que torna o sistema de genotipagem mais rápido e econômico. Os primers corados com o mesmo dye não geraram fragmentos de tamanho sobrepostos, possibilitando a análise automática.

A heterozigosidade média foi de 0,717, variando de 0,630 a 0,822, sendo todos os loci considerados informativos ($H > 0,50$) segundo OTT (1992). Conforme o esperado, o PIC foi maior para os loci de maior heterozigosidade. De todos os marcadores analisados, o que apresentou maior PIC foi o locus INRA006. Ao considerar-se confirmado o genótipo materno o PIC foi superior ao obtido quando este é dado como desconhecido (TABELA1).

A probabilidade de exclusão combinada obtida foi de 0,967 (PE1) e 0,860 (PE2). Conforme descrito por LUIKART et al. (1999), a probabilidade de exclusão geralmente é maior quando a mãe tem o genótipo conhecido, porém a exclusão de paternidade geralmente só envolve o conhecimento do genótipo do pai e da progênie.

USHA et al (1995), com apenas cinco sistemas de microssatélites, obtiveram probabilidade de exclusão de 0,99 em bovinos. HEYEN et al. (1997) obteve conteúdo de informação polimórfica médio de 0,59 e probabilidade de exclusão do pai incorreto $> 0,99999$, quando se utilizou 22 sistemas de microssatélites, em multiplex. Em caprinos, LUIKART et al. (1999) desenvolveram um painel com 22 microssatélites em dois multiplex para o teste de paternidade em caprinos obtendo uma probabilidade de exclusão $> 0,99999$. Portanto, mais loci deverão ser acrescentados para um teste de paternidade confiável, uma vez que existe com este painel a chance de inclusão errada de aproximadamente 1:30.

CONCLUSÕES

O teste de paternidade baseado em microssatélites, através do sistema automático de análises de fragmentos, utilizando os cinco loci estudados proporcionou uma probabilidade de exclusão de 0,86 quando apenas o par suposto pai-progênie é genotipado. Mais loci deverão ser estudados e incorporados ao painel para o teste de paternidade tornar-se mais confiável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., et al.(1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32, 314-331.
2. HEYEN, D.W., BEEVER, J.E., DA, Y., et al. (1997). Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semi-automated parentage testing. *Animal Genetics* 28, 21-27.
3. JAMIESON, A. (1994) . The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Animal Genetics* 25, supl. 1, 37-44.
4. JAMIESON, A., TAYLOR, St.C.S. (1997) . Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics* 28, 397-400.
5. LUIKART, G., BIJU-DUVAL, M-P., ERTUGRUL, O., et al. (1999). Power of 22 microssatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). *Animal Genetics* 30, 431-438.
6. OTT, J. (1992). Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *American Journal of Human Genetics* 51, 283-290.
7. PÉPIN, L., AMIGUES, Y., LÉPINGLE, A, et al. (1995). D. Sequence conservation of microsatellites between cattle (*B.taurus*), goat (*C.hircus*), and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. (1995). INRA. Laboratoire de Genétique biochimique et de cytogenetique. Jouy-en-Josas.
8. RIJUKELS, M., ELNITSKI, L., MILER, W., et al. Multi-species comparative sequences analysis of the casein gene cluster region: a gene domaine encoding epithelial secretory proteins. *Molecular and Cellular Biology* 16, 111-118.

(unpublished).

9. RON, M., BLANC, Y., BAND, M. (1996) . Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. *J. Dairy Science*, v.79, 676-681.
10. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATS, T. (1998) . *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press. New York.
11. SAS (1998). *User's Guide. Statistical Analysis System*.
12. SCHIBLER, L., VAIMAN, D., OUSTRY, A., et al. (1998) . Comparative gene mapping: a fine-scale survey of chromosome rearrangements between ruminants and humans. *Genome Research* 8, 901-915.
13. USHA, A.P., SIMPSON, S.P., WILLIAMS, J.L. (1995). Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Animal Genetics* 26, 155-161.

TABELA 1- Número de alelos (N), variação do tamanho dos fragmentos (pb), heterozigosidade estimada (H_u), probabilidade de informação polimórfica (PIC1 e PIC2) e probabilidade de exclusão (PE1 e PE2) para os cinco loci estudados em caprinos da raça Alpina.

<i>Loci</i>	N	(pb)	H_u	PIC1	PIC2	PE1	PE2
BETACAP	5	160-170	0.6447	0.5769	0,4315	0.3781	0,2253
INRA005	4	115-121	0.6305	0.5579	0,4113	0.3561	0,2078
ILSTS087	9	135-153	0.7157	0.6713	0,5307	0.4911	0,3160
INRA006	8	106-122	0.8220	0.7949	0,6758	0.6440	0,4693
INRABERN172	5	142-150	0.7712	0.7317	0,5966	0.5520	0,3720