

PATERNIDADE EM REBANHOS CAPRINOS POR MEIO DE MICROSSATÉLITES DE DNA¹

ADRIANA MELLO ARAÚJO^{2,3}, SIMONE E. FACIONI GUIMARÃES⁴, CARMEN SILVA PEREIRA⁵, PAULO SÁVIO LOPES⁴, MARCELO TEIXEIRA RODRIGUES⁴, VIRGÍNIA S. COLUMBIANO⁶

¹ Fapemig, CAPES e CNPq

² Pesquisador da Embrapa Caprinos, Estrada Sobral-Groaíras, km4, Caixa Postal D10, Sobral-CE 62011-970

³ Aluna de doutorado do Departamento de Zootecnia/UFV- Campus Universitário, Viçosa-MG 36570-000

⁴ Professor do DZO/UFV

⁵ Professor visitante do DZO/UFV

⁶ Bolsista de Iniciação Científica CNPq

RESUMO - Os erros de paternidade prejudicam a seleção e os ganhos genéticos obtidos nos rebanhos. O objetivo do trabalho foi estudar a verificação de paternidade em rebanhos utilizando-se inferência estatística da razão de verossimilhança. Foram genotipados onze *loci* de microssatélites em 292 caprinos das raças leiteiras Alpina e Saanen e da raça naturalizada Moxotó. As análises foram realizadas no programa CERVUS v 2.0 (Marshall et al., 1998). Se fosse adotado o método de exclusão (PE=0,9996), cerca de 60% dos casos de paternidade seriam resolvidos. Pela inferência estatística do CERVUS, solucionou-se 76% dos casos de paternidade. Desta forma, a metodologia pode ajudar as verificações de paternidade em larga escala, diminuindo o custo para sanar erros laboratoriais e perdas parciais de genotipagem. Considerando erros de paternidade aqueles com mais de três incompatibilidades de genótipo, a taxa de erro foi de 10%.

PALAVRAS-CHAVE: CERVUS, erro de paternidade, poder de exclusão, confiança estatística

PATERNITY VERIFICATION IN GOAT'S HERDS: STATISTICAL INFERENCE USING THE LIKELIHOOD RATIO

ABSTRACT – The paternity misidentification damage the selection and the genetic gain of herds. The objective of the work was to study the verification of paternity in herds using the method of statistical inference likelihood-based. Using eleven microsatellite loci, 292 goats were genotyped from the milking breeds Alpine and Saanen, and the naturalized breed Moxotó. The analyses were done in computational programs CERVUS v 2.0 (Marshall et al., 1998). If adopted the exclusion (PE=.9996), around 60% of paternity would be marked. The test of statistical inference classified 76% of the cases of paternity. In this context, the inference method can help the paternity verifications in large scale, decreasing the cost to solve the laboratory mistakes and partial losses of genotyping. Considering mistakes of paternity those with more than three genotype incompatibilities, the error rate was 10%.

KEYWORDS: CERVUS, exclusion, misidentification, statistical confidence

INTRODUÇÃO

Todas as metodologias existentes para avaliação genética são baseadas em informações de parentesco, e portanto, subordinadas a registros confiáveis de paternidade. A importância dos testes de paternidade para o melhoramento genético pode ser ilustrada nas perdas da acurácia de seleção e na redução do ganho genético originados de identificações errôneas na genealogia (Carneiro et al., 1999).

Os métodos para análise de paternidade em populações naturais, ou onde os dados são levantados em larga escala, podem diferir do enfoque utilizado nos laboratórios comerciais, onde apenas a confirmação de compatibilidade do genótipo do trio suposto pai-mãe-progênie é o objetivo, sendo conhecido como método de exclusão (Jamielson e Taylor, 1997). O método de exclusão não leva em consideração os erros de tipagem ou mutações nos alelos, que levam a incompatibilidades de genótipo pai-progênie. Outro problema parece surgir quando mais de um pai candidato não é excluído pelo teste, sendo necessário indicar paternidade (Slate et al., 2000).

A razão de verossimilhança representa a probabilidade de o pai candidato transmitir aqueles alelos à progênie, do que outro pai ao acaso. Para pares específicos mãe-filho, o alelo paterno obrigatório pode ser freqüente, enquanto em outras situações ele pode ser raro. Assim, a ausência de

exclusão na última situação será mais significativa que na primeira. Isto pode ser quantificado pela razão de verossimilhança entre paternidade e não-paternidade, e fornece uma maneira de quantificar a evidência encontrada em favor da paternidade biológica do possível pai.

A aplicação do método da razão de verossimilhança em populações naturais no programa CERVUS (Marshall et al., 1998) trouxe inferência estatística ao teste de paternidade. O termo LOD score definido por Meagher (1986) refere-se ao produto de razão de verossimilhança de vários *loci* marcadores tomados simultaneamente e ao logaritmo natural do valor obtido. Geralmente este valor é positivo se o pai alegado é mais provável de ser o pai verdadeiro, do que outro indivíduo tomado ao acaso na população.

Este trabalho estudou um sistema de microssatélites e sua utilização para a verificação de paternidade, comparando o método de exclusão (Jamielson e Taylor, 1997) e o método de inferência estatística da razão de verossimilhança (Marshall et al., 1998).

MATERIAL E MÉTODOS

Do rebanho da Universidade Federal de Viçosa (UFV), foram amostrados 121 animais da raça Alpina e 94 da raça Saanen; de um rebanho particular situado em Florestal, Minas Gerais, foram amostrados 36 animais da raça Alpina e 19 da raça Saanen; e do rebanho de preservação da Embrapa Caprinos, Ceará, foram amostrados 22 animais da raça naturalizada Moxotó, totalizando 292 caprinos. Os animais possuem registro de paternidade conhecido e alguns possuíam mãe conhecida no rebanho. As amostras foram distribuídas dentro das famílias dos reprodutores existentes dentro de cada rebanho, de forma a conseguir um grupo de progênie de cada reprodutor.

O sangue para extração de material genético das amostras foi colhido 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 das células brancas, através do protocolo do fenol:clorofórmio.

Os *loci* inicialmente testados foram BETACAP, INRA005, ILSTS087, INRA006, INRA063 e INRABERN172 (em colaboração com o LABOGENA, INRA); foram adicionados os *loci* ILSTS005, ILSTS011, SRCRSP05, OARFCB48 e BM3205 (Vaiman et al., 1996) para aumentar a confiabilidade do painel. As amplificações por PCR e eletroforese foram procedidas no LABTEC/DZO da UFV. Os fragmentos amplificados foram analisados em eletroforese capilar a 9 V, 60 °C, por 22 minutos e analisados no *Genetic Analyzer* ABI 310, da *Applied Biosystem*TM, utilizando o *software* Genescan®.

A probabilidade de exclusão foi calculada segundo Jamieson e Taylor (1997) para os casos em que são conhecidos os genótipos do suposto pai, da mãe confirmada e da progênie (PE1); e quando apenas os genótipos pai-progênie são conhecidos (PE2).

O valor crítico de delta foi obtido por simulação (50.000 rodadas), usando as freqüências alélicas observadas dos *loci* tipados, com e sem informação do genótipo materno. O delta é definido como a diferença entre LOD score do pai mais-provável com o próximo mais-provável (LOD1-LOD2), para todos os pais candidatos com LOD positivo. Assim, o delta crítico com 80% de confiança é aquele valor de delta que permite, na simulação, que 80% dos pais candidatos com delta acima daquele valor sejam pais verdadeiros.

Os parâmetros estabelecidos pelo estudo para o cálculo de simulação de delta foram 10% para erro de tipagem e 95% para a proporção de *loci* tipados. Foram considerados sete machos candidatos por rebanho/raça. Não foram considerados os possíveis parentescos existentes entre os pais candidatos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A probabilidade de exclusão combinada obtida foi de 0,99959 e 0,98837, considerando conhecidos um ou nenhum dos progenitores (PE1 e PE2), respectivamente. O poder de exclusão do painel apresentado foi similar ao proposto por Luikart et al. (1999) para a raça Saanen.

No pedigree disponível, observou-se 27 genótipos paternos registrados não compatíveis com o genótipo do filho, em pelo menos três dos *loci* analisados, sendo considerados para o estudo como erros de paternidade. Os erros de registro de paternidade ocorreram a uma taxa de 10,4% na Alpina-UFV, 13,5% na Saanen-UFV, 10% na Moxotó e 3,9% no rebanho particular como todo. De acordo com as normas internacionais para testes de paternidade, não se recomenda que a exclusão do pai alegado seja baseada em um *locus* individualmente. A taxa de erro de paternidade observada (cerca de 10%) está próxima a encontrada em países europeus para bovinos (Ron et al., 1996). No Brasil, Rosa et al. (1997) obtiveram taxa de erro de aproximadamente 15% em bovinos Nelore e Curi e Lopes (2002) obtiveram 27% de erro em famílias de bovinos da raça Gir.

Foram efetuados testes de verificação de paternidade para 276 progênies, sendo 43 com informação do genótipo materno. O programa CERVUS conseguiu solucionar 41 (95%) das paternidades com 80% de confiança quando o genótipo da mãe foi informado e 169 (73%) dos casos, quando não foi informado o genótipo materno, totalizando 210 casos solucionados (76%). Entende-se por casos solucionados aqueles que o delta obtido pelo pai mais-provável foi maior do que o delta crítico dado pela simulação.

Os erros de registro de pedigree detectados pelo método de exclusão foram detectados também pelo método de inferência. Neste último, além de excluir o pai falso, um pai candidato da população é apontado como o mais provável para a progênie. Vê-se na Tabela 1 que, com base na exclusão de paternidade, apenas 160 progênies teriam pai assinalado, ou seja, sem nenhuma incompatibilidade de genótipo (~60%). Nos 50 casos restantes, ou o pai candidato seria falso-excluído, ou então teria de confirmar sua genotipagem no laboratório. Dado ao alto preço das análises, tal fato poderia inviabilizar levantamentos em larga escala no Brasil. O método de inferência é mais robusto a erros de tipagem (Marshall et al., 1998; Slate et al., 2000) e facilita a genotipagem em larga escala, como por exemplo, de um rebanho inteiro.

A taxa de erro laboratorial encontrada foi alta, provavelmente em decorrência do grande volume de amostras processadas e do caráter de treinamento de pessoal na rotina das análises. Porém, poucas mães foram genotipadas e ocorreram seis erros de registro de maternidade. A taxa de erro admitida por Marshall et al. (1998) foi de cerca de 1%. A frequência de mutação e a ocorrência de alelos nulos ou não-amplificados podem também comprometer o taxa de erro.

CONCLUSÕES

O uso da metodologia proposta por Marshall et al. (1998) de inferência estatística por meio da razão de verossimilhança pode ser aplicado quando a genotipagem é feita em larga escala (rebanho), reduzindo o custo com repetições de genotipagem. O conhecimento do genótipo materno aumenta muito a acurácia do teste, devendo-se sempre que possível proceder a genotipagem materna.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARNEIRO, P.L.S.; EUCLYDES, R.F.; SILVA, M.A., et al. Efeito de erros de pedigree na seleção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, p.269-274, 1999.
- CURI, R.A.; LOPES, C.R. Evaluation of nine microsatellite loci and misidentification paternity frequency in a population of Gyr breed bovine. **Brazil. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.39, p.129-135, 2002.
- JAMIELSON, A; TAYLOR, ST. C.S. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. **Animal Genetics**, v. 28, p.397-400, 1997.
- LUIKART, G.; BIJU-DUVAL, M-P.; ERTUGRUL, O; ZAGDSUREN, Y.; MAUDET, C.; TABERLET, P. Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). **Animal Genetics**, v. 30, p.431-438, 1999.
- MEAGHER, T.R. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of most-likely male parent. **The American Naturalist**, v. 128, p. 199-215, 1986.
- MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUIK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p.639-655, 1998.
- ROSA, A.J.M.; PACKER, I.U.; REGITANO, L.C.A. Caracterização da raça Nelore e teste de paternidade por marcadores moleculares. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34, 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora :Embrapa, 1997. v.3, p.62-64.
- RON, M.; BLANC, Y.; BAND, M.; EZRA, E.; WELLER, J.I. Misidentification rate in Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 676-681, 1996.
- SLATE, J.; MARSHALL, T.; PEMBERTON, J. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 801-808, 2000.



V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal

VAIMAN, D.; SCHIBLER, L.; BOURGEOIS, F.; OUSTRY, A.; AMIGUES, Y.; CRIBIU, E.P. A genetic linkage map of the male goat genome. **Genetics**, v. 144, p.279-305, 1996.



TABELA 1. Número de incompatibilidades de genótipo pai candidato-progênie, nos casos solucionados e não-solucionados pelo programa CERVUS em caprinos.

Nº de incompatibilidade	Casos solucionados	Casos não-solucionados
0	160	21
1	36	11
2	14	10
3	-	15
>4	-	9