



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE PAINÉIS DE SNPs PARA TESTES DE  
PATERNIDADE EM OVINOS**

**CAROLINA CELSO MELO PINHEIRO DE VASCONCELOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF**  
**JUNHO DE 2012**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE PAINÉIS DE SNPs PARA TESTES DE  
PATERNIDADE EM OVINOS**

**ALUNA: Carolina Celso Melo Pinheiro de Vasconcelos**

**ORIENTADOR: Samuel Rezende Paiva**

**CO-ORIENTADOR: Alexandre Rodrigues Caetano**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 74/2012**

**BRASÍLIA/DF**  
**JUNHO DE 2012**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

**VASCONCELOS, C. C. M. P. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE PAINÉIS DE SNPs PARA TESTES DE PATERNIDADE EM OVINOS.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 58. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

VASCONCELOS, Carolina Celso Melo Pinheiro de. **Desenvolvimento e validação de painéis de SNPs para testes de paternidade em ovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 58. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012.

1. Marcadores moleculares. 2. Pedigree. 3. Crioula Lanada. 4. Manejo de Rebanhos.

CDD ou CDU  
Agris / FAO

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE PAINÉIS DE SNPs PARA TESTES DE  
PATERNIDADE EM OVINOS**

**CAROLINA CELSO MELO PINHEIRO DE VASCONCELOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA  
VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**SAMUEL REZENDE PAIVA, DSc (Embrapa)  
e-mail: samuel.paiva@embrapa.br**

---

**CONCEPTA MARGARET McMANUS PIMENTEL, PhD (UFRGS)  
e-mail: concepta.mcmanus@ufrgs.br**

---

**DANIELLE ASSIS DE FARIA, DSc (Embrapa)  
e-mail: danyafp@gmail.com**

**BRASÍLIA/DF, 29 de JUNHO DE 2012**

*Dedicatória...*

*À Teresa Marly Teles de Carvalho Melo  
e Fabio Barros Britto*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, por me dar força e confiança para seguir em frente pois sem ele nada seria possível;

À UnB, por me dar condições de cumprir esta etapa da minha vida profissional e em especial ao programa de Pós-Graduação em Ciências Animais;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por abrir as portas para a realização de meu trabalho e subsidiar minha pesquisa, com bolsa de estudos e espaço físico em seus laboratórios;

Ao Dr. Samuel pela orientação, paciência e por sua ajuda constante, seus ensinamentos e seus incentivos;

À Dra. Connie por me receber inicialmente como sua orientanda;

Ao Dr. Alexandre Caetano, por compartilhar sua experiência profissional e ensinamentos;

Aos meus professores de pós-graduação por ensinar não só disciplinas, mas por seus conselhos que me auxiliaram profissionalmente;

À Embrapa Pecuária Sul, nas pessoas dos pesquisadores Carlos José Hoff de Souza e José Carlos Ferrugem Moraes por fornecer parte do material genético que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa;

Ao Dr. Alexandre Floriani Ramos por fornecer amostras biológicas do BBGA, fundamentais para a realização de meu estudo;

À Dra. Danielle Assis de Faria, por sua paciência e atenção com os dados finais de meu trabalho e ajuda com as genotipagens;

À Dra. Patricia Ianella, por me receber de braços abertos quando cheguei;

À MSc. e doutoranda Thaísa por toda a atenção, ajuda, apoio e ensinamento na manipulação dos SNPs na BeadXpress;

Aos MSc. e doutorandos Elizabete e Ronyere, amigos conquistados, pelo apoio, ensinamentos, atenção, acompanhamento em genotipagens, manhãs rodando programas, sábados de trabalho na embrapa, força, companheirismo, desabafos e descontração, pelos muitos momentos que ri com vocês;

Aos colegas de laboratório e aos colegas de pós graduação pela descontração nos intervalos das aulas, no laboratório e apoio nas bancadas;

Ao Marcio da Silva Costa por me mostrar possibilidades, quando se pensa que tudo esta perdido, e mostrar que amigo verdadeiro está presente em todas as horas;

Aos amigos Misa, Luana, Joasy, Francisca, Gledson, Bruno, Ocimara, Raphael, Sergio, Alex, Hélio, Ellida, Jackelliny, Iassudara, Aecio entre outros por pela amizade, apoio e por não desistirem de mim mesmo estando distante;

Ao meu Marido Fabio e à minha filha Sophia, pelo companheirismo, paciência, compreensão em horas exaustivas de trabalho e noites perdidas e descontração em momentos de desespero;

À minha mãe Teresa Marly pelas vezes me mostrar querer até mais do que eu e que tudo é possível com garra e perseverança ao meu irmão Joao Victor pelos dias alegres e a minhas irmãs Gabriela, Juliana e Isadora pela companhia, amizade e desejos sinceros de retorno para casa, meu padrasto Ildemar, minha tia Carminha minha segunda mãe e a todos os meus familiares pelo apoio;

À minha avó Maria Dolores por me mostrar que nunca é tarde para buscar e alcançar seus objetivos.

Muito obrigada a todos!

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	2
<b>1.1. OBJETIVOS</b> .....	4
1.1.1. <i>Objetivo Geral</i> .....	4
1.1.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	4
<b>1.2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
1.2.1. <i>Origem e principais características das raças brasileiras</i> .....	5
1.2.2. <i>Conservação dos recursos genéticos ovinos no cenário nacional</i> .....	7
1.2.3. <i>Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos ovinos</i> .....	8
1.2.4. <i>Determinação de paternidade no melhoramento genético animal</i> .....	11
1.2.5. <i>Tecnologias para a genotipagem de SNPs</i> .....	12
<b>1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	16
<b>CAPÍTULO II</b> .....	21
<b>2.1. RESUMO</b> .....	22
<b>2.2. ABSTRACT</b> .....	23
<b>2.3. INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2.4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
2.4.1. <i>Material Biológico</i> .....	26
2.4.2. <i>Extração de DNA</i> .....	26
2.4.3. <i>Identificação/seleção inicial dos SNPs</i> .....	26
2.4.4. <i>Genotipagem</i> .....	27
2.4.5. <i>Análises dos Dados e Composição do Painel de SNPs</i> .....	27
<b>2.5. Resultados e Discussão</b> .....	29
2.5.1. <i>Resultados</i> .....	29
2.5.1.1. <i>Avaliação locos genotipados para montagem do painel</i> .....	29
2.5.1.2. <i>Análise de Paternidade</i> .....	40
2.5.2. <i>Discussão</i> .....	50
<b>2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	53
<b>CAPÍTULO III</b> .....	55
<b>4.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	56

## RESUMO

### DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE PAINÉIS DE SNPs PARA TESTES DE PATERNIDADE EM OVINOS

Carolina Celso Melo Pinheiro de Vasconcelos<sup>1</sup>  
Samuel Rezende Paiva<sup>2</sup>

1 – Mestranda da UnB, Brasília – DF

2 – Pesquisador da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF

A conservação dos recursos genéticos locais de ovinos é estratégica para contribuir na segurança alimentar da população de um país, seja na forma do fornecimento de produtos especializados com indicações de origem e/ou procedência geográfica seja na contribuição de combinações alélicas alternativas que poderão auxiliar programas de melhoramento e produção desenvolvidos para grupos genéticos especializados. Para isto, as informações sobre a genealogia dos rebanhos são críticas para se explorar o melhor potencial de cada raça e evitar problemas como aumento da endogamia e a erosão genética. Porém, como nem sempre essas informações estão disponíveis em parte do rebanho nacional, as ferramentas baseadas em marcadores moleculares podem ter papel fundamental para gerenciar programas de melhoramento ou conservação onde os registros genealógicos são escassos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e testar um conjunto de marcadores de Base Única (*Single Nucleotide Polymorphism* – SNPs) para realizar testes de paternidade em ovelhas. Amostras de animais de três raças brasileiras de ovinos localmente adaptadas foram genotipadas com o chip contendo aproximadamente 50.000 marcadores SNP (SheepSNP50 Bead Chip, Illumina Inc., San Diego, CA) e, deste banco de dados, um painel de baixa densidade contendo 123 SNPs foi selecionado. Deste painel, 71 SNPs foram validados em uma amostra composta por 71 animais do Núcleo de Conservação da raça Crioula da Embrapa Pecuária Sul. Foi observado que 53 SNPs tiveram sucesso nas genotipagens e demonstraram níveis significativos de polimorfismo de forma que as probabilidades de exclusão combinadas obtidas apresentaram valores entre 88,8% a 99,9%. A partir do conjunto de SNPs genotipados, quatro sub-painéis foram definidos e testados e o sucesso na atribuição de paternidade, de acordo com informações de genealogia dos animais, variou entre 76 - 79%. Apesar do claro potencial dos marcadores selecionados, notou-se a necessidade de se aumentar o número de marcadores deste painel para elevar o poder de resolução nas análises.

**Palavras-chave:** *Ovis aries*, manejo de rebanhos, recursos genéticos animais, marcadores moleculares, genética da conservação.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF LOW DENSITY SNP PANEL FOR PARENTAGE IN BRAZILIAN SHEEP

The conservation of local sheep genetic resources is strategic to ensure food security through the offer of specialized products with geographic indication or certificate of origin as well as maintenance of alternatives for allelic combinations in relation to specialized genetic groups. Thus, information about the genealogy of the flocks is critical to exploit the potential of each breed and avoid problems such as inbreeding and genetic erosion. However, as the genealogical records are not always available, tools based on molecular markers can play a fundamental role in management of breeding programs. The objective of this study was to test a set of SNP markers (Single Nucleotide Polymorphism) to conduct paternity tests on sheep. Samples from three locally adapted Brazilian sheep breeds were genotyped with a chip containing approximately 50,000 SNP markers (SheepSNP50 Bead Chip, Illumina Inc., San Diego, CA) and from this data bank a low density panel containing 123 SNPs was selected. Of these, 71 were validated on 71 Crioula sheep from the Conservation Nucleus, and 53 were successfully genotyped and showed significant levels of polymorphism. The combined probability of exclusion obtained showed values between 88.8% and 99.9% for paternity exclusion. From the set of SNPs genotyped, four sub-panels were defined based on analyzes of linkage disequilibrium (LD) and deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. According to genealogy information, the success in paternity assignments by SNP ranged between 76 and 79% according to the panel used. Despite the potential, there was noted the need for increasing the number of selected markers, thus elevating the power of the analysis.

Keywords: *Ovis aries*, livestock management, genetic diversity, animal genetic resources, molecular markers, conservation genetics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Etapa de hibridização de oligonucleotídeos alelo-específicos (ASO1 e ASO2) e loco-específico (LSO) ao DNA contendo o SNP com base T (timina). Todos os oligonucleotídeos contém sequências de primers universais em suas extremidades (ASO1 – P1 laranja; ASO2 – P2 amarelo; LSO – P3 verde) utilizados em amplificações realizadas em etapas futuras. Além disto, LSO contém também uma sequência alvo (em azul) para posterior ligação com microesferas VeraCode e leitura em BeadXpress. Note que apenas ASO1 se anela perfeitamente ao loco do SNP. (fonte: Technical Note: Illumina® SNP Genotyping, <http://www.illumina.com>)..... 14

**Figura 2.** Fragmento amplificado com primer P1, marcado com fluorescência vermelha (específica do alelo ASO1), e P3. Os produtos desta PCR serão posteriormente ligados às microesferas pela sequência alvo (azul), para leitura em BeadXpress. (fonte: Technical Note: Illumina® SNP Genotyping, <http://www.illumina.com>). ..... 15

### CAPÍTULO II

**Figura 1.** Quantidade mínima de marcadores para atribuir a paternidade em casos onde é possível obter o genótipo da mãe (P1 → 99% com 31 marcadores) e quando se conhece somente o genótipo do provável pai e da progênie (P2 → 98% com todos os 46 marcadores). ..... 45

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Triagem de 123 marcadores selecionados a partir de três raças brasileiras (Crioula, Morada Nova e Santa Inês) genotipadas com 50.000 SNPs (<http://www.sheephapmap.org>). Foram considerados valores de MAF (Minor Allele Frequency)  $> 0,4$  e desvios no Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) significativos ( $P < 0,01$ ) nas três raças. .... 30

**Tabela 2.** Segunda triagem, realizada a partir de 71 marcadores selecionados de acordo com os critérios estabelecidos na Tabela 1. Foram considerados três painéis de acordo com o número de locos ligados nas estimativas de desequilíbrio de ligação (DL): marcadores com até 9 locos ligados (~12,5% de locos ligados/loco), 7 locos ligados (~10%) e 5 locos ligados (~7,5%). .....36

**Tabela 3.** Terceira triagem, realizada a partir de 63 marcadores selecionados de acordo com os critérios estabelecidos na Tabela 2. Foram considerados três painéis de acordo com o número de locos ligados nas estimativas de desequilíbrio de ligação (DL = 12,5, 10 e 7,5%) e com o sucesso das genotipagens acima de 90% para cada loco..... 38

**Tabela 4.** Estimativas de diversidade independentes para 46 locos selecionados para os testes de paternidade para todo o conjunto de animais testados ( $n=71$ ). (A, número de alelos observado; HObs, heterozigosidade observada; HExp, heterozigosidade esperada; PIC, conteúdo de informação polimórfica; NE-1P, probabilidade média de não-exclusão para um pai candidato; NE-2P, probabilidade média de não-exclusão para um pai candidato dado o genótipo de um pai conhecido do sexo oposto; NE-I, probabilidade média de não-exclusão para a identidade de dois indivíduos não relacionados; NE-SI, probabilidade média de não-exclusão para a identidade de dois irmãos; significância para o desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg: \*significante ao nível de 0.05; \*\*significante ao nível de 0.01; \*\*\*significante ao nível de 0.001%; NR, não realizado; F(null) probabilidade de ocorrência de alelos nulos).....42

**Tabela 5.** Estimativas de probabilidades combinadas para quatro painéis de SNPs. (P1 – Probabilidade de Exclusão para apenas um progenitor; P2 – Probabilidade de exclusão sendo dado o genótipo de um dos progenitores; PI – probabilidade de identidade; DL – desequilíbrio de ligação; HWE – desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg). Foi ainda calculada a taxa esperada de insucesso (IS) nas atribuições de paternidade dos dados fornecidos, realizada nas simulações de uma prole com  $N = 100$  mil indivíduos.....45

**Tabela 6.** Teste de paternidade para identificação dos pais candidatos mais prováveis para a prole de animais nascidos em 2010 (total de 62 produtos) utilizando quatro diferentes painéis: A: 46 marcadores definidos após exclusão de

locos com desequilíbrio de ligação (DL) > 12,5%; B: 36 marcadores definidos após exclusão de locos com DL > 10%; C: 24 marcadores definidos após exclusão de locos com DL > 7,5%; D: 27 marcadores definidos após exclusão de locos com desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg. (N.E. – pais não encontrados; \* identificação com nível de confiança acima de 95%; + identificação com nível de confiança acima de 85%)..... 46

# **CAPÍTULO I**

## 1. INTRODUÇÃO

Diversas raças de animais domésticos criadas no Brasil foram trazidas no período do descobrimento, há aproximadamente 500 anos. Gradualmente, estas raças se adaptaram às condições locais e, hoje, elas são comumente denominadas de crioulas, localmente adaptadas ou naturalizadas (MARIANTE *et al.*, 2003). Devido às características adaptativas alcançadas por estes animais, eles podem ser considerados como um estoque genético diferenciado, possuindo genótipos com potencial para desenvolvimento de programas de melhoramento participativos ou mesmo industriais. No entanto, parte destes grupos genéticos encontram-se ameaçados de extinção em razão de cruzamentos absorventes com animais de raças exóticas especializadas, que passaram a ser importados no final do século XIX e início do século XX (MORAIS, 2001). Este processo tem levado animais como ovinos a uma rápida erosão genética, aumentando a vulnerabilidade dos mesmos às adversidades ambientais (SCHERF, 2000).

Observa-se, portanto, a importância dos estudos sobre conservação, que podem trazer informações sobre os padrões genéticos dos ovinos naturalizados bem como orientar programas de cruzamento e de melhoramento. Um dos principais desafios para a conservação dos recursos genéticos é conhecer, entender e manter toda diversidade genética distribuída pelo mundo (SILVA, 2010). Em diversas situações a manutenção da diversidade é dependente de informações confiáveis sobre a genealogia dos rebanhos, para guiar programas de melhoramento genético e evitar processos indesejados como o aumento da endogamia e a fixação de alelos deletérios (LUIKART *et al.*, 1999). No entanto, nem sempre estas informações estão disponíveis nos principais locais de criação de ovinos no Brasil. Para contornar esta condição, os marcadores moleculares baseados no DNA vêm sendo cada vez mais usados em estudos com ovinos (p. ex., PAIVA, 2005; McManus *et al.*, 2010). Além das informações sobre a genealogia, com este tipo de ferramenta é possível ter acesso a dados sobre evolução, filogenia, filogeografia e análise da estrutura e dinâmica populacionais (AVISE, 1994). Diferente dos marcadores morfológicos, os marcadores de moleculares permitem o acesso direto à informação genética na molécula de DNA, não sendo afetados por variações ambientais (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998).

Atualmente, despontam neste cenário os Marcadores de Base Única, mais conhecidos como SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) que podem ser utilizados como uma poderosa ferramenta de análise (SCHLÖTTERER, 2004). A grande vantagem desse tipo de marcador molecular é a possibilidade de automação da genotipagem de milhares de locos

em paralelo, além do fato de serem co-dominantes e apresentarem herança Mendeliana (LEE *et al.*, 2006). Dentre as várias consequências diretas desta tecnologia destaca-se o desenvolvimento de mapas genéticos de alta densidade saturados com marcadores moleculares bem como a possibilidade de efetiva implantação da seleção genômica nos programas de melhoramento.

Para os ovinos, o *International Sheep Genomics Consortium* (<http://www.sheephapmap.org>) teve atuação fundamental no desenvolvimento destas ferramentas genéticas. Este se iniciou em 2002 e contou com a participação de 20 países, incluindo o Brasil (DALRYMPLE *et al.*, 2007). Sua ação levou a criação de um painel de marcadores de alta densidade e ampla cobertura do genoma da espécie. Assim, informações de frequências alélicas em diferentes raças de ovinos podem ser obtidas utilizando para isso dezenas de milhares de marcadores SNP já identificados. Esta ação possibilita a instalação de protocolos de rastreabilidade, certificação, exclusão de paternidade, seleção de doadores de germoplasma bem como caracterizar sêmen depositado em Bancos de germoplasma em raças de ovinos utilizados na pecuária brasileira. O desenvolvimento e validação dessas tecnologias tem como objetivo potencializar a cadeia produtiva ovina bem como programas de conservação *ex situ*, provendo ferramentas de última geração, nos moldes do que está sendo desenvolvido e aplicado nos centros mundiais de produção e consumo de produtos de origem animal. Até o momento a seleção dos animais que compõe estes bancos no Brasil e, em muitos países, é realizada por meio de critérios tradicionais tais como a avaliação de características produtivas, reprodutivas e sanitárias (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

O impacto do desenvolvimento e validação de marcadores moleculares auxiliarão as associações de criadores e órgãos legislativos relacionados, como a Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Estes terão à disposição, informações que poderão ser úteis na formulação de políticas para avanço da ovinocultura no país. As soluções geradas poderão trazer, em futuro próximo, não apenas avanços para organização da cadeia produtiva de ovinos, mas também proporcionarão soluções para antever e contornar restrições não tarifárias sofridas pelos nossos produtos de origem animal nos mercados internacionais.

## **1.1. OBJETIVOS**

### *1.1.1. Objetivo Geral*

- Avaliar o potencial de marcadores SNPs no teste de exclusão de paternidade em ovinos no Brasil

### *1.1.2. Objetivos Específicos*

- Desenvolver um painel de marcadores de polimorfismo de base única (SNP) para exclusão de paternidade em ovinos no Brasil;
- Validar o painel desenvolvido utilizando animais do Núcleo de Conservação da Ovelha Crioula no Sul do Brasil

## 1.2. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.2.1. Origem e principais características das raças brasileiras

Evidências arqueozoológicas sugerem que os ovinos atuais foram primeiramente domesticados a partir de animais selvagens que viveram há cerca de 8.000 a 9.000 anos (LEGGE, 1996). Em seguida, as necessidades humanas levaram à geração de animais cada vez mais especializados na produção de lã, leite e/ou carne. Desde então os ovinos tem estabelecido uma ampla distribuição geográfica devido sua alta adaptabilidade à dietas pobres em nutrientes e sua tolerância à condições climáticas extremas, sendo hoje descritos mais de 1400 fenótipos distintos organizados em diferentes raças distribuídas ao longo do mundo (SCHERF, 2000).

As raças brasileiras de ovinos podem ser primeiramente divididas em raças produtoras de lã (Crioula Lanada e Bergamácia Brasileira) ou deslanadas (Santa Inês, Morada Nova, Somalis, Rabo Largo, Barriga Preta, Cariri), sendo as últimas conhecidas por produzirem as melhores peles entre os ruminantes (juntamente com caprinos) e terem alta demanda no mercado de roupas (JACINTO *et al.*, 2004).

Apesar da rusticidade ser um fator comum à maioria das raças naturalizadas no Brasil, outras características definem cada uma delas. A raça Crioula Lanada, cuja provável origem se deu a partir da raça espanhola Churra, foi introduzida no Rio Grande do Sul durante o século XVII. Possui a cara e as extremidades descobertas de lã e coloração variando de branco ao preto, podendo apresentar tonalidades de marrom. Seu porte é médio, quando comparado a outras raças naturalizadas, e são conhecidas pela precocidade, fertilidade e resitência a endoparasitas. São utilizadas para produção de lã destinada ao artesanato e tapeçaria industrial (MARIANTE *et al.*, 2003).

A raça Bergamácia Brasileira é originária do norte da Itália, foi inicialmente introduzida no Brasil no início do século XX. Os animais apresentam pelagem branca e são de grande porte. Os machos adultos apresentam peso variando entre 100 a 120 Kg e fêmeas entre 70 a 80 Kg. É considerada mista, pois, além da lã, produz carne e leite. Porém, sua lã é destinada principalmente para a fabricação de tecidos grosseiros (ARCO, 2012).

Entre as raças deslanadas, a Morada Nova teve origem incerta. Relatos indicam que sua provável origem ocorreu por meio de animais da raça Bordaleiro, de Portugal, que teriam capacidade de gerar tanto animais lanados, quanto deslanados. Porém, devido às pressões da seleção natural impostas pelo ambiente árido do Nordeste brasileiro, estes animais

foram perdendo a característica lanada. Apresentam coloração vermelha, branca ou creme e são considerados pequeno porte, com o peso adulto atingindo os 60 Kg nos machos e 50 Kg nas fêmeas. Apesar disto, são considerados como importante fonte de proteína nas regiões de clima adverso (ARCO, 2012).

A raça Somalis teve sua origem nas regiões da Somália e Etiópia, pertencente ao grupo dos ovinos de *garupa gorda*, pela deposição de gordura na inserção caudal. Porém, há evidências de que estes tenham sofrido a infusão de genes de raças sem esta característica pela pequena deposição de gordura, quando comparado ao seu ancestral mais primitivo, o Urial. Tem coloração característica branca com pescoço negro, apresentam porte médio e são destinados, principalmente à produção de carne e pele (ARCO, 2012).

A raça Santa Inês é considerada de grande porte, com animais adultos machos podendo alcançar 120 Kg, e fêmeas, 90 Kg. São originários do nordeste do Brasil, como resultado do cruzamento entre as raças Bergamacia, Morada Nova, Somalis e outros ovinos sem raça definida. Algumas características particulares confirmam esta hipótese como a presença de vestígios de lã (oriundos da Bergamácia), condições de pelagem típicas da Morada Nova e acúmulo de gordura na região da implantação caudal (Morada Nova), principalmente em animais de grande peso. Sua coloração pode ser preta, avermelhada ou branca, com diversas tonalidades intermediárias. Apresentam excelente qualidade de carne e baixo teor de gordura, pele de altíssima qualidade e adaptável a qualquer sistema de criação e pastagem (ARCO, 2012). Segundo dados de Mariante, *et al.* (2003), sua expansão se deu principalmente devido ao seu porte superior ao apresentado pela raça Morada Nova.

A raça Rabo Largo é provavelmente constituída por ovelhas de origem do Sul-Africana cruzadas com animais da raça Crioula (MARIANTE *et al.*, 2003). Tem como principal característica a cauda com base larga, devido ao acúmulo de gordura, a qual serve como reserva de energia para períodos de escasses de alimento. Além disto os animais apresentam chifres bem desenvolvidos. São de médio porte e possuem pelagem variando de branco a vermelho. Apresentam aptidão para produção de carne e pele, sendo considerados férteis mesmo em condições adversas. Seu porte é médio e seu corpo é longo e medianamente profundo (ACCOMIG, 2007).

Já a raça Cariri, assim como Santa Inês, originou-se no Nordeste brasileiro. Ocorre principalmente na região semi-árida dos Cariris Paraibanos. Relatos de criadores informam que esta se originou com o cruzamento entre animais Santa Inês, Morada Nova e Black-Belle (provenientes de Barbados). São caracterizados pela presença de uma mutação dominante que garante uma pelagem definida de coloração. O padrão apresenta-se preto com

ventre e parte interna dos membros brancos ou castanha clara. Machos cruzados com ovinos de qualquer outra raça transmitem estas características de forma consistente (ARCO, 2012).

### **1.2.2. Conservação dos recursos genéticos ovinos no cenário nacional**

Nos últimos anos o aumento populacional e a demanda por alimentos levou a uma alteração nas práticas agrícolas que passou a considerar como seu principal foco a produção (TABERLET *et al.*, 2007). Este processo levou à padronização dos produtos e dos sistemas de produção, aumentando a produtividade. Em contrapartida, o mesmo levou a perda de variedades tradicionais e aumentou a vulnerabilidade de diversos animais frente a mudanças climáticas, epidemias e doenças (ESQUINAS-ALCÁZAR, 2005). Atualmente a uniformização dos alimentos e das variedades tradicionais tem sido combatida em programas de conservação (LOTTI, 2010).

Os programas de conservação priorizam raças ameaçadas ou aquelas onde o nível de informação tecno-científica ainda é baixo. Deve-se ainda ressaltar que o termo “recurso genético” leva em consideração toda informação genética de origem animal e vegetal com potencial para uso em alimentação (FAO, 2007). Um dos principais desafios é entender e conhecer como toda a diversidade está distribuída e organizada pelo mundo. Porém, a escassez de estudos pode, muitas vezes, levar a falsas interpretações sobre a diversidade genética de determinadas localidades. Segundo a FAO, baixos níveis de biodiversidade animal doméstica são relatados na região Ibero-Americana. Porém, embora nem todas as raças brasileiras sejam contempladas em projetos de conservação, estima-se que 65% das raças criadas no Brasil já tiveram alguma característica de interesse estudada (MARIANTE *et al.*, 2003). Isto faz com que o Brasil se destaque quando comparado a outros países da América Latina.

Mesmo nestas condições, de todas as raças de ovinos existentes no Brasil, apenas 11 apresentam crescimento populacional efetivo em seus rebanhos (McMANUS *et al.*, 2007), mostrando que ainda há déficits de informação em alguns locais. Como exemplo, variedades de ovinos potencialmente distintas são hoje definidas apenas como “Crioulas” (DELGADO *et al.*, 2005). Este fator, juntamente com as diferenças geográficas, preferências reprodutivas e a seleção natural, podem dar origem a distintos ecótipos raciais ainda desconhecidos (LANARI *et al.*, 2003). Além disto, estudos genéticos vem demonstrando vulnerabilidades nas definições fenotípicas de algumas raças. Em Santa Inês foram

observadas diferenças significativas entre rebanhos do alto nordeste *versus* rebanhos do baixo nordeste e centro-oeste (PAIVA *et al.*, 2005).

### 1.2.3. Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos ovinos

Além da caracterização morfológica das raças, recentemente vem se destacando a caracterização molecular (PAIVA *et al.*, 2005; EGITO *et al.*, 2009; PAIVA *et al.*, 2011; KIJAS *et al.*, 2012). Assim, marcadores moleculares têm sido utilizados na tentativa de se determinar padrões genéticos específicos de raças ou de seus produtos, aumentando o nível técnico das informações.

Os marcadores moleculares são definidos como toda e qualquer informação molecular, oriunda de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, que segue os padrões Mendelianos de herança (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas para detectar variabilidade genética nas seqüências de DNA, mediante marcadores moleculares. Entre as principais utilizadas para o estudo em ovinos podemos destacar os microssatélites (também conhecidos como STR – *Short Tandem Repeats*) e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms* ou Marcadores de Base Única).

Os locos de microssatélites são altamente polimórficos e foram considerados a principal ferramenta molecular usada em estudos de genética de populações e associação com características quantitativas (SCHLÖTTERER, 2004). Em programas de conservação de ovinos no Brasil, um estudo com microssatélites detectou que 11,76% da variação total ( $p < 0,001$ ) ocorria devido às diferenças inter-raciais (PAIVA *et al.*, 2006). Três diagramas obtidos da diversidade de Nei e Neighbor-joining dividiram as raças em três grandes grupos: raças naturalizadas brasileiras, raças exóticas produtoras de lã e raças africanas recentemente introduzidas. Análises Bayesianas identificaram uma subestrutura significativa na raça Santa Inês e Morada Nova (PAIVA *et al.*, 2005). Estes resultados, juntos com a variabilidade interna das raças mostraram que, embora a Santa Inês possa ser considerada uma única raça, ela apresenta alguns eventos de introgressão no seu passado recente, apresentando, portanto, alta taxa de polimorfismo genético com uma pobre definição fenotípica (por exemplo, presença de múltiplas cores). Este fato pode ter várias causas, como o padrão da raça ser muito amplo, deixando margem para várias interpretações de definição de suas características ou pelo cruzamento entre raças. Assim, estudos associados a marcadores moleculares que incluem as ovelhas Santa Inês devem ser precedidos por testes detalhados de estrutura

genética, de modo que os resultados não sejam confundidos pelos ecótipos. A raça Bergamacia (produtora de lã), por exemplo, apareceu situada dentro do grupo das ovelhas deslanadas, indicando que a mesma pode ter sofrido cruzamentos com outras raças deslanadas no passado (McMANUS *et al.*, 2010).

Os microssatélites são, ainda hoje, o tipo de marcador mais usado para estudos de exclusão de paternidade em várias espécies (inclusive espécie humana), com a padronização de inúmeros painéis para esta finalidade homologados oficialmente, tanto no âmbito nacional para espécies domésticas de produção (MAPA, 2004) bem como internacional ([www.isag.org.uk](http://www.isag.org.uk)).

Entretanto, os microssatélites apresentam algumas características limitantes para estudos de paternidade, origem, estruturação populacional, certificação e rastreabilidade de determinadas raças (ex., ROHRER *et al.*, 2007; EGITO *et al.*, 2007; PAIVA, 2005; HEATON *et al.*, 2005; CANÕN *et al.*, 2001). Avanços tecnológicos recentes criaram condições para um cenário em que outro tipo de marcador molecular, os Polimorfismos de Base Única ou SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), passassem a auxiliar em estudos de diversidade, confirmação de genealogias, certificação e rastreabilidade de produtos de origem animal (veja, HEATON *et al.*, 2005 e NEGRINI *et al.*, 2008).

Os SNPs são as variações mais comuns no genoma, por se tratarem de pequenas mutações pontuais, como transições e transversões. Ocorrem a uma frequência aproximada de um SNP a cada Kilobase e seguem herança mendeliana (WANG *et al.*, 1998). Uma das vantagens dos SNPs quando comparados aos microssatélites é a baixa taxa de mutação em populações (VIGNAL *et al.*, 2002). Uma estimativa da taxa de mutação de um loco de indicou valores de  $10^{-9}$  mutações por sítio geração (SATTA *et al.*, 1993), sendo este valor inferior à taxa apresentada por marcadores microssatélites, que mostraram, em média,  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  mutações por sítio por geração (HEYER, 1993; TAUTZ *et al.*, 1994).

Outro fator que torna os SNPs mais vantajosos entre os marcadores moleculares é seu potencial para automação e padronização da técnica entre laboratórios. Em estudo recente, Kijas *et al.* (2012) avaliaram a diversidade genética de raças de ovinos de todo o mundo. A padronização da técnica de genotipagem dos marcadores moleculares permitiu a realização desse tipo de estudo em larga escala, de forma que dados originados de laboratórios situados em diferentes continentes pudessem ser gerados independentemente e, posteriormente, comparados utilizando os mesmos parâmetros estatísticos. Diversos laboratórios do mundo participaram desta iniciativa, incluindo o Brasil, com atuação direta da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os resultados mostraram a existência de

estruturação genética entre as principais raças de ovinos que corresponde aos eventos históricos ocorridos ao longo do tempo de dispersão das mesmas.

Existem desafios para o emprego efetivo de marcadores moleculares do tipo SNP na caracterização, paternidade, certificação e rastreabilidade de espécies de animais domésticos. Como são considerados bialélicos (ao contrário dos microssatélites que são multialélicos) é necessário um número maior de SNPs para um poder similar de discriminação (VAN EANNEN et al., 2007). Porém esta limitação vem sendo contornada com o aumento de informação sobre as principais espécies de interesse econômico. Utilizando a espécie humana como exemplo, mais de quatro milhões de SNPs foram genotipados durante a segunda fase do projeto HapMap (INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM et al., 2007). Em se tratando de espécies animais, uma ampla gama de SNPs também foram descritos para galinhas (INTERNATIONAL CHICKEN POLYMORPHISM MAP CONSORTIUM, 2004), cães (LINDBLAD-TOH et al., 2005), ratos (FRAZER et al., 2007) e bovinos (VAN TASSELL et al., 2008). Em humanos, estes marcadores tem sido associados a uma série de doenças complexas (VAN TASSELL et al., 2008) e, em animais domésticos, os SNPs tem sido mapeados para rastrear Locus de Características Quantitativas (QTLs) (KARLSSON et al., 2007; CHARLIER et al., 2008; MANOLIO et al., 2008).

O Consórcio Internacional do Genoma Ovino (*International Sheep Genomics Consortium*, ISGC, 2006) validou um painel de 60.000 marcadores SNP em aproximadamente 3.000 animais provenientes de mais de 50 raças de ovinos. Entre essas raças, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia enviou amostras de DNA permitindo assim que raças brasileiras participassem da validação da ferramenta desenvolvida. Tecnologias para genotipagem de marcadores SNP de alta densidade (de dezenas de milhares até 1 milhão de SNPs em um único ensaio), assim como média (centenas) e baixa densidade (dezenas) estão disponíveis. Muitas dessas tecnologias estão disponíveis na forma de serviços ofertados por empresas comerciais. Estas novidades estão revolucionando a capacidade de trabalho e os objetivos almejavéis em projetos de prospecção de genes de interesse econômico.

Assim, os marcadores moleculares podem ser usados na caracterização como uma estratégia de monitorar cruzamentos entre raças nos registros genealógicos. Os cruzamentos entre raças podem reduzir a frequência de importantes características na população e causar a introgressão de características não desejadas (McMANUS et al., 2010). Assim, a seleção de características desejáveis contará com o auxílio das informações obtidas

com o uso de seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM). Neste caso, os melhores marcadores seriam aqueles derivados de mutações casuais, porém, quando os mesmos não estão disponíveis, um haplótipo que está em forte desequilíbrio de ligação poderia ser utilizado (McMANUS *et al.*, 2010). Alguns exemplos já foram citados em ovinos como no caso do marcador Inverdale para identificar padrões de prolificidade em ovelhas (GALLOWAY *et al.*, 2000) e o haplótipo GDF8 para identificar uma variedade de ovelhas com uma musculatura mais desenvolvida (JOHNSON *et al.*, 2005).

#### **1.2.4. Determinação de paternidade no melhoramento genético animal**

Além da caracterização genética das raças, os programas de melhoramento requerem informações acuradas sobre o pedigree para controlar o aumento da endogamia nos rebanhos. Ron *et al.* (1996) estimou aumento de mais de US\$ 2 milhões em 20 anos, apenas aumentando a eficiência das informações de pedigree de raças de bovinos.

Como um exemplo em raças de ovinos, os programas de seleção para o aumento de fertilidade em ovinos são baseados na escolha de machos candidatos com referência na fertilidade de suas mães e, posteriormente, avaliando a fertilidade das suas filhas. Os melhores machos são escolhidos como reprodutores, aumentando o “valor” genético da população. Quando os erros de determinação de paternidade são altos, o sucesso de um projeto de melhoramento pode ser comprometido (ARRUGA *et al.*, 2001).

Neste sentido, os marcadores moleculares podem ser considerados uma ferramenta poderosa nos casos onde as informações genealógicas não estão disponíveis ou podem conter erros principalmente no que diz respeito ao provável pai da prole em questão. As informações de frequências alélicas destes marcadores podem ser utilizadas para a determinação dos possíveis pais de um rebanho por meio das estimativas de exclusão de paternidade. O principal requisito para a utilização dos marcadores em análise de paternidade é a obtenção de um painel com marcadores que tenha poder estatístico suficiente para identificar com acurácia os progenitores dentro de populações onde a informação genealógica é escassa (HEATON *et al.*, 2002). O emprego de ferramentas como essa possibilita a formulação de estratégias de conservação, determinação do número populacional efetivo e, por fim, abre possibilidades para o gerenciamento adequado de cruzamentos (McMANUS *et al.*, 2010).

A estimativa de exclusão de paternidade pode ser definida como a probabilidade de se excluir um indivíduo aleatoriamente como suposto pai frente a outro indivíduo amostrado aleatoriamente na população. Este tipo de análise pode ser definida em casos onde um dos pais é conhecido, ou nos casos onde nenhum dos pais estão confirmado (JAMIESON & TAYLOR, 1997). A probabilidade de identidade também pode ser utilizada e indica a chance de selecionar, aleatoriamente, dois indivíduos idênticos geneticamente (PEATKAU et al., 1998).

Diversos estudos citam a importância dos marcadores moleculares neste sentido. Como exemplo, Arruga *et al.* (2001) utilizaram apenas quatro microssatélites para estimar a paternidade de raças de ovelha Rasa Aragonesa. Porém, estas estimativas de exclusão de paternidade mostram que há uma taxa de erro relacionada com a quantidade de marcadores utilizados nas análises. Em trabalhos onde foram utilizados seis marcadores microssatélites, foi observado uma taxa de erro de 10% quando os genótipos das mães foram informados e 18% quando os mesmos não foram informados. Considerando marcadores com frequências alélicas uniformemente distribuídas, ao se comparar os resultados de microssatélites com os de SNPs, estimou-se que seriam necessários 30 SNPs para se obter a mesma taxa de erro quando a informação dos genótipos maternos está disponível e 70 quando não disponível (VIGNAL *et al.*, 2002). Isso mostra a necessidade de se acessar uma maior quantidade de locos quando os marcadores SNPs são utilizados.

### **1.2.5. Tecnologias para a genotipagem de SNPs**

Como citado anteriormente, um fator que conta positivamente a favor dos SNPs é o seu potencial para automação e a possibilidade de padronização da técnica entre laboratórios. Assim, diversas técnicas de genotipagem deste marcador vem sendo descritas, sendo que critérios como número de amostras e quantidade de locos analisados são os principais pontos a se considerar na escolha da melhor metodologia.

A metodologia que requer menor investimento em infra-estrutura para genotipagem de SNPs é a genotipagem por Clivagem por Endonuclease. Nesta metodologia, diferentes alelos de SNPs presentes em um determinado loco podem fornecer um sítio de clivagem ou não para uma enzima de restrição. Deste modos, fragmentos RFLP podem ser gerados onde um dos alelos conserva a sequencia do fragemento original, enquanto o outro é clivado pela enzima de restrição. Esta é uma das técnicas mais antigas utilizadas para a genotipagem de SNPs,

porém, apresenta a limitação de não poder ser realizada em análises em larga escala e a dependência de se encontrar um ponto de corte específico de restrição para cada loco estudado (TWYMAN, 2005).

Outra metodologia de genotipagem a ser citada é a genotipagem por Hibridização Alelo-Específica (TWYMAN & PRIMROSE, 2003), que consiste na criação de sondas complementares ao loco contendo o SNP (allele-specific oligonucleotide probes ou ASO probes), sendo criadas tantas sondas distintas quanto forem o número de alelos. Cada sonda é criada criada com nucleotídeos exatamente complementares ao alelos disponíveis e estas recebem marcação específica (p. ex., fluorocromos). As condições de estringência na hibridização entre *DNA*  $\times$  *sonda* definem o anelamento ou não entre ambos. Assim, é esperado que apenas a sonda totalmente complementar seja hibridizada. Conseqüentemente, a leitura da sonda hibridizada definirá qual alelo está presente na amostra. Ensaio mais sofisticados com esta técnica (*TaqMan*) usam a hibridização alelo específica como critério de discriminação inicial, porém, acrescentam passos enzimáticos adicionais para detectar o sinal do alelo correto.

Outra metodologia com princípio semelhante ao último e que pode ser empregada na análise de SNPs é a genotipagem por PCR Alelo-Específica (GAUDET *et al.*, 2009). Neste processo, as reações de PCR são dirigidas com a utilização de iniciadores que apresentam nucleotídeos específicos para cada alelo de SNP disponível. Cada um destes iniciadores recebem marcações fluorescentes distintas para que possam ser detectados os alelos da amostra. É uma metodologia simples, porém, conta com a desvantagem de necessitar de sequenciadores automáticos para a leitura e de apresentar alta taxa de erro nas genotipagens, já que as otimizações das reações devem ser rigorosamente calculadas. Além disto, a análise também é limitada pelo número de fluorescências que podem ser detectadas pelos sequenciadores (TWYMAN, 2005).

Como metodologia alternativa, pode-se citar ainda a Extensão de Base Única, também conhecida como Mini-Sequenciamento (SYVANEN, 1999). Nesta técnica, são desenhados iniciadores que se anelam a exatamente um nucleotídeo antes da posição do SNP. Assim, uma reação de sequenciamento é conduzida, porém esta contém apenas os dideoxynucleotídeos. Desta forma, apenas uma base será incorporada pela Polimerease na cadeia de DNA em crescimento e esta, por sua vez, corresponderá ao próprio SNP. O alelo correspondente pode, então, ser detectado uma vez que dependendo da base adicionada, uma marcação diferente poderá ser adotada. Esta metodologia é a base de alguns kits comerciais de genotipagem de

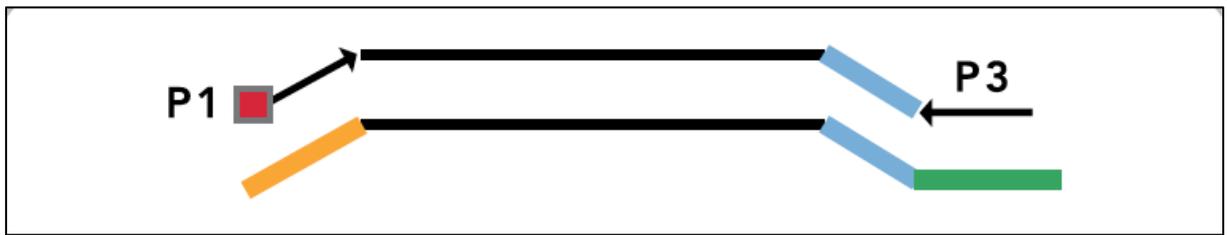
média a larga escala como *SnaPshot*<sup>TM</sup> (Applied Biosystems), *GenFlex*<sup>TM</sup> (Affymetrix) e *SNuPETM*<sup>TM</sup> (Amersham).

Outra metodologia que vem sendo explorada utiliza a combinação do processo de genotipagem *GoldenGate*<sup>®</sup> em conjunto com a tecnologia *VeraCode*<sup>®</sup> (LIN *et al.*, 2009). Genotipagens de média e alta densidade podem ser realizadas e a metodologia conta com a utilização de dois oligonucleotídeos alelo-específicos (ASO) que se posicionam exatamente antes do local do SNP e um terceiro oligonucleotídeo loco-específico (LSO), que se posiciona algumas bases depois da posição do SNP. Dependendo do alelo presente no DNA alvo, apenas um ou outro ASO irá se ligar (Figura 1).



**Figura1.** Etapa de hibridização de oligonucleotídeos alelo-específicos (ASO1 e ASO2) e loco-específico (LSO) ao DNA contendo o SNP com base T (timina). Todos os oligonucleotídeos contêm sequências de primers universais em suas extremidades (ASO1 – P1 laranja; ASO2 – P2 amarelo; LSO – P3 verde) utilizados em ampliações realizadas em etapas futuras. Além disso, LSO contém também uma sequência alvo (em azul) para posterior ligação com microesferas *VeraCode* e leitura em *BeadXpress*. Note que apenas ASO1 se anela perfeitamente ao loco do SNP. (fonte: Technical Note: Illumina<sup>®</sup> SNP Genotyping, <http://www.illumina.com>).

Após a hibridização dos oligonucleotídeos, a extremidade 3' do ASO é estendida pela enzima DNA-polimerase até alcançar a extremidade 5' do LSO. Em seguida, ambas as extremidades são ligadas pela enzima DNA-ligase, formando um fragmento único (ver Figura 2, fragmento inferior). A molécula resultante (ASO + loco estendido + LSO) servirá como molde para uma PCR onde os primers específicos de cada alelo (P1 ou P2) estão distintamente marcados. Após a PCR, os fragmentos gerados serão ligados às microesferas para posterior leitura em *BeadXpress*, utilizando a tecnologia *VeraCode*.



**Figura 2.** Fragmento amplificado com primer P1, marcado com fluorescência vermelha (específica do alelo ASO1), e P3. Os produtos desta PCR serão posteriormente ligados às microesferas pela sequência alvo (azul), para leitura em BeadXpress. (fonte: Technical Note: Illumina® SNP Genotyping, <http://www.illumina.com>).

### 1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCOMIG, Associação dos Criadores de Caprinos e Ovinos de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.caprileite.com.br>> Acessado em: 10/12/2007.

ARCO, Assistência ao Rebanhos Criadores de Ovinos; Associação Brasileira de Criadores de Ovinos. Disponível em: <http://www.arcoovinos.com.br> Acessado em: 15/08/2012.

ARRUGA, M.V.; MONTEAGUDO, L.V.; TEJEDOR, M.T.; BARRAO, R.; PONZ, R. Analysis of microsatellites and paternity testing in Rasa Aragonesa sheep. **Research in Veterinary Science**, 70, 271-273, 2001.

AVISE, J.C.; HAMRICK, J.L. 1994. **Conservation genetics: case histories from nature**. New York: Chapman e Hall. 556p.

CAÑON J., ALEXANDRINO P., BESSA I., CARLEOS C., CARRETERO Y., DENNER S., FERRAN N., GARCIA D., JORDANA J., LALOE D., PEREIRA A., SANCHEZ A., MOAZAMI-GOUDARZI K. Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. **Genet. Sel. Evol.** v. 33, p.311-332, 2001.

CHARLIER C, COPPIETERS W, ROLLIN F, DESMECHT D, AGERHOLM JS, *et al.* Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. **Nature Genetics**, p. 449–454, 2008.

DALRYMPLE, B.P.; KIRKNESS, E.F.; NEFEDOV, M.; McWILLIAM, S.; RATNAKUMAR, A.; BARRIS, W.; ZHAO, S.; SHETTY, J.; MADDOX, J.F.; O'GRADY, M.; NICHOLAS, F.; CRAWFORD, A.M.; SMITH, T.; JONG, P.J.; McEWAN, J.; ODDY, H.; COCKETT, N.E. and the INTERNATIONAL SHEEP GENOMICS CONSORTIUM. Using comparative genomics to reorder the human genome sequence into a virtual sheep genome. *Genome Biology*, v. 8, p. R152, 2007.

DELGADO, J.V.; MARTÍNEZ, R.; REVIDATTI, M.A.; VACA, J.L.; STEMMER, A.; SERENO, J.R.B.; BENÍTEZ, D.; MARIANTE, A.S.; RIBEIRO, M.N.; RIBAMAR, J.; ANZOLA, H.; VELAZQUES, F.; ZAMBRANO, D.; CAMACHO, M.E.; SIERRA, A.; HERNANDEZ, J.S.; PERREZGROVAS, R.; MEDRANO, A.; ALUJA, A.; URVIOLA, N.G.; MATOS, C.; CARCAMO, F.; FERNÁNDEZ, G.; PARIACOTE, F.; TOLEDO, P.M. Balance de siete años em pro de La conservación de razas ibero-americanas: Red cyted- XII-H. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v.54, p. 129-134, 2005.

EGITO, A.A.; PAIVA, S.R.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; MARIANTE, A.S.; ALMEIDA, L.D.; CASTRO, S.R. AND GRATTAPAGLIA D. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. **BMC Genetics**, v. 8, p. 83, 2007.

ESQUINAS-ALCÁZAR, J. Protecting crop genetic diversity for food security: political, ethical and technical challenges. **Natural Reviews Genetics**, v. 6, p. 946-953, 2005.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) **The state of the world's animal genetic resource for food and agriculture** (Eds. B. RISCHKOWSKY e D. PILLING). Roma, Italy, 2007, 512p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: Embrapa/CENARGEN, 1998.

FRAZER, K.A. *et al.* A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. **Nature**, n. 448, p. 1050–1053, 2007.

GAUDET, M; FARA, AG; BERITOGNOLO, I; SABATTI, M. **Allele-Specific PCR in SNP Genotyping**. In: WALKER, JM. (ed.). *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Clifton, NJ, 415-424, 2009.

HEATON, M.P.; HARHAY, G.P.; BENNETT, G.L. *et al.* Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. **Mammalian Genome**, v.13, n.5, p.272-81, 2002.

HEATON, M.P. ; KEEN, J.E. ; CLAWSON, M.L. ; HARHAY, G.P. ; BAUER, N. ; SCHULTZ, C. ; GREEN, B.T. ; DURSO, L.M. ; CHITKO-MCKOWN, C.G. ; LAEGREID, W.W. Use of bovine single nucleotide polymorphism markers to verify sample tracking in beef processing. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 8, p. 1311-1314, 2005.

HEYER, E., PUYMIRAT, J., DIELTJES, P., BAKKER, E., DE KNIJFF, P., Estimating Y chromosome specific microsatellite mutation frequencies using deep rooting pedigrees, **Hum Mol Genet** v. 6, p. 799–803, 1997.

INTERNATIONAL CHICKEN POLYMORPHISM MAP CONSORTIUM. A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. **Nature** 432: 717–722, 2004

INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM, *et al.* A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. **Nature** 449: 851–861, 2007.

JACINTO, M.A.C.; SOBRINHO, A.G.S.; COSTA, R.G. Características anátomo-estruturais da pele de ovinos (*Ovis aries* L.) lanados e deslanados, relacionadas com o aspecto físicomecânico do couro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1001-1008, 2004.

JAMIESON, A.; TAYLOR, St.C.S. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. **Animal Genetics**, 28, 397-400, 1997.

KARLSSON EK, BARANOWSKA I, WADE CM, SALMON HILLBERTZ NH, ZODY MC. Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. **Nature Genetics**, v. 39, p.1321–1328, 2007.

KIJAS, J.W.; TOWNLEY D, DALRYMPLE BP, HEATON MP, MADDUX JF, *et al.* A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. **PLoS Biology**: v. 10, p. e1001258, 2012.

LANARI, M.R.; TADDO, H.; DOMINGO, E.; PEREZ-CENTERO, M.; GALLO, L. Phenotypic differentiation of exterior traits in local Criollo Goat Population in Patagonia (Argentina). **Archives Animal Breeding**, Dummerstorf, v. 46, p. 347-356, 2003.

LEE MA, KEANE OM, GLASS BC, MANLEY TR, CULLEN NG, DODDS KG, MCCULLOCH AF, MORRIS CA. Establishment of a pipeline to analyse non-synonymous SNPs in *Bos taurus*. **BMC Genomics**, v. 7, p. 298, 2006.

LEGGE T (1996) The beginnings of caprine domestication, in HARRIS DR, ed. **The Origins and Spread of Agriculture and Pastoralism in Eurasia**. New York: Smithsonian Institution Press. pp 238–262.

LIN, C.H., YEAKLEY , J.M., MCDANIEL TK, SHEN R. (2009) Medium- to High-Throughput SNP Genotyping Using VeraCode Microbeads. **Methods Mol Biol**. v. 496, p.129-142, 2009.

LINDBLAD-TOH K, WADE CM, MIKKELSEN TS, KARLSSON EK, JAFFE DB, *et al.* (2005) Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature** 438: 803–819

LOTTI, A. The commodization of products and taste: slow food and the conservation of agrobiodiversity. **Agriculture and Human Values**, v. 27, n. 1, p. 71-83, 2010.

LUIKARTE, 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.

MANOLIO TA, BROOKS LD, COLLINS FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. **Journal of Clinical Investigation**. v. 118, p.1590–1605, 2008.

MARIANTE, A.S.; McMANUS, C. ; MENDONÇA, J.F. **Country report on the state of animal genetic resources**. (S. L.) : Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2003, p. 97 (Research Division Report).

McMANUS, C. ; PAIVA, S.R. ; LANDIM, A.V. ;LOUVADINI, H. Melhoramento genético de ovinos. In: ZOOTEC 2007, Londrina. A Zootecnia frente a novos desafios. Londrina : **Anais...** UEL, 2007, p. 501-530.

McMANUS, C. ; PAIVA, S.R. ; ARAUJO, R.O. Genetics and breeding of sheep in Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, p. 236-246, 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Instrução Normativa No. 74 de 20 de Outubro de 2004**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília: 2004.

MORAIS, O.R. O Melhoramento genético dos ovinos no Brasil. In: **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal** (ed. PEREIRA, J.C.C.). 3ed. Belo Horizonte, FEPMUZ, 555p., 2001.

NEGRINI, R. ; NICOLOSO, L. ; CREPALDI, P. ; MILANESI, E. ; MARINO, R. ; PERINI, D. ; PARISSET, L. ; DUNNER, S. ; LEVEZIEL, H. ; WILLIAMS, J.L. ; AJMONE- MARSAN, P. Traceability of four European Protected Geographic Indication (PGI) beef products using Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) and Bayesian statistics. *Meat Science*, v. 80, n. 4, p. 1212-1217, 2008. HEGGEBØ *et al.*, 2002

NOGUEIRA, D.M.; ELOY, A.M.X. ; SÁ, C.O. ; LOPES-JÚNIOR, E. S. ; SALLES, HÉVILA OLIVEIRA ; SÁ, J.L. ; SOUZA, PEDRO HUMBERTO FELIX DE . Manejo Reprodutivo. In: Tadeu Vinhas Voltolini. (Org.). Produção de Caprinos e Ovinos no Semiárido. Produção de Caprinos e Ovinos no Semiárido. 1ed.Petrolina: Embrapa Semiárido, 2011, v. 1, p. 385-420.

PAIVA, S.R. **Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares**. 2005. 108f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PAIVA, S.R.; SILVÉRIO, V.C.; EGITO, A.A.; MCMANUS, C.; FARIA, D.A.; MARIANTE, A.S.; CASTRO, S.R.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; DERGAM, J.A. Genetic variability of the Brazilian hair sheep breeds. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 40, n.9, p. 887-893, 2005.

PAIVA, S.R.; FARIA, D.A.; DERGAM, J. *et al.* Genetic structure of hair sheep breeds in Brazil by microsatellites markers. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANIMAL GENETICS, 30., 2006, Porto Seguro. **Proceedings...** Porto Seguro, 2006.

PAIVA, S.R.; FACÓ, O.; FARIA, D.A. ; LACERDA, T. ; BARRETTO, G.B. ; CARNEIRO, P.L.S. ; LOBO, R.N.B. ; McMANUS, C. Molecular and pedigree analysis applied to conservation of animal genetic resources: the case of Brazilian Somali hair sheep. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, p. 1-8, 2011

PEATKAU, D. ; WAITS, L. ; CLARKSON, P.L. *et al.* Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. **Conservation Biology**, 12, 418-429, 1998.

ROHRER, G. A.; FREKING, B. A.; NONNEMAN, D. Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion. **Animal genetics**, v. 38, p. 253-258, 2007.

RON, M.; BLANC, Y.; BAND, M.; EZRA, E.; WELLER, J.I. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implication for genetic improvment. **Journal of Dariry Science**, v.79, p. 676-681.

SATTA, Y., OHUIGIN, C., TAKAHATA, N., KLEIN, J., The synonymous substitution rate of the major histocompatibility complex loci in primates. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, p. 7480–7484, 1993.

SCHERF DB, ed (2000) **World Watch List for Domestic Animal Diversity**, Ed. 3. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 63–69, 2004.

SILVA, M.C. **Estudo Morfométrico de Ovinos da Raça Crioula Lanada no Sul do Brasil: um subsídio para a conservação in situ**. 2010. 71F. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universiade Federal de Goiás, Goiás, GO.

SOUZA, C.A.; PAIVA, S.R.; FARIA, D.A. *et al.* Allele frequency of 23 STRs loci among five populations of Santa Inês hair sheep breed in Brazil. In: 30th INTERNATIONAL

CONFERENCE ON ANIMAL GENETICS - ISAG, 30., 2006, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro, 2006.

SYVANEN, A.C. From gels to chips: “Minisequencing” primer extension for analysis of point mutations and single S nucleotide polymorphisms. **Human Mutat.** 1999, 13 (1), 16.

TABERLET, P.; VALENTINI, A.; REZAEI, H.R.; NADERI, S.; POMPANON, F.; NEGRINI, R.; AJMONE-MARSAN, P. Are cattle, sheep, and goats endangered species? **Molecular Ecology**, v. 17, p. 275-284, 2007.

TAUTZ D, SCHLOTTERER C. Simple sequences. **Curr. Opin. Genet. Dev.** v. 4, p. 832–37, 1994.

TWYMAN, R.M.; PRIMROSE, S.B. Techniques patents for SNP genotyping. **Pharmacogenomics**, v. 4, n. 1, p. 67–79, 2003.

TWYMAN, R.M. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Techniques—An Overview. **Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics**, p. 1202-1207, 2005.

TORRES, A.P.; JARDIM, W.R.; JARDIM, L.F. **Raças que interessam ao Brasil**. Ed. Agronômica Ceres, 2a ed., 303p. 1975.

VAN EENENNAAM, A.L.; WEABER, R.L; DRAKE, D.J.; PENEDO, M.C.T.; QUAAS, R.L.; GARRICK, D.J., POLLAK, E.J. DNA-based paternity analysis and genetic evaluation in a large, commercial cattle ranch setting. **Journal of Animal Sciences**, v. 85, p. 3159-3169, 2007.

VAN TASSELL CP, SMITH TP, MATUKUMALLI LK, TAYLOR JF, SCHNABEL RD, *et al.* (2008) SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. **Nature Methods** 5: 247–252.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOLBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 275-305, 2002.

WANG, D.G., FAN, J.B., SIAO, C.J., BERNO, A., YOUNG, P., SAPOLSKY, R., GHANDOUR, G., PERKINS, N., WINCHESTER, E., SPENCER., J., KRUGLYAK, L., STEIN, L., HSIE, L., TOPALOGLOU, T., HUBBELL, E., ROBINSON, E., MITTMANN, M, MORRIS, M. S., SHEN, N., KILBURN, D., RIOUX, J, NUSBAUM, C., ROZEN, S., HUDSON, T.J., LIPSHUTZ, R., CHEE, M.S., LANDER, E.S. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome, **Science** 280, p. 1077-1082, 1998.

## **CAPÍTULO II**

## CAPÍTULO II

### **Análise de Paternidade com Marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism) em Ovinos da raça Crioula Lanada**

Vasconcelos, Carolina; Caetano, A.R.; Yamagishi, Michel E.B.; Lacerda, Thaísa; McManus, Concepta M.; Silva, M.V.G.B.; Carneiro, Paulo L.S.; Azevedo, Hymerson C.; Facó, Olivardo; Souza, Carlos J.H.; Moraes, José C.F.; Araújo, Adriana M.; Martins, Vera M.V.; Paiva, Samuel R.

#### **2.1. RESUMO**

A conservação dos recursos genéticos locais de ovinos é estratégica para contribuir na segurança alimentar da população de um país, seja na forma do fornecimento de produtos especializados com indicações de origem e/ou procedência geográfica seja na contribuição de combinações alélicas alternativas que poderão auxiliar programas de melhoramento e produção desenvolvidos para grupos genéticos especializados. Para isto, as informações sobre a genealogia dos rebanhos são críticas para se explorar o melhor potencial de cada raça e evitar problemas como aumento da endogamia e a erosão genética. Porém, como nem sempre essas informações estão disponíveis em parte do rebanho nacional, as ferramentas baseadas em marcadores moleculares podem ter papel fundamental para gerenciar programas de melhoramento ou conservação onde os registros genealógicos são escassos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e testar um conjunto de marcadores de Base Única (Single Nucleotide Polymorphism – SNPs) para realizar testes de paternidade em ovelhas. Amostras de animais de três raças brasileiras de ovinos localmente adaptadas foram genotipadas com o chip contendo aproximadamente 50.000 marcadores SNP (SheepSNP50 Bead Chip, Illumina Inc., San Diego, CA) e, deste banco de dados, um painel de baixa densidade contendo 123 SNPs foi selecionado. Deste painel, 71 SNPs foram validados em uma amostra composta por 71 animais do Núcleo de Conservação da raça Crioula da Embrapa Pecuária Sul. Foi observado que 53 SNPs tiveram sucesso nas genotipagens e demonstraram níveis significativos de polimorfismo de forma que as probabilidades de exclusão combinadas obtidas apresentaram valores entre 88,8% a 99,9%. A partir do conjunto de SNPs genotipados, quatro sub-painéis foram definidos e testados e o sucesso na atribuição de paternidade, de acordo com informações de genealogia dos animais, variou entre 76 - 79%. Apesar do claro potencial dos marcadores selecionados, notou-se a necessidade de se aumentar o número de marcadores deste painel para elevar o poder de resolução nas análises. Palavras-chave: pedigree, marcadores moleculares, *Ovis aries*

## Parentage testing using SNP Markers for Brazilian Creole Sheep

Vasconcelos, Carolina; Caetano, A.R.; Yamagishi, Michel E.B.; Lacerda, Thaísa; McManus, Concepta M.; Silva, M.V.G.B.; Carneiro, Paulo L.S.; Azevedo, Hymerson C.; Facó, Olivardo; Souza, Carlos J.H.; Moraes, José C.F.; Araújo, Adriana M.; Martins, Vera M.V.; Paiva, Samuel R.

### 2.2. ABSTRACT

The conservation of local sheep genetic resources is strategic to ensure food security through the offer of specialized products with geographic indication or certificate of origin as well as maintenance of alternatives for allelic combinations in relation to specialized genetic groups. Thus, information about the genealogy of the flocks is critical to exploit the potential of each breed and avoid problems such as inbreeding and genetic erosion. However, as the genealogical records are not always available, tools based on molecular markers can play a fundamental role in management of breeding programs. The objective of this study was to test a set of SNP markers (Single Nucleotide Polymorphism) to conduct paternity tests on sheep. Samples from three locally adapted Brazilian sheep breeds were genotyped with a chip containing approximately 50,000 SNP markers (SheepSNP50 Bead Chip, Illumina Inc., San Diego, CA) and from this data bank a low density panel containing 123 SNPs was selected. Of these, 71 were validated on 71 Crioula sheep from the Conservation Nucleus, and 53 were successfully genotyped and showed significant levels of polymorphism. The combined probability of exclusion obtained showed values between 88.8% and 99.9% for paternity exclusion. From the set of SNPs genotyped, four sub-panels were defined based on analyzes of linkage disequilibrium (LD) and deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. According to genealogy information, the success in paternity assignments by SNP ranged between 76 and 79% according to the panel used. Despite the potential, there was noted the need for increasing the number of selected markers, thus elevating the power of the analysis.

Key-words: pedigree, molecular markers, *Ovis aries*

### 2.3. INTRODUÇÃO

Atualmente, das raças de ovinos presentes no Brasil, apenas 11 apresentam crescimento populacional efetivo em seus rebanhos, sendo os cruzamentos indiscriminados um dos principais fatores para o aumento da endogamia e, conseqüentemente, da diminuição da variabilidade genética (McMANUS *et al.*, 2010). Para reverter este quadro, um dos maiores pontos a ser explorado para o melhoramento genético é justamente o conhecimento sobre a origem e o pedigree de cada animal. Porém, esta é uma situação desafiadora visto que grande parte dos rebanhos não apresentam estas informações ou as possuem de forma incompleta. A utilização de múltiplos reprodutores também pode deixar estas informações imprecisas (ARRUGA *et al.*, 2001).

O uso de técnicas modernas baseadas em informações diretas do DNA vem auxiliando na identificação de paternidade e levando a informações sobre a genealogia (CUNNINGHAM & MEGHEN, 2001). Além disto, o emprego destas ferramentas possibilita a formulação de estratégias de conservação, determinação do número populacional efetivo e, por fim, abre possibilidades para o gerenciamento adequado de cruzamentos (McMANUS *et al.*, 2010). De acordo com Pariset *et al.* (2006) estas técnicas visam atingir três metas principais: (a) informações de pedigree mais confiáveis; (b) seleção de *pool* genético visando a conservação e a determinação de reprodutores e matrizes e (c) a oportunidade de utilizar as informações para a seleção de genes candidatos e QTLs.

Os pedigrees baseados em informações moleculares baseiam-se no simples conceito de que os pais passaram para seus filhos apenas um dos dois alelos que possuem para cada loco. No entanto, apesar da simplicidade, a seleção de locos que possam ser utilizados para se aplicar esta técnica pode não ser uma tarefa tão direta. Em alguns casos a quantidade de informação genética pode ser limitada ou, então, a taxa de erro de genotipagem pode induzir a falhas que comprometem os resultados, levando à identificação de progenitores falso-positivos ou à exclusão dos verdadeiros. Assim, diversas ferramentas estatísticas que utilizam metodologias de probabilidade com simulações de Monte Carlo ou técnicas Bayesianas foram formuladas e levam em consideração as possíveis fontes de erros (JONES *et al.*, 2010).

Dentre os marcadores moleculares utilizados para este fim, destacam-se os microssatélites, que são altamente polimórficos e tem demonstrado resultados confiáveis (FISHER *et al.*, 2009; HARA *et al.*, 2010). Entretanto, com o avanço da tecnologia e com o aumento da informação gerada em diversos projetos genoma, vem se destacando para este fim os marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*). A recente preferência por este tipo

de marcador em diversos projetos científicos vem sendo justificada pela capacidade de genotipagem de alta densidade, baixa taxa de mutação e, principalmente, pela transferibilidade da técnica entre laboratórios (ANDERSON & GARZA, 2006). No caso dos microssatélites, nem sempre é possível comparar dados gerados em diferentes laboratórios devido a inconsistência das medidas de comprimento dos alelos e das variações relacionadas com as próprias reações de PCR, sendo este um fator favorável ao uso dos SNPs (VIGNAL, 2002). Entretanto, o principal fator limitante dos últimos é o fato dos mesmos serem geralmente bialélicos. Assim, é necessário um grande número de SNPs para se alcançar o mesmo poder de exclusão dos microssatélites em testes de paternidade (JONES *et al.*, 2010).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de um conjunto de marcadores SNP para teste de paternidade em ovinos. Os marcadores foram testados na raça Crioula Lanada visando gerar uma ferramenta auxiliar para gerar informações de pedigree para os Núcleos de Conservação da raça.

## 2.4. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.4.1. Material Biológico

Para etapa de seleção foram usados 88 amostras de raças brasileiras (Crioula, Morada Nova e Santa Inês) genotipadas com 50.000 SNPs (Kijas et al., 2012). Para a etapa de validação do painel de baixa densidade de SNPs, foram utilizados ovinos da raça Crioula Lanada mantidos no Núcleo de Conservação da raça localizado na Embrapa Pecuária Sul (CPPSUL), Bagé, RS. Foram considerados para identificação de paternidade uma prole de 62 produtos nascidos no ano de 2010, com 9 pais candidatos. Informações da genealogia de todos os produtos foram fornecidas pela CPPSUL. Todos os animais tiveram amostras de sangue coletadas e depositadas no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

### 2.4.2. Extração do DNA

Todo material biológico foi submetido ao protocolo de extração de DNA descrito por Sambrook *et al.* (1989). Após as extrações as amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotômetro NanoDrop®, utilizando-se 1,0 µL do DNA diluído em TE + 1,0 µL de reagente Pico-Green. A concentração de todas as amostras foi ajustada para concentração final de 40 ng/µL de DNA, sendo estas destinadas à genotipagem.

### 2.4.3. Identificação/seleção inicial dos SNPs

Um conjunto inicial de 123 marcadores SNPs (ver Tabela 1, Resultados) foi selecionado a partir de critérios qualitativos e quantitativos estimados a partir da genotipagem das 88 amostras de raças brasileiras para aproximadamente 50.000 SNPs. Para mais informações acesse sobre este chip acessar: <http://www.sheepmap.org>.

O primeiro critério de seleção adotado para a montagem do painel de paternidade levou em consideração: (1) Alelo de menor frequência (Minor Allele Frequency - MAF >0,4; critério eliminatório); (2) posição no genoma definida; e (3) desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,01$ ) ocorrendo nas três raças genotipadas no Hapmap (critério eliminatório); (4) Realização de Teste de Desequilíbrio de Ligação entre cada par de marcadores SNP selecionado. A partir deste último critério foi realizada uma subdivisão adicional dos marcadores selecionados em que consistiu retirar, progressivamente, os locos que apresentaram maior número de combinações par a par com desequilíbrio de ligação (DL) significativo. Assim, foram montados três painéis considerando limites: (A) DL 7,5%:

eliminação dos locos que apresentaram 6 ou mais combinações par a par significativas; (B) DL 10%: eliminação dos locos que apresentaram 8 ou mais combinações par a par significativas; (C) DL 12,5%: eliminação dos locos que apresentaram 9 ou mais combinações par a par significativas. As estimativas de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e desequilíbrio de ligação (DL) foram estimadas no programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010).

#### **2.4.4. Genotipagem**

As amostras de DNA foram submetidas à genotipagem utilizando a tecnologia GoldenGate/Veracode, onde o DNA genômico de cada animal foi hibridizado com os oligonucleotídeos alelo-específicos para posterior leitura no BeadXpress (Illumina®), conforme especificações do fabricante (<http://www.illumina.com>).

#### **2.4.5. Análises dos Dados e Composição do Painel de SNPs**

Os dados gerados no BeadXpress foram analisados com o software GenomeStudio (Illumina®) para identificação dos alelos dos produtos e dos pais candidatos da raça Crioula Lanada.

A avaliação dos marcadores genotipados levou em consideração a taxa de sucesso na definição dos alelos de cada amostra. Foram considerados os locos que apresentaram no mínimo 90% de alelos definidos (terceira seleção). Marcadores que não atingiram esta meta foram excluídos das análises.

Após estes procedimentos, os dados dos marcadores selecionados foram submetidos à análise no programa CERVUS 3.0 (MARSHALL *et al.* 1998), onde foram determinadas as estimativas de Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e probabilidade de ocorrência de alelos nulos. O mesmo software foi, ainda, utilizado para realização de testes de inclusão/exclusão de paternidade, considerando-se toda a prole ( $N = 62$ ) juntamente com os pais candidatos ( $N = 9$ ). Na simulação de paternidade, o parâmetro “proporção de locos genotipados” foi fixada em 0,94, com taxa de erro de genotipagem de 0,01/indivíduo. Os valores críticos de Delta foram ajustados para 95% (confidência estrita) e 80% (confidência relaxada), baseados em 100.000 simulações. Após estas análises, os dados foram utilizados para se estimar a paternidade da progênie utilizando o parâmetro *Paternity*.

Comparações para determinar o número mínimo de marcadores SNPs necessários para exclusão de paternidade foram realizadas utilizando o software GENALEX 6 (PEAKALL & SMOUSE, 2006).

## 2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.5.1. Resultados

#### 2.5.1.1 Avaliação locos genotipados para montagem do painel

Dos 123 marcadores inicialmente utilizados, 71 foram selecionados após análise dos valores de MAF e desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 1). Após a triagem inicial, o novo painel gerado passou pela análise de desequilíbrio de ligação (DL) para a detecção do número de locos ligados a cada um deles. Dentro do conjunto de 71 marcadores, foram considerados três possibilidades para os testes de paternidade. Marcadores com até 9 locos ligados (~12,5% de locos ligados/loco), 7 locos ligados (~10%) e 5 locos ligados (~7,5%). Após estas análises três novos painéis foram gerados apresentando 63, 51 e 34 marcadores, aos níveis tolerância de DL de 12,5%, 10% e 7,5% respectivamente (Tabela 2).

Assim, o terceiro critério de seleção para a validação dos painéis de marcadores ocorreu de acordo com os sucessos obtidos nas genotipagens. As amostras de ovelha Crioula Lanada fornecidas pelo CPPSUL (62 produtos e 9 pais candidatos) foram genotipadas e apenas 46 marcadores mostraram definição precisa dos alelos de cada animal (Tabela 3).

Cada painel gerado com os diferentes níveis de tolerância de DL (12,5% - Painel A; 10% - Painel B; 7,5% - Painel C) foi testado no programa Cervus para avaliação das frequências alélicas e níveis de polimorfismos. Foram observados valores médios de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) de 0,388 ( $\pm 0,141$ ) e esperada ( $H_e$ ) de 0,423 ( $\pm 0,106$ ). Os valores de  $H_e$  variaram de 0,058 a 0,502, porém, apesar da ampla variação, apenas três dos locos apresentaram valores inferiores a 0,20 (Tabela 4). O polimorfismo dos mesmos também foi observado com os valores de PIC, que obteve média de 0,327 ( $\pm 0,072$ ) por loco analisado.

Mesmo com os testes preliminares mostrando ausência de locos com desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi constatado desvio significativo nas análises com os animais testados. Na Tabela 4, podem ser observados que, do total de 46 marcadores, 12 tiveram desvios significativos (26%). Outros sete marcadores apresentaram ausência de polimorfismos (15%), restando, portanto, 27 marcadores deste total. Assim, estes marcadores também foram testados como um painel independente (Painel D) para se avaliar seu potencial.

**Tabela 1.** Triagem de 123 marcadores selecionados a partir de três raças brasileiras (Crioula, Morada Nova e Santa Inês) genotipadas com 50.000 SNPs (<http://www.sheepmap.org>). Foram considerados valores de MAF (Minor Allele Frequency)  $> 0,4$  e desvios no Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) significativos ( $P < 0,01$ ) nas três raças.

No.	Loco	Cromossomo	MAF	Desvios no EHW			1a. Seleção
				Crioula	Morada Nova	Santa Inês	
1	OAR1_23734999	1	0,460				ok
2	OAR1_32906689	1	<0,4 (eliminado)				
3	OAR1_36080883	1	<0,4 (eliminado)				
4	OAR1_61493280	1	0,460				ok
5	OAR1_73027197	1	<0,4 (eliminado)				
6	OAR1_88092654	1	0,500				ok
7	OAR1_91326800	1	<0,4 (eliminado)				
8	OAR1_98453311	1	<0,4 (eliminado)				
9	OAR1_148726685	1	0,443				ok
10	OAR1_157363688	1	<0,4 (eliminado)				
11	OAR1_170034165	1	0,483				ok
12	OAR1_197916874	1	<0,4 (eliminado)				
13	OAR1_241598383	1	0,454				ok
14	OAR1_263131531	1	0,500				ok
15	OAR1_278980576	1	<0,4 (eliminado)				
16	OAR1_287365859	1	<0,4 (eliminado)				
17	OAR1_296820284	1	<0,4 (eliminado)				
18	OAR2_3512138	2	<0,4 (eliminado)				
19	s46561	2	<0,4 (eliminado)				
20	s16234	2	0,500				ok

Continua

**Tabela 1.** Triagem de 123 marcadores selecionados a partir de três raças brasileiras (Crioula, Morada Nova e Santa Inês) genotipadas com 50.000 SNPs (<http://www.sheepmap.org>). Foram considerados valores de MAF (Minor Allele Frequency)  $> 0,4$  e desvios no Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) significativos ( $P < 0,01$ ) nas três raças (**continuação**).

No.	Loco	Cromossomo	MAF	Desvios no EHW			1a. Seleção
				Crioula	Morada Nova	Santa Inês	
21	OAR2_43599765	2	<0,4 (eliminado)				
22	OAR2_58394462	2	<0,4 (eliminado)				
23	OAR2_116945286	2	0,477				ok
24	s71929	2	0,460				ok
25	OAR2_142085758	2	<0,4 (eliminado)				
26	OAR2_165344428	2	0,489				ok
27	OAR2_179267347	2	<0,4 (eliminado)				
28	OAR2_206338195	2	0,454				ok
29	s15714	2	0,477				ok
30	s69717	3	0,477				ok
31	s69310	3	0,483				ok
32	s57698	3	<0,4 (eliminado)				
33	OAR3_54271173	3	<0,4 (eliminado)				
34	OAR3_58366737	3	<0,4 (eliminado)				
35	s25032	3	<0,4 (eliminado)				
36	OAR3_84188031	3	0,454				ok
37	s60452	3	<0,4 (eliminado)				
38	OAR3_132066295	3	0,477				ok
39	OAR3_149119745	3	<0,4 (eliminado)				
40	OAR3_157444522	3	<0,4 (eliminado)				

continua

**Tabela 1.** Triagem de 123 marcadores selecionados a partir de três raças brasileiras (Crioula, Morada Nova e Santa Inês) genotipadas com 50.000 SNPs (<http://www.sheepmap.org>). Foram considerados valores de MAF (Minor Allele Frequency) > 0,4 e desvios no Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) significativos ( $P < 0,01$ ) nas três raças (**continuação**).

No.	Loco	Cromossomo	MAF	Desvios no EHW			1a. Seleção
				Crioula	Morada Nova	Santa Inês	
41	OAR3_179063841	3	0,489				ok
42	s62475	3	<0,4 (eliminado)				
43	OAR4_11240022	4	0,454				ok
44	s00373	4	0,460				ok
45	OAR4_91739253	4	0,448				ok
46	OAR4_94766796	4	<0,4 (eliminado)				
47	s37700	4	0,466				ok
48	OAR5_26459986	5	0,466				ok
49	OAR5_29893442	5	<0,4 (eliminado)				
50	OAR5_36153266	5	<0,4 (eliminado)				
51	s03876	5	0,460				ok
52	OAR5_82642729	5	<0,4 (eliminado)				
53	OAR5_111606992	5	0,477				ok
54	OAR6_48792023	6	0,448				ok
55	OAR6_68532683	6	0,460				ok
56	OAR6_72352340	6	<0,4 (eliminado)				
57	OAR6_83896483	6	<0,4 (eliminado)				
58	OAR6_95930760	6	0,489				ok
59	OAR6_101507836	6	<0,4 (eliminado)				
60	s71297	6	0,454	P < 0,01			ok

continua

**Tabela 1.** Triagem de 123 marcadores selecionados a partir de três raças brasileiras (Crioula, Morada Nova e Santa Inês) genotipadas com 50.000 SNPs (<http://www.sheepmap.org>). Foram considerados valores de MAF (Minor Allele Frequency)  $> 0,4$  e desvios no Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) significativos ( $P < 0,01$ ) nas três raças (**continuação**).

No.	Loco	Cromossomo	MAF	Desvios no EHW			1a. Seleção
				Crioula	Morada Nova	Santa Inês	
61	OAR7_1224949	7	0,500				ok
62	OAR7_5350977	7	<0,4 (eliminado)				
63	s60649	7	0,489				ok
64	OAR8_4035646	8	0,460				ok
65	OAR8_32459191	8	0,500				ok
66	s08950	8	<0,4 (eliminado)				
67	OAR9_48204690	9	0,494				ok
68	OAR9_56055528	9	<0,4 (eliminado)				
69	OAR9_59297091	9	<0,4 (eliminado)				
70	OAR9_67226699	9	<0,4 (eliminado)				
71	OAR9_80918118	9	0,454				ok
72	OAR9_93048703	9	0,489				ok
73	OAR10_38586588	10	0,448				ok
74	OAR10_45286350	10	<0,4 (eliminado)				
75	OAR10_68005037	10	0,477				ok
76	OAR10_71498684	10	<0,4 (eliminado)				
77	OAR10_88932679	10	0,448				ok
78	OAR11_13817708	11	0,477				ok
79	OAR12_70188998	12	0,489				ok
80	OAR12_75421182	12	<0,4 (eliminado)				

continua

**Tabela 1.** Triagem de 123 marcadores selecionados a partir de três raças brasileiras (Crioula, Morada Nova e Santa Inês) genotipadas com 50.000 SNPs (<http://www.sheepmap.org>). Foram considerados valores de MAF (Minor Allele Frequency) > 0,4 e desvios no Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) significativos ( $P < 0,01$ ) nas três raças (**continuação**).

No.	Loco	Cromossomo	MAF	Desvios no EHW			1a. Seleção
				Crioula	Morada Nova	Santa Inês	
81	s07776	13	0,489				ok
82	OAR13_48889355	13	0,494				ok
83	OAR13_81471049	13	0,460				ok
84	s02515	14	0,466				ok
85	OAR14_27308027	14	<0,4 (eliminado)				
86	OAR14_38256049	14	<0,4 (eliminado)				
87	OAR14_44836628	14	<0,4 (eliminado)				
88	s42929	14	0,500				ok
89	s33503	15	0,483				ok
90	OAR15_58590296	15	0,477				ok
91	OAR16_35656302	16	0,483				ok
92	OAR16_51697426	16	<0,4 (eliminado)				
93	OAR16_62197518	16	0,443				ok
94	s46434	16	<0,4 (eliminado)				
95	OAR17_2443477	17	0,454				ok
96	OAR17_37705408	17	0,477				ok
97	OAR17_42330622	17	<0,4 (eliminado)				
98	s23373	18	0,500				ok
99	OAR18_25765614	18	<0,4 (eliminado)				
100	DU396708_413	18	0,489				ok
101	s25497	19	0,455				ok
102	OAR19_31723606	19	<0,4 (eliminado)				

continua

**Tabela 1.** Triagem de 123 marcadores selecionados a partir de três raças brasileiras (Crioula, Morada Nova e Santa Inês) genotipadas com 50.000 SNPs (<http://www.sheepmap.org>). Foram considerados valores de MAF (Minor Allele Frequency)  $> 0,4$  e desvios no Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) significativos ( $P < 0,01$ ) nas três raças (**conclusão**).

No.	Loco	Cromossomo	MAF	Desvios no EHW			1a. Seleção
				Crioula	Morada Nova	Santa Inês	
103	s72304	19	0,460				ok
104	OAR20_37979703	20	0,494				ok
105	OAR20_49840203	20	<0,4 (eliminado)				
106	s53672	20	0,454				ok
107	OAR21_28570553	21	0,477				ok
108	s56586	21	<0,4 (eliminado)				
109	OAR21_37069978	21	<0,4 (eliminado)				
110	s66083	21	0,471				ok
111	OAR22_24300913	22	0,471				ok
112	s19752	22	0,494				ok
113	OAR23_24059095	23	0,443				ok
114	s35293	23	<0,4 (eliminado)				
115	s25094	24	0,437				ok
116	s37634	24	0,460				ok
117	DU512685_259	25	0,477				ok
118	OAR25_34706036	25	0,466				ok
119	OAR26_21211648	26	0,477				ok
120	OAR26_40381225	26	0,500				ok
121	s12967	26	<0,4 (eliminado)				
122	s75780	27	0,443				ok
123	s05229	27	0,455	P < 0,01			ok
<b>TOTAL SELECIONADO</b>							<b>71</b>

**Tabela 2.** Segunda triagem, realizada a partir de 71 marcadores selecionados de acordo com os critérios estabelecidos na Tabela 1. Foram considerados três painéis de acordo com o número de locos ligados nas estimativas de desequilíbrio de ligação (DL): marcadores com até 9 locos ligados (~12,5% de locos ligados/loco), 7 locos ligados (~10%) e 5 locos ligados (~7,5%).

No.	Loco	Cromossomo	2a. Seleção (% locos ligados/loco)		
			DL < 12,5%	DL < 10%	DL < 7,5%
1	OAR1_23734999.1	1	ok		
2	OAR1_61493280.1	1			
3	OAR1_88092654.1	1	ok	ok	
4	OAR1_148726685.1	1	ok		
5	OAR1_170034165.1	1	ok	ok	ok
6	OAR1_241598383.1	1	ok	ok	ok
7	OAR1_263131531.1	1	ok		
8	s16234.1	2	ok	ok	ok
9	OAR2_116945286.1	2	ok	ok	
10	s71929.1	2			
11	OAR2_165344428.1	2	ok	ok	ok
12	OAR2_206338195.1	2	ok	ok	
13	s15714.1	2	ok	ok	ok
14	s69717.1	3	ok	ok	ok
15	s69310.1	3			
16	OAR3_84188031.1	3	ok	ok	
17	OAR3_132066295.1	3	ok	ok	
18	OAR3_179063841.1	3	ok	ok	
19	OAR4_11240022.1	4			
20	s00373.1	4			
21	OAR4_91739253.1	4	ok	ok	ok
22	s37700.1	4	ok	ok	ok
23	OAR5_26459986.1	5	ok	ok	ok
24	s03876.1	5	ok		
25	OAR5_111606992.1	5	ok	ok	ok
26	OAR6_48792023.1	6	ok	ok	
27	OAR6_68532683.1	6	ok		
28	OAR6_95930760.1	6	ok	ok	
29	s71297.1	6	ok	ok	
30	OAR7_1224949.1	7	ok	ok	
31	s60649.1	7	ok	ok	ok
32	OAR8_4035646.1	8	ok		
33	OAR8_32459191.1	8	ok	ok	ok
34	OAR9_48204690.1	9	ok	ok	ok
35	OAR9_80918118.1	9	ok	ok	ok

continua

**Tabela 2.** Segunda triagem, realizada a partir de 71 marcadores selecionados de acordo com os critérios estabelecidos na Tabela 1. Foram considerados três painéis de acordo com o número de locos ligados nas estimativas de desequilíbrio de ligação (DL): marcadores com até 9 locos ligados (~12,5% de locos ligados/loco), 7 locos ligados (~10%) e 5 locos ligados (~7,5%) (**conclusão**).

No.	Loco	Cromossomo	2a. Seleção (% locos ligados/loco)		
			DL < 12,5%	DL < 10%	DL < 7,5%
36	OAR9_93048703.1	9	ok	ok	
37	OAR10_38586588.1	10	ok	ok	
38	OAR10_68005037.1	10	ok	ok	
39	OAR10_88932679.1	10	ok	ok	ok
40	OAR11_13817708.1	11	ok	ok	ok
41	OAR12_70188998.1	12	ok		
42	s07776.1	13			
43	OAR13_48889355.1	13	ok	ok	ok
44	OAR13_81471049.1	13	ok	ok	
45	s02515.1	14	ok	ok	ok
46	s42929.1	14	ok		
47	s33503.1	15	ok		
48	OAR15_58590296.1	15	ok	ok	ok
49	OAR16_35656302.1	16	ok	ok	ok
50	OAR16_62197518.1	16	ok	ok	ok
51	OAR17_2443477.1	17	ok	ok	ok
52	OAR17_37705408.1	17	ok	ok	ok
53	s23373.1	18	ok	ok	ok
54	DU396708_413.1	18			
55	s25497.1	19	ok	ok	ok
56	s72304.1	19			
57	OAR20_37979703.1	20	ok	ok	ok
58	s53672.1	20	ok	ok	ok
59	OAR21_28570553.1	21	ok	ok	ok
60	s66083.1	21	ok	ok	
61	OAR22_24300913.1	22	ok	ok	
62	s19752.1	22	ok		
63	OAR23_24059095.1	23	ok	ok	ok
64	s25094.1	24	ok		
65	s37634.1	24	ok		
66	DU512685_259.1	25	ok	ok	ok
67	OAR25_34706036.1	25	ok	ok	
68	OAR26_21211648.1	26	ok	ok	ok
69	OAR26_40381225.1	26	ok	ok	ok
70	s75780.1	27	ok	ok	ok
71	s05229.1	27	ok	ok	ok
<b>TOTAL SELECIONADO</b>			<b>63</b>	<b>51</b>	<b>34</b>

**Tabela 3.** Terceira triagem, realizada a partir de 63 marcadores selecionados de acordo com os critérios estabelecidos na Tabela 2. Foram considerados três painéis de acordo com o número de locos ligados nas estimativas de desequilíbrio de ligação (DL = 12,5, 10 e 7,5%) e com o sucesso das genotipagens acima de 90% para cada loco.

No.	Locus_Name	Cromossomo	3ª. Seleção (Genotipagem definida > 90%)		
			Painel A	Painel B	Painel C
1	OAR1_23734999.1	1	ok		
2	OAR1_88092654.1	1	ok	ok	
3	OAR1_148726685.1	1	ok		
4	OAR1_170034165.1	1	ok	ok	ok
5	OAR1_241598383.1	1	ok	ok	ok
6	OAR1_263131531.1	1	ok		
7	s16234.1	2	ok	ok	ok
8	OAR2_116945286.1	2	ok	ok	
9	OAR2_165344428.1	2	ok	ok	ok
10	OAR2_206338195.1	2			
11	s15714.1	2			
12	s69717.1	3	ok	ok	ok
13	OAR3_84188031.1	3			
14	OAR3_132066295.1	3	ok	ok	
15	OAR3_179063841.1	3	ok	ok	
16	OAR4_91739253.1	4	ok	ok	ok
17	s37700.1	4			
18	OAR5_26459986.1	5	ok	ok	ok
19	s03876.1	5	ok		
20	OAR5_111606992.1	5			
21	OAR6_48792023.1	6	ok	ok	
22	OAR6_68532683.1	6	ok		
23	OAR6_95930760.1	6			
24	s71297.1	6			
25	OAR7_1224949.1	7			
26	s60649.1	7	ok	ok	ok
27	OAR8_4035646.1	8	ok		
28	OAR8_32459191.1	8	ok	ok	ok
29	OAR9_48204690.1	9	ok	ok	ok
30	OAR9_80918118.1	9	ok	ok	ok
31	OAR9_93048703.1	9	ok	ok	
32	OAR10_38586588.1	10	ok	ok	
33	OAR10_68005037.1	10	ok	ok	
34	OAR10_88932679.1	10	ok	ok	ok
35	OAR11_13817708.1	11			

continua

**Tabela 3.** Terceira triagem, realizada a partir de 63 marcadores selecionados de acordo com os critérios estabelecidos na Tabela 2. Foram considerados três painéis de acordo com o número de locos ligados nas estimativas de desequilíbrio de ligação (DL = 12,5, 10 e 7,5%) e com o sucesso das genotipagens acima de 90% para cada loco (**conclusão**).

No.	Locus Name	Cromossomo	3 <sup>a</sup> . Seleção (Genotipagem definida > 90%)		
			Painel A	Painel B	Painel C
36	OAR12_70188998.1	12			
37	OAR13_48889355.1	13			
38	OAR13_81471049.1	13	ok	ok	
39	s02515.1	14			
40	s42929.1	14	ok		
41	s33503.1	15	ok		
42	OAR15_58590296.1	15	ok	ok	ok
43	OAR16_35656302.1	16	ok	ok	ok
44	OAR16_62197518.1	16	ok	ok	ok
45	OAR17_2443477.1	17	ok	ok	ok
46	OAR17_37705408.1	17			
47	s23373.1	18	ok	ok	ok
48	s25497.1	19	ok	ok	ok
49	OAR20_37979703.1	20	ok	ok	ok
50	s53672.1	20			
51	OAR21_28570553.1	21	ok	ok	ok
52	s66083.1	21	ok	ok	
53	OAR22_24300913.1	22	ok	ok	
54	s19752.1	22	ok		
55	OAR23_24059095.1	23	ok	ok	ok
56	s25094.1	24	ok		
57	s37634.1	24			
58	DU512685_259.1	25	ok	ok	ok
59	OAR25_34706036.1	25	ok	ok	
60	OAR26_21211648.1	26			
61	OAR26_40381225.1	26	ok	ok	ok
62	s75780.1	27			
63	s05229.1	27	ok	ok	ok
<b>TOTAL SELECIONADOS</b>			<b>46</b>	<b>36</b>	<b>24</b>

Os marcadores incluídos no teste de paternidade mostraram valores distintos de probabilidades de exclusão e identidade de acordo com o tamanho do painel considerado. As probabilidades combinadas de exclusão e identidade de todos os marcadores foram calculadas para os quatro painéis distintos sugeridos de acordo com os critérios de desequilíbrio de ligação e desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5). Probabilidades combinadas acima de 99% para P1 (Probabilidade de Exclusão para apenas um progenitor) e P2 (Probabilidade de exclusão sendo dado o genótipo de um dos progenitores) foram obtidas apenas nas análises do painel de 46 SNPs (Painel A). O painel de 36 SNPs (Painel B) apresentou probabilidade de exclusão acima de 99% apenas para P2, bem como o painel de 27 marcadores. O painel definido com 24 marcadores (Painel C) mostrou valores abaixo dos 99% para ambas as estimativas. O Painel D mostrou-se melhor que o Painel C, em todas as estimativas (Tabela 5).

No programa GENALEX todos os 46 marcadores foram testados para a determinação da quantidade mínima de marcadores para se atingir poder de exclusão superior a 99%. Os resultados indicaram que 29 SNPs são necessários para resolver a paternidade em casos onde é possível obter o genótipo da mãe, da progênie e do provável pai (probabilidade de 99%). Quando se conhece somente o genótipo do provável pai e da progênie, são necessários mais do que os 46 marcadores desse mesmo painel para atingir a probabilidade de 99% de exclusão de paternidade (Figura 1). Porém, o painel completo com 46 marcadores atingiu a probabilidade de 98%.

#### *2.5.1.2 Análise de Paternidade*

Os testes de paternidade realizados aferiram um suposto pai à maioria dos produtos, porém em alguns casos a paternidade não foi resolvida pelos marcadores SNPs. Os melhores resultados foram obtidos pelo Painel A, que apresentou maior número de marcadores ( $n = 46$ ), juntamente com o painel Painel D (Tabela 6). Ambos tiveram sucesso na atribuição de 79% dos pais (49 casos), de acordo com as informações fornecidas pelo CPPSUL (ver final da Tabela 6). Porém, no Painel A observou-se nove casos não resolvidos e quatro atribuições diferentes daquelas informadas pelo CPPSUL, enquanto o painel B apresentou seis casos não resolvidos e sete atribuições diferentes das informadas.

Ainda nesses painéis, foram observados 9,6% de casos sem paternidade atribuída e 11,4% de casos de atribuições diferentes daquelas informadas pelo CPPSUL.

Resultados ligeiramente inferiores foram obtidos com o painel DL < 10% (painel B), com 77% de identificações positivas (48 casos), e DL < 7,5% (painel C), com 76% (47 casos) (Tabela 6). O painel C destacou-se pelo menor número de casos não identificados (apenas três), mas mostrou o maior índice de atribuições diferentes das informadas nos registros genealógicos (12 casos).

Apesar dos critérios de seleção de marcadores adotados terem reduzidos demasiadamente o tamanho dos painéis testados, nota-se a importância desta avaliação para se evitar problemas como a presença de locos em desacordo (*mismatching loci*) entre progenitor e progênie. Todos os testes realizados mostraram ausência de locos nestas condições (Tabela 6).

As valores médios de LOD score obtidos foram superiores para o painel A, porém todos os outros painéis mostraram valores médios dentro da mesma magnitude ( $10^4$ ) (Tabela 6). Observa-se também que nos casos onde a paternidade foi identificada, os níveis de confiança mostraram-se superiores a 95% na maioria dos casos (Tabela 6). Assim, embora em pequeno número, nota-se que os marcadores selecionados apresentam qualidade de informação.

**Tabela 4.** Estimativas de diversidade independentes para 46 locos selecionados para os testes de paternidade para todo o conjunto de animais testados (n=71). (A, número de alelos observado; HObs, heterozigosidade observada; HExp, heterozigosidade esperada; PIC, conteúdo de informação polimórfica; NE-1P, probabilidade média de não-exclusão para um pai candidato; NE-2P, probabilidade média de não-exclusão para um pai candidato dado o genótipo de um pai conhecido do sexo oposto; NE-I, probabilidade média de não-exclusão para a identidade de dois indivíduos não relacionados; NE-SI, probabilidade média de não-exclusão para a identidade de dois irmãos; significância para o desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg: \*significante ao nível de 0.05; \*\*significante ao nível de 0.01; \*\*\*significante ao nível de 0.001%; NR, não realizado; F(null) probabilidade de ocorrência de alelos nulos).

Loco	A	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
OAR6_48792023	2	0,192	0,491	0,37	0,88	0,815	0,722	0,381	0,6	***	0,4357
OAR16_35656302	2	0,341	0,43	0,337	0,908	0,832	0,742	0,418	0,64	NS	0,1142
s33503	2	0,373	0,493	0,37	0,879	0,815	0,722	0,38	0,599	NS	0,1364
s69717	2	0,541	0,498	0,373	0,877	0,813	0,72	0,377	0,596	NS	-0,0431
OAR26_40381225	2	0,496	0,501	0,375	0,875	0,813	0,719	0,375	0,594	NS	0,0033
OAR9_80918118	2	0,415	0,33	0,275	0,946	0,863	0,78	0,505	0,712	NS	-0,1145
OAR1_263131531	2	0,519	0,501	0,375	0,875	0,813	0,719	0,375	0,594	NS	-0,0189
OAR1_170034165	2	0,489	0,5	0,374	0,876	0,813	0,719	0,376	0,595	NS	0,009
OAR1_148726685	2	0,096	0,092	0,087	0,996	0,956	0,918	0,829	0,911	NR	-0,0155
OAR1_241598383	2	0,203	0,262	0,227	0,966	0,887	0,811	0,58	0,765	NR	0,1245
OAR6_68532683	2	0,244	0,237	0,209	0,972	0,896	0,823	0,611	0,784	NR	-0,0165
OAR9_48204690	2	0,627	0,47	0,358	0,891	0,821	0,729	0,393	0,614	**	-0,1453
OAR10_38586588	2	0,328	0,38	0,307	0,928	0,847	0,76	0,458	0,675	NS	0,0712
OAR8_4035646	2	0,400	0,464	0,356	0,893	0,822	0,731	0,396	0,618	NS	0,0724
s60649	2	0,578	0,499	0,373	0,877	0,813	0,72	0,377	0,596	NS	-0,0755
s42929	2	0,467	0,474	0,361	0,889	0,82	0,728	0,39	0,612	NS	0,0056
OAR10_88932679	2	0,289	0,289	0,246	0,959	0,877	0,798	0,549	0,743	NR	-0,0023
OAR17_2443477	2	0,215	0,396	0,317	0,922	0,842	0,754	0,444	0,664	***	0,2949
OAR8_32459191	2	0,570	0,453	0,35	0,898	0,825	0,734	0,403	0,625	NS	-0,1162
OAR16_62197518	2	0,276	0,423	0,333	0,911	0,834	0,744	0,423	0,645	**	0,2087

Continua

**Tabela 4.** Estimativas de diversidade independentes para 46 locos selecionados para os testes de paternidade para todo o conjunto de animais testados (n=71). (A, número de alelos observado; HObs, heterozigosidade observada; HExp, heterozigosidade esperada; PIC, conteúdo de informação polimórfica; NE-1P, probabilidade média de não-exclusão para um pai candidato; NE-2P, probabilidade média de não-exclusão para um pai candidato dado o genótipo de um pai conhecido do sexo oposto; NE-I, probabilidade média de não-exclusão para a identidade de dois indivíduos não relacionados; NE-SI, probabilidade média de não-exclusão para a identidade de dois irmãos; significância para o desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg: \*significante ao nível de 0.05; \*\*significante ao nível de 0.01; \*\*\*significante ao nível de 0.001%; NR, não realizado; F(null) probabilidade de ocorrência de alelos nulos) (**continuação**).

Loco	A	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
s23373	2	0,333	0,367	0,299	0,933	0,851	0,765	0,469	0,685		0,0461
OAR1_88092654	2	0,504	0,479	0,363	0,886	0,818	0,726	0,387	0,608		-0,0273
s19752	2	0,652	0,482	0,365	0,885	0,818	0,725	0,386	0,606	**	-0,1518
OAR3_179063841	2	0,370	0,496	0,372	0,878	0,814	0,721	0,378	0,598		0,1429
s25497	2	0,059	0,058	0,056	0,998	0,972	0,946	0,89	0,944	NR	-0,0068
OAR4_91739253	2	0,274	0,248	0,217	0,969	0,892	0,818	0,597	0,776	NR	-0,0516
OAR13_81471049	2	0,511	0,499	0,374	0,876	0,813	0,72	0,376	0,595		-0,0137
OAR25_34706036	2	0,533	0,464	0,356	0,893	0,822	0,731	0,396	0,618		-0,0712
OAR20_37979703	2	0,291	0,497	0,373	0,877	0,814	0,72	0,377	0,597	***	0,2597
OAR23_24059095	2	0,319	0,289	0,246	0,959	0,877	0,798	0,549	0,743	NR	-0,0511
DU512685_259	2	0,341	0,482	0,365	0,885	0,818	0,725	0,386	0,606	*	0,1697
s16234	2	0,318	0,391	0,314	0,924	0,843	0,756	0,448	0,667		0,101
OAR3_132066295	2	0,407	0,483	0,366	0,884	0,817	0,725	0,385	0,605		0,0833
OAR22_24300913	2	0,341	0,501	0,375	0,875	0,813	0,719	0,375	0,594	*	0,1888
OAR2_165344428	2	0,541	0,501	0,375	0,875	0,813	0,719	0,375	0,594		-0,0396
OAR1_23734999	2	0,659	0,496	0,372	0,878	0,814	0,72	0,378	0,597	*	-0,1427
OAR9_93048703	2	0,496	0,491	0,369	0,88	0,815	0,722	0,381	0,601		-0,0074
s25094	2	0,178	0,321	0,269	0,949	0,866	0,783	0,514	0,718	***	0,2857
OAR21_28570553	2	0,358	0,488	0,368	0,882	0,816	0,723	0,382	0,602		0,1519

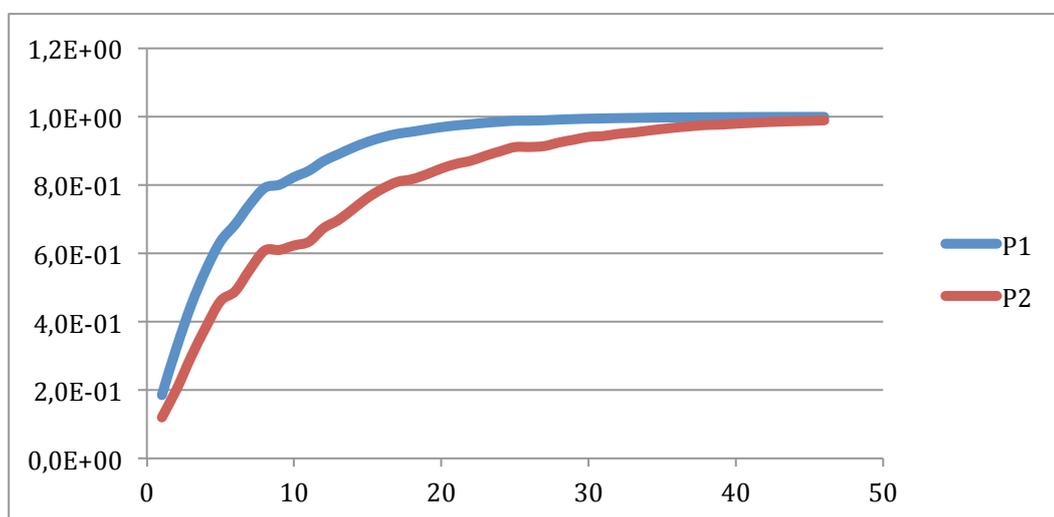
continua

**Tabela 4.** Estimativas de diversidade independentes para 46 locos selecionados para os testes de paternidade para todo o conjunto de animais testados (n=71). (A, número de alelos observado; HObs, heterozigidade observada; HExp, heterozigidade esperada; PIC, conteúdo de informação polimórfica; NE-1P, probabilidade média de não-exclusão para um pai candidato; NE-2P, probabilidade média de não-exclusão para um pai candidato dado o genótipo de um pai conhecido do sexo oposto; NE-I, probabilidade média de não-exclusão para a identidade de dois indivíduos não relacionados; NE-SI, probabilidade média de não-exclusão para a identidade de dois irmãos; significância para o desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg: \*significante ao nível de 0.05; \*\*significante ao nível de 0.01; \*\*\*significante ao nível de 0.001%; NR, não realizado; F(null) probabilidade de ocorrência de alelos nulos) (**conclusão**).

<b>Loco</b>	<b>A</b>	<b>HObs</b>	<b>HExp</b>	<b>PIC</b>	<b>NE-1P</b>	<b>NE-2P</b>	<b>NE-PP</b>	<b>NE-I</b>	<b>NE-SI</b>	<b>HW</b>	<b>F(Null)</b>
OAR2_116945286	2	0,496	0,458	0,352	0,896	0,824	0,733	0,4	0,622		-0,0422
s66083	2	0,296	0,501	0,374	0,876	0,813	0,719	0,376	0,595	***	0,2546
s03876	2	0,341	0,464	0,356	0,893	0,822	0,731	0,396	0,618		0,1515
OAR5_26459986	2	0,319	0,409	0,325	0,917	0,838	0,749	0,434	0,655		0,1228
s05229	2	0,348	0,396	0,317	0,922	0,842	0,754	0,444	0,664		0,0625
OAR15_58590296	2	0,348	0,502	0,375	0,875	0,813	0,719	0,375	0,594	*	0,179
OAR10_68005037	2	0,553	0,489	0,369	0,881	0,816	0,723	0,382	0,602		-0,0631
<b>MÉDIA</b>	<b>2</b>	<b>0,388</b>	<b>0,423</b>	<b>0,327</b>	<b>0,906</b>	<b>0,837</b>	<b>0,750</b>	<b>0,441</b>	<b>0,650</b>		

**Tabela 5.** Estimativas de probabilidades combinadas para quatro painéis de SNPs. (P1 – Probabilidade de Exclusão para apenas um progenitor; P2 – Probabilidade de exclusão sendo dado o genótipo de um dos progenitores; PI – probabilidade de identidade; DL – desequilíbrio de ligação; HWE – desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg). Foi ainda calculada a taxa esperada de insucesso (IS) nas atribuições de paternidade dos dados fornecidos, realizada nas simulações de uma prole com N = 100 mil indivíduos.

	<b>Painel A (46 SNPs) DL &lt; 12,5%</b>	<b>Painel B (36 SNPs) DL &lt; 10%</b>	<b>Painel C (24 SNPs) DL &lt; 7,5%</b>	<b>Painel D (27 SNPs) HWE p&gt;0,5</b>
<b>P1</b>	0,99077	0,97627	0,88827	0,95149
<b>P2</b>	0,99978	0,99880	0,98404	0,99462
<b>PI</b>	6,09E-18	1,84E-14	3,71E-09	1,93E-11
<b>IS</b>	83 (0,08%)	120 (0,12%)	623 (0,62%)	220 (0,22%)



**Figura 1.** Quantidade mínima de marcadores para a atribuir a paternidade em casos onde é possível obter o genótipo da mãe (P1 → 99% com 31 marcadores) e quando se conhece somente o genótipo do provável pai e da progênie (P2 → 98% com todos os 46 marcadores).

**Tabela 6.** Teste de paternidade para identificação dos pais candidatos mais prováveis para a prole de animais nascidos em 2010 (total de 62 produtos) utilizando quatro diferentes painéis: A: 46 marcadores definidos após exclusão de locos com desequilíbrio de ligação (DL) > 12,5%; B: 36 marcadores definidos após exclusão de locos com DL > 10%; C: 24 marcadores definidos após exclusão de locos com DL > 7,5%; D: 27 marcadores definidos após exclusão de locos com desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg. (N.E. – pais não encontrados; \* identificação com nível de confiança acima de 95%; + identificação com nível de confiança acima de 85%).

Produto/ Pai informado	Resultado suposto pai/painel				Atribuições Corretas/painel				Locos Comparados				Locos em desacordo				LOD Score (Confidência)							
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
3067/2809	2809	2809	2809	2809	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	9,52E+14	*	7,85E+14	*	3,65E+14	+	4,54E+14	*
3068/2809	2809	2809	2809	2809	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	9,20E+14	*	7,01E+14	*	1,73E+14	+	5,20E+14	*
3070/2896	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.																				
3075/2789	2789	2789	2789	2789	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	4,03E+14	*	2,05E+14		1,24E+14		1,19E+14	
3078/2896	2789	2789	2789	2789					46	36	24	27	0	0	0	0	6,47E+14	*	3,97E+14	*	1,54E+14	+	3,51E+14	*
3083/2809	2809	2809	2809	2809	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	8,77E+14	*	7,59E+14	*	4,09E+14	*	5,28E+14	*
3084/2809	2809	2809	2809	2809	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	1,00E+15	*	8,43E+14	*	4,24E+14	*	4,83E+14	*
3086/2809	2809	2809	2809	2809	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	1,04E+15	*	7,51E+14	*	3,10E+14		6,20E+14	*
3088/2789	2789	2789	2789	2789	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	9,25E+14	*	6,18E+14	*	3,14E+14	*	7,13E+14	*
3089/2809	N.E.	N.E.	2721	2858							24	27			0	0					2,18E+14	+	-6,29E+13	+
3092/2858	2858	2858	2646	2858	OK	OK		OK	46	36	24	27	0	0	0	0	9,90E+14	*	6,38E+14	+	5,26E+14	+	5,96E+14	*
3093/2858	2858	2858	2858	2858	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	7,76E+14	*	4,83E+14	*	2,49E+14	+	3,17E+14	+
3094/2789	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.																				
3095/2789	2789	2789	2789	2789	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	6,43E+14	*	5,84E+14	*	3,80E+14	*	4,01E+14	*
3096/2858	2858	2858	2858	2858	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	6,03E+14	*	5,39E+14	*	3,11E+14	*	3,38E+14	*
3098/2789	2789	2789	2789	2789	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	7,11E+14	*	4,76E+14	*	2,51E+14		4,01E+14	*
3099/2789	2789	2789	2789	2789	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	7,83E+14	*	6,02E+14	*	4,72E+14	*	6,39E+14	*
3101/2809	2809	2809	2809	2809	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	5,93E+14	*	5,16E+14	*	2,36E+14		2,84E+14	*
3103/2809	N.E.	N.E.	2863	N.E.							24				0						4,13E+14	*		

continua

**Tabela 6.** Teste de paternidade para identificação dos pais candidatos mais prováveis para a prole de animais nascidos em 2010 (total de 62 produtos) utilizando quatro diferentes painéis: A: 46 marcadores definidos após exclusão de locos com desequilíbrio de ligação (DL) > 12,5%; B: 36 marcadores definidos após exclusão de locos com DL > 10%; C: 24 marcadores definidos após exclusão de locos com DL > 7,5%; D: 27 marcadores definidos após exclusão de locos com desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg. (N.E. – pais não encontrados; \* identificação com nível de confiança acima de 95%; + identificação com nível de confiança acima de 85%) (continuação).

Produto/ Pai informado	Resultado suposto pai/painel				Atribuições Corretas/painel				Locos Comparados				Locos em desacordo				LOD Score (Confidência)							
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
3104/2809	2809	2809	2809	2809	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	7,63E+14	*	6,79E+14	*	4,29E+14	*	3,42E+14	*
3105/2789	2789	2721	2855	2721	OK				46	36	24	27	0	0	0	0	6,04E+13		1,62E+14	*	7,58E+13	+	1,43E+14	*
3107/2858	2858	2858	2858	2858	OK	OK	OK	OK	46	36	23	27	0	0	0	0	6,93E+14	*	4,27E+14	*	3,62E+14	*	2,63E+14	*
3108/2809	N.E.	N.E.	2809	2809			OK	OK			23	25			0	0					3,65E+14	*	2,86E+14	*
3112/2858	2858	2858	2858	2858	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	6,73E+14	*	4,97E+14	*	3,31E+14	+	4,55E+14	*
3113/2789	2789	2789	2789	2789	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	3,81E+14	*	2,37E+14	*	2,04E+14	*	2,84E+14	*
3115/2789	2789	2789	2789	2789	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	9,07E+14	*	6,73E+14	*	2,71E+14	*	7,60E+14	*
3116/2789	2789	2789	2789	2789	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	6,11E+14	*	4,99E+14	*	3,09E+14	*	3,19E+14	*
3117/2858	2858	2858	2858	2858	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	1,02E+15	*	6,15E+14		4,22E+14	+	5,79E+14	*
3118/2858	2858	2858	2858	2858	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	9,13E+14	*	5,95E+14	*	3,09E+14	+	4,57E+14	*
3121/2858	2858	2858	2858	2858	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	1,15E+15	*	9,02E+14	*	5,56E+14	*	6,51E+14	*
3122/2809	2809	2809	2809	2809	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	1,03E+15	*	8,60E+14	*	4,19E+14	*	4,34E+14	*
3124/2845	2845	2845	2845	2845	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	1,14E+15	*	8,33E+14	*	5,92E+14	*	7,71E+14	*
3125/2789	N.E.	N.E.	2646	N.E.							24				0						3,84E+14	+		
3126/2646	2646	2646	2646	2646	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	9,96E+14	*	8,07E+14	*	4,50E+14	+	5,42E+14	*
3127/2845	2845	2845	2896	2845	OK	OK		OK	46	36	24	27	0	0	0	0	6,18E+14	*	4,39E+14	*	6,36E+14	*	5,91E+14	*
3129/2855	2855	2855	2855	2855	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	1,14E+15	*	8,34E+14	*	5,77E+14	*	5,48E+14	*
3130/2845	2845	2845	2845	2845	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	8,77E+14	*	6,42E+14	*	3,95E+14	*	4,27E+14	*
3131/2845	2845	2845	2845	2845	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	1,05E+15	*	7,10E+14	*	5,39E+14	*	5,84E+14	*

continua

**Tabela 6.** Teste de paternidade para identificação dos pais candidatos mais prováveis para a prole de animais nascidos em 2010 (total de 62 produtos) utilizando quatro diferentes painéis: A: 46 marcadores definidos após exclusão de locos com desequilíbrio de ligação (DL) > 12,5%; B: 36 marcadores definidos após exclusão de locos com DL > 10%; C: 24 marcadores definidos após exclusão de locos com DL > 7,5%; D: 27 marcadores definidos após exclusão de locos com desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg (N.E. – pais não encontrados; \* identificação com nível de confiança acima de 95%; + identificação com nível de confiança acima de 85%). (continuação).

Produto/ Pai informado	Resultado suposto pai/painel				Atribuições Corretas/painel				Locos Comparados				Locos em desacordo				LOD Score (Confidência)							
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
3132/2845	2845	2845	2845	2845	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	7,79E+14	*	5,01E+14	*	2,87E+14	+	4,99E+14	*
3133/2721	2721	2721	2721	2721	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	1,06E+15	*	1,05E+15	*	7,16E+14	*	6,13E+14	*
3135/2845	2845	2845	2845	2845	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	6,34E+14	*	4,26E+14	+	1,63E+14	+	4,34E+14	*
3136/2646	2646	2646	2646	2646	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	1,17E+15	*	8,86E+14	*	4,69E+14	*	7,14E+14	*
3137/2646	N.E.	N.E.	2863	2863							24	27			0	0					2,13E+14	*	4,71E+14	*
3138/2845	N.E.	N.E.	2863	N.E.							24				0						3,92E+14	*		
3143/2896	2721	2721	2721	2721					46	36	24	27	0	0	0	0	9,77E+14	*	7,58E+14	*	5,46E+14	*	4,93E+14	*
3144/2855	2855	2855	2855	2855	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	1,08E+15	*	7,60E+14	*	5,66E+14	*	6,15E+14	*
3146/2721	2721	2721	2721	2721	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	1,02E+15	*	1,01E+15	*	7,03E+14	*	7,94E+14	*
3147/2721	2721	2721	2721	2721	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	9,76E+14	*	7,88E+14	*	5,55E+14	*	4,79E+14	*
3148/2863	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.																				
3149/2863	2863	2863	2863	2863	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	8,97E+14	*	6,59E+14	*	5,13E+14	*	4,14E+14	*
3151/2855	2855	2855	2855	2855	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	9,95E+14	*	7,51E+14	*	3,49E+14	*	5,77E+14	*
3152/2896	2896	2896	2896	2896	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	1,18E+15	*	1,05E+15	*	5,83E+14	*	7,48E+14	*
3153/2721	2721	2721	2721	2721	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	2,10E+14		1,30E+14	*	1,04E+14		1,64E+14	*
3154/2855	2855	2855	2855	2855	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	3,81E+14	*	4,49E+14	*	2,03E+14	*	1,86E+14	*
3155/2896	2858	2858	2858	2858					46	36	24	27	0	0	0	0	1,11E+14	*	1,44E+14	*	1,10E+14	+	-5,26E+13	
3157/2646	2646	2646	2646	2646	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	8,53E+14	*	7,34E+14	*	4,51E+14	+	5,95E+14	*

continua

**Tabela 6.** Teste de paternidade para identificação dos pais candidatos mais prováveis para a prole de animais nascidos em 2010 (total de 62 produtos) utilizando quatro diferentes painéis: A: 46 marcadores definidos após exclusão de locos com desequilíbrio de ligação (DL) > 12,5%; B: 36 marcadores definidos após exclusão de locos com DL > 10%; C: 24 marcadores definidos após exclusão de locos com DL > 7,5%; D: 27 marcadores definidos após exclusão de locos com desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg. (N.E. – pais não encontrados; \* identificação com nível de confiança acima de 95%; + identificação com nível de confiança acima de 85%). **(conclusão).**

Produto/ Pai informado	Resultado suposto pai/painel				Atribuições Corretas/painel				Locos Comparados				Locos em desacordo				LOD Score (Confidência)							
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
3158/2863	2863	2863	2863	2863	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	8,01E+14	*	5,22E+14	*	4,14E+14	*	3,43E+14	*
3159/2721	2721	2721	2721	2721	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	8,22E+14	*	7,41E+14	*	5,32E+14	+	5,59E+14	*
3160/2721	2721	2721	2721	2721	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	5,52E+14	*	5,41E+14	*	4,39E+14	*	2,43E+14	
3161/2721	2721	2721	2721	2721	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	7,51E+14	*	6,70E+14	*	2,33E+14		5,11E+14	*
3162/2863	2721	2721	2721	2721					46	36	24	27	0	0	0	0	8,16E+14	*	6,73E+14	*	5,20E+14	*	4,82E+14	*
3163/2646	2646	2646	2646	2646	OK	OK	OK	OK	46	36	24	27	0	0	0	0	8,91E+14	*	7,79E+14	*	4,79E+14	*	5,62E+14	*
<b>Acertos</b>					<b>79%</b>	<b>77%</b>	<b>76%</b>	<b>79%</b>									<b>8,09E+14</b>		<b>6,29E+14</b>		<b>3,81E+14</b>		<b>4,57E+14</b>	

### 2.5.2. Discussão

Um painel de SNPs adequado pode apresentar poder de resolução igual ou superior a um painel de microssatélites. Hauser *et al.* (2011), compararam um painel de 80 SNPs com 11 marcadores microssatélites (contendo 192 alelos) para a identificação de paternidade em salmão e evidenciaram maior acurácia nos SNPs. O principal requisito para a utilização dos marcadores SNP em análise de paternidade é a obtenção de um painel com marcadores que tenha poder suficiente para identificar com acurácia a progênie e seus respectivos progenitores dentro de populações onde a informação genealógica é escassa (HEATON *et al.*, 2002). Dentre os painéis avaliados no presente estudo, apenas o painel A (com 46 marcadores) conseguiu alcançar valores superiores aos 99% de probabilidade combinada de exclusão de paternidade nas análises. Este parâmetro mostrou estar diretamente relacionado com a quantidade de marcadores utilizados. Apesar das análises da quantidade mínima de marcadores necessária para se atingir probabilidade de exclusão de 99% mostradas no programa Genealex terem mostrado que 29 marcadores são suficientes, estes devem ser selecionados com cautela. Dentro dos 46 marcadores utilizados, observou-se que apenas 27 mostraram-se sem problemas com relação à ocorrência de desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estes desvios podem ser atribuídos não diretamente aos marcadores mas sim a algum possível processo que esteja levando ao aumento da endogamia da população amostrada, a alguma subdivisão da mesma ou, ainda, devido a processos de acasalamentos não aleatórios em decorrência da escolha de reprodutores específicos (MENEZES *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2012). Esta afirmação tem como base, o fato das 88 amostras primeiramente utilizadas do banco de dados de SNPs Hapmap ovino (raças Crioula, Morada Nova e Santa Inês) não terem mostrado esses desvios.

Os valores médios observados e esperados de heterozigosidade para os marcadores foram considerados dentro das expectativas, visto que os SNPs são marcadores bialélicos. Estes números foram comparados e mostraram-se semelhantes aos obtidos em trabalhos recentes que também tem utilizados os mesmos marcadores para análises de paternidade em animais de interesse econômico como bovinos (FISHER *et al.*, 2009; HARA *et al.*, 2010) e suínos (BALLESTER *et al.*, 2007). No entanto, aumentar o número de marcadores também leva um outro desafio: a proporção de SNPs fortemente ligados pode ser maior, gerando informações redundantes (SMOUSE, 2010). Assim, avaliar o desequilíbrio de ligação (LD) tem sido indicado como o primeiro passo antes de iniciar uma estimativa de parentesco (SANTURE *et al.*, 2010; ROLF *et al.*, 2010). Caso de desequilíbrio de ligação

foram observados em diferentes níveis ao longo do painel. Verificou-se, por exemplo, que embora o painel com menor número de marcadores tenha mostrado menor poder de resolução, este também é o que leva ao menor número de identificações falsas, já que o mesmo contou com menor número de marcadores em desequilíbrio de ligação.

Os marcadores analisados no presente estudo mostraram-se níveis consideráveis de polimorfismo. Valores de heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) para diversas raças de ovinos distribuídas pelo mundo foram estimados com marcadores SNPs (KIJAS *et al.*, 2012). Os resultados mostraram que valores acima de 0,3 podem representar um bom nível de polimorfismo para este tipo de marcador. Dos 46 marcadores utilizados no presente trabalho, 41 mostraram valores de  $H_e$  superiores a 0,3. Além disto, muitos destes evidenciaram valores que podem ser comparáveis até mesmo a aqueles obtidos por muitos locos de microssatélites (por volta de 0,5).

Os SNPs vem ganhando espaço por apresentar algumas vantagens frente aos microssatélites. Diversos trabalhos vem mostrando o poder de microssatélites altamente polimórficos para testes de paternidade, observando-se resultados altamente significativos (FISHER *et al.*, 2009; HARA *et al.*, 2010). Porém, um dos maiores desafios para a utilização do último é o fato de que nem sempre é possível se comparar dados gerados em laboratórios diferentes devido às inconsistências nos marcadores de comprimento de base (*ladders*). Além disto pode-se ainda observar variação nos comprimentos dos fragmentos gerados em decorrência da ação catalítica da enzima Taq polimerase, que pode adicionar bases extras na extremidade 3' dos fragmentos gerados. Esses tipos de erros não são encontrados quando as análises são feitas com SNPs. Outro ponto que conta negativamente para este marcador são os custos de genotipagem destes marcadores tem sido o maior fator limitante para aplica-los na prática (VIGNAL, 2002).

A utilização do painel de SNPs selecionados mostrou algumas limitações por questões do número total de marcadores, porém, a grande maioria dos casos de identificação se repetiram para qualquer um dos painéis testados, além do fato da maior parte das atribuições de paternidade terem sido realizadas com níveis de confiança  $\geq 95$ . Também vale não descartar completamente a hipótese de erro humano durante o processo de anotação do registro genealógico.

Seria necessário, portanto, que os mais testes fossem realizados, tentando, inclusive, melhorar o sucesso das genotipagens, já que dos 71 marcadores inicialmente selecionados, 18 foram eliminados por não apresentarem qualidade de genotipagem. Em todo caso, outros fatores que podem levar a erros de atribuição de paternidade podem estar

relacionados com erros no próprio processo de genotipagem, devido a presença de mutações ou, ainda, em decorrência da presença de alelos nulos. Estes tipos de erros podem levar a não exclusão de uma falsa paternidade ou então, a rejeição de uma verdadeira (WELLER *et al.*, 2004).

A utilidade dos marcadores selecionados pôde também ser avaliada com os valores de LOD score. De acordo com Marshal *et al.* (1998) LOD score indicaria que o pai/mãe são candidatos fortes à paternidade. Hill *et al.* (2008) ainda estima que LOD scores com valores maiores que 5 podem ser considerados como uma evidência de que a paternidade foi identificada. Porém, vale ressaltar que o número reduzido de marcadores também pode reduzir o poder de resolução das análises.

Embora muitos SNPs sejam necessários para se alcançar o mesmo nível de precisão dos microssatélites para a identificação de paternidade, o desenvolvimento de novas tecnologias de genotipagem em larga escala e a redução dos seus custos tem levado os SNPs a se tornarem os principais marcadores moleculares da atualidade. Seu alto potencial de automação tem possibilitado a realização do estudo em larga escala para que dados originados de laboratórios situados em diferentes partes do mundo possam gerar dados independentemente e, posteriormente, compará-los (KIJAS *et al.*, 2012). Sua natureza bialélica, que pode ser considerada uma desvantagem, pode transformar-se em uma de suas principais vantagens em decorrência da redução da taxa de erro nas análises laboratoriais. Assim, apesar de ainda estar em fase de aperfeiçoamento, este marcador vem sendo utilizado para este tipo de análise (HEATON *et al.*, 2002). Mesmo com os resultados do presente estudo não identificando 100% dos progenitores, as informações obtidas fornecem recursos para o planejamento de cruzamentos mais tecnificados, visando o melhoramento dos animais em questão e evitando o aumento da endogamia e a perda de alelos dos mesmos.

## 2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, E.C.; GARZA, J.C. The Power of Single-Nucleotide Polymorphisms for Large-Scale Parentage Inference. **Genetics** v. 172, p. 2567–2582, 2006.
- ARRUGA, M.V.; MONTEAGUDO, L.V.; TEJEDOR, M.T.; BARRAO, R.; PONZ, R. Analysis of microsatellites and paternity testing in Rasa Aragonesa sheep. **Research in Veterinary Science**, 70, 271-273, 2001.
- BALLESTER, M; MERCADE, A.; VAN HAANDEL, B.; SANTAMARTINA, J; SANCHEZ, A. Individual identification and genetic traceability in the pig using the SNPlex™ genotyping system. **Animal Genetics**, v. 38, p. 662–666, 2007.
- CUNNINGHAM, E.P.; MEGHEN, C.M. Biological Identification Systems: genetic markers. **Rev Sci Tech Off Int Epiz**, v. 20, n. 2, p. 491-499, 2001.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**. v. 10, p. 564-567, 2010.
- FISHER, P.J. ; MALTHUS, B. ; WALKER, M.C. ; CORBETT, G. ; SPELMAN, R.J. The number of single nucleotide polymorphisms and on-farm data required for whole-herd parentage testing in dairy cattle herds. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 369-374, 2009.
- HARA, K. ; WATANABE, S. ; MUKAI, H. ; MANNEN, H. Development of SNP markers for individual identification and parentage test in a Japanese Black cattle population. **Journal of animal Science**, v. 81, p. 152-157, 2010.
- HAUSER, L. ; BAIRD, M. ; HILBORN, R. ; SEEB, L.W. ; SEEB, J.E. An empirical comparison of SNPs and 1 microsatellites for 2 parentage and kinship assignment in a wild sockeye salmon 3 (*Oncorhynchus nerka*) population. **Molecular Ecology Resources**, in press. 2011.
- HEATON, M.P. ; HARHAY G.P. ; BENNETT G.L. ; STONE R.T. ; GROSSE W.M. ; CASAS E. ; KEELE J.W. ; SMITH T.P.L. ; CHITKO-MCKOWN C.G. ; LAEGREID W.W. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in US beef cattle. **Mammalian Genome**, v. 13, p. 272–281, 2002.
- HILL, W.G. ; SALISBURG, B.A. ; WEBB, J.A. Parentage identification using single nucleotide polymorphism genotypes : Application to product tracing. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 2508-2517, 2008.
- JONES, A.G., SMALL, C.M., PACZOLT, K.A., ANDRATTERMAN, N.L. A practical guide to methods of parentage analysis. **Molecular Ecology Resources**. v. 10, p. 6–30, 2010
- KIJAS, J.W.; TOWNLEY D, DALRYMPLE BP, HEATON MP, MADDOX JF, *et al.* A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. **PLoS Biology**: v. 10, p. e1001258, 2012.
- MARSHALL, T.C. ; SLATE, J. ; KRUK, L.E.B. ; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for Likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639-655, 1998.

McMANUS, C. ; PAIVA, S.R. ; ARAUJO, R.O. Genetics and breeding of sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 236-246, 2010.

MENEZES, M.P.C.; MARTINEZ, A.M.; RIBEIRO, M.N.; PIMENTA-FILHO, E.C.; BERMEJO, J.V.D. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1336-1341, 2006.

PARISET, L. ; CAPPUCCIO, I. ; AJMONE-MARSAN, P. ; BRUFORD, M. ; DUNNER, S. ; CORTES, O. ; ERHARDT, G. ; PRINZENBERG, E.M. ; GUTSCHER, K. ; JOOST, S. ; PINTO-JUMA, G. ; NIJMAN, I.J. ; LENSTRA, J.A. ; PEREZ, T. ; VALENTINI, A. and ECONOGENE CONSORTIUM. Characterization of 37 Breed-Specific Single-Nucleotide Polymorphisms in Sheep. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 5, p. 531–534, 2006.

PEAKALL, R. ; SMOUSE, P.E. GENEALX 6 : Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.

ROLF, M.M. ; TAYLR, J.F. ; SCHNABEL, R.D. ; McKAY, S.D. ; McCLURE, M.C. ; NORTHUTT, S.L., KERLEY, M.S. ; WEABER, R.L. Impact of reduced marker set estimation of relationship matrices on genomic selection for feed efficiency in Angus cattle. **BMC Genetics**, v. 11, p. 24, 2010.

SAMBROOK, J., FRITSCH ,E.F. E MANIATIS, T. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York.

SANTURE, A.W.; STAPLEY, J.; BALL, A.D.; BIRKHEAD, T.R.; BURKE, T.; SLATE, J. On the use of large marker panels to estimate inbreeding and relatedness: empirical and simulation studies of a pedigree zebra finch population typed at 771 SNPs. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 1439-1451, 2010.

SMOUSE, P.E. How many SNPs are enough? **Molecular Ecology**, v. 19, p. 1265–1266, 2010.

SOUZA, C.A.; PAIVA, S.R.; McMANUS, C.M.; AZEVEDO, H.C.; MARIANTE, A.S.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Inês hair sheep in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, no prelo, 2012.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOLBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 275-305, 2002.

WELLER, J.I.; FELDMESSER, E.; GOLIK, M. *et al.* Factors affecting incorrect paternity assignment in the Israeli Holstein population. *Journal of Dairy Science*, v.87, n.8, p.2627-2640, 2004.

## **CAPÍTULO III**

### 3.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da demanda por alimentos é um dos principais efeitos do crescimento da população humana. Neste sentido, os setores produtivos vem cada vez mais se tornando dependentes de tecnologias para atender a esta demanda e, entre os diversos componentes do agronegócio, destaca-se o melhoramento genético como um dos que demanda tecnologia de ponta para ser mais efetivo. Entretanto, a idealização de um panorama onde apenas o incremento da produção se torna o objetivo, pode acarretar na acentuada erosão genética de raças/ tipos localmente adaptados. Entre estes, destacam-se os ovinos naturalizados no Brasil, que vem sendo progressivamente cruzados com raças especializadas consideradas mais produtivas.

Após a chegada das novas tecnologias de sequenciamento e genotipagem de grande escala, a utilização dos SNPs vem se mostrando uma alternativa viável para a realização dos trabalhos de avaliação genética. Porém, um dos requisitos para a utilização destes marcadores é que os mesmos tenham uma cobertura densa e um alto nível de polimorfismo dentro das populações testadas.

Assim, o presente estudo mostrou que estes marcadores podem ser considerados uma alternativa viável nestas análises frente a tecnologia tradicional de microssatélites. Porém, observou-se a necessidade de se aumentar o número de marcadores no painel utilizado para aumentar sua representatividade, visto que estes são bialélicos. Porém, mesmo não identificando 100% dos progenitores testados, as informações obtidas fornecem recursos para o planejamento de cruzamentos mais tecnificados e de menor custo, visando o melhoramento dos animais em questão e evitando o aumento da endogamia e a perda de alelos dos mesmos.