INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE E SEUS EFEITOS NO
MELHORAMENTO DE BOVINOS DA RAÇA GIR LEITEIRO

ERICA ELIAS BARON

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura “Luiz de
Queiroz”, Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração:
Ciência Animal e Pastagens

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Maio -2000

INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE E SEUS EFEITOS NO
MELHORAMENTO DE BOVINOS DA RAÇA GIR LEITEIRO

ERICA ELIAS BARON

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura “Luiz de
Queiroz”, Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração:
Ciência Animal e Pastagens

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Maio -2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – Campus “Luiz de Queiroz/USP”

Baron, Erica Elias

Investigação de paternidade e seus efeitos no melhoramento de bovinos da
raça gir leiteiro / Erica Elias Baron – Piracicaba, 2000.
50 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Bovino leiteiro 2. Gado gir 3. Melhoramento genético animal 4. Marcador
genético 5. Paternidade animal I. Título

“ Permitida a cópia total deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus familiares

E amigos

DEDICO

Ao Luiz

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Luiz L. Coutinho pela orientação técnica, disponibilidade e auxílio que me ajudaram na realização deste trabalho, bem como pela amizade nesses anos de convivência.
- Aos professores do Departamento de Produção Animal pelas instruções técnicas necessárias à realização desta dissertação.
- Aos amigos do laboratório pela amizade e ajuda quando esta foi necessária.
- Às secretárias do Departamento de Produção Animal pela disponibilidade e atenção.
- À ESALQ/USP por dar-me a oportunidade de realizar este curso de pós-graduação.
- À EMBRAPA, Centro de Gado de Leite pela extensa colaboração, principalmente os amigos do setor de melhoramento genético animal.
- Agradeço aos meus pais que sempre me apoiaram nos meus projetos.
- Agradeço aos meus familiares, sempre presentes inclusive nas horas difíceis.
- Agradeço aos amigos pelo estímulo e amizade.
- A todos que de forma direta ou indireta contribuíram de maneira relevante para a elaboração deste trabalho.
- À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos e reserva técnica.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE QUADROS	ix
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISAO DE LITERATURA	05
2.1 Teste de progênie	05
2.2 Verificação de parentesco	06
3. MATERIAL E MÉTODOS	09
3.1 Escolha dos animais e colheita de amostras	09
3.2 Extração de DNA de sangue	10
3.3 Extração de DNA de sémen	11
3.3.1 Quantificação de DNA em fluorímetro	12
3.4 Amplificação de DNA extraído dos “FTA cards”	13
3.5 Amplificação de DNA extraído de sémen	15
3.6 Visualização de gel de agarose	15
3.7 Preparação de sequenciador automático A.L.F. (<i>Pharmacia</i>) para leitura da amplificação	16
3.8 Comparação dos genótipos das famílias de pai e filhas	17
3.9 Avaliação genética	19
3.9.1 Avaliação da amostragem	20
4. RESULTADOS	22
4.1 Resultado das quantificações em flourímetro	22
4.2 Resultado em gel de agarose e poliacrilamida	23
4.3 Resultado dos genótipos para os seis marcadores microsatélites	27
4.4 Porcentagem de erro	31

4.5 Frequências alélicas	31
4.6 Probabilidades de exclusão (PE) e probabilidades de exclusão combinada (PEC)	32
4.7 Valores genéticos (VG) e capacidade prevista de transmissão (PTA)	34
4.8 Resultado da análise de correlação	37
4.9 Resultado do cálculo de amostragem	38
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Modelo de “FTA card” e “FTA Gene card” utilizados nas colheitas.	10
2 Gel com amplificação de amostras controles.	24
3 Gel de agarose com material de reação de PCR de DNA extraído de “FTA cards”.	24
4 Resultado de corrida em gel de sequenciador automático A.L.F. (Pharmacia), para o microssatélite BMS483, para touro 1 e progênies.	25
5 Resultado de corrida de gel de sequenciador automático A.L.F. (Pharmacia) para o microssatélite TEXAN15, para touro 1 e progênies.	26

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Resultados dos alelos para os seis microssatélites utilizados no teste de paternidade.	27
2 Frequências alélicas para os seis loci microssatélites.	31
3 Probabilidades de exclusão combinada para os nove touros e seis marcadores microssatélites.	33
4 Resultado da avaliação genética de touros, em valores genéticos.	34
5 Resultado da correlação de ordem dos valores genéticos dos touros nas duas avaliações.	37
6 Resultado de cálculo de amostragem.	38

INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE E SEUS EFEITOS NO MELHORAMENTO DE BOVINOS DA RAÇA GIR LEITEIRO

Autora: ERICA ELIAS BARON

Orientador: Prof. LUIZ LEHMANN COUTINHO

RESUMO

Com o aumento da produtividade na área agropecuária, houve um aumento na busca por sistemas de produção mais eficientes e competitivos. Neste contexto, o melhoramento genético animal tem proporcionado avanços na obtenção de produtos de origem animal, principalmente na seleção de touros.

A superioridade genética de touros para produção de leite não pode ser medida diretamente nos animais, assim, o valor genético é medido pelo desempenho de produção de leite de suas filhas pelo teste de progênie.

A seleção de touros pelo teste de progênie pode ser considerada como método ideal quando temos características de baixa herdabilidade, populações grandes e um grande número de progênies, que hoje são obtidas pelo uso de inseminação artificial.

O correto parentesco entre reprodutores é um pré-requisito para um eficiente programa de melhoramento genético animal. Muitas das questões de parentesco podem ser resolvidas pelos testes convencionais, como grupos sanguíneos e proteínas do soro. Entretanto em alguns casos, esses polimorfismos não são suficientes para esclarecer a correta paternidade e, em função disso outros métodos passaram a ser utilizados, como os marcadores moleculares microssatélites. Esta metodologia tem sido descrita para resolver com maior eficiência os casos de verificação e determinação de parentesco, inclusive em bovinos, devido ao alto polimorfismo que apresenta, aliado a resultados de clara interpretação.

Para a investigação de paternidade, foram utilizados os marcadores microssatélites BM8246, BMS963, CSFM50, INRA112. Foram verificadas as paternidades de nove touros da raça Gir leiteiro em teste de progênie, calculada a taxa de erro de paternidade e o efeito que esta teria na estimativa do valor genético dos touros. Foi verificado que das 74 filhas analisadas, houve exclusão para 27 delas, correspondendo a um erro de 36% na identificação de paternidade. No entanto, a mudança observada na classificação dos touros devido à correção das paternidades incorretas e consequente mudanças nos valores genéticos dos touros, não foi significativa quando as duas avaliações foram comparadas pelo método de correlação de Spearman.

PARENTAGE VERIFICATION AND ITS EFFECTS ON BREEDING IN GIR CATTLE

Author: ERICA ELIAS BARON

Adviser: Prof. LUIZ LEHMANN COUTINHO

SUMMARY

Increased production in agribusiness has intensified the search for more efficient and competitive production systems. In animal production, advances are achieved primarily through sire selection.

Genetic superiority of bulls for milk production cannot be directly measured in the animal; therefore, genetic value is measured by the milk production of its daughters by a progeny test.

Selection of bulls by the progeny test could be considered an ideal method when the following characteristics are present: low heritability, large productions and a large number of progenies. However, the method presents two drawbacks that limit its use: 1) high cost and 2) increase in generation intervals. Nevertheless, these obstacles can be overcome when a large number of progenies are obtained with artificial insemination (A.I.).

Correct relationship among sires is essential for an efficient animal-breeding program. Many questions about relationship can be solved by conventional tests, such as blood type and serum proteins. In some cases these polymorphisms are not enough for accurate results; consequently, other methods are used such as microsatellite molecular markers. This methodology has been described to determine and verify parentage including bovines with high efficiency due to its greater polymorphism and easily interpreted results.

Microsatellite markers BM8246, BMS963, TEXAN15, BMS483, CSFM50, INRA112 were used to investigate paternity. Paternity of nine Gir dairy sires participating in a progeny test was verified. The paternity error rate was calculated and its effect on estimation of the genetic value of the sires determined. Of the 74 daughters analyzed 27 were excluded, which corresponds to a 36% error in paternity identification. However, the change observed in bull classification due to correction of inaccurate paternity and consequent changes of genetic value of the sires was not significant when the two evaluations were compared by the correlation method of Spearman.

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de aumento da produtividade na agropecuária, aumenta consequentemente a busca por sistemas de produção mais eficientes e competitivos. Assim, a atividade pecuária de bovinocultura leiteira distancia-se do padrão extrativista, moldando-se em empresa agrícola. Neste raciocínio, o melhoramento tem se destacado como meio de selecionar animais geneticamente superiores, ou buscar a otimização do sistema produtivo por meio da interação genótipo-ambiente. Qualquer que seja a situação, o uso eficiente das ferramentas do melhoramento genético animal tornam-se necessárias.

Dessa forma, o melhoramento genético tem proporcionado avanços na obtenção de produtos de origem animal, principalmente pela seleção, cruzamentos entre raças, avaliação genética e orientação de acasalamentos entre animais com bom desempenho produtivo. O objetivo do melhoramento é o progresso genético de uma população, e esse caracteriza-se por animais bons produtores e adaptados ao meio, o que ocorre principalmente pela seleção de touros. A superioridade genética de touros para produção de leite, por exemplo, não pode ser medida diretamente, logo a avaliação genética é medida pelo desempenho de produção de suas filhas pelo teste de progênie. A seleção de touros pode ser considerada como método ideal, uma vez que por definição, o valor médio dos descendentes de um indivíduo-filho tende para o valor genético aditivo médio deste indivíduo-pai. Entretanto o método apresenta dois inconvenientes que limitam sua utilização: 1) custo elevado e 2) aumento do intervalo de gerações. No entanto, seleção para características com baixa herdabilidade (produção de leite, $h^2=0,25$) e características onde o controle no candidato é impossível, claramente justificam o teste de progênie (Oliveira, 1995).

O teste de progênie tem por função avaliar animais, que futuramente poderão ser utilizados com o objetivo de promover o melhoramento da raça pela utilização de animais geneticamente superiores. O teste está fundamentado na avaliação do touro por meio da informação obtida das progênies e de companheiras de rebanho, considerando-se também as informações de pedigree (Embrapa, 1997). Este pode envolver medidas de conformação e manejo, e suas relações com as características produtivas e reprodutivas, estudo de efeitos de fatores genéticos e de meio ambiente sobre estas características e a avaliação genética de vacas e touros.

Na análise do animal, são eliminados fatores ambientais que podem interferir no verdadeiro potencial de transmissão de determinada característica. Assim, o sêmen do touro a ser analisado é distribuído a diferentes propriedades e suas filhas obtidas por inseminação artificial.

Apesar de toda documentação e registros realizados durante a inseminação artificial e nascimento das progênies de cada touro, podem ocorrer erros na identificação da paternidade. Quando ocorre erro na paternidade de progênies, temos uma avaliação errada do valor genético dos touros, que podem ser valores maiores ou menores daqueles que o animal realmente apresenta.

A incorreta identificação da paternidade dos touros em relação à progênie, e conseqüente valor genético incorreto de um touro, pode torná-lo intensamente utilizado por rebanhos, de acordo com sua classificação, quando comparado aos demais animais da mesma raça e categoria, e pode trazer conseqüências para a produção leiteira e composição de rebanhos. O valor genético incorreto de um touro também pode desvalorizar um touro capaz de imprimir em suas filhas boa capacidade de produção leiteira.

O correto parentesco entre reprodutores é um pré-requisito para um eficiente programa de melhoramento genético animal. Muitas dessas questões de parentesco podem ser resolvidas pelos testes convencionais, como grupos sanguíneos e proteínas do soro. Entretanto, em alguns casos, esses polimorfismos não são suficientes para esclarecer a correta paternidade e, em função disso, foram desenvolvidos outros métodos para a determinação da paternidade por marcadores genéticos.

O desenvolvimento tecnológico na área de marcadores, como a tecnologia do DNA recombinante e a amplificação de segmentos de DNA pela reação em cadeia da polimerase (“*polymerase chain reaction*”, PCR), abriu caminho para a análise genética direta da sequência de DNA. Assim, com o desenvolvimento da PCR, foi possível que se desenvolvessem outros métodos de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismos (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Vários tipos de marcadores têm sido estudados para uso em confirmação de paternidade, com vantagens e desvantagens. Marcadores do tipo polimorfismo no comprimento de fragmentos (“*restriction fragment length polymorphism*”, RFLP), possuem baixa heterozigosidade e baixo conteúdo de informação de polimorfismo (– “*polymorphic information content*”, PIC). Sondas minissatélites, são de difícil interpretação devido à extrema variabilidade genética que apresentam. Os marcadores microssatélites têm geralmente maior heterozigosidade que os RFLPs, sendo seus resultados mais facilmente interpretados que os minissatélites. O polimorfismo dos microssatélites ocorre devido à diferenças no número de vezes que uma sequência se repete. Tendo de 100 a 300 nucleotídeos “de comprimento”, eles podem ser amplificados pela PCR. Muitos microssatélites têm sido descritos no genoma bovino, (Glowatzki-Mullis et al., 1995; Usha et al., 1995; Regitano, 1996; Ron et al., 1996; Heyen et al., 1997; Rosa, 1997) e por serem altamente polimórficos, têm sido propostos como marcadores para verificação de parentesco em rebanhos bovinos. Usha (1995) e Heyen (1997) sugerem o uso de no mínimo cinco marcadores microssatélite analisados conjuntamente para a obtenção de 0,99 de probabilidade de exclusão de um touro incorreto na paternidade da progênie. Dessa forma, justifica-se o uso de microssatélites para a verificação da paternidade em relação a uma progênie.

Atualmente esse novo tipo de polimorfismo genético tem sido descrito para resolver com maior eficiência os casos de verificação e determinação de parentesco. Esse método está descrito para várias espécies, inclusive bovinos. Sua grande eficiência está no alto polimorfismo que apresenta, aliado a resultados de clara interpretação.

Assim este trabalho teve por finalidade, verificar a paternidade dos touros da raça Gir em teste de progênie; calcular a taxa de erro de paternidade e o efeito que esta teria

na estimativa do valor genético dos touros Gir leiteiro em teste de progênie, por meio dos marcadores microssatélites CSFM50 (Barendse et al., 1994; Moore et al., 1994), INRA112 (Vaiman et al., 1994), BMS963 (Kappes et al., 1997; Stone et al., 1995), BMS483 (Kappes et al., 1997; Stone et al., 1995), BM8246 (Stone et al., 1995) e TEXAN15 (Burns et al., 1995).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Teste de progênie

O teste de progênie consiste na avaliação do valor genético dos reprodutores pelo desempenho de suas progênes. É indicado para características de baixa herdabilidade, onde o fenótipo do indivíduo não indica, com precisão o valor genético do reprodutor, contribuindo assim para aumentar a eficiência da seleção individual. Também é indicado quando a característica não pode ser medida diretamente no indivíduo ou somente após a morte, e quando as populações são grandes. As limitações práticas são seu custo e o aumento no intervalo de gerações e consequentemente redução na taxa anual de ganho. Desta forma, este teste justifica-se quando resulta em grande precisão na escolha de reprodutores (Torres, 1981).

A associação entre teste de progênie e inseminação artificial traz as seguintes vantagens: 1) as progênes são mais numerosas, o que proporciona uma estimativa mais segura do valor genético dos reprodutores; 2) as progênes podem ser distribuídas em muitos rebanhos, reduzindo-se no modelo o erro devido à efeitos de ambiente; 3) os reprodutores podem ser provados em idade inferior do que em caso de monta natural; 4) o número de reprodutores em atividade pode ser reduzido, e consequentemente, há um aumento na intensidade de seleção; 5) permite maior e mais eficiente utilização de reprodutores (Oliveira, 1995).

O correto parentesco entre os indivíduos de uma população é pré-requisito para um programa de melhoramento genético eficiente (Glowatzki-Mullis et al., 1995).

Van Vleck (1970) afirma que uma estimativa tendenciosa dos parâmetros genéticos populacionais, resultam de dados incorretos dos grupos de touros que são

erroneamente identificados. Estimativas de correlação entre o valor genético estimado e o valor genético real, bem como as estimativas de progresso genético para seleção são influenciados quando são inclusos dados incorretos dos grupos de touros.

Um pequeno número de identificações equivocadas compromete as estimativas de parâmetros genéticos e estudos que envolvem segregação de características fenotípicas e marcadores genéticos (Kinghorn et al., 1993). Além disso, diversas fazendas empregam práticas de manejo que comprometem as informações relacionadas à genealogia, como o uso de reprodutores múltiplos em monta natural.

2.2 Verificação de parentesco

As relações de parentesco entre indivíduos podem ser testadas empregando diversas categorias de marcadores como grupos sanguíneos (sistema ABO) e polimorfismos de DNA (RFLP e microssatélites).

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma. Os RFLPs geralmente fornecem baixa heterozigose e baixo conteúdo de polimorfismo informativo. As sondas minissatélites multilocais são bastante informativas, mas são de difícil interpretação devido à complexidade do perfil de bandas produzido o que torna praticamente impossível identificar as bandas (alelos) correspondentes a cada loco (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Os microssatélites são caracterizados por repetições em tandem de um mono, di ou trinucleotídeo mais freqüente, localizado dentro de regiões de sequência única. Cada bloco de repetições é geralmente menor do que 100 pares de nucleotídeos (Tautz, 1989). Em genomas de eucariotos, estas sequências simples são mais freqüentes, melhor distribuídas ao acaso e formam locos genéticos muito mais polimórficos que os minissatélites.

O parentesco determinado por regiões mini e microssatélites loco específico supera muitas das dificuldades associadas a outros tipos de marcadores. Estes

marcadores geralmente apresentam uma heterozigose superior à fornecida por RFLPs, sendo de interpretação muito mais fácil do que os padrões gerados por minissatélites multilocais. As vantagens associadas aos microssatélites são codominância e facilidade de serem obtidos por reação em cadeia da polimerase, o que torna possível a padronização dos protocolos entre laboratórios (Glowatzki et al., 1995).

Os marcadores microssatélites vem sendo testados em eqüinos, caninos e bovinos para a verificação de paternidade (Bowling, 1997; Glowatzki-Mullis, 1995; Fredholm & Winterø, 1996; Rosa, 1997). Usha et al. (1995), estudaram as probabilidades de exclusão de vários marcadores microssatélites que têm sido descritos no genoma bovino, com a finalidade de identificação de indivíduos e verificação de parentesco. O mesmo foi feito por Heyen et al. (1997). Mommens et al. (1998) fizeram um estudo, otimizando microssatélites bovinos para resolver casos de paternidade em Bisões (*Bison bison* L.). Houlden et al. (1996), num estudo com coalas, e utilizando seis loci microssatélites, com uma média de 6,5 alelos por locus, conseguiram confirmar herança mendeliana para os loci estudados e a exclusão de machos que eram considerados reprodutores nas colônias estudadas. A otimização de microssatélites de origem bovina e ovina para alelos foi também estudada por Talbot et al. (1996).

Por aproximadamente três décadas cavalos registrados têm sido submetidos ao teste de paternidade utilizando tipagem sangüínea. Esta metodologia está sendo substituída pela PCR como uma alternativa para casos não resolvidos por tipagem sangüínea, particularmente com microssatélites. Suas vantagens são requerer pequenas quantidades de material biológico, não fazer restrição ao tipo de tecido, podendo ser utilizados além de sangue, sêmen congelado, tecidos degradados, pêlos, ossos e dentes. Essa possibilidade de trabalho com diversos materiais, facilita a obtenção de DNA para análise. Em eqüinos, num teste de rotina, cavalos Quarto-de-milha foram testados por tipagem sangüínea e 11 loci de microssatélites para verificação dos pedigrees. Foram identificadas 95 paternidades incorretas em 4803 progênies testadas, ou seja, 2% de erro foi encontrado. Neste caso, a tipagem sangüínea foi efetiva em 97,3% dos casos e a técnica com microssatélites, 98,2% quando consideradas a exclusão dos dois pais (matriz e progenitor) nos eqüinos. (Bowling et al., 1997).

Em bovinos, num estudo realizado em Israel (Ron et al., 1996), marcadores microssatélites foram utilizados com grande eficiência na determinação de paternidade incorreta. A frequência alélica da população foi determinada para 12 diferentes marcadores. A paternidade de nove entre 173 vacas (5,2%) e três entre 102 touros estudados (2,9%), foi excluída porque os genótipos paternos não estavam presentes na progênie para pelo menos um locus. Para quatro das nove vacas, e todos os três touros, a exclusão foi baseada em pelo menos dois loci. As vacas estudadas eram progênie de quatro touros progenitores. Neste mesmo estudo, foi possível a utilização de amostras de sêmen congelado, células sangüíneas e bulbos de pêlos para a extração de DNA para a genotipagem dos animais. A probabilidade de determinação de paternidade incorreta das vacas e touros de Israel foi inferior a estimativa de 15% de erro de identificação publicadas anteriormente por Geldermann et al. (1986). Por este motivo, o potencial para ganho genético é também mais alto se as vacas erroneamente identificadas forem excluídas do grupo de progênie. Assim, a implementação do controle de paternidade usando análises de DNA poderia ser economicamente viável para populações de gado leiteiro. Ron et al. (1996) sugere um acréscimo de 5% ao ganho genético anual, ao realizar teste de paternidade em, por exemplo, 100 filhas de 50 touros em teste de progênie em Israel.

Se o genótipo de um determinado touro for incompatível com os genótipos da mãe e progênie, este é excluído de paternidade. Por outro lado, se os genótipos são compatíveis podem existir duas possibilidades: uma de que o touro é realmente o progenitor; e a segunda de que seu genótipo é compatível por acaso. A probabilidade de se descobrir um genótipo incompatível é chamada de probabilidade de exclusão PE (Dodds et al., 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Escolha dos animais e colheita de amostras

Até 1998, o programa de melhoramento da raça Gir leiteiro conta com 126 touros em teste de progênie, sendo que 58 já foram testados. Para este estudo, nove touros foram amostrados aleatoriamente. O critério de escolha dos animais baseou-se no número de filhas de cada touro. Amostras de sangue foram coletadas das filhas em “FTA cards e Gene cards” (GIBCO BRL - Life Technologies TM). O número de filhas para cada animal variou de 11 filhas no máximo e seis filhas no mínimo.

As 74 filhas foram coletadas de um total de 2000 dentro de 15 rebanhos diferentes participantes do teste de progênie.

As mães utilizadas foram apenas aquelas que ainda se encontravam nos rebanhos e foram em número de 13 no total, distribuídas desigualmente entre os touros. Nem todas as progênies amostradas possuíam mãe.

A proporção de filhas para cada touro foi também desigual, variando de seis a dez filhas por touro. Considerando os 78 animais que seriam os ideais para a amostragem, distribuídos para os nove touros, tem-se uma média de nove filhas por touro. Nem todos os touros apresentaram essa média, no entanto o número de filhas foi suficiente para as análises posteriores.

A atividade de colheita das amostras, foi realizada por terceiros, técnicos da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora – M.G.).

Foram realizadas colheitas de amostras de sangue das filhas e das mães em “FTA cards” e “FTA Gene cards”, visualizados na figura 1. Estes cartões são papéis de filtro desenhados para uma conveniente colheita e estocagem de amostra e posterior

purificação do DNA para realização de análises diversas. Para a análise dos touros foram utilizadas paletas de sêmen destes animais, enviadas pela Embrapa Gado de Leite. Estes touros são animais que se encontram em centrais de inseminação artificial, e seu sêmen foi obtido congelado, em paletas com a identificação do animal, em número de duas por animal, e mantidas em freezer a -20°C , até a extração do DNA.

Figura 1 – Modelo de “FTA card” e “FTA Gene card” utilizados nas colheitas.

3.2 Extração de DNA de sangue

Para a extração de DNA das amostras de sangue, foram utilizados dois diferentes protocolos, o protocolo padrão dos “FTA cards”, segundo o fabricante; e o protocolo utilizando-se CHELEX-100 (Bio-Rad).

O protocolo padrão dos “FTA cards” e “Gene cards” (GIBCO – Life Technologies) consistiu em, utilizando-se um furador de 2 milímetros, remover uma amostra do papel embebido com sangue seco, e colocar em um tubo de amplificação com o mínimo de capacidade de 300 μl . Em seguida adicionou-se 200 μl de “FTA Purification Reagent” (GIBCO – Life Technologies) em cada tubo. Agitou-se por alguns segundos. Os tubos descansaram em temperatura ambiente por 5 minutos, com uma segunda agitação na metade do período de descanso. Após os cinco minutos os tubos foram agitados novamente e removeu-se cuidadosamente o máximo de reagente que foi

possível. Essa lavagem foi repetida por mais duas vezes, completando um total de três lavagens. Em seguida, após o “FTA Purification Reagent” ter sido removido pela terceira vez, adicionou-se 200 µl de TE (10mM Tris-HCl pH8,0 e 0,1mM EDTA), e agitou-se por alguns segundos. Os tubos descansaram novamente em temperatura ambiente por 5 minutos e agitou-se os tubos no meio do período de descanso. Repetiu-se a lavagem com TE mais uma vez, completando o total de duas lavagens. Após a remoção de todo o TE, o papel foi seco completamente durante uma hora à temperatura ambiente ou trinta minutos em estufa à 60°C. Em seguida, adicionou-se solução de amplificação no tubo com o papel de filtro, num volume de 40 µl.

No protocolo utilizado com CHELEX-100 (Bio-Rad), a resina age como quelante de metais e partículas que poderiam inibir a PCR (Walsh; 1991). Neste caso, cortou-se 6 mm do papel de filtro e deixou-se repousar em temperatura ambiente em 1 ml de água por trinta minutos. Agitou-se ocasionalmente e centrifugou-se a 10.000 rpm por cinco minutos após este período. Eliminou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µl de Chelex 5%. Os tubos foram colocados para incubar a 56°C por trinta e cinco minutos. Fez-se uma agitação no final do período de incubação e as amostras foram fervidas por oito minutos, sendo em seguida aliquoteadas para a PCR.

3.3 Extração de DNA de sêmen

A extração de DNA de amostras de sêmen foi realizada segundo protocolo de Shuster (1992), seguido de posterior método de limpeza com CTAB descrito por Via (1993).

O protocolo utilizado para a extração consistiu de descongelar uma paleta em um tubo de 1,5 ml e centrifugá-lo por dez minutos a 14.000 rpm. Em seguida, o pelete que se formou foi lavado quatro vezes seguidas em 1 ml de PBS (2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄; pH 7,0). No intervalo entre uma lavagem e outra o pelete foi ressuspensionado e centrifugado por cinco minutos a 14.000 rpm. Na lavagem final o pelete foi ressuspensionado em 100 µl de PBS. Foram adicionados então,

400 µl de solução de lise (2% β-mercaptoetanol; 10 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,5% SDS) e seguindo-se incubação por trinta minutos a 50°C. Adicionou-se proteinase K a 200 µg/ml e seguiu-se incubação por dezesseis horas a 52°C. A proteinase K foi inativada por quinze minutos a 95°C e as amostras armazenadas a -20°C até o momento da amplificação.

O método de limpeza com CTAB consistiu em aliquotar 200 µl de amostra e adicionar 50 µl de 5M NaCl e misturar. Em seguida foram adicionados 40 µl de 10% CTAB (diluído em 1M NaCl) e misturados novamente. As amostras foram aquecidas a 65°C por dez minutos. Foram adicionados 300 µl de clorofórmio e misturados novamente. Seguiu-se centrifugação por cinco minutos a 12.000 rpm. Formavam-se três fases nos tubos centrifugados. O sobrenadante foi retirado sem tocar na interface e transferido para um tubo limpo de mesmo volume. Foram adicionados 300 µl de isopropanol, misturados e centrifugados novamente a 12.000 rpm por dez minutos, descartando-se o sobrenadante desta vez. Lavou-se o pelete que se formou com 250 µl de etanol 70% por duas vezes, centrifugando por cinco minutos a 12.000 rpm nos intervalos das lavagens. Na última lavagem o líquido foi descartado cuidadosamente. O pelete foi seco à 37°C por trinta minutos e ressuspendido em 200 µl de água.

3.3.1 Quantificação do DNA em fluorímetro

Para saber a quantidade de DNA que resultou da extração foi utilizado o método de leitura em fluorímetro, que consiste em preparar uma solução de leitura para média de DNA entre 10-500 ng/µl de DNA (corante fluorescente 33258 10 µl; TNE buffer 10 ml; água MilliQ 90 ml para um volume total de 100 ml de solução). Com o aparelho Fluorímetro Hoefer DyNA Quant 200 ligado há mais ou menos 15 minutos e a solução de leitura pronta, foi preenchida uma cubeta com 2 ml de solução de leitura e colocada no aparelho, para uma calibração “zero”. Em seguida na mesma cubeta com a mesma quantidade de água foram adicionados 2 µl de padrão de DNA (1 mg/ml) diluída para

100 µg/ml, feita homogeneização e calibração do aparelho. Para a leitura das amostras, a cubeta foi lavada com água destilada três vezes, com o auxílio de uma piceta acrescentado 2 ml de solução de leitura, seguido de 2 µl de cada amostra.

3.4 Amplificação de DNA extraído dos FTA cards

Uma vez que as amostras foram sendo coletadas e recebidas no laboratório, realizou-se a extração de DNA tanto das amostras de sangue como sêmen do modo descrito acima.

As amostras assim que lavadas, foram utilizadas para a amplificação dos diferentes microssatélites. Os programas utilizados para amplificação são apresentados no quadro 1.

Quadro 1 - Descrição dos programas de amplificação dos microssatélites:

Passos	BMS483 109-117 pb	BMS963 134-154 pb	BM8246 167-197 pb	CSFM50	INRA112	TEXAN15
Inicial	96°C/5min	96°C/5min	96°C/5min	96°C/5min	96°C/5min	96°C/5min
1	94°C/2min	94°C/2min	94°C/2min	94°C/2min	94°C/2min	94°C/2min
2	94°C/1min	94°C/1min	94°C/1min	94°C/1min	94°C/1min	94°C/1min
3	57°C/30seg.	59°C/30seg.	59°C/30seg.	55°C/30seg.	57°C/30seg.	56°C/30seg.
4	72°C/30seg.	72°C/30seg.	72°C/30seg.	72°C/30seg.	72°C/30seg.	72°C/30seg.
5	72°C/4min	72°C/4min	72°C/4min	72°C/4min	72°C/4min	72°C/4min
6	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
Ciclos	40	40	40	40	40	40

Assim conseguiu-se uma eficiente amplificação que foi visualizada em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo e posteriormente aplicado no sequenciador automático *A.L.F. (Pharmacia)* para detecção dos alelos em gel de poliácridamida.

As reações de amplificação seguem as seguintes condições para os microssatélites BM8246, BMS963, BMS483, INRA112 e TEXAN15:

-tampão 10X	5,0 µl
-MgCl ₂ (50 mM)	2,4 µl
-Primer forward (4 µm)	2,0 µl
-Primer reverse (4 µm)	2,0 µl
-DNA(30 ng)	2 mm de papel de “FTA card” ou “Gene card”
-dNTP (10 mM)	1,0 µl
-Taq (5U/µl)	0,4 µl
-água	27,2 µl
Para volume total de	40,0 µl

Para o marcador microssatélite CSFM50, as condições são diferentes em relação à concentração de primer, sendo a seguinte:

-tampão 10X	5,0 µl
-MgCl ₂ (50 mM)	2,4 µl
-Primer forward (0,2 µm)	2,0 µl
-Primer reverse (0,2 µm)	2,0 µl
-DNA (30 ng)	2 mm de “FTA card” ou “Gene card”
-dNTP (10 mM)	1,0 µl
-Taq (5U/µl)	0,4 µl
-água	27,2 µl
Para volume total de	40,0 µl

3.5 Amplificação de DNA extraído de sêmen

Dos 200 µl de DNA de sêmen extraído e ressuspendido, foram tomadas alíquotas de 5 µl para a PCR. Os programas dos termocicladores utilizados “PTC-100 Programmable Thermal Controller” (M.J. Research) e “GeneAmp PCR System 9600” (Perkin-Elmer), foram os mesmo utilizados para a amplificação de DNA extraído dos “FTA cards”, para os seis microssatélites, inclusive o número de ciclos. Porém, as concentrações foram diferentes, sendo as mesmas para os seis marcadores microssatélites:

-tampão 10X	2,5 µl
-MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
-Primer forward (4 µm)	2,0 µl
-Primer reverse (4 µm)	2,0 µl
-DNA (30 ng)	5 µl de solução de extração
-dNTP (10 mM)	0,5 µl
-Taq (5U/µl)	0,2 µl
-água	12,2 µl
Para volume total de	25,0 µl

Foram distribuídos 20 µl da solução de amplificação nos tubos e em seguida adicionados 5 µl de DNA. Posteriormente as amostras foram colocadas para amplificar.

3.6 Visualização em gel de agarose

Após amplificação das amostras, foi feita a eletroforese horizontal das mesmas em gel de agarose 3% para confirmação da reação de amplificação, assim como a confirmação do tamanho aproximado das bandas para os seis microssatélites. As cubas

utilizadas foram Horizon 11-14 e 58 – model 200 (Life Technologies-Gibco BRL), com tampão TBE 1X (0,9 M Tris-Base (); 0,9 M Ácido bórico (); 0,5 M EDTA, () pH8,0), na quantidade suficiente para cobrir o gel, que dependia da cuba utilizada. A voltagem utilizada para a eletroforese foi de 100 volts. Foram aplicados no gel 10 µl de produto de amplificação. As corridas duravam em média 20 minutos para as cubas Horizon 58, e 30 minutos para os géis maiores, que corriam nas cubas Horizon 11-14. Junto com todas as amostras foi colocado sempre um padrão de bandas de tamanho de pares de bases conhecidos de modo a podermos comparar e confirmar os tamanhos de fragmentos amplificados. Os dois mais utilizados foram ϕ X174 (fragmentos de *Hae*III, que possui as seguintes bandas com 1353, 1078, 872, 603, 310, 271/281, 234, 194, 118, 72 pares de bases) e 1Kb ladder. Este possui as seguintes bandas de tamanho 12.216, 11.198, 10.180, 9.162, 8.144, 7.126, 6.108, 5.090, 4.072, 3.054, 2.036, 1.636, 1.018, 517, 396, 344, 298, 221, 220, 154, 75 pares de bases). O DNA foi corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de UV.

3.7 Preparação do Sequenciador Automático A.L.F. (*Pharmacia*) para leitura da amplificação

Após amplificação e posterior confirmação da mesma em gel de agarose 3%, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida para detecção dos alelos dos marcadores microsatélites. Para isso os tubos foram marcados para as amostras, para o padrão interno (PI) e padrão externo (PE) que foram utilizados para padronização da corrida. Em seguida, foi feita a diluição do padrão externo que contém picos de fragmentos de 50 a 500 pares de base chamado ladder 50-500pb (PE). Este foi diluído com TE e um tampão Loading dye ou desnaturante (100% de formamida deionizada; 5 mg/ml de azul de Dextran 2000). Esta solução foi aplicada em pelo menos duas canaletas do gel para a posterior análise dos alelos que foram identificados nas amostras estudadas.

Da mesma forma, foi feita a diluição dos padrões internos (PI, marcadores de peso molecular utilizados para ajuste dos tamanhos dos fragmentos diagnosticados no gel). Estes variam de acordo com os microssatélites que foram aplicados no gel. Assim, foi utilizado 0,1 µl de PI para cada amostra aplicada, diluído em 1,0 µl de TE.

Quando tínhamos microssatélites de tamanhos em pares de bases bastante distintos, estes foram colocados em uma mesma canaleta de leitura sem que houvesse sobreposição entre os picos que foram encontrados correspondentes aos alelos do marcador. E para isso preparamos as amostras de forma que pudessem correr no gel juntas. Fizemos uma solução de corrida com o PI e o loading dye na proporção: 1,0 µl de PI/amostra e 5,0 µl de Loading dye. Esses 6,0 µl foram distribuídos nos tubos marcados para as amostras e 2 µl de produto de amplificação das amostras foram então misturados. As amostras de DNA foram desnaturadas à 95°C por cinco minutos e transferidas imediatamente para o gelo. Foram centrifugadas à 4°C por trinta segundos à 14.000 rpm e transferidas novamente para o gelo. Desta forma prontas, foram aplicadas no gel. Ao término da corrida fizemos a análise dos diferentes marcadores com o programa Fragment Manager TM (Pharmacia Biotech AB), separando se necessário os marcadores que correram nas mesmas canaletas.

3.8 Comparação dos genótipos das famílias de pai e filhas

Foram usados para a confirmação de paternidade seis diferentes marcadores, escolhidos com base no alto polimorfismo e frequência bem distribuída entre os alelos do marcador, além de serem de diferentes cromossomos. Os marcadores que foram utilizados são BM8246 (cromossomo 1), CSFM50 (cromossomo 2), BMS963 (cromossomo 3), TEXAN15 (cromossomo 5), BMS483 (cromossomo 6), INRA112 (cromossomo 7). Além dos fatores acima citados para a escolha destes marcadores existe o fato de já serem usados em rotina pelo laboratório onde foram realizadas todas as

etapas necessárias para a avaliação da paternidade dos nove touros como demonstram Regitano (1996) e Rosa (1997). Ver quadro 2.

Quadro 2 – Descrição dos primers dos seis microssatélites e respectiva temperatura de anelamento.

Marcadores Microssatélites	Sequência dos primers	Temperatura Anelamento
BM8246 Cromossomo 1	Forward AAT GAC AAA TTG AGG GAG ACG Reverse AGA GCC CAG TAT CAA TTC TTC C	60°C
CSFM50 Cromossomo 2	Forward AGT TCT CCT CTT GAT TTC AGT AAC Reverse CCT ACT TCC TGC CTT TGT AGC ATT	55°C
BMS963 Cromossomo 3	Forward GGA GGA TGA AGG AGT CTT TGG Reverse AAT TTA CCA CAG TCC ACC GC	58°C
TEXAN15 Cromossomo 5	Forward TCG CAA ACA GTC AGA GAC CAC TC Reverse TGG ATG AGA AAG AAG AGC AGA GTT G	56°C
BMS483 Cromossomo 6	Forward GGT ATG AGA CCA GGT GTG GG Reverse CAG GGC CAC ATT TCC AAG	56°C
INRA112 Cromossomo 7	Forward GCC TCT CAA AGC CAC CTG C Reverse GAT CTA ACT AGA GCT TTC C	58°C

Os resultados foram obtidos por comparação do genótipo de um determinado touro considerado como provável pai, com os genótipos das progênes e das mães, quando houvesse.

Considerou-se a exclusão quando o genótipo do touro considerado como pai, era incompatível com o genótipo do par mãe-progênie para pelo menos um dos seis marcadores.

A probabilidade de exclusão do touro foi calculada em relação a um par vaca/progênie, dado por:

Probabilidade de Exclusão (PE)

$$PE = (1 - p_i)^2$$

onde,

p_i = soma das frequências dos dois alelos do touro

As frequências dos alelos foi determinada em uma população de 64 animais Gir não aparentados.

Para múltiplos loci, foi calculada a probabilidade de exclusão combinada (CPE), segundo Ron et al., 1996:

$$CPE = 1 - \prod_m (1 - PE_i)$$

onde,

m = número total de marcadores

i = i-ésimo marcador (1,2,...,m)

A taxa de erro de identificação da paternidade foi calculada pelo número de indivíduos que estavam com paternidade incorreta em relação ao número de animais analisados.

3.9 Avaliação genética

A avaliação foi realizada utilizando-se o sistema MTDFREML (Boldman, et al.; 1993). O sistema considera o modelo animal e usa o método da máxima verossimilhança restrita para estimar componentes de variância. Usar o modelo animal significa

considerar o animal como variável aleatória. Os valores genéticos dos animais são estimativas BLUP (preditores genéticos não viesados). O modelo animal utilizado foi:

$Y = \mu + \text{animal} + \text{rebanho-ano parto} + \text{época de parto} + \text{composição genética da filha} + \text{idade da vaca ao parto}$ como co-variável no termos linear e quadrático + e.

A base de dados inicial incluiu todas as lactações de todas as filhas dos touros de todos os rebanhos e suas companheiras de rebanho. Destes dados foram considerados somente a primeira lactação da filha; foi eliminada toda lactação com causa de encerramento considerada anormal. Neste caso, eram considerados anormais fatores como morte ou separação do bezerro da mãe, doença, morte ou venda da vaca durante período de controle leiteiro, tetos perdidos por mastite, ausência parcial ou total dos controles leiteiros, intervalo entre controles leiteiros superior a 75 dias antes de atingir 305 dias de lactação.

O efeito do erro na avaliação dos touros foi realizado, avaliando todos os animais numa base comum ignorando que existisse o erro. Em seguida eliminado-se os dados das progênies excluídas, colocando-se como touro desconhecido o campo de identificação do pai, onde a paternidade não foi confirmada. Uma nova avaliação desses touros foi feita para comparação com a avaliação anterior onde não tinha sido realizado o teste de paternidade. Com os dois resultados obtidos, foi feita uma correlação de ordem dos 58 touros, usando o método de análise de correlação de ordem pelo método de Spearman, que significa avaliação de grau de associação.

3.9.1 Avaliação da amostragem

Para calcular se a amostra considerada representava a população utilizada na avaliação e se a porcentagem encontrada de erro poderia ser aplicada à população, utilizou-se a seguinte fórmula de cálculo de amostragem, considerando N= número total de animais utilizados com dados de produção na avaliação; Z=1,96 para obtenção de $\alpha=0,95$; P=0,36 (que foi a porcentagem de erro encontrada); S= raiz quadrada de n (número de animais amostrados) multiplicada por p (porcentagem de erro de paternidade

encontrada) multiplicada por q (p-1); D= significa a diferença entre p amostral para o p populacional (diferença de erro que pode ocorrer devido à amostragem para um $\alpha=0,95$.

$$n \geq N \left\{ 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{D}{Z.S} \right)^2 \right\}^{-1} = \frac{N}{1 + \frac{1}{N} \left(\frac{D}{Z.S} \right)^2}$$

Desta forma, isolando-se D, sabe-se qual a porcentagem de erro numa amostra de 74 animais, considerando que calculando-se para $\alpha=0,95$ o ideal seriam 78 animais.

$$D = Z.S \sqrt{\frac{N^2 - n.N}{N}}, \text{ onde } D = 0,051 \text{ para } 74 \text{ animais, considerando que a}$$

amostragem das filhas foi aleatória, assim como a amostragem dos nove touros dentro dos 58 em teste de progênie, e considerando, ainda, que a porcentagem de filhas por touro é proporcional àquelas que contribuem com a produção na avaliação genética dos touros.

Neste caso, podemos considerar aleatória tanto a amostragem das filhas como dos touros que foram utilizados. Já quanto ao número de filhas iguais para cada touro, temos uma média de seis a dez filhas variando de touro para touro, o que dentro de 78 animais que seriam os ideais, distribuídos dentro dos nove touros amostrados, teríamos uma média de nove filhas por touro como ideal. O que acaba sendo mais ou menos a média de filhas quando consideramos os nove touros. Assim, observa-se que existe uma pequena variação levando-se em conta que o número de filhas amostradas não foi igual proporcionalmente, mas diante dos demais dados apresentados pode-se considerar essa variação desprezível.

4 RESULTADOS

4.1 Resultados das quantificações em fluorímetro

As leituras da extração das amostras dos touros feitas em fluorímetro são mostradas no quadro 3.

Com as amostras de DNA dos touros sendo extraídas pelo método descrito e em seguida sendo lavado com CTAB, foi possível a amplificação das mesmas de forma que as bandas fossem visualizadas em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo.

A variação obtida na extração de DNA de sêmen corresponde ao encontrado por Regitano (1996), que encontrou uma variação de 10 a 100 ng/ μ l de DNA quando a extração é feita a partir de sêmen bovino.

Na primeira extração das amostras de sêmen, denominadas por números correspondentes aos diferentes touros testados, obteve-se a seguinte leitura em fluorímetro, seguido da leitura após uso de CTAB, mostrados nos quadros 3 e 4:

Quadro 3– Primeira leitura de amostras de sêmen, protocolo padrão, em ng/ μ l de solução obtida da extração de DNA de sêmen de volume total igual a 200 μ l.

Touro	Leitura (ng/μl)
Touro 1	96
Touro 2	78
Touro 5	87
Touro 7	65

Quadro 4– Leitura das amostras de sêmen, extraídas com protocolo de CTAB.

Touro	Leitura (ng/μl)
Touro 1	96
Touro 2	78
Touro 3	35,6
Touro 4	136
Touro 5	87
Touro 6	249,9
Touro 7	65
Touro 8	80,3
Touro 9	77

4.2 Resultados em gel de agarose e poliacrilamida

Os resultados obtidos das amplificações foram bandas nítidas do material amplificado, visualizadas em gel de agarose 3%. Em alguns casos, houve a amplificação de bandas inespecíficas devido à alta quantidade de ciclos de amplificação e boa condição do material utilizado. Esse resultado pode ser observado na figura 2, onde são exibidas amplificações para dois diferentes marcadores. A canaleta número 1 corresponde ao marcador de peso molecular ϕ x174 (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 234, 194, 118, 72 pares de bases (pb) para as respectivas bandas que aparecem no gel de agarose), as seguintes são as demais amostras utilizadas como controles, e a canaleta número 7 corresponde ao controle negativo. Na primeira parte do gel, o fragmento esperado tem aproximadamente 134 pb e na segunda metade do gel o tamanho esperado é de 221 pb.

Figura 2 – Gel com amplificação de amostras controles. Canaleta 1 corresponde ao ϕ X174, canaletas dois a seis às amostras, e canaleta sete é o controle negativo.

Na figura 3 o tamanho esperado é de aproximadamente 180 pb. E temos o resultado de amplificação de DNA de sangue, extraído dos “FTA cards” e “Gene cards”.

Figura 3: Gel de agarose com material de reação de PCR de DNA extraído de “FTA cards”. Canaleta 1 corresponde ao ϕ X174; dois a 18 às amostras, 19 controle positivo e canaleta 20 ao controle negativo.

A visualização da amplificação, depois de confirmada em gel de agarose, era visualizada no sequenciador automático A.L.F. como mostram as figuras 4 e 5:

Figura 4 - Resultado de corrida em gel de sequenciador automático A.L.F. (*Pharmacia*), para o microssatélite BMS483, para touro 1 e progênies. Linha 20 corresponde ao controle externo de 100-250 pb; linha 21 corresponde ao touro 1 e linhas 22 a 34 às amostras dos animais.

Figura 5 - Resultado de corrida em gel de sequenciador automático A.L.F. (*Pharmacia*), para o microssatélite TEXAN15, para touro 1 e progênie. Linha cinco corresponde ao touro; linhas sete e 40 são controles; linha 20 corresponde ao marcador externo e linhas 28 a 39 correspondem às amostras das filhas.

4.3 Resultado dos genótipos para os seis marcadores microssatélites

Como resultado da análise dos géis de poliacrilamida do A.L.F., temos a tabela 1, com os genótipos das famílias dos nove touros analisados.

Tabela 1 - Resultados dos alelos para os seis microssatélites utilizados no teste de paternidade.

	BM8246	BMS963	TEXAN15	BMS483	CSFM50	INRA112
Touro 01	179/197	134/156	203/207	107/109	170/170	178/180
Filha 01	179/197	134/156	203/203	107/117	168/170	168/180
03	197/197	134/156	203/203	107/109	168/170	166/180
04	195/195	134/134	207/207	107/109	168/170	178/180
05	179/195	134/144	201/207	109/109	170/176	170/180
06	179/179	134/150	201/207	107/107	170/176	170/180
07	179/187	134/156	201/207	107/111	168/170	164/180
09	179/183	136/156	201/207	107/111	170/170	172/180
10	167/197	146/156	201/207	109/117	170/176	168/180
11	185/195	136/148	201/201	109/117	170/170	172/182
12	187/197	134/150	207/217	109/115	170/170	180/182
13	179/187	148/178	201/205	111/115	178/178	170/170
Mãe 01m	179/197	134/156	203/221	109/117	168/170	168/178

	BM8246	BMS963	TEXAN15	BMS483	CSFM50	INRA112
Touro 02	179/195	136/150	203/203	109/109	168/170	170/182
Filha 01	179/189	144/150	203/207	109/115	168/170	168/182
02	167/167	136/136	203/203	107/109	168/170	166/166
03	179/179	136/150	203/221	109/109	170/176	174/182
04	195/195	136/150	203/205	109/109	170/170	170/186

05	175/175	136/136	203/207	109/115	170/176	182/182
06	179/179	136/136	203/205	109/109	170/172	166/182
07	195/195	136/136	203/217	109/109	170/182	166/170
08	195/195	136/136	203/207	109/115	170/172	168/170
09	179/179	134/136	203/217	109/109	170/172	166/170
Mãe 01m	175/189	136/150	203/207	115/115	170/172	168/168
02m	167/177	136/156	203/207	107/111	170/176	166/166
03m	179/193	136/136	203/221	109/117	170/176	174/174
04m	179/195	146/150	205/205	109/109	168/170	176/186

	BM8246	BMS963	TEXAN15	BMS483	CSFM50	INRA112
Touro 03	195/195	138/138	203/203	115/115	168/170	168/180
Filha 01	195/195	138/156	201/203	107/115	168/178	180/184
02	179/195	138/146	203/205	107/109	168/176	176/180
03	179/195	138/148	205/215	113/115	168/168	166/168
04	179/187	138/156	203/205	109/115	168/176	160/166
05	181/195	138/150	203/207	115/115	168/178	164/168
06	185/195	138/144	203/217	115/115	168/170	164/168
07	193/195	138/144	203/217	115/115	170/170	168/178
08	189/195	138/144	203/215	111/115	168/168	164/168
09	183/195	138/148	203/217	111/115	168/170	166/170
Mãe 03m	179/189	148/148	205/207	111/115	168/168	166/168
06m	185/195	144/150	207/217	115/115	168/176	164/164

	BM8246	BMS963	TEXAN15	BMS483	CSFM50	INRA112
Touro 04	171/195	134/154	201/215	107/109	168/168	180/186
Filha 01	195/195	144/154	201/201	107/111	168/186	180/186
02	179/195	134/150	201/207	107/115	168/186	186/190
03	191/195	134/140	201/201	107/109	168/168	164/186
04	193/195	148/154	203/215	107/109	168/168	162/162

05	187/187	134/134	207/215	111/111	168/186	180/184
06	195/195	134/148	205/215	109/117	178/178	176/178
07	187/195	146/154	201/215	107/115	168/172	168/180
08	167/195	154/154	201/215	107/109	168/168	186/186

	BM8246	BMS963	TEXAN15	BMS483	CSFM50	INRA112
Touro 05	179/193	152/154	201/201	109/109	168/176	170/180
Filha 01	175/179	146/154	201/201	109/115	168/168	178/178
02	179/193	134/152	201/201	105/109	176/176	164/180
03	193/193	146/154	201/205	109/109	168/168	164/170
04	179/193	134/154	201/205	109/115	168/178	170/184
05	193/195	148/154	201/205	109/117	168/176	168/170
06	185/193	150/154	201/207	109/109	176/178	168/170
07	179/195	136/142	201/201	109/115	170/176	166/168
08	187/193	142/148	201/209	107/109	168/178	168/170

	BM8246	BMS963	TEXAN15	BMS483	CSFM50	INRA112
Touro 06	179/179	136/148	201/205	109/109	168/170	166/180
Filha 01	191/191	136/146	201/205	107/113	168/176	166/166
02	169/179	144/148	201/221	107/109	172/176	166/180
03	179/179	136/136	203/205	109/109	176/176	174/180
04	179/193	148/150	201/207	109/115	168/176	166/180
05	175/179	146/148	201/201	109/115	168/170	160/180
06	177/179	136/136	207/219	109/109	168/170	160/180
07	177/179	136/156	201/201	109/109	170/176	178/180
08	177/179	136/136	207/219	109/109	176/176	166/166

	BM8246	BMS963	TEXAN15	BMS483	CSFM50	INRA112
Touro 07	179/187	136/154	201/207	109/109	170/174	178/180
Filha 01	187/191	136/146	201/207	109/115	170/170	170/178
02	179/195	136/150	201/205	109/109	168/170	168/180
03	193/193	136/136	201/207	115/115	172/174	166/170
04	175/195	136/136	201/201	107/107	170/170	178/180
05	179/191	136/136	201/201	109/109	174/176	178/178
06	179/179	136/136	201/201	109/115	170/170	178/178
07	179/193	136/136	201/205	109/109	170/182	162/178
08	179/195	136/146	201/217	109/115	170/178	168/178
Mãe 01m	179/191	146/146	201/201	115/117	170/170	170/180

	BM8246	BMS963	TEXAN15	BMS483	CSFM50	INRA112
Touro 08	171/195	136/136	201/205	111/111	170/178	180/180
Filha 01	189/195	136/144	201/205	111/111	170/178	168/180
02	195/195	136/150	205/205	111/111	170/178	160/180
03	179/195	136/144	205/207	111/111	172/178	166/180
04	189/195	136/150	205/215	111/115	168/170	168/180
05	185/195	138/146	201/201	111/115	168/180	170/172
06	185/195	134/134	201/201	107/107	170/172	166/170
Mãe 01m	189/191	144/144	201/215	111/115	170/176	162/168
02m	177/195	142/150	205/205	111/115	178/180	160/160
03m	179/189	144/144	201/207	111/111	172/172	166/180

	BM8246	BMS963	TEXAN15	BMS483	CSFM50	INRA112
Touro 09	179/187	146/156	201/201	109/109	172/176	174/182
Filha 01	187/195	136/156	201/219	107/113	170/172	170/182
02	189/193	136/144	201/215	109/115	168/172	162/172
03	179/183	136/142	201/205	109/115	168/174	170/182

04	183/195	136/148	201/205	107/111	170/172	174/190
05	179/189	136/146	201/201	109/113	172/176	182/182
06	183/187	136/156	201/215	109/115	176/178	170/174
02m	183/189	144/150	215/215	109/115	168/168	162/170
03m	183/195	142/148	205/215	115/115	174/176	168/170

Obs. Os animais “filhas” que aparecem em negrito correspondem àqueles onde a paternidade não foi confirmada.

4.4 Porcentagem de erro

No total foram analisadas 74 filhas de nove touros. Como resultado da exclusão de paternidade temos 27 delas com genótipos incompatíveis com o do provável pai para pelo menos um marcador microsatélite, gerando um erro de 36% na identificação da paternidade.

4.5 Frequências alélicas

As frequências alélicas da população de touros Gir genotipada, composta por 64 animais não aparentados, estão apresentados na tabela 2, a seguir:

Tabela 2 – Frequências alélicas para os seis loci microsatélites:

BM8246		BMS963		TEXAN15	
Alelos	Frequência	Alelos	Frequência	Alelos	Frequência
171	0,015873	134	0,016129	201	0,301587
175	0,134921	136	0,419355	203	0,166667
177	0,023810	138	0,040323	205	0,214286
179	0,230159	140	0,008065	207	0,111111

181	0,015873	144	0,008065	209	0,047619
183	0,015873	146	0,153226	215	0,007937
187	0,039683	148	0,024194	217	0,007937
189	0,007937	150	0,161290	219	0,087302
191	0,031746	152	0,008065	221	0,055556
193	0,039683	154	0,032258		
195	0,373016	156	0,112903		
197	0,055556	158	0,016129		
199	0,015873				
BMS483		CSFM50		INRA112	
Alelos	Frequência	Alelos	Frequência	Alelos	Frequência
105	0,015873	174	0,008197	188	0,008065
107	0,230159	170	0,245902	190	0,008065
109	0,460317	176	0,196721	186	0,048387
111	0,031746	178	0,106557	164	0,032258
113	0,095238	172	0,057377	184	0,040323
115	0,158730	168	0,368852	172	0,112903
117	0,007937	180	0,016393	182	0,104839
				178	0,064516
				168	0,088710
				170	0,129032
				174	0,072581
				180	0,169355
				166	0,120968

4.6 Probabilidades de exclusão (PE) e probabilidades de exclusão combinada (PEC)

Os resultados obtidos para as duas probabilidades, segundo Ron et al. (1996) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Probabilidades de exclusão e exclusão combinada para os nove touros e seis marcadores microssatélites.

Touros	Probabilidades de Exclusão						CEP
	BM8246	BMS963	TEXAN15	BMS483	CSFM50	INRA112	
1	0,510203	0,758585	0,521605	0,095805	0,258263	0,586954	0,98433
2	0,15747	0,175859	0,444444	0,006299	0,148414	0,586954	0,865166
3	0,0645	0,845212	0,444444	0,465861	0,148414	0,550468	0,98355
4	0,373457	0,905567	0,476757	0,095805	0,068799	0,611928	0,989884
5	0,533131	0,92098	0,157471	0,006299	0,188727	0,492261	0,987277
6	0,291257	0,309638	0,234379	0,006299	0,148414	0,503641	0,842653
7	0,533131	0,300728	0,344924	0,006299	0,556368	0,586954	0,961059
8	0,373457	0,026014	0,234379	0,877047	0,419309	0,437304	0,98123
9	0,533131	0,538567	0,157471	0,006299	0,55637	0,676638	0,974126

O que cada um desses valores significa é que a probabilidade de excluir uma paternidade incorreta para o touro 1, utilizando o locus marcador BM8246, por exemplo é de 0,510203, e a probabilidade combinada de exclusão quando utilizamos os seis loci ao mesmo tempo para o touro 1 é 0,98. É levada em consideração a frequência dos alelos do provável pai para os cálculos, frequência esta que foi conseguida pelos 64 animais Gir não aparentados.

A probabilidade de exclusão combinada para os marcadores dentro das respectivas famílias, teve variação de 0,842 a 0,989, que fica abaixo do ideal (0,99). A PEC para sete marcadores com PE de 0,5 aproximadamente seria de 0,992. Uma CEP de mesma magnitude (0,991) seria alcançada com somente quatro marcadores que tivessem $PE = 0,7$. (Rosa, 1997). Ainda, segundo Ron et al. (1996), se oito loci forem genotipados, com cinco alelos de igual frequência 0,2 para cada um dos loci, a CEP será de 0,986. Dessa forma o poder de exclusão pode ser maximizado pela seleção de marcadores onde os alelos do provável progenitor são raros, elevando o valor da probabilidade de exclusão.

4.7 Valores genéticos (VG) e Capacidade prevista de transmissão (PTA)

Quando é realizada a avaliação, o resultado obtido é considerado como valor genético. O PTA corresponde à capacidade prevista de transmissão, sendo uma medida do desempenho esperado das filhas do touro em relação à média genética dos rebanhos. E corresponde à metade do valor genético ajustado para uma base genética. A base genética é a média do valor genético das filhas dos touros nascidas em um ano pré-determinado. Assim, por exemplo, uma PTA de 500 kg para produção de leite significa que, se o touro for usado numa população com nível genético igual ao usado para avaliá-lo, cada filha produzirá em média 500 kg de leite por lactação a mais do que a média do rebanho. O PTA é hoje um valor mais utilizado quando se quer fazer a utilização de um touro em um rebanho determinado. A tabela 4 apresenta os valores genéticos (VG), obtidos das duas avaliações genéticas, corrigida e não corrigida para os touros em teste de progênie.

Na primeira avaliação, o touro 2 tinha um valor genético de 706,577, quando corrigimos a avaliação, retirando da análise as lactações das filhas que tiveram a paternidade excluída, este tem seu valor genético aumentado. O mesmo acontece com o touro de número 50 por exemplo, que tem sua classificação modificada e passa a ser o 48º touro.

Tabela 4 – Resultado da avaliação genética dos touros, em valores genéticos.

Touro	VG.ERR*	CONF.ERR**	VG.COR***	CONF.COR****
1	720.466	0.87	720.260	0.87
2	706.577	0.89	707.127	0.89
3	586.400	0.83	582.231	0.83
4	578.226	0.86	578.495	0.86
5	595.625	0.80	577.796	0.80
6	491.211	0.75	511.050	0.74
7	460.786	0.74	462.175	0.74

8	450.454	0.77	454.301	0.77
9	417.226	0.82	440.216	0.81
10	428.312	0.80	429.328	0.80
11	429.093	0.85	428.852	0.85
12	427.342	0.82	427.901	0.82
13	411.273	0.79	412.133	0.79
14	409.468	0.78	408.196	0.78
15	403.635	0.76	401.723	0.76
16	383.536	0.89	387.069	0.89
17	351.543	0.78	352.276	0.78
18	339.819	0.85	339.780	0.85
19	322.886	0.84	325.449	0.84
20	270.231	0.83	270.541	0.83
21	266.340	0.82	267.440	0.82
22	265.770	0.81	263.131	0.81
23	259.603	0.79	260.138	0.79
24	254.283	0.86	256.344	0.86
25	245.003	0.83	250.864	0.83
26	291.615	0.77	235.406	0.76
27	233.893	0.77	234.218	0.77
28	223.081	0.81	223.710	0.81
29	217.787	0.82	217.920	0.82
30	206.646	0.77	209.667	0.77
31	199.270	0.83	199.388	0.83
32	194.514	0.81	194.685	0.81
33	187.982	0.81	188.144	0.81
34	181.271	0.81	178.987	0.81
35	165.988	0.83	167.622	0.83
36	165.643	0.81	166.598	0.81
37	146.858	0.86	147.585	0.86
38	136.091	0.84	136.506	0.84
39	117.597	0.82	117.595	0.82
40	73.796	0.88	80.266	0.87

41	77.824	0.86	76.685	0.86
42	57.534	0.85	58.194	0.85
43	45.314	0.82	46.456	0.82
44	44.389	0.88	46.244	0.88
45	40.081	0.78	40.119	0.78
46	-43.740	0.72	-0.145	0.71
47	-31.648	0.86	-30.051	0.86
48	-47.682	0.78	-36.603	0.77
49	-41.836	0.84	-40.989	0.84
50	-45.834	0.79	-45.022	0.79
51	-83.188	0.87	-60.883	0.87
52	-68.809	0.82	-67.950	0.82
53	-111.685	0.84	-110.798	0.84
54	-169.703	0.86	-168.180	0.86
55	-171.928	0.86	-171.522	0.86
56	-309.717	0.71	-306.840	0.71
57	-322.257	0.71	-328.505	0.71
58	-432.021	0.76	-430.845	0.76

* VG.ERR corresponde ao valor genético antes da correção

** CONF.ERR corresponde à confiabilidade da avaliação antes da correção

*** VG.COR corresponde ao valor genético depois das correções das paternidades incorretas

****CONF.COR corresponde à confiabilidade após as correções

As colunas terceira e quinta representam a confiabilidade do teste.

A confiabilidade é uma medida de associação entre o valor genético previsto de um animal e seu valor genético real. Quanto maior for a confiabilidade, maior é a possibilidade do valor genético previsto ser o mesmo que o real. O valor da confiabilidade depende da quantidade de informação usada para avaliar o animal, incluindo dados do próprio animal, sua filhas e parentes. E da distribuição dessas informações em diferentes rebanhos.

4.8 Resultado da análise de correlação

Para saber se as mudanças nos valores genéticos apresentados eram significantes, ou seja, se representavam alguma mudança real, fizemos uma análise de correlação de ordem de Spearman, utilizando o sistema SAS, onde foram obtidos os resultados apresentados abaixo:

Tabela 5 – Resultado da correlação de ordem dos valores genéticos dos touros nas duas avaliações.

Variável	N	Média	Des. Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
VGERR	58	200.03852	249.23382	212.21650	-432.02100	720.46600
VGCOR	58	201.42203	247.91856	213.79350	-430.84500	720.26000

Coeficiente de Correlação de Spearman / Prob > |R| under Ho: Rho=0 / N = 58

	VGERR	VGCOR
VGERR	1.00000 0.0	0.99754 0.0001
VGCOR	0.99754 0.0001	1.00000 0.0

O resultado mostra que as diferenças entre os valores genéticos dos animais não foi significativo, uma vez que o valor da correlação foi 1,0. Ou seja, a diferença encontrada na classificação dos touros antes e depois da correção, não foi significativa. As correções, devido às paternidades incorretas não afetaram de forma significativa os valores genéticos dos touros obtidos antes da correção e da nova avaliação.

4.9 Resultado do cálculo de amostragem

Para verificar se a amostragem foi suficiente para representar a população utilizou-se a fórmula de cálculo de amostragem, segundo Barnett, V. (1974), considerando N= número total de animais utilizados com dados de produção na avaliação; Z=1,96 para obtenção de $\alpha=0,95$; P=0,36 (que foi a porcentagem de erro encontrada); S= raiz quadrada de n (número de animais amostrados) multiplicada por p (porcentagem de erro de paternidade encontrada) multiplicada por q (p-1); D= significa a diferença entre p amostral para o p populacional (diferença de erro que pode ocorrer devido à amostragem para um $\alpha=0,95$).

$$n \geq N \left\{ 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{D}{Z.S} \right)^2 \right\}^{-1} = \frac{N}{1 + \frac{1}{N} \left(\frac{D}{Z.S} \right)^2}$$

O resultado, utilizando o sistema SAS, está apresentado na tabela 6:

Tabela 6 – Resultado do cálculo de amostragem.

OBS	P	Q	N	S	Z	D	M
1	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.000	2000.00
2	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.005	1606.50
3	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.010	1010.22
4	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.015	624.13
5	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.020	406.58
6	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.025	280.76
7	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.030	203.71
8	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.035	153.82
9	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.040	119.93

10	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.045	95.97
11	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.050	78.45
12	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.055	65.28
13	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.060	55.14
14	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.065	47.18
15	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.070	40.81
16	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.075	35.64
17	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.080	31.39
18	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.085	27.86
19	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.090	24.89
20	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.095	22.37
21	0.36	0.64	2000	.00011526	1.96	0.100	20.21

O resultado obtido mostrou que para um $\alpha=0,050$, seriam necessários 78 animais sendo analisados. Foram genotipados 74 animais. A mesma análise foi feita para “M”=74 animais, e obteve-se um $\alpha=0,051$. Pode-se considerar desta forma, que o número de animais amostrados e genotipados representa a população.

5 DISCUSSÃO

Como mostram os resultados, obteve-se para as 74 filhas amostradas entre nove touros diferentes, 36% de erro de identificação de paternidade, sendo a exclusão feita quando ao menos um marcador microssatélite indicava a presença de genótipo incompatível da filha com o touro. Essa porcentagem está um pouco acima do que foi encontrado em outros países, como Alemanha de 4 a 23% (Geldermann et al., 1986), Dinamarca de 5 a 15%, chegando a 20% em machos bovinos na Irlanda segundo Ron et al. (1996) e 15,4% em animais nelore no Brasil, segundo Rosa (1997). O fato de ter-se encontrado 36% de erro de paternidade, na amostra utilizada alterou de modo não significativo a classificação dos touros. Mesmo assim, alguns pontos do teste de progênie precisam ser observados e sanados. Um fator importante a ser considerado é a coleta de sangue dos animais ter sido realizada com o animal já em idade adulta e/ou lactação. Esse fato dificulta a real identificação do animal, precisando um técnico responsável, aceitar a identificação feita por um funcionário da empresa agrícola, ou registros que nem sempre podem estar atualizados. Nesse caso, considerando a coleta de sangue de animais adultos e a alta porcentagem de erro de paternidade, podemos considerar duas situações. A primeira de que o animal adulto que está sendo amostrado é realmente aquele que teve sua produção considerada para o teste, e segunda seria de que o animal teve sua lactação incluída mas não é filha do touro indicado.

Segundo Alexander et al. (1983), em criações como de bovinos leiteiros, a veracidade dos dados de pedigree normalmente baseiam-se numa variedade de fatores, incluindo contenção correta de animais, controle de monta por observação ou inseminação artificial, observação do parto ou atividade do bezerro recém nascido.

Observando-se os resultados da amostragem e que a escolha dos touros foi aleatória, assim como a coleta de filhas dentro de diferentes rebanhos, pode-se dizer que a colheita é razoável dentro do universo de um teste de progênie que tenha aproximadamente 2000 filhas de touros.

É importante dizer também, que dentro do grupo de animais com paternidade incorreta haviam animais cujas lactações já tinham sido excluídas da avaliação e assim em nada afetaram o desempenho dos progenitores. Dentre as 27 filhas consideradas com paternidade incorreta, entre as 74 amostradas, tem-se que oito delas já haviam sido excluídas. Durante o processo de recepção dos dados que são utilizados na análise genética é feita uma exclusão de dados que deixem dúvidas quanto à sua veracidade, de modo a corrigir possíveis erros que podem ocorrer desde o encaminhamento dos dados pelas fazendas até o momento da seleção destes dados para a avaliação. Como algumas filhas consideradas com paternidade incorreta já haviam sido excluídas podemos acreditar que os critérios utilizados para que se considere ou não uma lactação estão bem fundamentados, de modo a detectar dados incorretos ou que sejam de caráter duvidoso. Dentre as lactações que foram excluídas, tem-se os seguintes fatores: é considerada apenas a primeira lactação do animal; causa de encerramento de lactação anormal (são considerados anormais os itens morte ou separação do bezerro; doença, morte ou venda da vaca durante o período medido para a avaliação; parto subsequente sem período seco; tetos perdidos por mastite; vaca que mama nela mesma ou em outras; ausência total ou parcial dos controles leiteiros; intervalo entre controles superior a 75 dias antes de atingir 305 dias de lactação); animais que são filhas mas não eram participantes do teste de progênie; nascimento do animal após período considerado válido para primeira lactação e antes de ser revelado comercialmente o nome do touro codificado para uso no teste de progênie. Entram somente lactações com mais que 90 dias e menores que 600 dias.

Um dos possíveis fatores que contribuem para o erro na identificação de paternidade é a identificação incorreta do sêmen que é utilizado nas vacas receptoras. Na análise de dados, e conferências do número de inseminações feitas, não foi possível obter uma relação da maior ou menor taxa de erro, com o número de inseminações que

foram feitas nas mães. Observou-se número idêntico de animais com paternidade incorreta resultado de primeira e segunda inseminações.

Em estudos de paternidade em humanos, critérios como o uso de mais marcadores, com grande número de alelos e baseados em outros estudos já realizados em populações grandes em diferentes regiões, conseguem-se determinar mais facilmente casos de mutações, e é possível calcular com que taxa essas mutações estariam ocorrendo. Num estudo com a população filipina, com o objetivo de gerar dados para estudos de casos de paternidade, foram analisados nove microssatélites, que não tinham desvios de equilíbrio de Hardy-Weinberg, e conseguiu-se uma probabilidade de exclusão de 0,9962 para os nove marcadores juntos. (Halos, et al.; 1999). No presente trabalho, como a população de animais não correlacionada foi suficiente para o cálculo das frequências alélicas, mas não foi suficiente para estimar taxas de mutação, poderíamos aceitar como exclusão os casos onde mais de um marcador excluiu a filha, descartando a possibilidade de cometer um diagnóstico falso. Se nossa análise tivesse este carácter, de assumir como exclusão apenas os casos onde pelo menos dois marcadores excluíram a paternidade, teríamos 22% de erro de paternidade ocorrendo na amostra considerada (16 exclusões/74 animais analisados).

Como visto no resultado alguns touros tiveram seu valor genético alterado quando a segunda avaliação genética foi realizada. E tiveram sua ordem alterada (por exemplo um touro passou de 50 para 48), isso porque houve a mudança nos valores genéticos. No entanto esta mudança foi pequena e não significativa, provada quando realizamos a análise correlação de ordem. Neste caso, um dos motivos pelo qual a mudança de valores genéticos não alterou significativamente a ordem dos touros pode ter sido que a distância dos valores de um touro e outro é ainda grande. O efeito de mudança em alguns touros que não foram testados é devido à algum parentesco que pode ter entre eles, ou seja, outras filhas companheiras de rebanho podem estar influenciando a avaliação daquele touro. Uma vez com uma amostragem razoável, podemos afirmar que a credibilidade do teste continua a mesma. A diferença entre os touros não foi significativa como mostrou a análise de correlação.

6 CONCLUSÕES

a) Os “FTA cards” são uma boa opção para a coleta de sangue, mas não é aconselhável quando se tem um número muito grande de amostras para serem feitas. O papel de filtro “FTA card” e “FTA Gene card” impossibilitam que grandes quantidades de DNA sejam extraídas, já que o DNA é eluído de 2mm de papel diretamente para a solução de PCR. Somente 500 µl de sangue são aplicados em cada círculo do papel, e 2 mm desse papel é utilizado numa única reação, limitando o número de reações que podem ser feitas a partir desta colheita quando comparada com as extrações que são feitas com sangue fresco e congelado.

b) As leituras das extrações de DNA feitas a partir de sêmen encontradas nas amostras utilizadas concordaram com o descrito na literatura, sugerindo que a metodologia de extração foi eficiente.

c) Os marcadores microssatélites BM8246, BMS963, TEXAN15 e INRA112 foram os que apresentaram maiores PE, ou seja, foram mais polimórficos para essa população sendo capazes de maior poder de exclusão e adequados para a utilização em testes de paternidade. Os marcadores BMS483 e CSFM50 apresentaram os menores valores de PE. A PEC variou de 0,842 até 0,989, mas não atingiu o valor ideal de 0,99 para o teste de paternidade.

d) De modo geral pelos resultados de exclusão apresentados, pode-se concluir que os seis microssatélites utilizados no teste foram suficientes para identificar paternidades incorretas, e podem assim ser utilizados para esse fim, desde que sejam consideradas as frequências alélicas dentro da população onde serão utilizados e que taxas de mutação sejam consideradas.

e) Apesar do cálculo para ajuste da amostragem ter mostrado que a amostra utilizada neste trabalho foi suficiente, a mesma poderia ser ampliada para permitir que proporcional número de progênes de cada touro fosse analisada, e poderiam ser ampliados também o número de touros a serem analisados.

f) O sequenciador automático A.L.F. permitiu separar alelos com diferença em até 2 pares de bases, proporcionando os resultados satisfatórios do trabalho.

g) O erro de identificação de paternidade obtido neste trabalho foi mais alto do que o encontrado na literatura, que está entre 5 e 23%, e justifica o uso do teste de paternidade em programas de melhoramento genético como os testes de progênie.

h) O teste de paternidade poderia ser utilizado em animais registrados nas associações e em programas de seleção de touros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, G.; STEVENS, D.; MOTTERSHEAD, B. Problems in the accurate recording of lambing data. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, v.23, p.361-368, 1983.
- BARENDSE, W.; ARMITAGE, S.M.; KOSSAREK, L.M.; SHALOM, A.; KIRKPATRICK, B.W.; RYAN A.M.; CLAYTON, D.; LI, L.; NEIBERGS, H.L.; ZHANG, N.; GROSSE, W.M.; WEISS, J.; CREIGHTON, P.; MCCARTHY, F.; RON, M.; TEALE, A.J.; FRIES, R.; MCGRAW, R.A.; MOORE, S.S.; GEORGES, M.; SOLLER, M.; WOMACK, J.E.; HETZEL, D.J.S. A genetic linkage map of the bovine genome. **Nature Genetics**, v.6, p.227-235, 1994.
- BARNETT, V. **Elements of sampling theory**. London: English University Press, 1974. 151p.
- BOLDMAN, K.G.; KRIESE L.A.; VAN VLECK L.D.; KACHMAN S.D. **A Manual for use of MTDFREML**: a set of programs to obtain estimates of variances and covariances. Lincoln: USDA, 1993. 120p.
- BOWLING, A.T.; EGGLESTON-STOTT, M.L.; BYRNS,G.; CLARK R.S.; DILEANIS, S.; WICTUM, E. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. **Animal Genetics**, v.28, p.247-252, 1997.

- BURNS, B.M.; TAYLOR, J.F.; HERRING, K.L.; HERRING, A.D.; HOLDER, M.T.; COLLINS, J.S.; GUERRA, T.M.; SANDERS, J.O.; DAVIS, S.K. Bovine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the TEXAN11, TEXAN12, TEXAN13, TEXAN14 and TEXAN15 loci. **Animal Genetics**, v.26, p.201-213, 1995.
- CAGGANA, M.; CONROY, J.M.; PASS, K.A. Rapid, efficient method for multiplex amplification from filter paper. **Human Mutation**, v.11, p.404-409, 1998.
- CARDUCCI, C.; ELLUL, L.; ANTONOZZI, I.; PONTECORVI, A. DNA elution and amplification by polymerase chain reaction from dried blood spots. **BioTechniques**, v.13, n.5, p.735-737, 1992.
- DODDS, K.G.; TATE, M.L.; McEWAN, J.C.; CRAWFORD, A.M. Exclusion probabilities for pedigree testing farm animals. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, n.8, p.966-975, 1996.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite. **Programa nacional de melhoramento do gir leiteiro: resultado do teste de progênie do 5º grupo de touros**. Juiz de Fora, 1997. 7p.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: Embrapa, CENARGEN, 1996. 220p.
- FREDHOLM, M. e WINTERØ, A.K. Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellites. **Animal Genetics**, v.27, p.19-23, 1996.

- GELDERMANN, H.; PIEPER, U.; WEBER, W.E. Effect of misidentification on the estimation of breeding value and heritability in cattle. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1759-1768, 1986.
- GLOWATZKI-MULLIS, M-L.; GAILLARD, C.; WIGGER, G.; FRIES, R. Microsatellite-based parentage control in cattle. **Animal Genetics**, v.26, p.7-12, 1995.
- HALOS, S.C.; CHU, J.Y.; FERREON, A.C.M.; MAGNO, M.M.F. Philippine population database at nine microsatellite loci for forensic and paternity applications. **Forensic Science International**, v.101, p.27-32, 1999.
- HEYEN, D.W.; BEEVER, J.E.; DA, Y.; EVERT R.E.; GREEN, C.; BATES, R.S.E.; ZIEGLE, J.S.; LEWIN, H.A. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. **Animal Genetics**, v.28, p.21-27, 1997.
- HOLDEN, J.J.A.; CHALIFOUX, M.; WING, M.; JULIEN-INALSING, C.; WHITE, B.N. A rapid, reliable, and inexpensive method for detection of di- and trinucleotide repeat markers and disease loci from dried blood spots. **American Journal of Medical Genetics**, v.64, p.313-318, 1996.
- HOULDEN, B.A.; ENGLAND, P.; SHERWIN, W.B. Paternity exclusion in Koalas using hypervariable microsatellites. **The Journal of Heredity**, v.87, n.2, p.149-152, 1996.
- KAPPES, S.M.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; MCGRAW, R.A.; SONSTEGARD, T.S.; SMITH, T.P.L.; LOPEZ-CORRALES, N.L.; BEATIE, C.W. A second generation linkage map of the bovine genome. **Genome Research**, v.7, p.235-249, 1997.

- KINGHORN, B.P.; KENNEDY, B.W.; SMITH, C. A method of screening for genes of major effect. **Genetics**, v.134, p.351-360, 1993.
- MOMMENS, G.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L.J. Effectiveness of bovine microsatellites in resolving paternity cases in American bison, *Bison bison* L. **Animal Genetics**, v.29, p.12-18, 1998.
- MOORE, S.S.; BYRNE, K.; BERGER, K.T.; BARENDSE, W.; MCCARTHY, F.; WOMACK, J.E.; HETZEL, D.J.S. Characterization of 65 microsatellites. **Mammalian Genome**, v.5, p.84-90, 1994.
- OLIVEIRA, A.I.G. **Introdução ao melhoramento animal I**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1995. 107p.
- REGITANO, L.C.A. Polimorfismo molecular em gerações de bovinos da raça Canchim. Piracicaba, 1996. 132p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- RON, M.; BLANC, Y.; BAND, M.; EZRA, E.; WELLER, J.I. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.676-681, 1996.
- ROSA, A.J.M. Caracterização da raça Nelore e teste de paternidade por marcadores moleculares. Piracicaba, 1997. 125p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SHUSTER, D.E.; KEHRLI, M.E.Jr.; ACKERMANN, M.R.; GILBERT, R.O. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, v.89, p.9225-9229, 1992.

- STONE, R.T.; PULIDO, J.C.; DUYK, G.M.; KAPPES, S.M.; KEELE, J.W.; BEATIE, C.W. A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite. **Mammalian Genome**, v.6, p.714, 1995.
- TALBOT, J.; HAIGH, J.; PLANTE, Y. A parentage evaluation test in North American Elk (Wapiti) using microsatellites of ovine and bovine origin. **Animal Genetics**, v.27, p.117-119, 1996.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v.17, n.16, p.6463-6471, 1989.
- TORRES, A.P. **Melhoramento dos Rebanhos: noções fundamentais**. São Paulo: Nobel, 1981. 399p.
- USHA, A.P.; SIMPSON, S.P.; WILLIAMS, J.L. Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. **Animal Genetics**, v.26, p.155-161, 1995.
- VAIMAN, D.; MERCIER, D.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; EGGEN, A.; CIAMPOLINI, R.; LEPINGLE, A.; VELMALA, R.; KAUKINEN, J.; VARVIO, S.L.; MARTIN, P.; LEVEZIEL, H.; GUERIN, G. A set of 99 cattle microsatellite: characterization, synteny mapping and polymorphism. **Mammalian Genome**, v.5, p.288-297, 1994.
- VAN VLECK, L.D. Misidentification and sire evaluation. **Journal of Dairy Science**, v.53, n.12, p.1697-1702, 1970.

VIA, L.E.; JR STEWART, C.N. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. **BioTechniques**, v.14, n.5, p.748-751, 1993.

WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUSHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **BioTechniques**, v.10, n.4, p.506-513, 1991.