

ISABELLA SILVESTRE BARRETO PINTO

**CERTIFICAÇÃO GENEALÓGICA EM BOVINOS GIR LEITEIRO
POR MEIO DE EXAME DE PATERNIDADE PELO DNA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P659c
2010
Pinto, Isabella Silvestre Barreto, 1980-
Certificação genealógica em bovinos gir leiteiro por meio
de exame de paternidade pelo DNA / Isabella Silvestre
Barreto Pinto. – Viçosa, MG, 2010.
xi, 51f. : il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Ricardo Frederico Euclides.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 43-49

1. Gir (Zebu) - Melhoramento genético. 2. Bovino de leite.
3. Genética molecular. 4. Teste de paternidade. 5. Holandês
(Bovino). I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

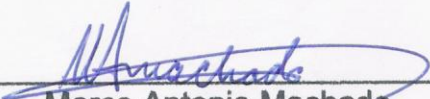
CDD 22. ed. 636.20821

ISABELLA SILVESTRE BARRETO PINTO


**CERTIFICAÇÃO GENEALÓGICA EM BOVINOS GIR LEITEIRO
POR MEIO DE EXAME DE PATERNIDADE PELO DNA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

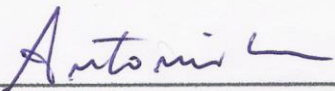
APROVADA: 05 de março de 2010



Marco Antonio Machado
(Co-orientador)




Rui da Silva Verneque
(Co-orientador)



Antônio Policarpo Souza Carneiro



Gustavo Henrique de Souza



Ricardo Frederico Eúclydes
(Orientador)

*Aos meus pais Iracema e Anibal.
Aos meus irmãos e sobrinhos.
Ao Fabrício.*

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em especial à Embrapa Gado de Leite por ceder seu espaço físico para que o trabalho pudesse ser realizado.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Frederico Euclides – Bajá – por ter me recebido como orientada e me apoiado tanto quando cheguei a Viçosa. Meu muito obrigado!

Ao Dr. Marco Antonio Machado pela orientação, confiança e credibilidade em meu trabalho.

Ao Dr. Rui da Silva Verneque que tanto me ensinou e me ajudou durante todo o trabalho.

A Dra. Ana Luisa de Souza Azevedo pelo tempo dedicado a me ensinar todo o trabalho de análise das amostras no laboratório.

A Dra. Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto pelas palavras de incentivo, sugestões e grande ajuda nas análises dos dados.

A Karla Gasparini que me ensinou tudo quando cheguei para iniciar meu trabalho e que, apesar de me desesperar, sempre me ajudou muito.

Ao pessoal do laboratório: Robert, Ariosto, Daniele, Lívia, Pricila, Karina, Isabela, Gustavo, Daisy e Tamires pela companhia, amizade, risadas e discussões.

Aos que sempre me apoiaram e que são meus pilares de sustentação. Meus pais Iracema e Anibal por sempre me incentivarem e pelo amor. Aos meus irmãos Juliana, Renata e Anibal pelo apoio e aos meus sobrinhos pelos sorrisos em dias nublados.

Ao Fabrício, meu marido, pelo amor, companheirismo, pela ajuda, e incentivo mesmo quando estivemos distantes.

As meninas da República Tia Vilma que me acolheram e que me propiciaram tantos momentos divertidos. A Odete, Deborah, Deyse, Raíra, Lucía e a todos os agregados que sempre estiveram presentes.

Ao meu cunhado Fabiano que dividiu os apertos de morar fora de casa comigo e que tanto me ajudou e atrapalhou e divertiu enquanto morávamos em Viçosa.

A todos os meus amigos que sempre me incentivaram e torceram por mim.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
2.1 - Objetivos Gerais.....	03
2.2 - Objetivos Específicos.....	03
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3.1 - Programa Nacional de Melhoramento de Gir Leiteiro.....	04
3.2 - Programas de Melhoramento e Seleção Assistida Por Marcadores..	04
3.3 - Teste de Progênie.....	06
3.4 - Testes de Paternidade.....	07
3.5 - Utilização de Marcadores Moleculares em Testes de Paternidade...	09
3.6 - Teste de Progênie e Teste de Paternidade.....	11
3.7 - Heterozigosidade e Conteúdo Polimórfico Informativo – PIC.....	11
3.8 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Endogamia.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 - Estratégia de amostragem.....	13
4.2 - Extração de DNA.....	13
4.2.1 - Extração de DNA a partir do sangue.....	13
4.2.2 - Extração de DNA a partir do sêmen.....	14
4.3 - Amplificação e Precipitação do DNA.....	14
4.3.1 - Kit StockMarks.....	15
4.3.2 - Marcadores Adicionais.....	16
4.4 - Eletroforese dos Produtos de PCR.....	17
4.5 - Análise dos dados.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.1 - Teste de Paternidade.....	20
5.2 - Análise dos marcadores moleculares.....	25
5.3 - Frequência alélica, heterozigosidade e PIC.....	27
5.4 - Frequência de erros de paternidade encontrada por touro avaliado.....	31
5.5 - Frequência de erros de paternidade encontrados nas fazendas.....	32
5.6 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Endogamia.....	36
5.7 - Coeficiente de endogamia e coeficiente de parentesco dos touros..	37
6. CONCLUSÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
8. ANEXOS.....	50

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1 - Grupo de sistemas e fatores sangüíneos de bovinos.....	08
TABELA 2 - Relação dos marcadores moleculares utilizados para realização do teste de paternidade com 303 vacas filhas de 55 touros.....	15
TABELA 3 - Protocolo de preparo do Máster Mix utilizado nas reações de PCR.....	16
TABELA 4 - Protocolo de preparo das amostras de DNA para eletroforese capilar.....	17
TABELA 5 - Protocolo de preparo das reações de genotipagem utilizando os multiplex A e B.....	17
TABELA 6 - Número de fazendas classificadas de acordo com o nível tecnológico e de manejo.....	19
TABELA 7 - Número de animais e número de marcadores a partir dos quais a paternidade foi excluída.....	22
TABELA 8 - Poder de exclusão combinada para os animais Gir utilizados no teste de paternidade.....	23
TABELA 9 - Poder de exclusão combinada para os animais Gir x Holandês utilizados no teste de paternidade.....	24
TABELA 10 - Falhas encontradas por marcador molecular utilizado na população analisada.....	26
TABELA 11 - Tamanho dos alelos encontrados (pb) e frequência alélica observada para os marcadores em toda a população de 303 indivíduos.....	28
TABELA 12 - Valores de heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada e PIC para a população analisada.....	30
TABELA 13 - Frequência de erros de paternidade encontrados por touro avaliado.....	31
TABELA 14 - Distribuição dos erros de paternidade nas 74 fazendas que participaram dos testes de paternidade.....	32
TABELA 15 - Frequência de erros de paternidade encontrados para toda a população de 303 indivíduos.....	33

TABELA 16 - Freqüência de erros de paternidade encontrada em cada classe de fazenda utilizada no teste de paternidade.....	34
TABELA 17 - Freqüência de erros de paternidade encontrada dentro da classe A de fazendas para Gir e Gir x Holandês.....	35
TABELA 18 - Freqüência de erros de paternidade encontrada dentro da classe B de fazendas para Gir e Gir x Holandês.....	35
TABELA 19 - Valores para Equilíbrio de Hardy - Weinberg para toda a população de 303 animais analisados.....	36
TABELA 20 - Coeficiente de endogamia e número de <i>loci</i> em homozigose para os touros avaliados.....	38
TABELA 21 - Coeficiente de parentesco, número de alelos compartilhados (NAC) e número de lócus compartilhados (NLC) por cada dupla de touros.....	39
FIGURA 1 - Resultado da corrida no seqüenciador automático Megabace 1000 para o marcador 28-2 para o touro 2 e duas de suas progênies.....	21

RESUMO

PINTO, Isabella Silvestre Barreto. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2010. **Certificação genealógica em Bovinos Gir Leiteiro por meio de exame de paternidade pelo DNA.** Orientador: Ricardo Frederico Euclides. Co-orientadores: Marco Antonio Machado e Rui da Silva Verneque.

A Embrapa Gado de Leite e a ABCGIL vêm desenvolvendo há 25 anos o Programa Nacional de Melhoramento de Gir Leiteiro – PNMGIL – que tem como objetivo promover o melhoramento genético da raça Gir por meio da seleção de touros geneticamente superiores, por meio de informações de suas progênies. Para avaliação genética dos touros em teste de progênie utiliza-se as informações das suas filhas, sendo importante a precisa informação de paternidade, uma vez que erros de identificação de filiação podem afetar o ganho genético. O objetivo deste trabalho foi utilizar marcadores moleculares para verificar a genealogia de animais pertencentes ao PNMGIL, verificar a frequência de erros de paternidade encontrada por fazenda e touro analisados, a frequência dos alelos encontrados na população e a eficiência dos marcadores utilizados. Para isso foram coletadas amostras de sangue de 303 filhas de 55 touros diferentes em 74 fazendas, sendo 15 fazendas criadoras de Gir puro e 59 criadoras de Gir x Holandês. Foram analisados 11 marcadores pertencentes ao Kit StockMarks for Cattle® Bovine Paternity PCR Typing recomendados pela ISAG (*International Society of Animal Genetics*) e cinco marcadores adicionais. Os produtos de PCR foram analisados no seqüenciador de DNA Megabace 1000, a análise dos fragmentos foi feita no software Fragment Profiler e os valores de heterozigosidade esperada e observada, frequência alélica e número de alelos foram calculados com o aplicativo POPGENE 1.32. Os valores de PIC (conteúdo polimórfico informativo) foram calculados no programa PowerStats v1.2 e os valores das frequências de erros por fazendas foram calculados no software SAS®. A exclusão de paternidade foi considerada quando os alelos de dois ou mais marcadores não foram compartilhados entre pai e filha. Foi encontrado um total de 18,15% de erros de paternidade em todos os casos analisados. Erros de 19,28% e 17,73%

foram encontrados nas fazendas de gado Gir e Gir x Holandês, respectivamente. Analisando o número de erros por touros foi encontrado que 22 touros não apresentaram erros e 33 touros tiveram pelo menos um erro de paternidade. Os touros com sêmen mais difundido para inseminação das vacas apresentaram maior número de erros, quando comparados aos touros com sêmen menos difundido. Os marcadores com maior número de alelos foram o ETH3, 11-3 e 28-2 com 17 alelos cada um e o marcador com menor número foi o BM1824 com 9 alelos. As médias da heterozigosidade esperada e observada dos marcadores foram de 0,7682 e de 0,7136, respectivamente. O valor médio de PIC para todos os marcadores foi de 0,78, variando de 0,59 (ETH3) a 0,86 (28-2), valores que demonstram o alto índice de polimorfismo dos marcadores. O poder de exclusão combinado para os marcadores utilizados no presente estudo foi maior que 99,99%, mostrando que estes foram eficientes para realização do teste de paternidade mesmo não sendo específicos para a população analisada. Utilizando-se marcadores mais informativos para a população analisada pode-se reduzir o número de marcadores utilizados, o que poderá diminuir o custo dos testes de paternidade. Para isso, um painel específico para zebuínos deve ser elaborado.

ABSTRACT

PINTO, Isabella Silvestre Barreto. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, March 2010. **Pedigree Certificate in Gir Breed Dairy Cattle Through Paternity Testing DNA**. Adviser: Ricardo Frederico Euclides. Co-Advisers: Marco Antonio Machado and Rui da Silva Verneque.

Embrapa Dairy has been developing for 25 years the National Program for Improvement of Dairy Gir - PNMGIL - which aims to promote the breeding Gir through the selection of top bulls. The program uses information from progeny of bulls on test, it is important to have information on paternity, since misidentification of membership can affect the genetic gain. This work used molecular markers to verify the pedigree of animals belonging to PNMGIL, check the frequency of paternity errors by farms and bull tested, verify the frequency of alleles in the analyzed population and the efficiency of markers used. Blood samples from 303 daughters were collected of 55 bulls from 74 different farms, 15 farms Gir pure and 59 of Gir x Holstein. 11 markers belonging to Kit StockMarks for Cattle® Bovine Paternity PCR Typing and five additional markers recommended by ISAG (*International Society of Animal Genetics*) were used. PCR products were analyzed on DNA sequencer MegaBACE 1000. The analysis of the fragments was done in the Fragment Profiler software and the application software POPGENE 1.32 was used to calculate observed and expected heterozygosity, allelic frequency and number of alleles. PIC values were calculated in the program PowerStats v1.2 and SAS ® software was used to estimate errors frequencies per farms. Paternity exclusion was seen when two or more markers were not shared between father and daughter. We found a total of 18.15% of paternity errors in all cases analyzed. Errors of 19.28% and 17.73% were found on Gir cattle farms and Gir x Holstein, respectively. The 55 tested bulls, in 22 were not errors observed and 33 presented at least one error of paternity. The bulls with semen for insemination of more widespread cows had a greater number of errors when compared to bulls with semen less widespread. The markers with highest number of alleles were ETH3, 11-3 and 28-2 with 17 alleles each and a marker with the lowest was the BM1824 with 9 alleles. The mean expected and observed heterozygosity of

the markers were 0.7682 and 0.7136, respectively. The average PIC for all markers was 0.78, ranging from 0.59 (ETH3) to 0.86 (28-2), values which show high polymorphisms rate to markers. Combined power of exclusion for the markers used in this study was higher than 99.99%, showing that they were efficient to perform the paternity test while not specific to the population studied. Using the most informative markers for the population tested can reduce the number of markers used, which could reduce the cost of paternity testing. For this, a specific panel for zebu must be prepared.

1. INTRODUÇÃO

Existem em vários países, distribuídos no mundo inteiro, programas de melhoramento de bovinos de leite. A eficiência destes programas depende principalmente da seleção de touros, baseados em testes realizados nas suas progênes. Com isso, o tempo esperado para se alcançar o ganho genético desejado é menor, porque pode-se inseminar várias vacas ao mesmo tempo com o sêmen de um touro que está em teste (Ron et al,1996).

No Brasil, a Embrapa Gado de Leite há 25 anos vem desenvolvendo o Programa Nacional de Melhoramento de Gir Leiteiro (PNMGL) junto com associações e criadores que se tornaram parceiros e que somam aproximadamente 400 fazendas colaboradoras contendo rebanhos de Gir e Gir x Holandês (Verneque et al., 2008).

As avaliações a partir do teste de progênie devem ser obtidas utilizando parentes próximos como mãe, irmãs e filhas, uma vez que os touros não expressam as características para leite. O teste de progênie consiste em comparar filhas de touros com suas companheiras de rebanho, ou seja, as filhas de touros nascidas no mesmo rebanho, no mesmo ano e na mesma estação. As diferenças entre os grupos de progênie são classificadas em diferenças genéticas entre touros, entre mães das progênes, entre as filhas por causas aleatórias e diferenças de natureza não genética (Lopes, 2005).

A comprovação da genealogia é fundamental para o sucesso de um programa de melhoramento, e sua importância tem aumentado com a introdução de um número cada vez maior de animais que participam desses programas. A porcentagem de erros de genealogia já foi descrita por alguns autores, podendo variar de 4% (Gelderman et al., 1986) a 36% (Baron et al., 2002). Estes erros causam falhas em programas de melhoramento podendo interferir no ranking dos touros e prejudicar as comparações dos animais. Para minimizar a ocorrência de erros de paternidade, têm sido utilizados os testes de DNA baseados nos marcadores microssatélites recomendados pela ISAG (*International Society of Animal Genetics*).

Marcadores microssatélites tem sido muito usados para testes de paternidade por serem altamente polimórficos, co-dominantes e abundantes no genoma. Esses marcadores são facilmente identificados pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*), que amplifica as seqüências dos primers aumentando o número de vezes em que ele aparece. Trabalhos realizados anteriormente por Ron et al (1996) e Gelderman et al (1986), entre outros autores, indicam que a utilização desses marcadores tem mostrado resultados consideráveis e constituem importante ferramenta em programas de melhoramento genético (Andreazza, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Realizar testes de paternidade em animais Gir e Gir x Holandês para certificação de genealogia.

2.2 – Objetivos Específicos

Verificar a eficiência dos marcadores moleculares utilizados na população analisada.

Calcular a frequência de erros de paternidade por touro avaliado.

Calcular a frequência de erros de paternidade dentro das fazendas criadoras de Gir Leiteiro e de Gir x Holandês, onde os animais foram amostrados.

Verificar a frequência de erros de paternidade encontrados dentro das fazendas classificadas como de alto nível tecnológico (classe A).

Verificar a frequência de erros de paternidade encontrados dentro das fazendas classificadas como de médio nível tecnológico (classe B).

Calcular o coeficiente de endogamia dos touros avaliados.

Calcular o coeficiente de parentesco dos touros avaliados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Programa Nacional de Melhoramento de Gir Leiteiro (PNMGL)

No Brasil, o melhoramento genético para leite na raça Gir apresenta duas importantes fases. A primeira caracteriza-se pela seleção praticada nos rebanhos e a segunda, na implantação do Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro (Verneque et al., 2001).

O Programa Nacional de Melhoramento de Gir Leiteiro (PNMGL) há 25 anos vem sendo desenvolvido e é coordenado tecnicamente pela Embrapa Gado de Leite. O PNMGL é executado em parceria com empresas públicas e privadas como a ABCGIL (Associação Brasileira dos Criadores dos Gir Leiteiro), a ABCZ (Associação Brasileira dos Criadores de Zebu), centrais de processamento de sêmen, CNPq, Fapemig, empresas estaduais de pesquisa, criadores de gado Gir e fazendas colaboradoras. O objetivo do programa é promover o melhoramento genético da raça Gir por meio da seleção e multiplicação de animais de genética superiores, previamente identificados, para as características de produção de leite, de conformação e de manejo (Verneque *et al*, 2008).

3.2 - Programas de Melhoramento de Gado de Leite e Seleção Assistida Por Marcadores - MAS

Utilizando-se marcadores moleculares, é possível detectar diferenças na seqüência do DNA, possibilitando a seleção indireta para genes de interesse no melhoramento. A identificação de marcadores próximos a determinado gene, com grande efeito numa característica quantitativa, permite acelerar o melhoramento para essa característica, pois não será mais necessário gastar tempo e esforços para avaliar fenotipicamente a população inteira.

O uso da MAS é importante em programas de melhoramento que visam selecionar características de resistência a doenças e de produção

(Martinez e Machado, 2002) e pode aumentar o ganho genético anual, aumentando a precisão das avaliações, a intensidade de seleção, diminuindo o intervalo de geração. A MAS também pode ajudar a aumentar a resposta genética especialmente em características de baixa herdabilidade, limitadas pelo sexo ou que só podem ser medidas na carcaça (Rosa et al., 2007).

Weller (2007) propôs os seguintes sistemas para criação com vistas ao melhoramento de gado de leite, utilizando-se MAS:

- um sistema de teste de progênie padrão, com informações de marcadores genéticos a serem utilizados para aumentar a precisão das avaliações de touros, além de informações fenotípicas a partir de registros das filhas (Meuwissen e Van Arendonk, 1992);
- um núcleo MOET (*Multiple Ovulation and Embryo Transfer*) em que a informação do marcador é usada para selecionar touros para serviço na população MOET, em adição a informações fenotípicas de meio-irmãs. (Meuwissen e Van Arendonk, 1992);
- sistemas de teste de progênie em que as informações sobre marcadores genéticos são usadas para pré-selecionar touros jovens para a entrada no teste de progênie (Kashi et al. 1990; Mackinnon e Georges, 1998);
- seleção de touros sem um teste de progênie, com base em registros de meio-irmãs e marcadores genéticos (Spelman et al, 1999);
- seleção de touros em regime de meio-irmãos, com base em registros de meio-irmãs e marcadores genéticos (Spelman et al. 1999);
- utilização de marcadores genéticos para reduzir os erros na determinação de paternidade (Israel e Weller, 2000).

O uso da seleção assistida por marcadores se aplica aos programas de melhoramento de gado de leite, porque esta é uma técnica economicamente viável, onde os ganhos são maiores que os custos. Isto ocorre porque ao contrário de investimento com equipamentos, os ganhos genéticos nunca se perdem, eles são cumulativos. (Weller, 2007).

Meuwissen e Van Arendonk (1992) constataram que a inclusão das informações dos marcadores para aumentar a acurácia das avaliações dos touros aumentou a taxa de ganho genético em 5% quando os marcadores explicavam 25% da variação genética.

3.3 - Teste de Progênie

O sucesso dos programas de melhoramento genético de gado de leite depende do planejamento de acasalamentos, da correta informação sobre os animais que serão acasalados e da escolha de marcadores específicos para a população que será testada (Dodds, 1995). As informações sobre as produções de leite das fêmeas podem ser facilmente obtidas com um controle que pode ser feito nos rebanhos. No entanto, o mesmo não acontece com os touros, que não expressam a característica fenotípica, como produção de leite, e que podem contribuir com até 94% do progresso genético dos rebanhos. (Verneque et al, 2008). Neste caso as avaliações devem ser obtidas em parentes próximos como mãe, irmãs e filhas. Vários programas de melhoramento utilizam informações de progênie, sendo importante a precisa informação de paternidade (Tambasco et al, 2000).

O teste de progênie consiste na avaliação genética de touros baseando-se no desempenho ou produção de suas progênies. Para tanto, os dados de produção de um número de filhos de um reprodutor são comparados aos dados de filhos de outro reprodutor nas mesmas condições de manejo e criação. O teste de progênie é indicado quando a característica não é de alta herdabilidade, quando a característica não se manifesta no próprio animal ou quando há condições de avaliar um número expressivo de filhos do reprodutor (Lopes, 2005).

Os objetivos de um teste de progênie são identificar, avaliar, selecionar e difundir os reprodutores de alto valor genético com vistas ao aumento da produção e produtividade dos rebanhos. Além disso, é possível identificar reprodutores geneticamente superiores para a produção de leite, selecionar os touros que deverão ser intensamente difundidos por meio de sêmen, planejar acasalamentos seletivos escolhendo-se os melhores reprodutores e vacas elite e submeter à avaliação pela progênie os touros jovens provenientes desses acasalamentos eletivos (Valente et al., 2001). O resultado genético que se espera alcançar ao realizar o teste de progênie é lento e é necessário que os proprietários das fazendas adotem o sistema de inseminação artificial e que tenham condições de manter os filhos dos reprodutores enquanto os animais estiverem em teste (Lopes, 2005).

Criadores têm investido em novas tecnologias para modernizar e manter atualizados os dados sobre seus rebanhos. Segundo Verneque et al. (2008), em 1992, cerca de 87.000 doses de sêmen de touros Gir Leiteiro foram comercializadas no Brasil. A venda de sêmen tem sido altamente difundida e as doses vendidas em 2008 chegaram a 805.152, mostrando que existiu uma evolução nesses 16 anos que passaram. Até o ano de 2009, 186 touros foram testados e mais de 130 ainda encontram-se em teste (ABCGIL). Este aumento demonstra uma confiabilidade dos criadores nos programas de melhoramento, estimulando a entrada de novos touros em teste e interesse nas avaliações dos touros previamente testados.

Para a implantação de teste de progênie em um rebanho é necessário que seja feita uma seleção prévia dos touros que serão testados, quando ainda jovens. A partir disso serão planejados os acasalamentos e o sêmen será distribuído para os rebanhos colaboradores. O acompanhamento deve ser feito desde a inseminação até a primeira lactação das filhas, pois qualquer informação perdida pode prejudicar a avaliação dos touros (ABCGIL).

3.4- Testes de Paternidade

O primeiro teste disponível para a verificação de parentesco em bovinos, tipagem sanguínea, surgiu por volta de 1938, como resultado dos trabalhos realizados pelo Dr. Irwin e seu grupo na Universidade de Wisconsin, Madison-EUA (Oliveira e Kuabara, 2006). Estes testes são baseados na reação de antígeno/anticorpo, onde cada antigênico é referido a um determinado fator sanguíneo (Caminhas et al., 1992). Atualmente são conhecidos 11 sistemas de grupos sanguíneos e mais de 90 diferentes fatores sangüíneos (Tabela 1). O exame de tipagem sanguínea consiste no reconhecimento dos fatores sanguíneos do animal realizado através de testes sorológicos, bem como das variantes protéicas, obtidas por eletroforese em gel de amido ou poliacrilamida. (Andreazza, 2006).

Tabela 1 – Grupo de sistemas e fatores sangüíneos de bovinos.

Sistema	Fatores sangüíneos
A	A1, A2, D1, D2, D3, H, Z'
B	B1, B2, G1, G2, G3, I1, I2, K1, K2, O1, O2, O3, O4, Ox, P1, P2, Q1, Q2, T1, T2, T3, Y1, Y2, Y3, A'1, A'2, B', D'1, D'2, E'1, E'2, E'3, E'4, E'x, F', G', I'1, I'2, J'1, J'2, K', O', P'1, P'2, Q', Y', A'', B'', F'', G'', I'', J''
C	C1, C2, C3, E1, E2, R1, R2, W1, W2, X1, X2, X3, C', L'1, L'2, C''
F	F1, F2, V1, V2, N'
J	J
L	L
M	M1, M2, M'
S	S, H', U1, U2, U', S'', H'', U''
Z	Z1, Z2
R'	R', S'
T'	T'

Adaptado de Oliveira e Kuabara, 2006.

A segurança do teste de tipagem sanguínea pode ser de 99% se este for realizado de acordo com as recomendações da ISAG, que propõe um painel de testes com pelo menos 60 diferentes anticorpos, pertencente a no mínimo 10 sistemas de grupos sangüíneos. (Oliveira e Kuabara, 2006).

Os testes de tipagem sanguínea ainda hoje são realizados, mas estão sendo substituídos pelos testes de paternidade pelo DNA. Uma vantagem deste tipo de teste em relação ao de tipagem sanguínea é que este pode ser realizado com sangue, sêmen, pêlo, saliva, muco nasal (Grattapaglia, 2004). Além disso, os testes realizados com DNA podem apresentar um poder de exclusão de paternidade maior que 99,99%, seguindo-se as normas da ISAG que recomenda o uso de 11 marcadores moleculares.

Marcadores moleculares usados para determinação de paternidade podem ser do tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), minissatélites e STR (*Short Tandem Repeats*) ou microssatélites. O RFLP geralmente tem baixo PIC (conteúdo polimórfico informativo) e baixo índice de polimorfismos, e tem deixado de ser usado por ser pouco informativo. Os minissatélites são bastante informativos, mas muito complexos o que dificulta o cálculo do poder de exclusão de paternidade, em razão da grande quantidade de bandas a serem analisadas. Marcadores microssatélites

geralmente apresentam alto índice de polimorfismo e PIC, necessitam de pequena quantidade de DNA para realização dos testes, são facilmente amplificados pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) e tem fácil interpretação de resultados. Com todas essas vantagens este marcador molecular tem sido o mais utilizado em testes de paternidade (Curi e Lopes, 2002).

3.5- Utilização de Marcadores Moleculares em Testes de Paternidade

O marcador molecular de DNA é uma técnica que permite detectar diferenças na seqüência do DNA, possibilitando a seleção indireta para genes de interesse no melhoramento animal (Martinez e Machado, 2002).

Dentre os principais tipos de marcadores moleculares, podemos destacar os microssatélites ou STR (Tambasco et al, 2000). Marcadores microssatélites são pequenas seqüências repetitivas que possibilitam monitorar regiões do genoma que podem ser transcritas ou não. Podem ser detectados por amplificação via PCR que usam primers específicos que flanqueiam repetições de di, tri ou tetranucleotídeo que caracterizam cada região do microssatélite (Dakin e Avise, 2004). O marcador microssatélite tem sido o mais utilizado por ser co-dominante e altamente polimórfico (Carneiro et al, 2007), o que possibilita verificar erros de genealogia com alto poder de discriminação. Esse polimorfismo possibilita uma boa comparação entre o material genético dos touros e de suas progênies (RON et al, 1996).

A utilização de marcadores moleculares na realização de testes de paternidade e diversidade genética tem contribuído para confiabilidade das avaliações genéticas e para a sustentabilidade de programas de melhoramento. Marcadores têm sido eficientes para estudos de paternidade mesmo quando o genótipo da mãe não está disponível.

Andreazza et al. (2001) testaram a eficiência de 11 marcadores microssatélites para identificação genética de zebuínos através de cálculos de heterozigosidade, PIC e Equilíbrio de Hardy-Weinberg. De acordo com Mommens et al. (1998) quanto menores os valores de polimorfismo e de número de alelos menor será o valor do poder de exclusão (PE), por isso

uma seleção prévia dos marcadores baseados na heterozigidade e PIC são fundamentais para o bom resultado dos testes de paternidade.

Ron et al (1996) verificaram que a frequência de erros de paternidade na população de gado Holstein em Israel, utilizando 12 marcadores microssatélites, foi de 5,2% para vacas e 2,9% para touros, em um total de 1073 amostras de animais utilizados, oriundos de 14 fazendas e do Instituto de Inseminação Artificial. Também em Israel, Weller et al (2004) coletaram amostras de 6040 vacas, filhas de 11 touros e distribuídas em 181 Kibbutz (fazendas coordenadas por grupos de famílias em Israel). Na realização deste trabalho foram utilizados 104 marcadores microssatélites, 8 destes recomendados pela ISAG para realização de confirmação de pedigree, e foi encontrada uma frequência de 11,7% de erros de paternidade. Trabalho realizado por Gelderman et al. (1986) na Alemanha encontrou erros de identificação de paternidade que variaram de 4 a 23% em grupos de filhas de 15 touros testados.

No Brasil, poucos trabalhos têm sido publicados utilizando marcadores moleculares em testes de paternidade.

Baron et al. (2002) testaram 74 filhas de 9 touros, utilizando 6 marcadores moleculares e encontraram 36% de erros de paternidade, o que, neste caso, não alterou a classificação dos touros no programa de melhoramento. Neste caso, a paternidade foi desconsiderada quando pelo menos um marcador não era compartilhado entre touro e filha.

Curi e Lopes (2002) fizeram teste de paternidade em quarenta famílias (touro/vaca/filha) de Gir Gir, utilizando 9 marcadores microssatélites, sete deles recomendados pela ISAG, e encontraram 27,5% de erros de identificação de paternidade.

Para Ron et al (1996) a utilização de marcadores moleculares para genotipagem de animais é considerada economicamente justificável para realização de testes de paternidade. Com bases nessas informações pode-se justificar a utilização de marcadores microssatélites para determinação de paternidade em bovinos.

3.6 - Teste de Paternidade e Teste de Progenie

Weller et al. (2004) afirmam que com controle de qualidade, principalmente quanto à inseminação, é possível reduzir 8% dos erros de paternidade e obter um progresso genético de 1%. Em 2001, Banos et al. fizeram uma pesquisa para verificar o impacto de erros de paternidade para posterior avaliação dos animais e perceberam que existe uma tendência de diminuição de 11 a 15% por ano em decorrência destes erros.

Christensen (1982) citado por Weller (2004) descreveu em seu trabalho que os erros de paternidade podem acontecer pelos seguintes motivos: erros na tabela de distribuição de sêmen, erros na identificação das palhetas de sêmens, erros no nome ou número de identificação dos touros, inseminação de vacas já prenhes antes da inseminação, mudança de animais de fazendas, erros na entrada das informações sobre as produções das filhas dos touros nos bancos de dados e a utilização de cobertura natural ocasionando a prenhez de vacas previamente inseminadas assumindo-se que a prenhez foi a partir da inseminação.

Segundo Gelderman et al. (1986) erros de genealogia podem diminuir a acurácia, a estimação de parâmetros como teor de gordura do leite, prejudicar a avaliação de um touro em teste reduzindo o ganho genético anual e comprometer um programa de melhoramento, uma vez que características medidas nas filhas não implicam em ganho para aquele determinado touro. Estes erros reduzem o ganho genético e fazem com que um número maior de filhas por touro testado seja necessário para se obter o resultado esperado.

3.7 – Heterozigosidade e Conteúdo Polimórfico Informativo - PIC

Para se realizar o teste de paternidade é importante que os marcadores sejam eficientes para a população a ser analisada. Uma forma de se estimar a eficiência dos marcadores é através dos valores de heterozigosidade e PIC. O valor de PIC fornece uma estimativa do poder de discriminação de um lócus, com base no número de alelos encontrados e nos valores das frequências alélicas de cada uma desses alelos.

Os valores de heterozigosidade esperada (h_e) e heterozigosidade observada (h_o), somados ao valor de PIC, auxiliam na escolha de marcadores mais informativos para a população em análise (Botstein et al, 1980). Além disso, os valores de h_e e h_o podem indicar a diversidade genética em uma população, sendo que uma discrepância entre estes valores indica que a população pode estar passando por algum processo seletivo e/ou evolutivo.

3.8- Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Endogamia

Uma forma de verificar se a população pode estar passando por algum processo de seleção é através do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (1908), descreve que “Em uma população grande, sem migração, mutação ou seleção, e que se reproduz ao acaso, as freqüências gênicas e genotípicas se mantêm constantes de geração em geração” (Falconer e Mackay, 1996).

Quando os valores observados e esperados das freqüências gênicas não se mantêm constantes de uma geração para outra, pode-se dizer que a população está sob efeito de algum tipo de pressão evolutiva, como por exemplo, seleção natural ou artificial - quando alguns genes de interesse estão sendo selecionados.

Um fator que pode interferir no Equilíbrio de Hardy-Weinberg é o alto índice de endogamia dentro de uma população. Endogamia é o resultado do acasalamento de indivíduos mais aparentados entre si do que o parentesco médio da população. A conseqüência de dois animais terem o mesmo ancestral é que ambos podem apresentar réplicas de um dos alelos presentes no ancestral e passá-lo para seus filhos, gerando um aumento de genes em homozigose (Falconer e Mackay, 1996).

O principal efeito da endogamia é aumentar a probabilidade de homozigose, às vezes aumentando a freqüência de genes deletérios recessivos, fato que pode reduzir o desempenho fenotípico não apenas em características de importância econômica, mas principalmente em características relacionadas à viabilidade dos animais (WEIGEL e LIN, 2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Estratégia de amostragem

Para se realizar o teste de paternidade foram selecionadas 303 vacas filhas de 55 touros, sendo que o número de filhas por reprodutor foi variado. As amostras de sangue foram coletadas em 74 fazendas colaboradoras do Programa Nacional de Melhoramento de Gir Leiteiro (PNMGL), sendo 15 criadoras de Gir e 59 criadoras de Gir x Holandês. Foram coletadas amostras de sangue de uma filha de cada reprodutor por rebanho. O sangue dos animais foi coletado por técnicos vinculados ao programa, colocado em tubos vacutainer, homogeneizados e mantidos sob refrigeração. Após a coleta as amostras foram levadas para o Laboratório de Genética Molecular Mário Luiz Martinez da Embrapa Gado de Leite para as análises.

4.2. Extração de DNA

4.2.1 – Extração de DNA a partir do sangue

A extração de DNA a partir do sangue foi realizada no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora - MG. O protocolo utilizado foi o de Sambrook e Russel (2001) com modificações. Os leucócitos foram retirados dos tubos contendo as amostras, com o uso de uma ponteira de 1000µL com a ponta cortada, e colocados em tubos ependorf de 2mL, previamente identificados. Em seguida foi adicionado 1mL de tampão de lise, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Esse passo foi repetido por 3 a 4 vezes, até se obter um pelete bem claro. Após isto foram adicionados 850µL de tampão de DNA com RNase e 16µL de DTT 10% e o pelete dissolvido com o auxílio de uma pipeta. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 2 horas. Em seguida foi acrescentado 20µL de Proteinase K e as amostras ficaram incubadas a 50°C *overnight* para remoção de proteínas. Foram

acrescentados 300µL de Fenol e 300µL de Clorofórmio:Isoamil (24:1) a cada amostra que, em seguida, foi agitada por 1 minuto e centrifugada por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi acrescentado 600µL de Clorofórmio:Isoamil (24:1), agitada e centrifugada novamente. Esse passo foi repetido mais uma vez e em seguida a fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado 80µL de Acetato de Sódio (NAOAC 3M) que foi misturado levemente com o auxílio de uma pipeta. Em seguida foram adicionados 600µL de Isopropanol -20°C e o tubo invertido até precipitar o DNA. O tubo foi deixado na geladeira por 2 horas e centrifugado por 10 minutos. Após isto foi descartado o sobrenadante, adicionado 400µL de Etanol 70% e centrifugado por mais 1 minuto. Descartado o sobrenadante, o pelete foi deixado para secar a temperatura ambiente por 30 minutos, resuspendido em 500µL de TE e congelado até a hora do uso.

4.2.2 – Extração de DNA a partir do sêmen

O sêmen de touros Gir Leiteiro, contido nas palhetas, foi descongelado diretamente nos tubos previamente identificados e em seguida centrifugado. A partir dessa etapa o protocolo foi o mesmo utilizado no processo de extração de DNA por sangue.

4.3. Amplificação e Precipitação do DNA

Para realizar o teste de paternidade foram utilizados o Kit StockMarks for Cattle® Bovine Paternity PCR Typing contendo 11 marcadores microssatélites recomendados pela ISAG, e mais 5 marcadores complementares. Estes marcadores foram escolhidos por seu índice de polimorfismos, multi-alelismo e posição (Tabela 2) de acordo com informações disponibilizadas pelo MARC/USDA (Meat Animal Research Center/United States Department of Agriculture (<http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>)).

Tabela 2 - Relação dos marcadores moleculares utilizados para realização do teste de paternidade com 303 vacas filhas de 55 touros.

Marcador	Fluóforo	Coloração	Tamanho esperado (bp)	BTA*	Het**
TGLA227 ¹	FAM	Azul	64–115	18	81
BM2113 ¹	FAM	Azul	116–146	2	69
TGLA53 ¹	FAM	Azul	147–197	16	78
ETH10 ¹	FAM	Azul	198–234	5	59
SPS115 ¹	FAM	Azul	235–265	15	-
TGLA126 ¹	JOE	Verde	104–131	20	67
TGLA122 ¹	JOE	Verde	134–193	21	67
INRA23 ¹	JOE	Verde	193–235	3	-
ETH3 ¹	NED	Amarelo	90–135	19	59
ETH225 ¹	NED	Amarelo	136–165	9	71
BM1824 ¹	NED	Amarelo	170–218	1	60
6-1 ²	FAM	Azul	179 – 202	6	77
10-1 ²	FAM	Azul	187 – 223	10	69
28-2 ²	FAM	Azul	215 – 243	28	79
11-3 ²	TAMRA	Preto	208 – 244	11	75
20-1 ²	HEX	Verde	251 – 261	20	61

¹Marcadores pertencentes ao Kit StockMarks for Cattle® Bovine Paternity PCR Typing.

²Marcadores adicionais

*Cromossomo bovino

**Valor de heterozigidade informado no site do MARC/USDA.

Os marcadores adicionais foram renomeados baseados em sua localização cromossômica. Desta forma o marcador do cromossomo 6 foi codificado como 6-1, o marcador do cromossomo 10 como 10-1, do cromossomo 11 como 11-3, do cromossomo 20 como 20-1 e o do cromossomo 28 como 28-2.

4.3.1 – Kit StockMarks

O kit StockMarks for Cattle® Bovine Paternity PCR Typing foi diluído de forma a realizar 200 amplificações com 8µl de volume final cada. Após o preparo das placas foram pipetados os coquetéis de PCR, as amostras de DNA e os controles positivo e negativo, sendo que, os coquetéis para PCR foram preparados de acordo com o número de amostras a serem utilizadas (Tabela 3). Em seguida foram colocados 7µl do “Máster Mix” e 1µl de DNA por tubo de PCR.

Tabela 3 – Protocolo de preparo do Máster Mix utilizado nas reações de PCR.

Reagente	Volume por amostra (μ l)
Água MilliQ	0,50
StockMarks Buffer	1,50
dNTP	2,00
AmpliTaq Gold	0,25
Primer Mix	2,75
DNA (100ng/ μ l)	1,00
Total	8,00

As amostras foram colocadas no termociclador que foi ajustado conforme o manual do Kit. A reação consistiu de desnaturação prévia a 95°C por 10 min, seguido de 31 ciclos com desnaturação a 94°C a 45 seg, anelamento a 61°C por 45 seg e extensão a 72°C por 60 seg, seguido de extensão final a 72°C por 60min e um passo final a 25°C por 2 horas.

As reações de PCR foram precipitadas com 2,4 μ l de acetato de amônio (7,5M), 24,0 μ l de álcool 98% e centrifugadas por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 24,0 μ l de álcool 70% e o DNA final foi ressuspendido com 10,0 μ l de Água MilliQ.

4.3.2 – Marcadores Adicionais

Para cada reação de PCR foi realizado um teste para verificação das condições ótimas de cada marcador, sendo verificadas temperatura de ligação do primer e concentração de magnésio. Com base nos resultados destes testes, foi utilizada a concentração de 1,5mM de magnésio para o marcador 6-1, a concentração de 2,0mM de magnésio para os marcadores 10-1, 11-3 e 28-2 e a concentração de 2,5mM de magnésio para o marcador 20-1. As amostras foram amplificadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700, de acordo com as condições de cada marcador (Anexo I).

As reações de PCR foram precipitadas com 3,0 μ l de acetato de amônio (7,5M), 30,0 μ l de álcool 98% e centrifugadas por 30 minutos. A seguir foram adicionados 30,0 μ l de álcool 70% e centrifugado por mais 1 minuto. O DNA final foi ressuspendido em 20,0 μ l de água MilliQ.

4.4. Eletroforese dos Produtos de PCR.

Para realizar a injeção das amostras com o kit StockMarks foi preparado um mix contendo 2 μ l de DNA precipitado e 8 μ l do mix para cada reação (Tabela 4) e distribuídos nas cinco placas previamente preparadas.

Tabela 4 – Protocolo de preparo das amostras de DNA para eletroforese capilar.

Reagente	Volume por amostra (μ l)
Água MilliQ	7,75
ET 400-ROX	0,15
Tween 20 (8%)	0,10
DNA Amplificado	2,00
Total	10,00

A injeção das amostras com os marcadores adicionais foi dividida em um multiplex A contendo três marcadores e um multiplex B contendo dois marcadores (Tabela 5).

Tabela 5 – Protocolo de preparo das reações de genotipagem utilizando os multiplex A e B.

Reagente	Multiplex A	Multiplex B
	Volume por amostra (μ l)	Volume por amostra (μ l)
Água MilliQ	1,25	3,75
ET 400-ROX	0,15	0,15
Tween 20 (8%)	0,10	0,10
6-1	3,00	-
11-3	3,50	-
28-2	2,00	-
10-1	-	3,00
20-1	-	3,00
Total	10,00	10,00

Em seguida as amostras foram desnaturadas a 95°C por 2 minutos e colocadas imediatamente no gelo por 3 minutos. Os fragmentos foram submetidos a eletroforese capilar no seqüenciador de DNA Megabace 1000 (GE Healthcare) e analisados no software Fragment Profiler (GE Healthcare).

4.5. Análise dos dados

Para calcular as freqüências alélicas, número de alelos (Nei, 1987), heterozigidade observada (Ho) e esperada (He) e teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada marcador foi utilizado o aplicativo POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1997).

O cálculo do valor do conteúdo polimórfico informativo (PIC); foi obtido utilizando o aplicativo PowerStats v1.2 (Promega Corporation).

$$PIC = 1 - \sum_{i=a}^n \sum_{j \geq i}^n P_{ij}^2 - \left(\left(\sum_{i=a}^n \sum_{j \geq i}^n P_{ij}^2 \right)^2 + \sum_{i=a}^n \sum_{j \geq i}^n P_{ij}^4 \right)$$

em que:

n = número de alelos;

P_i = freqüência relativa do alelo i na amostra;

P_j = freqüência relativa do alelo j na amostra.

O poder de exclusão para cada marcador, obtido com o aplicativo PowerStats v1.2 (Promega Corporation) foi calculado segundo Brener e Morris (1989), por meio da fórmula:

$$PE = h^2 (1 - 2hH^2),$$

onde:

h = heterozigotos

H = homozigotos

A probabilidade de exclusão combinada (PEC) foi calculada segundo a fórmula simplificada de Jamieson e Taylor (1997), com base em Garber e Morris (1983) sempre que o genótipo da mãe não estava disponível. Os valores por loco de PE foram combinados para a população por meio da fórmula:

$$PEC=1-(1-PE1)(1-PE2)(1-PE3)...(1-PEk),$$

para *k* número de locos.

Os valores de coeficiente de endogamia e coeficiente de parentesco, obtidos por meio de informações genealógicas, foram obtidos usando-se o Proc Inbreed, disponível no SAS[®] (Statistical Analysis Software, SAS, 2003).

As correlações de erros de paternidade encontrados por população testada, por touro avaliado e para as fazendas foram calculadas usando-se o mesmo sistema.

Com o objetivo de se ter uma visão ampla de onde os erros de paternidade estão ocorrendo e se o nível tecnológico poderia ter alguma influência nos resultados, as fazendas foram agrupadas em duas classes distintas, de acordo com seu nível tecnológico e de manejo. Para tanto, a frequência de erros de paternidade encontrados dentro das fazendas foi calculada para o número total de fazendas, para a classe A de fazendas e para a classe B de fazendas, separadamente. Das 74 fazendas analisadas, 46 fazendas foram classificadas como de alto nível tecnológico (classe A) e 28 fazendas foram classificadas como de médio nível tecnológico (classe B) (Tabela 6).

Tabela 6 – Número de fazendas classificadas de acordo com o nível tecnológico e de manejo.

População	Classe A	Classe B	Total
Gir	12	3	15
Gir x Holandês	34	25	59
Total			74

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Teste de paternidade

Em um total de 303 testes realizados, 248 paternidades foram confirmadas e 55 foram excluídas, valor que corresponde a 18,15% de erros de genealogia.

Este valor foi menor do que os encontrados por Curi e Lopes (2002) e Baron et al (2002) em seus trabalhos realizados no Brasil com gado Gir, de 27,5% e 36%, respectivamente. Por outro lado foi maior que os erros encontrados em testes de paternidade realizados com população de gado da raça holandesa em outros países, que foram de 11,7% em Israel (Weller et al.,2004), 10,73% na República Checa (Rehout et al., 2006) e 2,9% a 5,2% também em Israel (RON et al, 1995). Estes valores indicam que deve haver um maior controle dos animais participantes dos programas de melhoramento, uma vez que estes erros podem ser decorrentes da falta de controle dos animais, de distribuição incorreta de sêmen, entre outros (Weller, 2004).

A paternidade foi excluída quando os alelos de dois ou mais marcadores não foram compartilhados entre touro e filha (Figura 1).

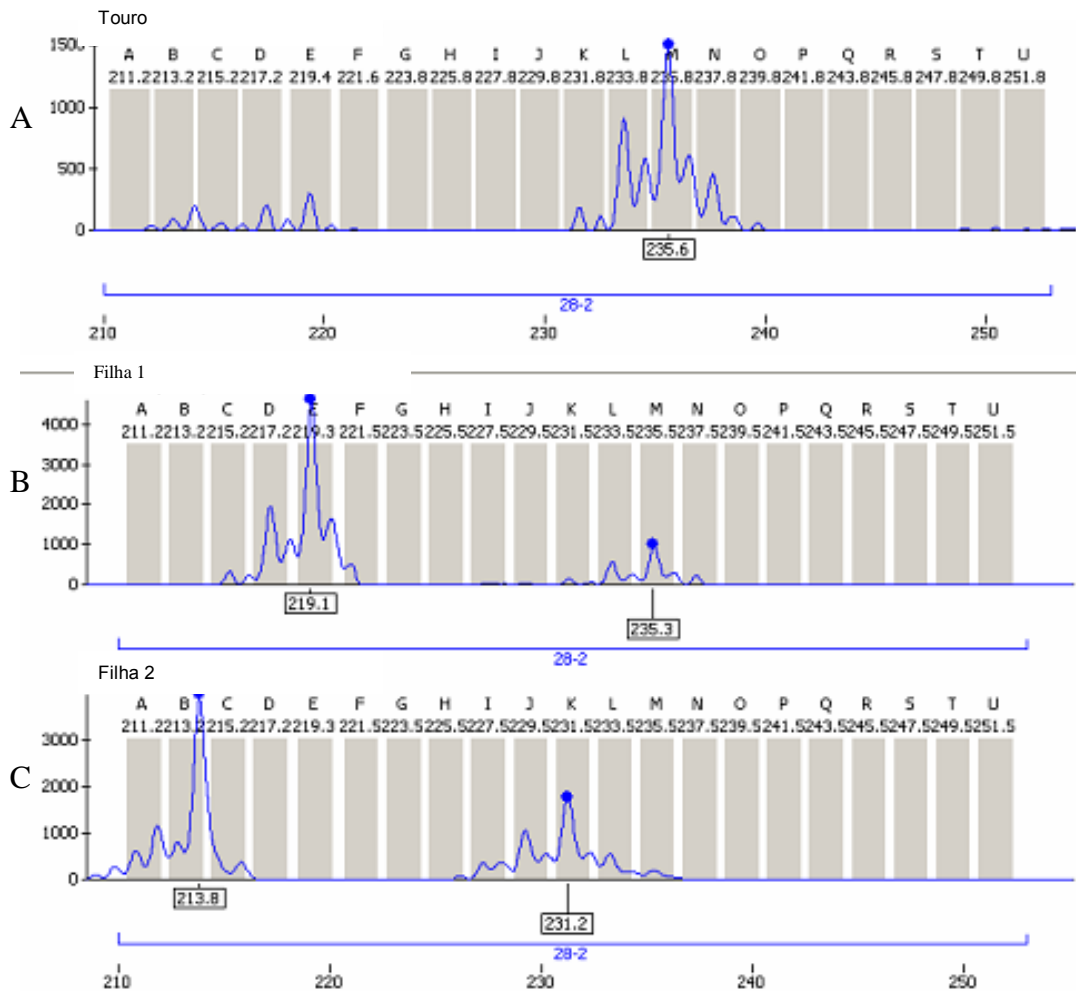


Figura 1 - Resultado da corrida no seqüenciador automático Megabace 1000 para o marcador 28-2 para o touro 2 e duas de suas progênies. A imagem A corresponde ao touro e as imagens B e C correspondem a duas de suas filhas. A imagem B mostra que a filha compartilha o mesmo alelo que o pai (M – 235pb) e a imagem C mostra a exclusão da paternidade por falta de compatibilidade de alelos.

Em cada teste de paternidade realizado foi analisado o número de marcadores não compartilhados entre touro e filha. O número de incompatibilidades encontradas em cada teste variou de 0 a 10 marcadores (Tabela 7).

Tabela 7 – Número de animais e número de marcadores a partir dos quais a paternidade foi excluída.

Animais	Marc. diferentes
179	0*
69	1*
18	2
9	3
7	4
10	5
4	6
1	7
3	8
1	9
2	10
303	

*paternidade incluída = 248 animais

Os resultados obtidos somente com a utilização dos marcadores do kit não foram satisfatórios (PEC = 99,58%) a ponto de excluir a paternidade com segurança. Para se obter o valor de poder de exclusão combinado (PEC) satisfatório então, foram selecionados, através do site do MARC/USDA, cinco marcadores extras, baseados em seus valores de heterozigidade e polimorfismo. Após o acréscimo desses cinco marcadores o valor de PEC chegou ao índice desejável de 99,99%.

Os valores de poder de exclusão para os marcadores foram calculados separadamente para as populações de Gir (Tabela 8) e Gir x Holandês (Tabela 9). O cálculo do poder de exclusão foi feito separadamente para as duas populações analisadas para obtermos valores e informações mais precisos sobre cada uma delas.

Tabela 8 – Poder de exclusão combinada para os animais Gir utilizados no teste de paternidade.

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M	8M	9M	10M	11M	12M	13M	14M	15M	16M
BM2113 ¹	0,586	0,586	0,586	0,586	0,586	0,586	0,586	0,586	0,586	0,586	0,586	0,586	0,586	0,586	0,586	0,586
ETH10 ¹		0,101	0,101	0,101	0,101	0,101	0,101	0,101	0,101	0,101	0,101	0,101	0,101	0,101	0,101	0,101
SPS115 ¹			0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422
TGLA227 ¹				0,241	0,241	0,241	0,241	0,241	0,241	0,241	0,241	0,241	0,241	0,241	0,241	0,241
TGLA53 ¹					0,167	0,167	0,167	0,167	0,167	0,167	0,167	0,167	0,167	0,167	0,167	0,167
INRA23 ¹						0,542	0,542	0,542	0,542	0,542	0,542	0,542	0,542	0,542	0,542	0,542
TGLA122 ¹							0,590	0,590	0,590	0,590	0,590	0,590	0,590	0,590	0,590	0,590
TGLA126 ¹								0,484	0,484	0,484	0,484	0,484	0,484	0,484	0,484	0,484
BM1824 ¹									0,547	0,547	0,547	0,547	0,547	0,547	0,547	0,547
ETH225 ¹										0,148	0,148	0,148	0,148	0,148	0,148	0,148
ETH3 ¹											0,182	0,182	0,182	0,182	0,182	0,182
6-1 ²												0,585	0,585	0,585	0,585	0,585
11-3 ²													0,608	0,608	0,608	0,608
28-2 ²														0,682	0,682	0,682
10-1 ²															0,65	0,65
20-1 ²																0,415
PEC	0,586	0,6278	0,7849	0,8367	0,864	0,9377	0,9745	0,9868	0,994	0,9949	0,9958**	0,9983	0,99932	0,99978	0,99992	0,99996

¹ Marcadores do Kit StockMarks for Cattle® Bovine Paternity PCR Typing

² Marcadores adicionais

** Resultado parcial de PEC obtido somente com o kit StockMarks for Cattle® Bovine Paternity PCR Typing

Tabela 9 – Poder de exclusão combinada para os animais Gir x Holandês utilizados no teste de paternidade

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M	8M	9M	10M	11M	12M	13M	14M	15M	16M
BM2113 ¹	0,454	0,454	0,454	0,454	0,454	0,454	0,454	0,454	0,454	0,454	0,454	0,454	0,454	0,454	0,454	0,454
ETH10 ¹		0,664	0,664	0,664	0,664	0,664	0,664	0,664	0,664	0,664	0,664	0,664	0,664	0,664	0,664	0,664
SPS115 ¹			0,388	0,388	0,388	0,388	0,388	0,388	0,388	0,388	0,388	0,388	0,388	0,388	0,388	0,388
TGLA227 ¹				0,290	0,290	0,290	0,290	0,290	0,290	0,290	0,290	0,290	0,290	0,290	0,290	0,290
TGLA53 ¹					0,308	0,308	0,308	0,308	0,308	0,308	0,308	0,308	0,308	0,308	0,308	0,308
INRA23 ¹						0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533
TGLA122 ¹							0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422	0,422
TGLA126 ¹								0,611	0,611	0,611	0,611	0,611	0,611	0,611	0,611	0,611
BM1824 ¹									0,524	0,524	0,524	0,524	0,524	0,524	0,524	0,524
ETH225 ¹										0,281	0,281	0,281	0,281	0,281	0,281	0,281
ETH3 ¹											0,436	0,436	0,436	0,436	0,436	0,436
6-1 ²												0,787	0,787	0,787	0,787	0,787
11-3 ²													0,914	0,914	0,914	0,914
28-2 ²														0,706	0,706	0,706
10-1 ²															0,800	0,800
20-1 ²																0,620
PEC	0,454	0,8165	0,8877	0,9203	0,9448	0,9742	0,9851	0,9942	0,9972	0,998	0,9989**	0,9998	0,99998	0,99999	0,99999	0,99999

¹ Marcadores do Kit StockMarks for Cattle® Bovine Paternity PCR Typing

² Marcadores adicionais

** Resultado parcial de PEC obtido somente com o kit StockMarks for Cattle® Bovine Paternity PCR Typing

O valor de poder de exclusão combinado de 99,99% foi alcançado com 15 marcadores na população de Gir e com 13 marcadores na população de Gir x Holandês. Estes resultados podem ser justificados porque os marcadores do kit comercial foram desenvolvidos e padronizados para raças européias taurinas e não para raças zebuínas. Este fato evidencia a importância de se conhecer as diferentes raças para que se possam estabelecer os melhores marcadores para cada uma delas uma vez que elas não apresentam, necessariamente, os mesmos alelos (Curi e Lopes, 2002).

No cálculo do poder de exclusão para a população de Gir x Holandês, 11 dos 16 marcadores foram mais informativos, tendo um valor de poder de exclusão combinada maior que na população de Gir. Os marcadores ETH10, TGLA53, TGLA227 e ETH3, que são recomendados pela ISAG para testes de paternidade, no entanto, apresentaram baixo poder de exclusão tanto para animais Gir quanto para animais Gir x Holandês. Curi e Lopes (2001) e Cervini et al (2006) encontraram resultado semelhante em seus trabalhos para os marcadores ETH225 e ETH3, com Gir e Nelore respectivamente, mostrando que estes não são eficientes para a população de zebuínos.

Rehout et al (2006) testaram uma população de gado holandês com alguns marcadores utilizados no presente estudo e pertencentes ao kit, e encontraram maiores valores de poder de exclusão. Com apenas nove marcadores (BM2113, ETH3, ETH10, ETH225, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126 e TGLA227) eles conseguiram o índice de PEC de 99,99%. Se apenas os marcadores com maior poder de exclusão fossem usados para a realização do presente estudo o número de marcadores utilizados também poderia ser reduzido. (Anexo II)

5.2 – Análise dos marcadores moleculares.

Embora os marcadores utilizados não fossem específicos para Gir eles foram eficientes ao identificar erros de paternidade mesmo sem o genótipo das mães. Este resultado também foi obtido por Ron et al. (1996) e

Rehout et al. (2006) que também demonstraram a eficiência desses marcadores na mesma situação.

Dentre os marcadores moleculares aqui testados pode-se destacar que 6-1, 10-1, 11-3, 20-1 e 28-2 foram os mais informativos para as populações de Gir e de Gir x Holandês. Azevedo (2006) indicou em seu trabalho que os marcadores 13-5, 19-1B e 27-1 também podem ser utilizados em testes de paternidade devido a seu alto grau de polimorfismo e grande número de alelos.

Alguns marcadores apresentaram falhas durante a fase da amplificação (Tabela 10). A porcentagem de falhas variou de 0% (TGLA122) a 12,01% (TGLA227), com uma média de 9,56%.

Tabela 10 – Falhas encontradas por marcador molecular utilizado na população analisada.

Marcador	% falhas
BM2113	1,67
ETH10	1,12
SPS115	5,31
TGLA227	12,01
TGLA53	3,35
INRA23	0,28
TGLA122	0,00
TGLA126	0,83
BM1824	0,28
ETH225	2,23
ETH3	1,40
6-1	4,75
11-3	2,51
28-2	3,07
10-1	2,51
20-1	1,40

Apesar da porcentagem de falhas do TGLA227 ter sido alta ele não foi eliminado dos testes porque não influenciou os resultados quando se verificou a frequência de falhas individualmente.

Para verificarmos a eficiência dos marcadores, foram calculados os valores de heterozigosidade e PIC para todos os marcadores utilizados neste estudo, em toda a população analisada. Com base nestes valores verifica-se a qualidade dos marcadores em questão, importante para exclusão da paternidade.

5.3 – Frequência alélica, heterozigosidade e PIC.

O número e a frequência de alelos para os 16 marcadores foram contabilizados para toda a população analisada. O total do número de alelos encontrados no presente estudo foi de 214 com uma média de 13 alelos por loco (Tabela 11). De forma geral o número de alelos encontrados foi maior que o indicado no site do MARC. Apenas os marcadores 6-1 e TGLA122 tiveram menor número de alelos (16 e 14) que o listado no site do MARC (21 e 19 respectivamente). Resultados publicados por Rodrigues et al. (2002) com a raça Gir apontaram sete alelos para o marcador BM2113 variando de 125 a 141bp enquanto que, no presente trabalho, foram identificados onze alelos cujos tamanhos variaram de 118 a 144bp.

Carneiro et al (2007) identificaram em seu trabalho com a raça Nelore, utilizando os onze marcadores presentes no kit, número de alelos variando de 4 (TGLA227 e ETH10) a 13 (TGLA53) com uma média de 8,2 alelos. Mukesh et al (2004) encontraram uma média de 8,3 alelos para os 20 *loci* analisados em trabalho com raças indianas, sendo três (ETH3, ETH10 e ETH225) também analisados aqui. Embora o número de alelos encontrados no presente estudo seja maior em comparação aos descritos na literatura acima, nenhum dos dois resultados obtidos foram suficientes para que o índice de exclusão de paternidade fosse ideal, sendo necessária, nos dois casos, a inclusão de marcadores adicionais.

Tabela 11 – Tamanho dos alelos encontrados (pb) e frequência alélica observada para os marcadores em toda a população de 303 indivíduos.

Marcador	Alelo	Frequência	Marcador	Alelo	Frequência
BM2113	118	0,0322	TGLA126	105	0,0602
	126	0,0182		107	0,0028
	128	0,0154		113	0,0028
	130	0,3165*		115	0,1331
	132	0,0014		119	0,1812
	134	0,0350		121	0,1527
	136	0,2395		123	0,1064
	138	0,0462		125	0,1064
	140	0,1078		127	0,3543*
	142	0,1148		129	0,0938
BM1824	144	0,0560	TGLA227	69	0,0014
	176	0,0028		71	0,0084
	178	0,0014		73	0,0210
	180	0,1415		79	0,0140
	182	0,3501*		81	0,5434*
	184	0,3151		83	0,0882
	186	0,0602		85	0,0700
	190	0,0420		87	0,0252
	192	0,0126		89	0,0014
	194	0,0714		91	0,0182
TGLA53	149	0,0014	ETH3	93	0,0070
	153	0,0364		95	0,0210
	157	0,0602		97	0,0350
	159	0,4314*		99	0,0112
	161	0,0602		101	0,0126
	163	0,0462		107	0,0014
	165	0,0742		98	0,0112
	167	0,1415		100	0,0140
	169	0,0280		102	0,0882
	171	0,0042		104	0,0014
TGLA122	175	0,0084	ETH10	108	0,0042
	177	0,0014		110	0,0028
	179	0,0434		112	0,0028
	181	0,0014		114	0,5588*
	183	0,0280		116	0,2087
	134	0,0028		118	0,0266
	136	0,2801*		120	0,0070
	138	0,0028		122	0,0014
	140	0,0042		124	0,0014
	143	0,1303		126	0,0196
	145	0,0252	128	0,0210	
	147	0,1485	130	0,0154	
	151	0,1485	132	0,0014	
	153	0,0854	203	0,0014	
	155	0,2031	207	0,0014	
	159	0,0028	209	0,1849	
	161	0,0042	211	0,0140	
	163	0,0952	213	0,5406*	
	165	0,0112	215	0,0028	
			217	0,0574	
		219	0,1303		
		221	0,0182		
		223	0,0238		
		225	0,0140		

*Alelo com maior frequência para o marcador especificado.

Tabela 11 – continuação

Marcador	Alelo	Freqüência	Marcador	Alelo	Freqüência
	137	0,1821		209	0,1022
	139	0,0042		211	0,0056
	141	0,0350		213	0,0084
	143	0,0168		215	0,1583
	145	0,0854		217	0,0056
ETH225	147	0,1050		219	0,0336
	149	0,0266		221	0,0546
	151	0,0098	11-3	223	0,3445*
	153	0,0014		225	0,0574
	155	0,0098		227	0,0518
	157	0,4888*		229	0,0294
	159	0,0070		231	0,0672
				233	0,0350
	194	0,0084		235	0,0070
	196	0,0490		237	0,0112
	198	0,1499		239	0,0014
	200	0,0084		241	0,0014
	202	0,0238			
	204	0,0462		184	0,0014
INRA23	206	0,0840		186	0,0056
	208	0,1050		188	0,0434
	210	0,1527		190	0,1022
	212	0,0028		192	0,0602
	214	0,3263*		194	0,2521*
	216	0,0308	10-1	196	0,0546
	218	0,0014		200	0,0336
				202	0,1681
	237	0,0014		204	0,1723
	243	0,0028		206	0,0350
	245	0,1695		222	0,0028
	247	0,4608*		224	0,0406
SPS115	249	0,2003		226	0,0028
	251	0,0294			
	253	0,0182		246	0,0014
	255	0,0336		248	0,1078
	257	0,0210		250	0,0672
	259	0,0070		252	0,0406
			20-1	254	0,0308
	172	0,0042		256	0,0924
	174	0,0014		258	0,1667
	176	0,0042		260	0,4510*
	178	0,0028		262	0,0266
	180	0,1345		266	0,0014
	182	0,0448			
6-1	184	0,0546		213	0,0112
	186	0,0186		215	0,0070
	188	0,0084		217	0,0252
	190	0,0084		219	0,2619*
	192	0,0658		221	0,0728
	194	0,0448		225	0,0056
	196	0,3473*		227	0,0042
	198	0,1779	28-2	229	0,0056
	200	0,0028		231	0,0616
	202	0,0336		233	0,0644
				235	0,1064
				237	0,0406
				239	0,0868
				241	0,1134
				243	0,0728
				245	0,0266
				247	0,0028

*Alelo com maior freqüência para o marcador especificado.

Os valores de heterozigidade esperada (h_e), heterozigidade observada (h_o) e PIC foram calculados para todos os marcadores utilizados em toda a população analisada (Tabela 12).

Tabela 12 – Valores de heterozigidade observada, heterozigidade esperada e PIC para a população analisada.

Locus	Ho	He	PIC
BM2113	0,7283	0,8104	0,78
ETH10	0,6723	0,6528	0,61
SPS115	0,6359	0,7139	0,64
TGLA227	0,4902	0,6748	0,58
TGLA53	0,5658	0,7741	0,74
INRA23	0,7647	0,8245	0,80
TGLA122	0,7647	0,8252	0,80
TGLA126	0,7899	0,8040	0,78
BM1824	0,7395	0,7485	0,71
ETH225	0,5070	0,7073	0,66
ETH3	0,6078	0,6349	0,59
6-1	0,8207	0,8156	0,78
11-3	0,8880	0,8293	0,80
28-2	0,8319	0,8781	0,86
10-1	0,8571	0,8561	0,83
20-1	0,7535	0,7417	0,71
Média	0,7136	0,7682	0,778

A média de PIC para a população foi de 0,778 e a média de heterozigidade foi de 0,7136. A maior heterozigidade observada foi encontrada para o marcador 11-3 (0,8880) e a menor para o TGLA227 (0,4902). O maior valor de PIC foi observado para o marcador 28-2 (0,86) e o menor foi para o marcador TGLA227 (0,58). A elevada heterozigidade média observada (0,7136) e a esperada (0,7682), sugerem a existência de alta diversidade genética na população em estudo. O valor de H_e somado ao alto valor médio de PIC (0,778) justifica o fato de o poder de exclusão encontrado neste estudo ter sido maior que 99,99%.

5.4 – Frequência de erros de paternidade encontrada por touro avaliado.

A frequência de erros de paternidade foi calculada para todos os touros testados nos presente estudo. O objetivo desse cálculo foi verificar se os touros com sêmen mais difundido teriam mais problemas de paternidade.

Dos 55 touros testados, 22 não apresentaram nenhum erro e 33 apresentaram erros de paternidade (Tabela 13).

Tabela 13 – Frequência de erros de paternidade encontrados por touro avaliado.

Touro	% erros	N	Touro	% erros	N
7	0%	3	34	14%	7
9	0%	4	1	17%	6
10	0%	4	8	17%	6
11	0%	5	15	17%	6
14	0%	2	35	17%	6
17	0%	4	41	17%	6
19	0%	2	18	20%	5
21	0%	5	28	20%	5
22	0%	2	33	20%	5
25	0%	5	24	25%	4
26	0%	5	40	25%	8
29	0%	5	45	25%	4
30	0%	4	38	27%	11
32	0%	8	2	33%	6
36	0%	10	13	33%	9
44	0%	4	52	33%	3
47	0%	6	31	38%	8
48	0%	3	37	38%	8
49	0%	5	43	40%	5
51	0%	3	3	50%	8
54	0%	3	16	50%	2
55	0%	4	20	50%	2
5	8%	13	50	50%	4
4	11%	9	53	50%	4
23	11%	9	6	60%	5
39	11%	9	46	67%	6
42	11%	9	12	100%	2
27	14%	7			

N = número de filhas analisadas por touro.

O fato de os touros com sêmen mais utilizado para inseminação artificial terem tido maior índice de erros de paternidade do que os touros com sêmen menos difundido pode ser em decorrência de erros na tabela de distribuição de sêmen, erros na identificação das palhetas de sêmens e erros no nome ou número de identificação dos touros. Quanto mais disseminado for o sêmen do touro maior a probabilidade de ocorrerem erros relacionados a este.

5.5 – Frequência de erros de paternidade encontrados nas fazendas.

Das 74 fazendas em cujos dados foram utilizados, 35 fazendas não apresentaram erro de paternidade e 39 fazendas apresentaram erros. O número de erros dentro das 74 fazendas amostradas variou de zero a três (Tabela 14).

Tabela 14 – Distribuição dos erros de paternidade nas 74 fazendas que participaram dos testes de paternidade.

N de erros	Quant. fazendas	Nº erros por fazenda	Raça
0	35	5	Gir
		30	Gir x Holandês
1	25	6	Gir
		19	Gir x Holandês
2	12	2	Gir
		10	Gir x Holandês
3	2	2	Gir

Dos 55 erros de paternidade identificados 16 foram encontrados em fazendas criadoras de Gir e 39 em fazendas criadoras de Gir x Holandês. As causas desses erros devem ser verificadas para que não ocorram novamente. A mudança de animais de fazendas, erros na entrada das informações sobre as produções das filhas dos touros nos bancos de dados

e a utilização de cobertura natural ocasionando a prenhez de vacas previamente inseminadas assumindo-se que a prenhez foi a partir da inseminação são alguns fatores que podem justificar a freqüência destes erros dentro das fazendas. Um acompanhamento mais cauteloso de todas as etapas do programa de melhoramento pode ajudar a identificar onde estes estão acontecendo e como é possível reduzi-los até serem eliminados.

A freqüência e o número de erros de paternidade encontrados para cada população analisada foram calculados e estão listados na tabela 15.

Tabela 15 – Freqüência de erros de paternidade encontrados para toda a população de 303 indivíduos.

Erro		Gir x Holandês	Gir	Total
Sem erro	Freqüência	181	67	248
	Porcentagem	59,74	22,11	81,85
	% Linha	72,98	27,02	
	% Coluna	82,27	80,72	
Com erro	Freqüência	39	16	55
	Porcentagem	12,87	5,28	18,15
	% Linha	70,91	29,09	
	% Coluna	17,73	19,28	
Total		220	83	303
		72,61%	27,39%	100%
Sem erro – paternidade incluída				
Com erro – paternidade excluída				

Dos 303 testes realizados, 220 foram com animais Gir x Holandês e 83 com Gir. Nos testes realizados com Gir x Holandês foram encontrados 17,73% de erros de paternidade e nos testes realizados com Gir 19,28% de erros. Estes valores estão próximos ao encontrado para a população geral que foi de 18,15%. Isto sugere que erros de paternidade têm ocorrido na mesma freqüência dentro das duas populações estudadas.

A porcentagem de erros de paternidade encontrada por classe de fazenda, classificadas de acordo com seu nível tecnológico, está listada na tabela 16.

Tabela 16 – Frequência de erros de paternidade encontrada em cada classe de fazenda utilizada no teste de paternidade.

Erro		A	B	Total
Sem erros	Frequência	186	62	248
	Porcentagem	61,39	20,46	81,85
	% linha	0,75	0,25	
	% coluna	83,04	78,49	
Com erros	Frequência	38	17	55
	Porcentagem	12,54	5,61	18,15
	% linha	69,1	30,9	
	% coluna	16,96	21,51	
	Total	224	79	303
	% Total	73,93	26,07	100%

Sem erro – paternidade incluída, Com erro – paternidade excluída
A = alto nível tecnológico, B= médio nível tecnológico

A frequência de erros encontrada dentro da classe A de fazendas foi de 16,96% e na classe B foi de 21,51%. Os erros foram maiores na classe B de fazendas apesar de o número de fazendas incluídas nesta classe – 79, serem menor que o número de fazendas incluídas na classe A – 224. Estes valores podem indicar que quanto maior o nível tecnológico e o controle sobre os animais menor será a frequência de erros de paternidade na população.

Com o objetivo de avaliar a frequência de erros encontrada para as populações de Gir x Holandês e Gir dentro de cada classe de fazenda, os cálculos das frequências de erros de paternidade foram realizados separadamente para as classes A (Tabela 17) e B (Tabela 18) de fazendas.

Tabela 17 - Frequência de erros de paternidade encontrada dentro da classe A de fazendas para Gir e Gir x Holandês.

Raça		Erro		Total
		0	1	
Gir x Holandês	Frequência	126	24	150
	Porcentagem	56,25	10,71	66,96
	% linha	84,00	16,00	
	% coluna	67,74	63,16	
Gir	Frequência	60	14	74
	Porcentagem	26,79	6,25	33,04
	% linha	81,08	18,92	
	% coluna	32,26	36,84	
Total		186	38	224
% Total		83,03	16,97	100%

Nas fazendas classificadas como de alto nível tecnológico - A, 66,96% dos 224 animais são Gir x Holandês e 33,04% são Gir. Os resultados apresentados sugerem que a frequência de erros presentes dentro de fazendas classificadas como A, independe da população, uma vez que o valor encontrado para Gir (18,92%) ficou muito próximo do valor encontrado para Gir x Holandês (16%).

Tabela 18 - Frequência de erros de paternidade encontrada dentro da classe B de fazendas para Gir e Gir x Holandês.

Raça		Tipo erro		Total
		0	1	
Gir x Holandês	Frequência	55	15	70
	Porcentagem	69,62	18,99	88,61
	% linha	78,57	21,43	
	% coluna	88,71	88,23	
Gir	Frequência	7	2	9
	Porcentagem	8,86	2,53	11,39
	% linha	77,78	22,22	
	% coluna	11,29	11,77	
Total		62	17	79
% Total		78,48	21,52	100%

Nas fazendas classificadas como B, 88,61% dos 79 animais são Gir x Holandês e 11,39% são Gir. As frequências de erros de Gir x Holandês (21,43%) e Gir (22,22%) dentro da classe B, também demonstram que nesta classe os erros independem da população, tendo valores próximos nas duas populações analisadas.

5.6 – Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Endogamia

Com a realização do teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg em toda a população de animais Gir e Gir x Holandês analisada, foram detectados que quatro dos 16 marcadores estão em equilíbrio (Tabela 19).

Tabela 19 – Valores para Equilíbrio de Hardy- Weinberg para toda a população de 303 animais analisados.

Marcador	Probabilidade
BM2113	0,000007
ETH10*	0,099385
SPS115	0,000000
TGLA227	0,000000
TGLA53	0,000000
INRA23	0,036287
TGLA122*	0,472777
TGLA126	0,010495
BM1824*	0,664459
ETH225	0,000000
ETH3*	0,654162
6-1	0,000000
11-3	0,000001
28-2	0,000153
10-1	0,000105
20-1	0,003929

*Marcadores em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$)

No presente estudo, quatro dos 16 loci estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg: ETH10, TGLA122, BM1824 e ETH3. Andreazza (2006) relatou em seu trabalho que estes mesmos loci encontravam-se em equilíbrio para a população de Gir testada naquela ocasião. A confirmação desses resultados é um indicativo de que estes loci, nestas populações, não estão sujeitos à pressão de seleção, e pode-se considerar que o fluxo de migração e a mutação são desprezíveis. (Viana et al., 2003)

De forma geral a população apresentou-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. Este resultado pode ser em consequência de um elevado número de cruzamentos preferenciais que acontecem dentro de programas de melhoramento (Carneiro et al, 2007). O fato de alguns marcadores estarem em desequilíbrio também sugere que podem existir associações desses marcadores com alguma característica de interesse econômico que possivelmente está sendo selecionada nos programas de melhoramento ou mesmo que a população foi limitada, sendo necessária uma avaliação mais abrangente (Andreazza, 2006).

5.7 – Coeficiente de endogamia e coeficiente de parentesco dos touros

O coeficiente de endogamia (F) é um dos fatores que podem afetar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Animais altamente endogâmicos tendem a causar um desequilíbrio na população geral, onde as frequências gênicas ou alélicas não estarão constantes. Para se ter uma visão das frequências e sua possível correlação com o EHW foi calculado o coeficiente de endogamia e o número de *loci* encontrados em homozigose para cada touro individualmente. (Tabela 20).

Tabela 20 – Coeficiente de endogamia e número de *loci* em homozigose para os touros avaliados.

Touro	F	NLHo*	Touro	F	NLHo*
1	0,073	2/16	29	0,080	6/16
2	0,030	3/16	30	0,001	5/16
3	0,000	3/16	31	0,002	6/16
4	0,001	3/16	32	0,000	4/16
5	0,016	7/16	33	0,000	6/16
6	0,000	2/16	34	0,020	4/16
7	0,000	4/16	35	0,000	3/16
8	0,010	3/16	36	0,010	5/16
9	0,000	4/16	37	0,032	8/16
10	0,000	4/16	38	0,000	6/16
11	0,010	6/16	39	0,000	2/16
12	0,001	7/16	40	0,010	5/16
13	0,000	4/16	41	0,014	5/16
14	0,020	5/16	42	0,001	1/16
15	0,000	4/16	43	0,020	7/16
16	0,000	6/16	44	0,010	2/16
17	0,020	7/16	45	0,000	3/16
18	0,040	4/16	46	0,000	2/16
19	0,020	4/16	47	0,040	6/16
20	0,020	6/16	48	0,010	7/16
21	0,090	6/16	49	0,020	5/16
22	0,000	5/16	50	0,000	6/16
23	0,070	3/16	51	0,018	4/16
24	0,010	6/16	52	0,050	3/16
25	0,000	3/16	53	0,080	6/16
26	0,000	6/16	54	0,040	5/16
27	0,030	6/16	55	0,060	7/16
28	0,000	2/16			

*Número de *Loci* em homozigose

O cálculo do coeficiente de parentesco foi realizado através do aplicativo Proc Inbreed, disponível no SAS[®] (Statistical Analysis Software, SAS, 2003), por meio de informações de genealogia disponíveis sobre os touros em teste. Foram recolhidas e analisadas as informações até a 3^a geração de ancestrais para cada touro em teste. Os valores do número de alelos e números de loci compartilhados por cada dupla de touros foi calculado para verificação de possível correlação do coeficiente de parentesco com o número de alelos em loci em comuns (Tabela 21).

Tabela 21 – Coeficiente de parentesco, número de alelos compartilhados (NAC) e número de loci compartilhados (NLC) por cada dupla de touros.

Pares	Coef. Parentesco	NAC	NLC	Pares	Coef. Parentesco	NAC	NLC
1-35	0.2500	15	13	12-51	0.2500	16	14
1-36	0.1250	13	12	13-24	0.2500	16	13
1-40*	0.5000	19	14	13-31	0.0156	16	12
1-45	0.2500	14	11	13-41	0.0078	15	13
1-47	0.1250	16	12	13-43	0.0313	13	12
1-50*	0.5000	18	15	13-44	0.0313	11	10
2-14	0.2500	19	14	14-16*	0.5000	19	14
2-16	0.1250	15	12	14-18	0.0625	14	12
2-18	0.0625	15	13	14-48	0.0313	14	11
2-48	0.0313	13	11	14-54	0.2500	20	14
2-55*	0.5000	18	14	14-55	0.1250	14	11
7-10*	0.5000	13	12	15-26	0.1875	16	14
7-21	0.2500	14	13	15-31	0.0313	11	11
7-34	0.2500	14	13	15-41	0.0156	10	10
7-47	0.1250	12	10	15-43	0.0625	13	11
8-22	0.2500	18	14	16-18	0.0313	11	9
8-28	0.1250	15	12	16-48	0.0156	13	11
8-29	0.2500	15	13	16-54	0.1250	11	10
8-32*	0.5000	20	14	16-55	0.0625	10	7
8-38	0.2500	14	11	17-25	0.0313	11	9
8-40	0.1250	15	12	17-33	0.5000	20	15
8-42	0.0156	16	12	17-37	0.2500	16	13
8-46	0.2500	16	13	17-39	0.2500	16	15
8-49	0.2500	21	15	17-51	0.0156	13	11
9-11	0.0625	12	10	18-48	0.1250	15	11
9-13	0.0625	14	11	18-52	0.0625	13	12
9-15	0.1250	11	10	18-55	0.0313	12	9
9-24	0.0625	9	8	19-20*	0.5000	22	15
9-26	0.1875	14	12	19-23*	0.5000	12	12
9-31	0.2500	16	12	19-24	0.2500	15	10
9-41	0.1250	14	13	19-31	0.2500	12	11
9-43*	0.5000	19	16	19-54	0.2500	15	12
9-44	0.1250	15	14	19-55	0.2500	15	11
10-21*	0.5000	17	13	20-23*	0.5000	15	13
10-34*	0.5000	14	10	20-24	0.2500	19	11
10-47	0.2500	15	13	20-31	0.2500	15	12
11-13	0.2500	14	12	20-54	0.2500	20	14
11-19	0.2500	17	13	21-34	0.2500	15	13
11-20	0.2500	15	11	21-47	0.5000	18	14
11-24*	0.5000	16	11	21-52	0.2500	16	13
11-31	0.0156	11	8	22-28	0.3750	16	13
11-41	0.0078	15	12	22-29	0.2500	13	12
11-43	0.0313	11	9	22-32*	0.5000	18	12
11-44	0.0313	10	8	22-34	0.2500	13	9

*Touros com alto coeficiente de parentesco e grande número de alelos em comum

Tabela 21 – Continuação

Pares	Coef. Parentesco	NAC	NLC	Pares	Coef. Parentesco	NAC	NLC
22-38	0.2500	10	9	33-37	0.1250	14	11
22-40	0.1250	13	11	33-39	0.1250	13	11
22-46	0.2500	13	11	33-48	0.1250	18	13
22-49	0.2500	17	13	33-49	0.2500	17	14
23-31	0.5000	10	9	33-50	0.2500	15	13
23-54*	0.5000	15	11	33-51	0.0078	13	12
24-31	0.0156	10	9	34-38	0.2500	11	10
24-41	0.0078	12	11	34-47	0.1250	14	12
24-43	0.0313	5	5	35-36	0.2500	17	15
24-44	0.0313	8	7	35-40	0.1250	13	11
24-45	0.2500	16	12	35-45*	0.5000	17	13
25-33	0.0156	14	13	35-50	0.1250	15	12
25-37	0.0313	11	9	35-51	0.0625	14	11
25-39	0.0313	13	11	36-40	0.0625	11	10
25-41	0.0469	13	10	36-45	0.2500	14	11
25-51	0.1250	12	12	36-47	0.0625	14	11
26-31	0.0469	15	11	36-50	0.0625	16	12
26-41	0.0234	14	11	36-51	0.0625	11	10
26-43	0.0938	11	9	37-39	0.2500	17	14
27-33	0.2500	16	13	37-51	0.0156	11	8
27-48*	0.5000	22	15	38-40	0.1250	14	11
27-49	0.2500	19	15	38-46	0.2500	14	11
27-50	0.2500	17	14	38-49	0.2500	16	12
28-29	0.1250	14	12	39-51	0.0156	11	9
28-32	0.2500	16	12	40-45	0.1250	13	12
28-38	0.1250	13	10	40-46	0.1250	13	12
28-40	0.0625	14	11	40-47	0.0625	12	10
28-46	0.1250	15	11	40-48	0.1250	12	10
28-49	0.1250	15	13	40-49	0.1250	15	13
28-50*	0.5000	14	13	40-50	0.2500	17	11
29-32*	0.5000	18	14	41-43	0.0625	11	9
29-38	0.2500	15	10	41-44	0.0156	17	14
29-40	0.1250	14	11	43-44	0.0625	13	12
29-46	0.2500	14	12	45-50	0.1250	17	12
29-49	0.2500	12	10	46-49	0.2500	16	13
31-41	0.1250	15	12	47-50	0.0625	16	11
31-43	0.1250	14	10	47-52	0.1250	16	14
31-44	0.0313	11	11	48-49	0.1250	16	15
31-54	0.2500	14	12	48-50	0.1250	17	14
32-38*	0.5000	16	13	48-52	0.0313	12	10
32-40	0.2500	18	13	48-55	0.0156	13	10
32-46*	0.5000	19	15	52-53	0.0313	15	14
32-49*	0.5000	19	15				

*Touros com alto coeficiente de parentesco e grande número de alelos em comum

O valor do coeficiente de parentesco foi calculado para todos os touros, de forma que cada um foi analisado com todos os outros que apresentavam qualquer nível de parentesco. O alto valor de coeficiente de parentesco encontrado para alguns pares de touros pode ser justificado pelo número reduzido de animais, o que gera um aumento de acasalamentos utilizando indivíduos aparentados. O aumento de acasalamentos entre indivíduos aparentados pode estar relacionado ao uso de inseminação artificial utilizando-se os mesmos touros em vários rebanhos diferentes (VANZIN, 2007).

Os valores encontrados para coeficiente de endogamia e de parentesco dos touros, mostram a importância de se utilizar marcadores informativos, com alto poder de exclusão e PIC para maior discriminação dos animais em teste. Estas informações sugerem, mais uma vez, que um painel específico para zebuínos deve ser desenvolvido para que se possa obter um resultado confiável nos testes de paternidade.

6. CONCLUSÕES

Os marcadores 6-1, 10-1, 11-3, 20-1 e 28-2 foram os mais informativos para a população testada.

Utilizando-se marcadores mais informativos para a população analisada pode-se reduzir o número de marcadores utilizados, o que poderá diminuir o custo dos testes de paternidade. Para isso, um painel específico para zebuínos deve ser elaborado.

Os erros de paternidade encontrados no presente estudo ocorreram na mesma frequência nas duas populações testadas.

A ocorrência de erros de paternidade dentro das fazendas classificadas com A foi menor quando comparada com as fazendas classificadas como B. Isto sugere que os níveis tecnológicos e de manejo podem ter efeito sobre a frequência de erros.

A avaliação dos touros mostrou que para aqueles com sêmen altamente difundido a frequência de erros de paternidade foi maior.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a importância de um controle mais eficaz nos rebanhos participantes dos programas de melhoramento. Dessa forma será possível obter ganhos mais promissores utilizando teste de progênie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREAZZA, M.C. Aplicação de Microsatélites (STR) de bovinos em Animais de Raças Zebuínas. Porto Alegre, 2006. 51p. (Dissertação - Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ABCGIL - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE GIR LEITEIRO. <http://www.girleiteiro.org.br>, acessado em 20 de novembro de 2009.

AZEVEDO, A.L.S. Varredura genômica para QTL associados a resistência a *Boophilus Microplus* em bovinos. Viçosa: 2006. 53p. (Dissertação - Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

BANOS, G.; WIGGANS, G.R. e POWELL, R.L. Impact of paternity errors in cow identification on genetic evaluations and international comparisons. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.2523-2539, 2001.

BARON, E.E.; MARTINEZ, M.L.; VERNEQUE, R.S.; COUTINHO, L.L. Parentage testing and effect of misidentification on the estimation of breeding value in Gir Cattle. **Genetics Molecular Research**, v.25, p.389-394, 2002.

BRENNER, C. e MORRIS, J.. Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes: validation and other studies. **Proceedings for the International Symposium on Human Identification**. Promega Corporation, Madison, WI. p.21-53. 1990.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M. e DAVIS, R.W. Construction of a gene linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p. 314-331, 1980.

CAMINHAS, M.M.T.; BORTOLOZZI, J.; CHAMMA, O.J. e CURI, P.R. Grupos sangüíneos de bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.8, p. 1195-1200, 1992.

CARNEIRO, T.X.; GONÇALVES, E.C.; SCHNEIDER, M.P.C.; SILVA, A. Diversidade genética e eficiência de DNA microssatélites para o controle genealógico da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1257-1262, 2007.

CERVINI, M; HENRIQUE-SILVA, F.; MORTARI, N. e MATHEUCCI JR., E. Genetic variability of 10 microsatellite markers in the characterization of Brazilian Nelore cattle (*Bos indicus*) **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.3, 486-490, 2006.

CHAPUIS, M.P e ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, n.3, p. 621-631, 2007.

CURI, R.A.; LOPES, C.R. Evaluation of nine microsatellite loci and misidentification paternity frequency in a population of Gyr breed bovines. **Brazilian Journal Vet. Research Animal Science**, São Paulo, v. 39, p.129-135, 2002.

DAKIN, E.E. e AVISE, J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, p. 504-509, 2004.

DODDS, K.G.; TATE, M.L.; McEWAN, J.C. et al. Exclusion probabilities for pedigree testing farm animals. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, 966 – 975, 1995.

FALCONER, D.S e MACKAY, T.F.C. Introduction of Quantitative Genetics. England: Longman, 4^o edition. 1996. P. 3 - 22.

GARBER, R.A.; MORRIS, J.W. General equations for the average power of exclusion for genetic systems of n codominant alleles in one-parent and no-parent cases of disputed parentage. In: WALKER, R.H. (Ed.). **Inclusion probabilities in parentage testing**. Arlington: American Association of Blood Banks, p.277- 280. 1983.

GELDERMAN, H., PIEPER, U. e WEBER, W.E. Effect of misidentification on the estimation of breeding value and heritability in cattle. **Journal of Animal Science**, v.63:1759–1768, 1986.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores de DNA para registro de animais e diagnóstico de maciez de carne. 13º Exposição Nacional das Raças Simental e Simbrasil. São Paulo, 2004.

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.

ISRAEL, C. e WELLER, J.I. Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.181–187, 2000.

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

KASHI, Y., HALLERMAN, E. e SOLLER, M. Marker-assisted selection of candidate bulls for progeny testing programmes. **Animal Production**, v.51, p.63–74, 1990.

LEVENE, H. On a matching problem in arising in genetics. **Annals of Mathematic Statistics**, v.20, 91-94, 1949.

LOPES, P.S. **Teoria do Melhoramento Animal**. FEPMVZ, Belo Horizonte, 2005.118p.

MACKINNON, M.J. e GEORGES, M.A.J. Marker-assisted preselection of young dairy sires prior to progeny-testing. **Livestock Production Science**, v.54, p.229–250, 1998.

MARTINEZ, M.L. e MACHADO, M.A. Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. **Anais do IV Simpósio Nacional de Melhoramento Animal**, 2002.

MEAT ANIMAL RESEARCH CENTER/UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>, acessado em 26 de junho de 2009.

MEUWISSEN, T.H.E.; VAN ARENDONK, J.A.M. Potential improvements in rate of genetics gain from marker-assisted selection in dairy cattle breeding schemes. **Journal of Dairy Science**, v.75: 1651-1659, 1992.

MOMMENS, G.; VAN ZEVEREN, A. e PEELMAN, L.J. Effectiveness of bovine microsatellites in resolving paternity case in American bison, *Bison bison* L. **Animal Genetics**, v.29, p.12-18, 1998.

MUKESH, M; SODHI, M; BATHIA, S; MISHRA, B.P. Genetic diversity of Indian native cattle breeds as analysed with 20 microsatellite loci. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.121, p. 416-424, 2004.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University, 1987.

OLIVEIRA, D.A.A. e KUABARA, M.Y. A genealogia, sua importância para o melhoramento e para a produção animal e os métodos de confirmação de pedigrees. <http://www.limousin.com.br/pages/artigos/vendo.asp?ID=91>, 2006. Artigo número: 180106. Acessado em 02 dezembro de 2009.

REHOUT, V.; HRADECKA, E e CITEK, J. Evaluation of parentage testing in the Czech population of Holstein cattle. **Czech Journal of Animal Science**, v.51, n. 12, p.503-509, 2006.

RODRIGUES, S.G.; OLIVEIRA, D.A.A.; TEIXEIRA, C.S. et al. Microssatélites BM2113, ILSTS005, ILSTS008, ETH131 e RM88 em testes de verificação de parentesco para bovinos da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.3, 2002.

ROSA, A.J.M.; BIJMA, P.; OLIVEIRA, H.N.; LOBO, R.B. e VAN ARENDONK, J.A.M. A deterministic simulation study of embryo marker-assisted selection for age at first calving in Nelore (*Bos indicus*) beef cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.3, 552-559, 2007.

RON, M.; BLANC, Y.; BAND, M.; EZRA, E. e WELLER, J.L.. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. **Journal of Dairy Science**. v.79, 676–681, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, v. 2, 142-147, 1986.

SPELMAN, R.J., GARRICK, D.J. e VAN ARENDONK, J.A.M. Utilization of genetic variation by marker assisted selection in commercial dairy cattle populations. **Livestock Production Science**, v.59, p.51–60, 1999.

TAMBASCO, D.D.; ALENCAR, M.M.; COUTINHO, L.H.; et al. Caracterização molecular de animais da raça Nelore utilizando microssatélites e genes candidatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.4, p. 1044-1049, 2000.

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.

VALENTE, J; DURÃES, M.C.; MARTINEZ, M.L.; TEIXEIRA, N.M. (Ed).
Melhoramento genético de bovinos de leite. Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 2001. 256p.

VANZIN, I.M. **Inseminação artificial e manejo reprodutivo em bovinos**.
Disponível em: <http://www.inseminaçãoartificial.com.br>, acessado em 27/07/2009.

VERNEQUE, R.S.; LEDIC, I.L.; MARTINEZ, M.L. et al. Programa de Melhoramento do Gir Leiteiro. **III Simpósio Nacional de Melhoramento Animal**. 2001.

VERNEQUE, R.S.; PEIXOTO, M.G.C.D.; VERCESI FILHO, A.E.; et al.
Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro – Sumário Brasileiro de Touros – Resultado do Teste de Progênie – Maio 2008.
Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2008. 63p.

VIANA, J.M.S.; CRUZ, C.D. e BARROS, E. G. Genética – Fundamentos.
Viçosa: **UFV**, V.1, 2003.

YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T.B.J. et al. POPGENE (VERSION 1,32):
Software Microsoft Windows-based freeware for population genetics analysis. Alberta: **University of Alberta**, 1997.

WEIGEL, K.A. e LIN, S.W. Use of computerized mate selection programs to control inbreeding of Holstein and Jersey cattle in the next generation.
Journal of the Dairy Science. V. 83, p. 822-828, 2000.

WELLER, J.I; FELDMESSER, E.; GOLIK, M.; TAGER-COHEN, I. Factors Affecting Incorrect Paternity Assignment in the Israeli Holstein Population.
Journal of Dairy Science. v. 87, p. 2627-2640, 2004.

WELLER, J.I. Marker-assisted selection in dairy cattle. In: Guimarães, E.P.; Ruane, J.; Scherf, B.D.; Sonnino, A.; Dargie, J.D. (Eds.). Marker assisted

selection: Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. Roma: **FAO**, p. 199-228, 2007

ANEXO I

Condições de amplificação dos marcadores adicionais utilizados na realização do teste de paternidade.

Marcador 6-1

	10 ciclos			25 ciclos			
Desnat.	Desnat.	Anel.	Ext.	Desnat.	Anel.	Ext.	Ext. Final
94°C	94°C	62°C	72°C	94°C	52°C	72°C	72°C
00:30	00:30	00:30	00:30	00:30	00:30	00:30	45:00:00

Marcadores 10-1 e 11-3

	10 ciclos			25 ciclos			
Desnat.	Desnat.	Anel.	Ext.	Desnat.	Anel.	Ext.	Ext. Final
94°C	94°C	64°C	72°C	94°C	54°C	72°C	72°C
00:30	00:30	00:30	00:30	00:30	00:30	00:30	45:00:00

Marcador 20-1

	10 ciclos			25 ciclos			
Desnat.	Desnat.	Anel.	Ext.	Desnat.	Anel.	Ext.	Ext. Final
94°C	94°C	60°C	72°C	94°C	50°C	72°C	72°C
00:30	00:30	00:30	00:30	00:30	00:30	00:30	45:00:00

ANEXO II

Probabilidade de exclusão combinada para toda a população analisada, utilizando-se somente os marcadores mais informativos.

	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M	8M	9M
6-1	0,719	0,719	0,719	0,719	0,719	0,719	0,719	0,719	0,719
11-3		0,818	0,818	0,818	0,818	0,818	0,818	0,818	0,818
28-2			0,712	0,712	0,712	0,712	0,712	0,712	0,712
10-1				0,759	0,759	0,759	0,759	0,759	0,759
20-1					0,533	0,533	0,533	0,533	0,533
BM2113						0,495	0,495	0,495	0,495
INRA23							0,544	0,544	0,544
TGLA122								0,536	0,536
TGLA126									0,589
	0,719	0,94886	0,98527	0,99645	0,99834	0,99916	0,99962	0,99982	0,99993