



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE BIOTECNOLOGIA

LUCIANO GOMES DE LIMA

Diversidade genética, estrutura populacional e associação de regiões cromossômicas com a prolificidade em *Capra hircus* (Linnaeus, 1758)

MACEIÓ
2018

LUCIANO GOMES DE LIMA

Diversidade genética, estrutura populacional e associação de regiões cromossômicas com a prolificidade em *Capra hircus* (Linnaeus, 1758)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, com ponto focal na Universidade Federal de Alagoas - UFAL, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Angelina Bossi Fraga

MACEIÓ
2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

L732d Lima, Luciano Gomes de
Diversidade genética, estrutura populacional e associação de
regiões cromossômicas com a prolificidade em *Capra hircus*
(Linnaeus, 1758) / Luciano Gomes de Lima. – 2018.
140 f. : il. tabs., grafs.

Orientadora: Angelina Bossi Fraga.

Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2018.

Inclui bibliografias.

1. Caprinos - Prolificidade. 2. Genotipagem. 3. Goat SNP50. 4. Raças locais brasileiras. I. Título.

CDU:575.22

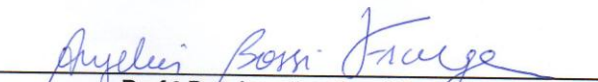
LUCIANO GOMES DE LIMA


Diversidade genética, estrutura populacional e associação de regiões cromossômicas com a prolificidade em *Capra hircus*

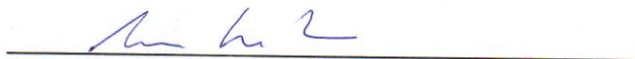
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária.


Aprovada em: 05/11/2018.


BANCA EXAMINADORA


Prof.ª Dr.ª Angelina Bossi Fraga
Universidade Federal de Alagoas - UFAL


Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
Universidade Federal de Alagoas – UFAL


Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart
Universidade Federal de Alagoas - UFAL


Dr. João Gomes da Costa
EMBRAPA Tabuleiros Costeiros


Dr. Karlos Antônio Lisboa Ribeiro Júnior
Pesquisador Desenvolvimento Científico Regional CNPq

A Deus, na pessoa de seu Filho Jesus Cristo, que me deu vida e saúde para que eu pudesse chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me capacitou para realizar o doutorado em Biotecnologia.

A minha orientadora, professora Dr^a Angelina Bossi Fraga, pela disponibilidade, acolhida, respeito, incentivo e principalmente pela sua orientação firme e dedicação exemplar, acompanhando no passo-a-passo deste trabalho. Destaco o apoio incondicional prestado, a forma interessada e pertinente como acompanhou a realização deste estudo. As suas críticas construtivas, conselhos e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Não posso esquecer a sua grande contribuição para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Eternamente grato por todo o apoio.

À memória dos meus pais, José Petrócio Gomes da Silva e Creusa Gomes de Lima, sábios orientadores da vida. Seus ensinamentos e todo o amor que me deram.

Aos meus filhos Leonardo, Lucas e Lavynia, por todo amor, companheirismo, ajuda e paciência, que sempre me motivaram abrindo mãos de muitos lazes e tempo que mereciam para que conquistássemos o nosso propósito.

A minha irmã Luciana e meu cunhado Bernardo, por toda ajuda e por me incentivarem mesmo à distância.

Ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, através do coordenador do Curso de Doutorado em Biotecnologia, Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana, visto a importância de formar recursos humanos com sólida base científica para suprir as demandas tanto do setor acadêmico como do setor empresarial com vistas ao incremento tecnológico, permitindo acelerar o processo de desenvolvimento da região Nordeste, produzindo impacto socioeconômico, diminuindo as desigualdades sociais, possibilitando a melhoria da qualidade de vida de sua população.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas – FAPAL que representa hoje uma instituição inteiramente comprometida com o desenvolvimento e com o destino do Estado, melhor qualificando e contribuindo para a formação de recurso humano de alto nível para Alagoas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos – código de financiamento 001, talvez sem esse auxílio fosse mais difícil constituir esse trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE, pelo Acordo de Cooperação Técnica celebrado junto à Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Rio Largo/AL, que por meio da cessão dos dados referentes aos seus rebanhos caprinos, oportunizou a realização dessa pesquisa.

Ao Drº Kleibe de Moraes Silva, pesquisador da Embrapa/Caprinos e Ovinos, responsável pelo Acordo de Cooperação Técnica celebrado entre à Embrapa e a Universidade Federal de Alagoas – UFAL, bem como pelo auxílio na interpretação dos resultados e na elaboração dos artigos.

Aos professores Drº Guilherme Jordão Magalhães Rosa e Drº Fernando Brito Lopes do Department of Animal Science – University of Wisconsin, pela importante contribuição pelo auxílio durante as análises e interpretação dos dados.

Aos membros da banca examinadora, pela disposição e paciência em analisar este trabalho.

Em especial, aos meus amigos Breno Melo, Filipe Chagas, Jailton Bezerra, Raisal Rios, Rosália Medeiros, Luiz Fernando, Reinaldo Vilar, Lays Thayse, Namíbia Balbino e Isabelle de Melo pelo carinho, amizade e incentivo.

Aos animais.

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

Muitíssimo obrigado!

"O grande desafio humano é resistir à sedução do repouso, pois nascemos para caminhar e nunca para nos satisfazer com as coisas como estão. A insatisfação é um elemento indispensável para quem, mais do que repetir, deseja criar, inovar, refazer, modificar, aperfeiçoar. Assumir esse compromisso é aceitar o desafio de construir uma existência menos confortável, porém ilimitada e infinitamente mais significativa e gratificante."

Mario Sergio Cortella

RESUMO

A prolificidade na espécie caprina (*Capra hircus*) é uma característica relevante para o sistema de produção em virtude de seu forte impacto na viabilidade do rebanho e contribuição significativa para o melhoramento genético dessa espécie. Utilizando-se marcadores moleculares de última geração, Goat SNP50 Beadchip Illumina® (53,347 SNPs) foram genotipadas 127 cabras pertencentes ao plantel da Embrapa Caprinos e Ovinos em Sobral/CE visando ao estudo de diversidade genética, estrutura populacional e associação genômica ampla com a prolificidade das fêmeas. As informações eram provenientes de cabras das raças Saanen (32), Anglo Nubiana (29), Moxotó (36) e Canindé (30). Inicialmente, foi realizado o estudo de validação dessa plataforma de microarranjo para as raças locais brasileiras. O controle de qualidade foi aplicado empregando-se os seguintes critérios: Call rate ($>0,98$), MAF ($>0,05$) e HWE ($>0,001$) resultando na manutenção de 39.726, 36.532, 38.431 e 44.025 SNPs para as raças Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen, respectivamente. Os estudos de validação indicaram que o painel Goat SNP50 Beadchip foi eficiente devido a sua ampla amostragem no genoma para as raças em estudo. O estudo da diversidade genética e estrutura populacional mostraram que as heterozigosidades esperadas e observadas (H_e e H_o) foram similares entre si e baixas para todas as raças em estudo, dando origem a baixos coeficientes de endogamia revelando haver diversidade genética nas populações estudadas. As análises de componentes principais mostraram que os quatros grupos raciais são geneticamente distintos, entretanto, foi identificado a transferência de material genético entre eles. Nas análises de associação genômica ampla, de acordo com o Manhattan plot, considerando um threshold (limite) P-value ajustado por Bonferroni ($P=0,05/N^\circ$ de marcadores) não houve a presença de SNPs significativamente associados com a prolificidade.

Palavras-chave: Goat SNP50. Caprinos. Genotipagem. Raças locais brasileiras. Prolificidade.

ABSTRACT

Goat (*Capra hircus*) prolificacy is an important trait for animal production because of its great impact on viability of herd and significant contribution to breeding of this species. This study was carried out using next generation high throughout Goat SNP50 Beadchip Illumina® (53,347 SNPs) to genotype 127 goats from “Goats and Sheep Embrapa Sobral/CE” aiming to study the genetic diversity, population structural and wild genomic association with prolificacy. Information studied were from Saanen (32), Anglo Nubian (29), Moxotó (36) and Canindé (30) goats. First, validation study this genotyping microarray was carried out on high processing microarray platform (Goat SNP50 Beadchip) for Moxotó and Canindé breeds, since these were not included during the development of this tool. Control quality was applied according following criteria: Call rate (> 0.98), MAF (> 0.05) and HWE (> 0.001). After quality control, from 52,975 SNPs included, 40,401; 38,399; 41,792 and 46,502 were maintained SNPs for the studies of diversity of the Moxotó, Canindé and Anglo Nubian breeds, respectively. The results of validation study indicated that Goat SNP50 Beadchip panel was efficient, due to its extensive sampling in the genome of the populations studied. Genetic diversity study and population structural showed that expected and observed heterozygosity (H_e and H_o) were similar and low for all studied breeds lead law inbreeding coefficient revealing genetic diversity into the studied population. Principal component analysis showed the four breed groups were genetically different. However, transfer of genetic material was identified between each other. In genome wide association analyses, according Manhattan plot with one threshold P-value adjusted by Bonferroni ($P=0.05/N^\circ$ of markers) there was no significant SNPs associated with prolificacy.

Keywords: Genetic association. Prolificacy. Single nucleotide polymorphisms. Goat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial – Caprino.....	17
Figura 2 - Representação de parto simples (A) e de parto duplo (B).....	20
Figura 3 - Representação de polimorfismos de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphism SNPs)	27
Figura 4 - Exemplar da raça Moxotó.....	35
Figura 5 - Exemplar da raça Canindé.....	35
Figura 6 - Exemplar da raça Saanen.....	35
Figura 7 - Exemplar da raça Anglo Nubiana.....	35
Figura 8 - Número de SNPs (barra Verde) e comprimento do cromossomo (barras vermelhas) por cromossomos em cabras.....	44
Figura 9 - Distribuição da frequência do menor alelo por genoma inteiro de cabras das raças caprinas Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen.....	44
Figura 10 - Distribuição de menor frequência alélica por genoma de acordo com as raças caprinas Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen após o controle de qualidade	45
Figura 11 - Declínio do desequilíbrio de ligação para cada raça separadamente: Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen	46
Figura 12 - Declínio do desequilíbrio de ligação para todas as raças caprinas em estudo Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen	47
Figura 13 - Arvore filogenética dos grupos genéticos baseadas nas distancias genéticas padrão de Nei	51
Figura 14a - Sccater plot tridimensional baseado na matriz de parentesco genômica para as raças Moxotó, Canindé, Saanen e Anglo Nubiana	52
Figura 14b - Sccater plot tridimensional baseado na matriz de parentesco genômica para as raças Moxotó (Amarelo), Canindé (Vermelho), Saanen(Verde) e Anglo Nubiana(Azul).....	53

Figura 15 - Cluster baseado na matriz genômica para os caprinos da raça Moxotó, Canindé, Saanen e Anglo Nubiana	53
Figura 16 - Heatmap baseado na matriz genômica para as raças Moxotó, Canindé, Saanen e Anglo Nubiana.....	54
Figura 17 - Número ótimo de cluster com base na estatística Gap e no total na soma do quadrado	55
Figura 18 - Estrutura genética para $k = 4$ usando o programa structure em quatro raças de caprinos	55
Figura 19 - Quantile – quantile plots do estudo de associação genômica ampla SNP por SNP em cabras Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen	57
Figura 20 - Genome-wide Manhattan plots do estudo de associação Genoma-ampla das análises SNP por SNP para as quatro raças caprinas: Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Os dez maiores efetivos de rebanhos caprinos no mundo	18
Tabela 2 – Média de prolificidade em caprinos de acordo com a raça, local e fonte	21
Tabela 3 - Estimativas de herdabilidade (h^2) e repetibilidade (t) para a prolificidade em cabras de acordo com a raça, local e fonte	23
Tabela 4 - Genes candidatos identificados com papel na fecundidade em cabras, de acordo com a mutação, ação fisiológica, tipo de marcador molecular, raça e fonte	28
Tabela 5 - Número de cabras de acordo com a raça, origem e Aptidão	39
Tabela 6 - Frequência de tipo de parto de acordo com a raça de cabras	39
Tabela 7 - Número de SNP incluídos inicialmente, número de SNP excluídos de acordo com cada critério de controle de qualidade (Call rate, MAF e HWE) e número de SNP mantidos após a aplicação do controle de qualidade por raça caprina.....	42
Tabela 8 - Desequilíbrio médio entre os pares de SNPs adjacentes de acordo com o cromossomo e número de SNPs	46
Tabela 9 - Número de SNP incluídos no teste de desequilíbrio de ligação (LD), número de SNP mantidos após a aplicação do teste LD e porcentagem de SNP excluídos em virtude do LD para as raças Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen.....	47
Tabela 10 - Valores médios de MAF, HWE e HZ antes e após o teste de desequilíbrio de ligação (LD) para as raças Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen	48
Tabela 11 - Heterozigosidade esperada (H_s) e observada (H_o), endogamia (Fis) para as raças Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
BLUP	Best linear unbiased prediction
BMPR1B	Bone morphogenetic protein
C	Citosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization
G	Guanina
GDF9	Growth Differentiation Factor
GNRH	Gonadotropin releasing hormone
GWAS	Genome-wide association studies
h²	Herdabilidade
IGGC	Consórcio internacional do genoma caprine
ISSR	Repetição inter-simples
LD	Desequilíbrio de ligação
MAF	Frequência do menor alelo
NGS	Next-generation sequence
P	Probabilidade
PCR	Reação em cadeia de polymerase
QTL	Quantitative trait loci
RFLP	Restriction fragment lengther polymorphism
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSCP	Strand conformation polymorphism
SSR	Simple sequence repeats
t	Repetibilidade
T	Timina
U	Uracila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Considerações preliminares sobre a prolificidade em cabras	21
2.2 Fatores não genéticos que afetam a prolificidade	22
2.3 Melhoramento genético para a prolificidade das cabras.....	23
2.4 Técnicas moleculares aplicadas ao melhoramento da prolificidade	25
2.4.1 Utilização de marcadores moleculares na identificação de genes com funções reprodutivas em cabras.....	28
2.4.2 Desenvolvimento de plataformas de microarranjos de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP).....	32
2.5 Genome-wide association studies – GWAS nos estudos de prolificidade em cabras	34
2.6 Diversidade genética e estrutura populacional	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Animais e genotipagem.....	40
3.2 Coleta do material biológico e extração do DNA	41
3.3 Controle de Qualidade dos dados genômicos	41
3.4 Análise de desequilíbrio de ligação	42
3.5 Estudo de diversidade genética e estrutura populacional	43
3.6 Estudos de associação genômica ampla (GWAS)	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Estudos de validação.....	44
4.2 Genótipos	45
4.3 Desequilíbrio de ligação	47
4.4 Diversidade genética.....	51

4.5 Distância genética	53
4.6 Análise de componentes principais.....	54
4.7 Análise de associação genômica (GWAS)	61
4.7.1 Validação do teste estatístico com os QQ plots	61
4.7.2 Análises de associação genômica ampla – GWAS	62
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

A indústria da caprinocultura, com um rebanho mundial na ordem de 1,06 bilhão de cabeças vem apresentando formas que a coloca numa posição estratégica no cenário do agronegócio e nos programas sociais praticamente em todos os continentes do planeta (Figura 1). Este setor vem representando uma importante fonte de proteína, combatendo a pobreza e a insegurança alimentar globalmente, com destaque nos países que detém os maiores rebanhos de caprinos, Tabela 1 (FAO, 2016).

Esse seguimento, em particular no Brasil, ocupa a 21ª posição no ranking mundial, com 9,7 milhões de cabeças (FAO, 2016). De acordo com o IBGE (2018) a caprinocultura brasileira possui grande potencial para ampliação da produção de carne, leite e seus derivados, além da venda de caprinos que movimentou a cifra de R\$ 290 milhões em 2017. Além disso, permite incremento na participação do setor industrial e no seguimento de calçados e vestuários.

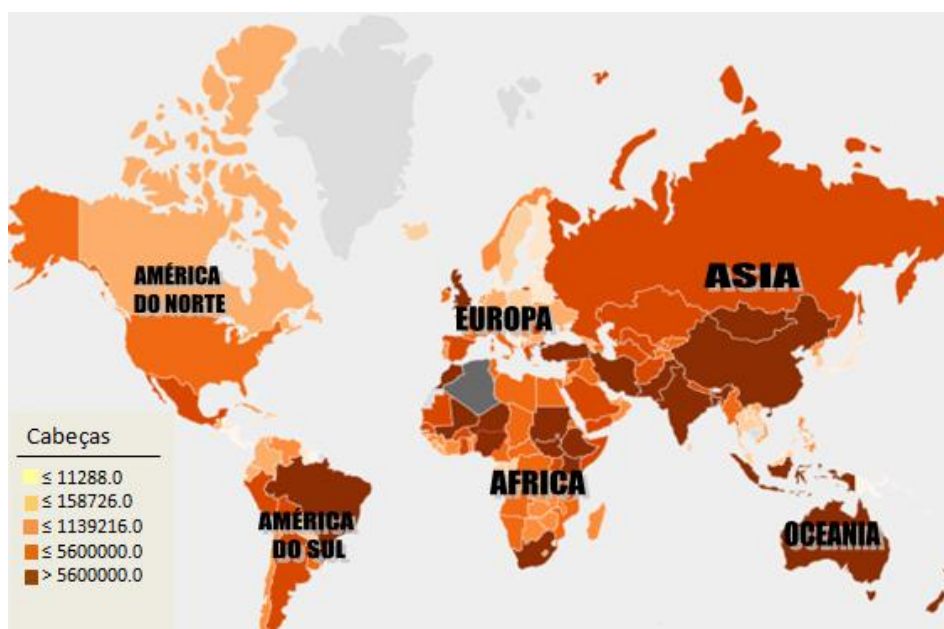


Figura 1 - Distribuição mundial – Caprinos.

Fonte: FAOSTAT (FAO, 2016).

Tabela 1 - Os dez maiores efetivos de rebanhos caprinos no mundo

País	Cabeças (milhões)	Participação (%)
China	149	14,05
Índia	133	12,54
Nigéria	73	6,88
Paquistão	70	6,60
Bangladesh	56	5,28
Sudão	31	2,92
Etiópia	30	2,83
Quênia	26	2,45
Mongólia	25	2,35
Mali	22	2,07

Fonte: FAOSTAT (FAO, 2016).

Apesar do seu crescimento e do reconhecido valor socioeconômico, esta atividade apresenta reduzidos índices de produtividade em decorrência do baixo desempenho reprodutivo e produtivo dos rebanhos. A demanda do mercado consumidor mundial por produtos de origem animal de melhor qualidade é expressiva, e neste quadro, o melhoramento das habilidades reprodutivas dos animais é fundamental. Dentre essas, a prolificidade merece especial atenção nos programas de seleção, pois se refere ao número médio de progênes produzidas por uma matriz em cada parto e exercendo impacto positivo na taxa de desfrute dos rebanhos.

Os pequenos ruminantes, em geral, possuem maior habilidade de apresentar partos múltiplos quando comparado com as outras espécies domésticas (HAFEZ e HAFEZ, 2004; ESTRADA et al., 2014). Várias pesquisas têm mostrado que a prolificidade média na espécie *Capra hircus* é maior que a unidade, podendo variar de 1.30 a 2.94 (GONZALEZ et al., 1974; TU, 1989; CREPALDI et al., 1999; HAMED et al., 2009; HALDAR et al., 2014; RIO, 2015). Essa habilidade peculiar dos caprinos constitui numa excelente oportunidade de incrementar a renda do sistema produtivo, por meio do aumento do número de produtos por ciclo reprodutivo.

Em virtude de sua variabilidade, a qual depende dos fatores genéticos (HAMED et al., 2009) e não genéticos (SARMENTO et al., 2010 e HALDAR et al., 2014), a prolificidade é passível de seleção. O melhoramento da prolificidade das cabras contribui para o aumento da amostra populacional, possibilitando o incremento da intensidade seletiva e, conseqüentemente, o aumento do ganho genético anual. De forma que, quanto maior o número médio de crias produzido por fêmeas, maior será a taxa de animais para reposição no

rebanho, reduzindo o intervalo de geração e permitindo o aumento na pressão de seleção. Algumas pesquisas têm apontado a prolificidade como um atributo bastante promissor para o progresso genético anual em caprinos, (SARMENTO, et al., 2010; SANTOS, et al., 2013).

Entretanto, o melhoramento da prolificidade pelo método de seleção tradicional tem mostrado ser difícil e demorado em virtude da baixa herdabilidade, as quais variam entre 0.08 a 0.18 (HAMED et al., 2009; ZHANG et al., 2009; GUNIA et al., 2010, SANTOS et al., 2013; MENEZES et al., 2016). Nesse contexto, o desenvolvimento da genética molecular tem possibilitado o estudo da variabilidade genética diretamente ao nível de DNA com capacidade de detecção de genes individuais que influenciam as características reprodutivas (AHLAWAT et al., 2015). O uso das técnicas moleculares na identificação de regiões polimórficas associados com as características importantes na produção é fundamental para o avanço da seleção genômica e para o melhoramento genético em caprinos. No entanto, apesar da sua importância, o avanço dos estudos do genoma caprino está muito aquém, quando comparado com o estudo do genoma das outras espécies.

Por outro lado, essa linha de pesquisa na espécie *Ovis aires*, utilizando a estratégia de genes candidatos e os estudos de associação genômica tem sido amplamente estudada, gerando resultados impactantes para o melhoramento genético dos ovinos (JOHNSTON et al., 2011; KIJAS et al., 2012). Mas no que diz respeito à espécie caprina, pouco se conhece sobre a associação das regiões cromossômicas com características de importância econômica, principalmente, com as aquelas relacionadas à incidência de partos múltiplos.

Diante disso, essa pesquisa propõe um estudo de investigação científica visando elucidar os avanços das técnicas de marcadores moleculares empregados no estudo da prolificidade em cabras e as implicações desses avanços, fazer um estudo da diversidade genética, estrutura populacional e estudo de associação genômica ampla na prolificidade de cabras das raças Saanen, Anglo Nubiana, Moxotó e Canindé.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações preliminares sobre a prolificidade em cabras

A taxa de prolificidade representa a incidência de partos múltiplos no rebanho. Conforme Sarmiento et al. (2010), a prolificidade reflete o número de cabritos nascidos por fêmea parida, e se traduz em uma das características mais relevantes para a determinação da eficiência do sistema, pois está diretamente relacionada com a viabilidade econômica da exploração do rebanho. Os pequenos ruminantes, em geral, apresentam partos com número de produtos superior a unidade (HAFEZ et al., 2004; ESTRADA et al., 2014). As cabras podem apresentar partos simples, duplos (Figura 2), triplos ou quádruplos.

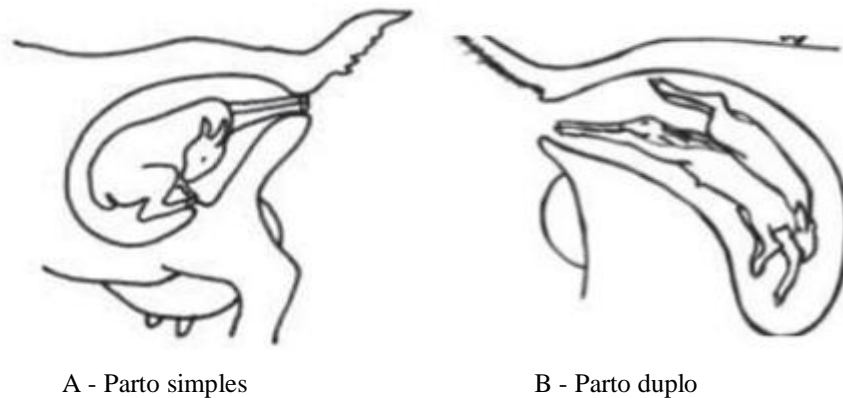


Figura 2 - Representação de parto simples (A) e de parto duplo (B).
Fonte: Sérgio et al. (2012).

De modo que, a taxa de prolificidade é a razão entre a quantidade de cabritos nascidos por fêmea e o número de partos efetuados por essa mesma fêmea. Ou seja, um plantel de cabras com cem partos ocorridos e cento e trinta cabritos nascidos, apresenta uma taxa de prolificidade de 130% e, portanto, uma média de 1,3 cabritos nascidos para cada cabra. De forma que, quanto maior a taxa de prolificidade, maior o número de cabritos produzidos e, conseqüentemente, maior o número de cabritos disponíveis para comercialização no final do ciclo.

Em geral, a prolificidade em cabras varia de 1,30 a 2,37 (Tabela 2), sendo essa peculiaridade um benefício para o rebanho e apresenta grande potencial para exploração econômica.

Tabela 2 - Média de Prolificidade em caprinos de acordo com a raça, local e fonte

Raça	Local	Prolificidade	Fonte
Alpina	Itália	1,60	Gonçalves et al. (2008)
Anglo Nubiana	Brasil	1,90	Cardoso et al. (2018)
Black Bengal	Índia	1,75	Haldar et al (2014)
Crioula	França	2,10	Gunia et al. (2010)
Jining Grey	China	2.37	Feng et al. (2011)
Laoshan	China	1,70	Lai et al. (2016)
Mestiço (Pardo Alpino x Gurgueia)	Brasil	1,49	Sarmento et al. (2010)
		1,40	Santos et al. (2013)
Saanem	Brasil	1,50	Leal et al. (2018)
Toggenburg	Brasil	1,75	Leal et al. (2018)
Zaraibi	Egito	1,60	Hamed et al. (2009)

Fonte: O autor (2018).

2.2 Fatores não genéticos que afetam a prolificidade

A expressão do fenótipo da prolificidade possui dois componentes distintos, o componente genético e o componente ambiental. Para a obtenção das estimativas de valores genéticos acurados é fundamental que as fontes de variação fenotípica, decorrentes dos efeitos ambientais, sejam devidamente consideradas. Sarmento et al. (2010) relataram que os efeitos de variação de ambiente (mês), maturidade fisiológica (ordem de parição), condição corporal (peso) e idade de início da vida reprodutiva da matriz afetaram a prolificidade. Segundo os autores é possível promover melhorias da prolificidade por meio do ajuste no manejo alimentar e adequação da idade mínima para o início da vida reprodutiva, dentre outras ações.

Em pesquisa com caprinos de corte da raça Black Bengal na Índia, Haldar et al. (2014) revelaram que as medidas corporais lineares dos animais também podem afetar a prolificidade das cabras. Os resultados mostraram que existe uma forte e positiva relação entre número de crias e várias medidas corporais. De forma que animais com comprimento de pescoço (>22.78 cm), comprimento do corpo (>54.86 cm), altura de cernelha (>48.85 cm), altura de garupa (>50.67 cm), largura das coxas femorais (>11.38 cm) e largura da garupa (>4.56 cm) mostraram maior probabilidade de estar gestando mais de um feto. Essas medidas podem ser usadas para discriminar as fêmeas de partos simples e múltiplos, e dessa forma, fazer ajustes necessários no manejo.

O manejo nutricional também constitui em uma importante fonte de variação para a prolificidade em cabras, um animal bem nutrido é capaz de expressar todo o seu potencial genético. De acordo com Cezar et al. (2006), uma nutrição equilibrada contribui para maior taxa de ovulação nos ciclos estrais e, portanto, maior número de cabritos por gestação.

Portanto, o melhoramento das taxas de prolificidade no rebanho pode ser realizado pelo melhoramento dos manejos nutricionais, sanitários, reprodutivo, bem como pelas práticas de melhoramento genético, seja pela seleção ou pelo cruzamento. Entretanto, vale ressaltar, que os benefícios alcançados com o melhoramento dos efeitos ambientais se limitam apenas àquele ciclo de produção. Enquanto que, os avanços alcançados pelo melhoramento genético se perpetuam no rebanho, de forma acumulativa, proporcionando benefícios para todos os futuros ciclos de produção.

2.3 Melhoramento genético para a prolificidade das cabras

A prolificidade apresenta variabilidade genética aditiva justificando a prática de sua seleção, contribuindo para o melhoramento genético. O método tradicional de seleção utiliza a avaliação genética – BLUP (Best Linear Unbiased Prediction), que faz uso da matriz de parentesco, entre os indivíduos estudados. Fazendo uso também, do método GBLUP, da matriz genômica, o qual pode conter informações de pedigree, mapa genético, pedigree fake e de marcadores.

$$\begin{vmatrix} X'X & X'Z \\ Z'X & Z'Z + A \end{vmatrix} \alpha^{-1} \begin{vmatrix} \beta \\ \mu \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} X'Y \\ Z'Y \end{vmatrix}$$

$$\begin{vmatrix} X'X & X'Z \\ Z'X & G \end{vmatrix} \begin{vmatrix} \beta \\ \mu \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} X'Y \\ Z'Y \end{vmatrix}$$

O método GBLUP difere do BLUP tradicional por substituir a matriz de parentesco baseada no pedigree (matriz A) pela matriz de parentesco baseada nos marcadores ou matriz de parentesco realizada (matriz G), assim, a segregação mendeliana é avaliada em nível individual e não em nível médio, tornando as predições dos valores genéticos via GBLUP mais acurados em relação ao BLUP tradicional.

Dentre os parâmetros genéticos utilizados em programas de melhoramento genético tradicional para a prolificidade das cabras, destacam-se a herdabilidade (h^2) e a repetibilidade (t) e ambos se referem à determinados caracteres quantitativos. A herdabilidade é um parâmetro genético o qual mede a fração da variância fenotípica atribuída aos efeitos aditivos dos genes. Os genes que possuem efeito aditivo são aqueles passíveis de serem transmitidos para as progênes. De forma que, quanto maior a herdabilidade (varia de 0 a 1) maior será a capacidade de transmissão dos efeitos genéticos (PEREIRA, 2008).

No sentido amplo, h^2_A , é definida como a razão entre a variância genotípica e a variância fenotípica:

$$h^2_A = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_P^2}$$

No sentido restrito, h^2 , é definida como a razão entre a variância genética aditiva e a variância fenotípica:

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2}$$

Em geral, segundo Rao et al. (2000), a prolificidade possui elevada herdabilidade quando comparada com as outras características reprodutivas, o que sugere uma elevada resposta a seleção. Vários autores relataram que a herdabilidade e a repetibilidade da prolificidade em cabras variam entre 0,08 a 0,18 e 0,15 a 0,67, respectivamente, Tabela 3.

Tabela 3 - Estimativas de herdabilidade (h^2) e repetibilidade (t) para a prolificidade em cabras de acordo com a raça, local e fonte

h^2	t	Raça	Local	Fonte
0,08	0,15	Zaraibi	Egito	Hamed et al. (2009)
0,12	0,16	Boer	China	Zhang et al. (2009)
0,12	0,16	Crioulos	França	Gunia et al. (2010)
0,18	0,67	Mestiças	Brasil	Santos et al. (2013)

Fonte: O autor (2018).

A repetibilidade é um parâmetro populacional, a qual mede a fração da variância fenotípica atribuída aos fatores que se repetem na vida de um mesmo animal, ao longo de sua vida produtiva, sendo eles o componente genético associado ao componente de ambiente permanente (PEREIRA, 2008). Na prática, a repetibilidade mede a correlação entre a manifestação de um mesmo caráter na vida de um mesmo indivíduo.

A seleção para prolificidade, além de ser um fenômeno acumulativo, tem como benefício imediato, o aumento do número de crias disponíveis para a taxa de reposição. De forma que, possibilita a prática de maior intensidade seletiva e, conseqüentemente, maior ganho genético anual.

Para a implementação de um programa de melhoramento animal, para quaisquer que sejam as características, alvo da seleção, é necessária a obtenção dos valores genéticos dos animais. No método tradicional de seleção dos animais, os valores genéticos são obtidos por meio de avaliações genéticas usando a metodologia Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) desenvolvido por Henderson (1984). Para a avaliação genética são utilizadas informações das características expressas pelo próprio animal, bem como de seus parentes, além das informações de parentesco entre os animais.

Entretanto, o método tradicional de seleção utiliza apenas as informações fenotípicas para inferir sobre o valor genético dos animais, podendo comprometer o grau de acurácia dos resultados. O desenvolvimento científico e os avanços da genética molecular surgiram no cenário atual e permitiram a incorporação de informações genômicas na avaliação genética dos animais, proporcionando um aumento na acurácia da estimação dos valores genéticos e incremento nos ganhos genéticos. Além desses benefícios, a genômica tem contribuído para a investigação ou identificação da relação de parentesco entre animais, o que na ausência de pedigree tradicional, permitindo a obtenção de valores genéticos com maior acurácia. Portanto, os avanços da genômica podem ser fundamentais para a modernização da metodologia de avaliação genética e para o desenvolvimento da seleção genômica, proporcionando progressos significativos no melhoramento animal.

A atual possibilidade de associação entre a genética quantitativa e a genética molecular pode proporcionar grande impacto nos programas de seleção, pois auxilia no processo de definição dos critérios de seleção que sejam realmente eficazes. Além disso, a identificação dos genes relacionados ao controle das características de interesse econômico é fundamental para uma utilização mais ampla de marcadores moleculares em programas de melhoramento genético animal.

2.4 Técnicas moleculares aplicadas ao melhoramento da prolificidade

Nos últimos anos, houve um aumento significativo de técnicas da genética molecular e suas aplicações para aumentar a eficiência dos programas de melhoramento animal. De acordo com Caetano et al. (2015), ferramentas genômicas modernas mudam os padrões do

melhoramento genético dos animais, permitindo que os rebanhos do futuro, sejam mais produtivos, desenvolvidos em menor tempo, com alta precisão e custos reduzidos, portando características de interesse econômico.

De acordo com Diniz (2015) o genoma corresponde a toda informação hereditária de um organismo codificada em seu DNA. Isso inclui tanto os genes como as sequências não codificadoras. A genômica por sua vez, é uma ciência que tem como objetivo entender como os genes e as sequências não codificadoras envolvidas na regulação dos genes estão organizadas e interagem para o funcionamento global do ser vivo. Conhecer as técnicas moleculares aplicadas ao melhoramento da prolificidade significa conhecer os genes e suas funções, ou seja, os genes responsáveis pela manifestação de partos múltiplos.

O primeiro passo para entender o funcionamento do genoma de um organismo é sequenciá-lo, de preferência de forma completa. A genética molecular na espécie caprina teve crescimento acentuado após o sequenciamento do seu genoma. O genoma da *Capra hircus* foi decifrado pela tecnologia de sequenciamento de nova geração (Next-Generation Sequence – NGS), por um grupo de pesquisadores do Kunming Instituto de Zoologia da Academia Chinesa de Ciências, BGI, e outros institutos. Essa tecnologia tem permitido uma nova abordagem de sequenciamento em larga escala (HGS – High throughput sequencing), possibilitando a descoberta de variações no número de cópias, inserções e deleções e novos polimorfismos de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphism – SNPs). A técnica tem proporcionado o desenvolvimento de novas metodologias e estratégias para o mapeamento de genes de interesse (DONG et al., 2013).

Ao longo dos anos, diversas plataformas de NGS foram desenvolvidas, baseadas principalmente na metodologia de sequenciamento por síntese, plataforma Illumina® GAI (Illumina Inc., EUA), que propiciou em 2012, a publicação da sequência rascunho do genoma caprino com tamanho de 2,66 Gb, ou seja, 91% dos 2,92 Gb estimados a partir do DNA de uma fêmea Yunnan Black Goat de três anos de idade (PEREIRA et al., 2013).

Todavia, Silva (2016) relata que apesar da caracterização genética dos caprinos ter avançado nos últimos anos, essa ainda é escassa, quando comparada com outras espécies como é o caso das espécies bovinas e ovinas.

Essas sequências genômicas são disponibilizadas em bancos de dados genéticos, que ficam à disposição para iniciar a segunda fase, chamada de genômica funcional, ou pós-genômica, onde os genes e as sequências reguladoras são estudados para compreender como funcionam e interagem. Tais estudos levam também à identificação de marcadores moleculares, que são utilizados para medir a variação genética existente entre indivíduos e

marcar mais facilmente a posição de genes e trechos de interesse no genoma, de acordo com Diniz (2015).

Com relação à espécie *Capra hircus* a seleção para a característica de prolificidade alta, tem sido realizada com base apenas nas informações fenotípicas e de pedigree dos animais. O uso de informações genômicas no melhoramento da prolificidade em cabras tem sido nulo ou incipiente. Por outro lado, a caracterização genética da prolificidade em ovinos tem sido amplamente estudada, gerando resultados impactantes para o melhoramento dessa característica na espécie *Ovis aires* (DROUILHET et al., 2009; SILVA et al., 2014; DEMARS et al., 2013; KHODABAKHSHZADEH et al., 2016).

No entanto, é indiscutível que o uso de técnicas moleculares abre novas possibilidades para o melhoramento da prolificidade em cabras, com a utilização de marcadores moleculares que dão maior agilidade e rapidez para se identificar os animais portadores de genes associados a partos múltiplos.

As pesquisas pioneiras utilizavam marcadores moleculares Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) associados às características de interesse econômico dos animais domésticos. Posteriormente, foram usados os marcadores do tipo Simple Sequence Repeats (SSR). A invenção dos equipamentos sequenciadores foi possível detectar as variantes alélicas. Por conseguinte, foi desenvolvida a metodologia de alto desempenho e acurácia, baixo custo e mão de obra para prospecção, caracterização e genotipagem de marcadores Single Nucleotide Polymorphism (SNP), (CAETANO, 2009).

Segundo Foulkes (2009), os marcadores SNP (Figura 3), tem como base as alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina). Normalmente, esses marcadores são bi-alélicos, ou seja, geralmente são encontradas apenas duas variantes para cada *locus* em uma espécie. Podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, porém, na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada. Se ocorrerem em regiões codificadoras, promotoras, reguladoras do genoma, os SNPs poderão promover mudanças na síntese proteica e, portanto, na fisiologia e desempenho dos animais.

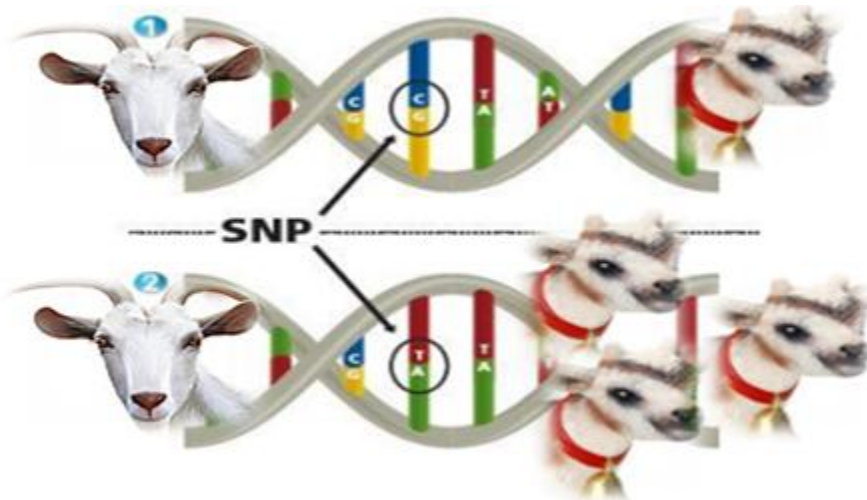


Figura 3 - Representação de polimorfismos de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphism – SNPs).

Fonte: Adaptado de Genetics Generation, (2015)

Os primeiros marcadores moleculares utilizados no melhoramento genético animal datam da década de 60. Na espécie caprina, inicialmente, os estudos com marcadores moleculares foram focados para os trabalhos de diversidade e com a conservação de recursos genéticos. No Brasil, poucos trabalhos são encontrados na literatura com SNP na espécie caprina (SILVA, 2016).

2.4.1 Utilização de marcadores moleculares na identificação de genes com funções reprodutivas em cabras

Estudos genômicos estão sendo realizados objetivando a identificação de genes candidatos, que desempenham funções reguladoras na vida reprodutiva das cabras, abrindo novas possibilidades para otimizar o desempenho produtivo e reprodutivo desses animais (Tabela 4).

Neste âmbito, os estudos de genômica levam também à identificação de marcadores moleculares, que funcionam como uma espécie de impressão digital molecular. Eles são utilizados, entre outras informações, para medir a variação genética existente entre indivíduos e marcar mais facilmente a posição de genes e trechos de interesse no genoma (DINIZ, 2015).

Table 4 – Candidate genes, role of regulatory genes in little size in goat according to breed and reference

GENE	MUTATION (CODING BASE)	ROLE OF REGULATORY GENES IN LITTLE SIZE	BREED	AUTHORS
AA-NAT	C825T, C1249T	It is a key enzyme associated with melatonin (MLT) biosynthesis being critical for animal reproductive system (Sharma et al. 2015b)	Beetal, Barbari, Black Bengal, Malabari, Osmanabadi, Sangamneri, Jakhrana, Ganjam, Sirohi	Sharma et al., (2015b)
BMP15	G751T, G752C, A757C, G760C, G762A, G762T, G769C, G769A	Regulates granulosa cell proliferation and differentiation by promoting granulosa cell mitosis, suppressing follicle-stimulating hormone receptor expression and stimulating kit ligand expression, all of which play a pivotal role in female fertility in mammals (Juengel et al., 2002)	Zaraibi, Baladi, Damasco, Alpino	Heikal et al (2017)
	G735A, C808G		Barbari, Beetal, Black Bengal, Jakhrana, Osmanabadi, Sangamneri, Ganjam	Ahlawat et al. (2016)
BMPR1B	T242C	Plays an important role for increase in ovulation rate and litter size (Souza et al., 2001)	Barbari, Beetal, Black Bengal, Jakhrana, Osmanabadi, Sangamneri, Ganjam	Ahlawat et al. (2016)
BMP4	G1534A	Modulate the granulosa cell (GC) function in the follicle of domestic animals (Rajesh et al., 2018)	Barbari, Beetal, Black Bengal, Malabari, Jakhrana, Osmanabadi, Sangamneri, Sirohi, Ganjam	Sharma et al. (2013)
CART	C539A	It is important in the regulation of GnRH secretion and onset of puberty (Boone et al., 2008)	Chuangdong White, Guizhou white, Gulin ma	Wang et al. (2011)
CSNS1	CSN1S1	Expressed in goat ovary, which may produce several key hormones changes related to production traits (Wang et al., 2018)	Shaanbei, Cashmere	Wang et al. (2018)
FSHB	A2645G	Plays a key role in the regulation of gonadal function and follicle development in mammals (Aerts and Bols, 2010)	Boer, Matou, Boer–Matou crossbred	Zhang et al. (2011b)
FSHR	T70A, G130C	relays neuronal signals from the hypothalamus to the gonads and keeps the endocrine balance in the reproductive axis maintaining the follicle growth, development, differentiation, and maturation as well as spermatogenesis (George et al., 2011)	Jining Grey, Boer and Inner Mongolia Cashmere	Guo et al. (2013)
GDF9	G3288A, G423A, A959C, G1189A	Plays a crucial role in early folliculogenesis and its mutations can increase the ovulation and infertility in female mammals	Jining Grey, Guizhou White, Boer, Lianoning Cashmere	Feng et al. (2011)
	C818T, A959C, G1189A	(Otsuka et al., 2011)	Barbari, Beetal, Black Bengal, Jakhrana, Osmanabadi, Sangamneri, Ganjam	Ahlawat et al. (2016)
GH	A781G, A1575G	This hormone is a peptide hormone that is produced from the anterior pituitary. Acts on the development of small antral	Boer, Matou	Zhang et al. (2011a)

		follicles in the gonadotrophin-dependent stages and stimulating oocyte maturation (Silva et al., 2009)		
GNRHR	G757A	It is a key regulator of the reproductive system, which triggers the synthesis and release of the LH and FSH in the pituitary gland, that in turn regulate the production of gametes and gonadal hormones (Naor, 2009)	Jining Grey, Angora, Boer, Inner Mongolia, Cashmere	Chu et al. (2009)
	G891T, G757A		Boer	Yang et al. (2011)
	A730G, G757A, G891T		Local goats in Sri Lanka	Ariyaratne et al. (2017)
GPR54	C1122T	G - protein-coupled receptor (GPR54) acts as a cognate receptor for a family of neuropeptides called kisspeptins, which are the peptide products of KiSS1 gene. KiSS1/GPR54 system is considered fundamental gatekeeper of puberty onset in mammals (Ahlawat et al., 2015b)	Black Bengal	Ahlawat et al. (2015b)
IGF1	G224A, G227C	It is a member of somatotrophic axis and plays a key role in proliferation of cells, mitosis, myogenesis, meiosis, differentiation in fetal development and post-natal growth (Thomas et al., 2017)	Attappady Black Malabari	Thomas et al. (2016)
INHBB	G693A, C840T	It is chemical signal of the number of growing follicles in the ovary to the pituitary gland to reduce the secretion of FSH to a level which maintains the species-specific number of ovulations (Taya et al. 1996)	Beetal, Osmanabadi, Sangamneri, Ganjam	Sharma et al. (2015a)
KITLG	G12654A, G12772A, T12829C	Stimulate primordial follicle activation and follicle growth (Celestino et al., 2010)	Xinong Saanen, Guanzhong	An et al. (2015)
KISS-1	T0950C, C3416T, C3811T, T3963C	kisspeptins stimulate the secretion of gonadotropins from the pituitary by stimulating the release of GnRH from the forebrain after the activation of GPR54, which is expressed by GnRH neurons (Dungan et al., 2006)	Gondar, Woyto Guji	Mekuriaw et al. (2017)
LHB	C59A, C543T	confers its specific biologic action and is responsible for the specificity of the interaction with the LH receptor (Long et al., 2009)	Boer	Li et al. (2011)
PRLR	C113T, C59T	Member of the growth hormone/prolactin receptor gene family which is a mediator of prolactin Ahlawat et al. (2015a)	Boer	Li et al. (2011)

Arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15), Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B (BMPR1B), Bone morphogenetic proteins 4 (BMP4), Cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART), Alpha-S1-casein (CSNS1), Follicle stimulating hormone beta (FSH β), Follicle stimulating hormone receptor (FSHR), Growth

Differentiation Factor 9 (GDF9), Growth hormone (GH), Gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR), G protein-coupled receptors 54 (GPR54), Insulin-like growth factor 1(IGF1), Inhibin (INH β), Kit ligand (KITLG), Kisspeptin (KiSS-1), Luteinizing hormone beta-subunit (LH β) and Prolactin receptor (PRLR)

2.4.2 Desenvolvimento de plataformas de microarranjos de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP)

Em meados da última década, plataformas baseadas em tecnologias de sequenciamento de próxima geração, ou de nova geração (Next-Generation Sequence – NGS), começaram a ser comercializadas e têm sido amplamente empregadas em substituição a outros métodos existentes, por não ter grande demanda de tempo e altos custos (PEREIRA et al, 2013).

Os avanços da genética molecular propiciaram o desenvolvimento dos mapas densos de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) e o sequenciamento de alta processividade. Portanto, a utilização de plataformas de genotipagem de SNPs permite gerar informações, em um único ensaio, de milhões de pares de bases, tornado esse processo mais vantajoso quanto ao custo por base e, quanto à economia de tempo, quando comparado às outras classes de marcadores.

Embora a distribuição dos SNPs não seja homogênea ao longo do genoma, existem milhões de polimorfismos deste tipo distribuídos ao longo do genoma de espécies de interesse zootécnico, o que faz dele um marcador genômico muito atraente (FOULKES, 2009). Essas técnicas têm favorecido os estudos de associação e mapeamento genético, seleção genômica, ensaios diagnósticos para confirmação de paternidade e identificação individual.

De acordo com Caixeta et al. (2013), as plataformas mais utilizadas atualmente para a genotipagem de SNPs são: SNPstream (Beckman Couter), GeneChip (Affymetrix), Perlegen Wafers, Molecular Inversion Probe – MIP (Affymetrix) e GoDLenGate e Infinium da Illumina. A SNPstream utiliza extensão de primers com minisequenciamento e arranjo disposto em lâmina, processando grande quantidade de genótipos (4.600 a 3.000.0000) por dia, porém com número de SNPs menor quando comparada a outras plataformas de genotipagem. A Perlegen Wafers e GeneChip são baseados em processos de hibridização de oligonucleotídeos.

A Molecular Inversion Probe analisa 10.000 SNPs por ensaio em arranjo de lâmina e extensão de primers por meio de minisequenciamento. As plataformas GoldenGate e Infinium baseiam-se no emprego de microarranjos e extensão de primers alelo-específicos, no entanto, a primeira utiliza a PCR no passo de amplificação e pode genotipar apenas 1536 loci simultaneamente, enquanto que a segunda dispensa amplificação via Reação da Cadeia de Polimerase e genotípica de centenas a milhares de polimorfismos de base única de simultaneamente (CAIXETA et al., 2013).

Em comparação com outros marcadores microssatélites, os SNPs são mais abundantes no genoma, apresentam menor taxa de erro e menor custo no processo de genotipagem e são geneticamente estáveis devido a menor taxa de mutação. Embora as vantagens da utilização da informação molecular sejam conhecidas, as metodologias ainda estão em desenvolvimento e, especialmente, o número de marcadores que devem ser utilizados para estimativas mais acuradas ainda está em discussão, dependendo da espécie e da estrutura de cada população. Logo, as propostas de pesquisa focadas na aplicação prática dessas ferramentas têm despertado a atenção de empresas e de pesquisadores (GUIMARÃES et al., 2013).

Além disso, os painéis de SNPs possibilitam o desenvolvimento de estudos de diversidade genética entre e dentro de populações, estrutura populacional e estimação de endogamia. Ainda, detectam assinaturas de seleção, o que possibilita a identificação de regiões genômicas de interesse relacionadas a características quantitativas. Isso aumenta as perspectivas para estudos de genética animal, bem como de conservação dessa diversidade (FAO, 2013).

Considerando os marcadores genéticos envolvidos na prolificidade na espécie caprina, apesar de algumas pesquisas apontarem possíveis genes de efeito maior sobre essa característica (AHLAWAT et al., 2016; THOMAS et al., 2016; ARIYARATHNE et al., 2017), ainda há muito o que desvendar. Sobre esse aspecto, os estudos em genética molecular nos caprinos foi impulsionado a partir da criação do international goat genome consortium (IGGC), no ano de 2010 na China, idealizado por pesquisadores chineses e franceses, objetivando-se o sequenciamento do genoma caprino e sua montagem efetivada por Benjin Genomics Institute (BGI); mapeamento e desenvolvimento de um painel híbrido de radiação e produção de chip com alta densidade de SNPs (RUMINANT GENOME BIOLOGY CONSORTIUM, 2010). Dando um grande salto, após o sequenciamento do seu genoma, decifrado inteiramente por tecnologia NGS (WADE et al., 2009; DOAN et al., 2012; DONG et al., 2013).

Após o sequenciamento do genoma caprino, Tosser-Klopp et al. (2014) projetaram o chip GoatSNP50, constituído por 53.347 SNPs igualmente espaçados e segregando com alta a moderada frequência nas raças Alpina, Boer, Crioulo, Katjang, Saanem e Savana. Essa plataforma de alto processamento foi desenvolvida pelo consórcio Internacional do Genoma Caprino (IGGC) e tem possibilitado os estudos de associação ampla do genoma (GWAS) obtenção de valor genético genômico e incorporação dessas informações nos programas de seleção de caprinos.

Durante o desenvolvimento dessa plataforma de genotipagem foram incluídas apenas seis raças caprinas (Alpina, Boer, Crioula, Katjang, Saanem e Savana). Sendo assim, faz-se necessário o teste de validação dessas plataformas de auto processamento objetivando-se sua aplicação em outras raças. Lashmar et al. (2015) realizaram o estudo de validação do Goat SNP50 Beadchip em uma população de cabras Angorá sul Africanas, exploradas para produção de lã. Esses autores relataram que 46 983 SNP (88.1%) de 53 347 SNPs foram polimórficos ($MAF > 0.05$). Depois do controle de qualidade, 3.960 SNP foram filtrados devido à violação do equilíbrio de Hardy-Weinberg e call-rate, deixando 43.759 (82%) dos 53 347 para as análises posteriores de validação.

De modo semelhante, Moura et al. (2015) mostraram que o Goat SNP50 Beadchip foi informativo para a raça Marota, uma raça nativa brasileira. Nesse caso, esses autores mostraram que depois do controle de qualidade 8.578 SNP (16.08%) foram filtrados, deixando 44.769 (83.92%) dos 53 347 ser validados nas análises seguintes.

Os marcadores SNPs em desequilíbrio de ligação com os QTL (Quantitative Trait Loci) podem ser utilizados como critério extra para a identificação de indivíduos candidatos à seleção, o que aumentaria a acurácia na avaliação genética. Entretanto, embora a proposta inicial dos marcadores SNPs tenham sido a predição do mérito genômico de animais sob seleção, sua utilização foi ampliada para a identificação de material genético, ainda pouco explorado, de forma que a conservação desses recursos vem ganhando destaque no cenário atual da área de Genética Animal, (SILVA et al., 2015).

Neste cenário, espera-se que o uso de dados moleculares impulse as pesquisas genômicas com caprinos, pois a seleção genômica representa uma valiosa ferramenta para gerir a diversidade genética e endogâmica na produção animal (SILVA, 2016).

2.5 Genome-wide association studies – GWAS nos estudos de prolificidade em cabras

O Estudo de associação de genética ampla, Genome-Wide Association Studies (GWAS) é um procedimento que utiliza marcadores de alta densidade localizados ao longo de todo o genoma para a identificação de regiões associadas a uma característica, sem conhecimento prévio da mutação responsável pela variação no fenótipo. Os marcadores para este tipo de análise genômica são os SNPs por permitirem facilidade de genotipagem em plataformas de alta definição, além de apresentarem alta taxa de mutação e herança mendeliana (GUIMARÃES et al., 2013).

Esses estudos baseiam-se na suposição de que uma mutação causativa para um determinado fenótipo está em desequilíbrio de ligação (LD – Linkage Disequilibrium) com marcadores adjacentes nas diversas famílias de uma população. Isto permanece mesmo após diversas gerações de cruzamento e recombinação de segmentos genômicos, possibilitando o uso destes marcadores em varredura ampla do genoma, independente do delineamento de famílias segregantes, permitindo o seu uso em populações comerciais. Para se capturar todos os seguimentos cromossômicos em LD fraco com pequeno efeito, se faz necessário um mapa de alta densidade. Vários estudos de GWAS já foram realizados em outras espécies de animais domésticos, como exemplo, em gado de leite (ABO-ISMAIL et al., 2017), em gado de corte (SANTIAGO et al., 2017), em suínos (VAN SON et al., 2017) e em ovinos (BERTON et al., 2017).

As análises de GWAS têm sido fundamentais para a modernização da metodologia de avaliação genética, pois permitem a inclusão das informações genômica dos animais para a predição dos valores genéticos genômicos, tornando-os bem mais acurados. Enquanto que no método tradicional de avaliação genética, os valores genéticos são obtidos utilizando-se apenas as informações fenotípicas expressas pelo próprio animal e seus parentes. Ou seja, na metodologia tradicional de avaliação genética, apenas as informações fenotípicas são utilizadas para fazer inferência sobre o valor genético dos animais, e isto pode comprometer o grau de acurácia dos resultados.

De acordo com Amills et al. (2017), a implementação de novas tecnologias moleculares tais como sequenciamento do genoma inteiro e genotipagem genômica ampla, permite a exploração da diversidade caprina em uma escala sem precedentes gerando novos “in sites” na história evolucionária das cabras. A seleção genômica e seleção por assinatura também guardam grande potencial particularmente por melhorar característica que não podem ser modificadas facilmente pela seleção tradicional.

As características de reprodução, em geral, apresentam de baixa à média herdabilidade e respondem pouco à seleção realizado com base unicamente na resposta fenotípica. Portanto, a inclusão das informações dos genes associados com a habilidade reprodutiva pode aumentar consideravelmente à resposta à seleção. Nesse sentido, os estudos de associação de genética ampla, a predição dos valores genéticos com propriedades BLUP (*Best Linear Unbiased Prediction*) pode ser uma ferramenta promissora para o melhoramento genético das características reprodutivas das cabras.

O estudo de caracterização genética ao nível de DNA para prolificidade em cabras têm sido incipientes. Esse fato, associado à baixa herdabilidade para prolificidade, a qual varia

entre 0.08 a 0.18 (HAMED et al., 2009; ZHANG et al., 2009; GUNIA et al., 2010; SANTOS et al., 2013 e MENEZES et al., 2016), dificulta a obtenção do ganho genético. Portanto, a inclusão dos dados genômicos nas análises de avaliação genética é fundamental para aumentar a acurácia da seleção para a prolificidade de cabras.

2.6 Diversidade genética e estrutura populacional

A formação dos rebanhos caprinos nativos na América do Sul foi resultante de acasalamentos aleatórios entre animais introduzidos pelos colonizadores, portugueses e espanhóis, durante o período da colonização (PRIMO, 2004). Esses recursos genéticos sofreram ação da seleção natural, ao longo do tempo, adquirindo notável rusticidade, capacidade de sobrevivência e reprodução nas regiões intertropicais. Atualmente, são referenciados como raças nativas, crioulas ou naturalizadas. No Brasil, especialmente nas regiões semiáridas do Nordeste, o processo de seleção natural foi fundamental para assegurar a reprodução e sobrevivência desses pequenos ruminantes, dentre os quais estão incluídas as raças caprinas crioulas: Moxotó e Canindé, Figuras 4 e 5. As habilidades adaptativas adquiridas durante esse processo tornaram esses recursos genéticos importantes reservas de genes para rusticidade.

As raças Saanen e Anglo Nubiana (Figuras 6 e 7), dentre as diversas raças caprinas em torno do mundo, foram submetidas ao melhoramento genético visando à produção de leite (Saanem) e produção de leite e carne (Anglo Nubiana) e são referenciadas como raças especializadas. Essas duas raças se destacam como um dos principais grupos genéticos introduzidas no Brasil, visando à modernidade dos sistemas de produção. A raça Saanen, é originária da Suíça e possui elevado potencial para produção de leite. A raça Anglo Nubiana, desenvolvida na Inglaterra por meio do cruzamento de cabras inglesas com reprodutores oriundos da África, foi selecionada para múltiplo propósito, sendo explorada para leite, carne e pele.



Figura 4 - Exemplar da raça Moxotó.
Fonte: www.agencia.cnptia.embrapa.br



Figura 5 – Exemplar da raça Canindé
Fonte: www.agencia.cnptia.embrapa.br



Figura 6 - Exemplar da raça Saanen.
Fonte: www.agencia.cnptia.embrapa.br



Figura 7 - Exemplar da raça Anglo Nubiana.
Fonte: www.agencia.cnptia.embrapa.br

Com a modernização dos sistemas de produção no Brasil, a maioria das raças nativas estão em estado de deriva genética, seja por causa da crescente substituição desses recursos genéticos por raças especializadas mais produtivas, seja por causa da sua utilização em cruzamentos (OLIVEIRA et al., 2007) objetivando-se uma maior produtividade. De acordo com Ribeiro et al. (2016), as raças caprinas nativas encontram-se em franco processo de diluição genética e carecem de programas de conservação que garantam a sobrevivência desses importantes reservatórios gênicos.

O estudo da diversidade genética e estrutura populacional são importantes ferramentas que podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias de conservação desses recursos genéticos. De acordo com Martínéz et al. (2012), o estudo da diversidade genética dentro e entre as raças proporciona uma visão da estrutura e dos relacionamentos da população e é essencial para o desenvolvimento de programas de conservação e reprodução. O uso de marcadores genéticos tem sido imprescindível para os avanços dos estudos de diversidade genética e estrutura populacional (ARAÚJO et al., 2006; LIU et al., 2007; GINJA et al., 2017; SILVA et al., 2017). Nos últimos anos, o desenvolvimento de painéis de alta densidade do tipo Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) para a genotipagem de animais domésticos vem mostrando exercer um papel indispensável nos estudos genômicos, de diversidade e estrutura populacional, visto que, fornecem uma visão geral do genoma sobre a história genética de cada raça, ajudando desta forma, a priorizar e proteger os programas de conservação animal. Vários estudos relacionados a essa abordagem já foram realizados em outras espécies de animais na pecuária, como relataram Ai et al. (2013) em suínos, Sharma et al. (2016) e Martínéz et al. (2017) em bovinos e Brito et al. (2017) em ovinos.

No que diz respeito aos caprinos, esses estudos tornaram-se mais informativos após o sequenciamento do genoma dessa espécie (DONG et al., 2013) e o desenvolvimento dos painéis de alta densidade específico (TOSSER -KLOPP et al., 2014), contribuindo para maior eficiência dos planos ou programas de conservação dos recursos genéticos. Os microarranjos de genotipagem de alta processividade específico para caprinos, Goat SNP50 Beadchip, foi consolidado pela colaboração entre dois grupos de trabalho: o International Goat Genome Consortium (IGGC) e a Illumina Inc. (San Diego, Califórnia). Essa plataforma é constituída por 53.347 SNPs, uniformemente espaçado em todo o genoma, e segrega com alta e moderada frequência nas raças Alpina, Boer, Crioulo, Katjang, Saanen e Savana. (TOSSER-KLOPP et al., 2014).

Diante do exposto, uso de informações sobre a diversidade genética das cabras, é essencial para o estabelecimento de programas adequados de melhoramento animal e de

conservação, a fim de prevenir a extinção de raças ameaçadas de extinção, além de permitir compreender a relação entre e dentro das diversas raças, neste sentido, diversas pesquisas foram desenvolvidas (NEI, 1973; DIXIT et al., 2010; SOUSA et al., 2011; ALJUMAAH et al., 2012; ZHANG et al., 2015; MARQUES et al., 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e genotipagem

Esta pesquisa foi conduzida na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Caprinos e Ovinos, na cidade de Sobral, estado do Ceará, cujas coordenadas geográficas foram de 3°42' Latitude Sul e 40°21' Longitude Leste e altitude de 83 metros acima do nível do mar. O clima é do tipo Savana conhecido por AW, seguindo a classificação de Koppen A, com aproximadamente 96,28 mm de chuva por ano e temperatura média anual de 28°C, variando de 24°C (mínimo) a 31,3°C (máximo) e Umidade Relativa do Ar média de 77,2%. Esta pesquisa foi aprovada pelo "Comitê de Ética em Uso de Animais da Embrapa Caprinos e Ovinos", com registro nº 002/2017 (anexo 1) para uso de animais vivos durante o experimento. O total de cabras utilizadas neste trabalho foi de 127, conforme Tabela 5. Essas cabras foram criadas em condições semiextensivas, recebiam alimentos concentrados e volumosos e suplementação de silagem e feno. Eram submetidas à estação de monta e possuíam medicação e vacinação para o controle de vermes e outras doenças. Foram registradas 414 informações de parto, entre abril de 2006 a dezembro de 2016, sendo que: 42,51% foram simples, 51,45% foram duplos e 6,04% foram triplos, Tabela 6. A taxa de prolificidade das fêmeas em estudo foi 1,78 cabritos por parto por fêmea.

Inicialmente, foram criados dois bancos de dados, sendo um deles constituído pelas informações fenotípicas e, o outro, pelas informações genotípicas. Após a compilação e análise de consistência, esses arquivos foram concatenados para dar origem ao banco de dados final para a realização das análises. Os dados fenotípicos consistiam em registros da identidade do animal, raça, data de nascimento, tipo de parto (simples ou múltiplos) e número de partos por fêmea.

Tabela 5 - Número de cabras de acordo com a raça, origem e Aptidão

Raça	Código	N	Origem	Aptidão
Anglo Nubiana	AN	29	Inglaterra	Carne e leite
Canindé	CA	30	Brasil	Carne e leite
Moxotó	MO	36	Brasil	Carne e leite
Saanen	SA	32	Suíça	Leite

Fonte: o autor (2018).

Tabela 6 - Frequência de tipo de parto de acordo com a raça de cabras

Tipo de Parto	Anglo Nubiana	Canindé	Moxotó	Saanen	Total
Simplex	47	37	57	35	176
(%)	(34,56)	(48,05)	(53,77)	(36,84)	(42,51)
Duplos	77	35	48	53	213
(%)	(56,62)	(45,45)	(45,28)	(55,79)	(51,45)
Tripos	12	5	1	7	25
(%)	(8,82)	(6,50)	(0,95)	(7,37)	(6,04)
Total	136	77	106	95	414

Fonte: o autor (2018).

3.2 Coleta do material biológico e extração do DNA

Amostras de sangue foram coletadas de cabras, por meio de punção intravenosa utilizando Vacuntainer®. O DNA dos animais foi extraído do sangue pelo método de resina Chelex 100 (WALSH et al. 1991). A genotipagem da cabra foi realizada pela “Deoxi Biotechnology Ltda,” Sociedade Empresaria Limitada de Aracatuba - SP, que oferece serviços de genômica em todo o mundo, e fornecem testes de DNA inovadores e acessíveis para a descoberta e aplicação comercial de avanços genômicos, utilizando um painel de alta densidade com 50k SNPs, Beadchip GoatSNP50, oriundo da estratégia combinada de usar sequenciamento de próxima geração do genoma e mapeamento em uma montagem de genoma contingente, complementada com ferramentas de projeto da Illumina sendo eficiente na produção deste chip GoatSNP50. (TOSSER-KLOPP et al., 2014).

3.3 Controle de Qualidade dos dados genômicos

O controle de qualidade é primordial como etapa precedente nas análises de associação genômica. Para tornar as informações genotípicas mais confiáveis, o controle de qualidade foi realizado em 53,347 SNPs, número total disponíveis no início das análises, utilizando R® software, versão 3.4.0 (R CORE TEAM, 2017). Na primeira filtragem, foram

eliminados os 3,660 SNPs monomórficos ou com posição desconhecida, sendo mantidos 49,687 SNPs. Para excluir os marcadores SNPs e amostras potencialmente problemáticos os seguintes critérios foram considerados e adotados para o controle de qualidade: MAF (Frequência do Menor Alelo) inferior a 0,05, ou seja, é a frequência em que um determinado alelo ocorre em uma dada população, devendo variar entre 2-5%, dependendo do número de amostras a serem genotipadas. Em uma análise de associação genômica, alelos com frequência baixa pode conduzir a erros, pois não são informativos. Call Rate (porcentagem de genótipos válidos) dos animais genotipados inferior 98%, permite a exclusão de marcadores que não estejam presentes em pelo menos 98% da população. Reflete a qualidade da genotipagem e é representado pela razão entre o número de SNPs detectados pelo total analisado, e aqueles que não estavam segundo as proporções esperadas do HWE (Equilíbrio de Hardy-Weinberg), $p < 0,001$. Os SNPs que apresentam desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) podem sinalizar problemas, como erros na determinação do perfil de SNPs ou peculiaridades nos dados, o que tem levado esse parâmetro a ser utilizado no controle de qualidade dos genótipos (SALANTI et al., 2005).

3.4 Análise de desequilíbrio de ligação

A análise de desequilíbrio de ligação (LD) entre os marcadores foi realizada utilizando o pacote GASTON (PERDRY e DANDINE-ROULLAND, 2018). O parâmetro r^2 (HILL e ROBERTSON, 1968) apresenta correlação quadrada entre alelos de dois locus SNP separados. O r^2 é definido pela seguinte fórmula:

$$r^2 = \frac{D^2}{f(A_i)f(B_i)f(A_j)f(B_j)}$$

Onde, $f(A_i)$, $f(B_i)$, $f(A_j)$ e $f(B_j)$ são as frequências observadas dos alelos A_i , B_i , A_j e B_j , respectivamente e, i e j são marcadores.

$$D = \frac{N}{N-1} \left[\frac{4N_{AABB} + 2(N_{AABb} + N_{AaBB}) + N_{AaBb}}{2N} - 2 * f(A) * f(B) \right]$$

Onde, N é o número total de animais, e N_{AABB} , N_{AABb} , N_{AaBB} and N_{AaBb} são os números correspondentes dos genótipos AABB, AABb, AaBB e AaBb, respectivamente.

O pruning (remoção de SNPs) foi realizado considerando um limite de $r^2 = 0,2$, em distância máxima de 50 Kb, objetivando-se a remoção de SNPs que estavam em LD para manter apenas os SNPs independentes para as análises seguintes.

3.5 Estudo de diversidade genética e estrutura populacional

As estimativas de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) foram calculadas de acordo com Nei (1973). A estatística-F foi determinada como explicado por Weir e Cockerham (1984) usando os pacotes HIERFSTAT (GOUDET e JOMBART, 2015) e ADEGENET (JOMBART, 2008; JOMBART e AHMET, 2011).

A variação genética entre pares de raças foi medida usando a distância genética angular (DA) (NEI et al., 1973). A metodologia de vizinhança (NJ) foi usada para construir árvore filogenética por meio do pacote APE (PARADIS et al. 2004).

O estudo da estrutura populacional foi realizado utilizando a abordagem multivariada, a análise do componente principal (PC). A escala multidimensional foi utilizada para obter uma visão da estrutura genética das raças estudadas, utilizando o ADEGENET (JOMBART, 2008; JOMBART e AHMET, 2011) implementado em R® versão 3.4.0 (R CORE TEAM 2017). Os três primeiros PCs foram considerados para fazer a inspeção visual da relação entre as raças.

3.6 Estudos de associação genômica ampla (GWAS)

As análises de associação entre os marcadores SNP presentes no chip HD goatSNP52 Beadchip com a prolificidade das cabras foram realizadas utilizando regressão linear de efeitos fixos de acordo com o seguinte modelo:

$$y = \mu + A + R + NP + \varepsilon$$

em que y é o vetor de observações dos fenótipos, μ é a média geral de registros fenotípicos, A é vetor contendo o ano de nascimento das cabras, R é o vetor contendo a raça da cabra, NP é o vetor que contem o número de partos por fêmea e ε é o vetor de resíduos $\varepsilon \sim N(0, I\sigma_e^2)$.

Após a análise de associação genética os efeitos dos SNP foram apresentados em um gráfico (Manhattan Plot) para a visualização da probabilidade de associação de cada SNP ao longo dos cromossomos utilizando o pacote QQMAN (TURNER, 2017).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos de validação

Inicialmente foram incluídos 49.687 SNPs para cada raça e após o controle de qualidade 79,95%(AN), 73,52%(CA), 77,35%(MO), 88,60%(SA) SNP foram mantidos para as análises subsequentes (Tabela 7).

Tabela 7 – Número de SNP incluídos inicialmente, número de SNP excluídos de acordo com cada critério de controle de qualidade (Call rate, MAF e HWE) e número de SNP mantidos após a aplicação do controle de qualidade por raça caprina

Raça	SNP incluídos	Call Rate <0.98	MAF <.05	HWE <0.001	SNP excluídos	SNP mantidos
AN	49.687	2.323	7.765	1.598	9.961	39.726
CA	49.687	3.499	9.690	1.454	13.155	36.532
MO	49.687	4.479	6.685	1.366	11.256	38.431
SA	49.687	2.404	3.061	1.596	5.662	44.025

Fonte: o autor (2018).

O call rate para as raças Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen foram 94.79%, 92.42%, 90.36% e 94.57%, respectivamente. Portanto, a média de call rate para as raças estudadas foi 93.04%, indicando maior perda de informação genética para as análises subsequentes.

Durante a exclusão de SNP, observando-se cada critério de controle, é possível que tenha ocorrido a sobreposição de eventos. Em outras palavras, é possível que um SNP tenha sido excluído para mais de um critério, como por exemplo para Call rate e MAF, simultaneamente.

O controle de qualidade é um importante passo para utilização de dados genômicos do tipo SNP, pois sua execução remove as fontes potenciais de viés, seja por erro de amostragem ou por erros de procedimentos laboratoriais. A média de call rate para as raças estudadas foi 93.04%. Por outro lado, valores médios de call rate superiores foram reportados por kijias et al. (2013), Lashmar et al. (2015) e Tossier-Klopp et al. (2014), os quais foram 99.5%, 99.6%, 99.9%, respectivamente, tornando-os mais informativos.

Em estudo de validação do Beadchip GoatSNP50 em uma população de cabras Angorá sul Africanas, exploradas para produção de lã, Lashmar et al. (2015) mostraram que

de 53,347 SNP iniciais, 43,759 (82%) permaneceram para as análises de validação posteriores. Os critérios de controle de qualidade foram: exclusão de SNP com call rate <0.98 ; com $MAF < 0.05$ e dos SNP que violaram o EHW ($P < 0.001$).

De modo semelhante, Moura et al. (2015) mostraram que o Goat SNP50 Beadchip foi informativo para a raça Marota, uma raça nativa brasileira. Nesse caso, os autores mostraram que depois do controle de qualidade, do total de 53,347 SNP iniciais, 8,578 SNP (16.08%) foram excluídos, deixando 44,769 (83.92%) para as análises seguintes. Os critérios empregados por esses autores foram: call rate < 0.95 ; $MAF < 0.05$ e 1,36% descartados devido à violação do EHW.

O estudo de validação da presente pesquisa mostrou que o painel Goat SNP50 Beadchip foi informativo, devido a sua ampla amostragem no genoma das populações estudadas permitindo a realização de estudos de diversidade genéticas, Genome-wide Association (GWAS) e seleção genômica.

4.2 Genótipos

O número de SNPs por cromossomo variou de 3,129 (Cromossomo 1) a 822 (Cromossomo 25), e eles estão espalhados em todos os genomas, Figura 8. A distribuição da MAF após controle de qualidade mostra que a MAF média para todos os genótipos foi 0,286 e para cada raça foi 0,281, 0,275, 0,279 e 0,310 para AN, CA, MO e SA, respectivamente.

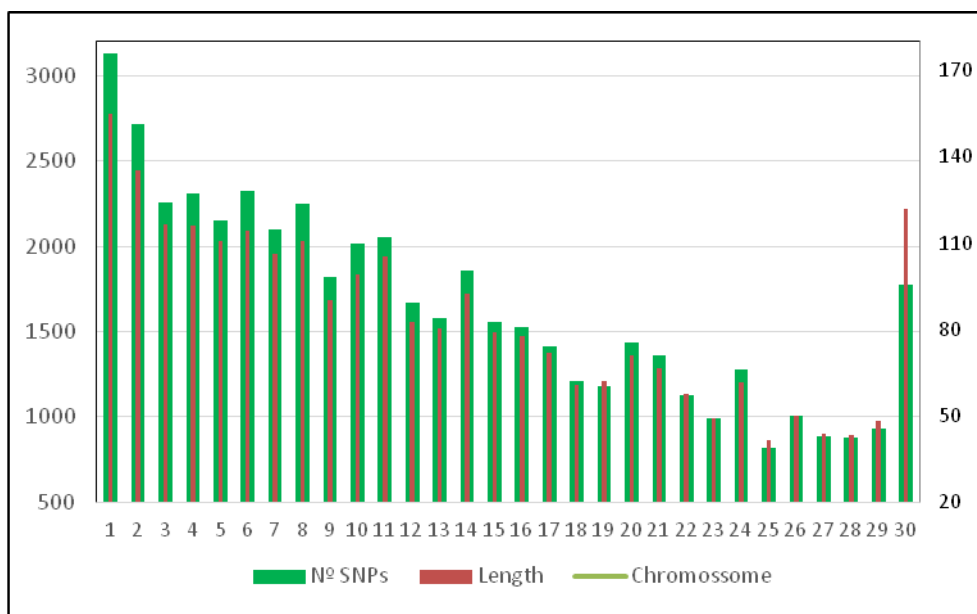


Figura 8 – Número de SNPs (barras verdes) e comprimento do cromossomo (barras vermelhas) por cromossomo em cabras.
Fonte: o autor (2018).

Os resultados mostraram que após o controle de qualidade a proporção de SNP com $MAF > 0,3$ foi de aproximadamente 60%, indicando grande diversidade genética na população estudada, Figura 9.

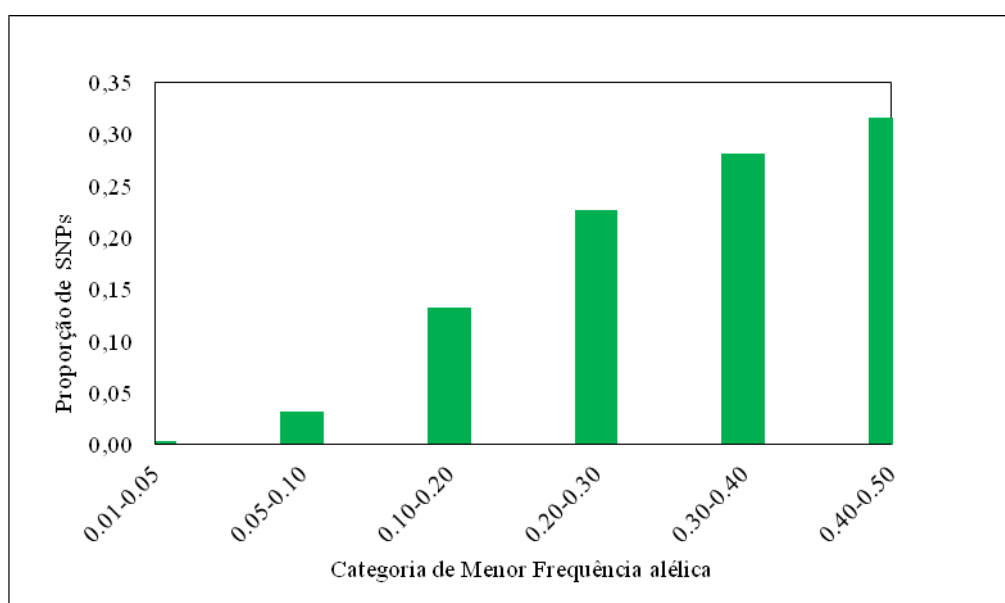


Figura 9 – Distribuição da frequência do menor alelo por genoma inteiro de cabras das raças caprinas Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen após o controle de qualidade.
Fonte: o autor (2018).

A distribuição de MAF por grupo genético (Figura 10) mostrou que quase 50%, 56% e 53% do SNP apresentaram MAF <0,3 para AN, CAN e MOX, respectivamente. Já a raça SA apresentou aproximadamente 62% de SNP com MAF > 0,3, indicou maior diversidade que as demais raças estudadas.

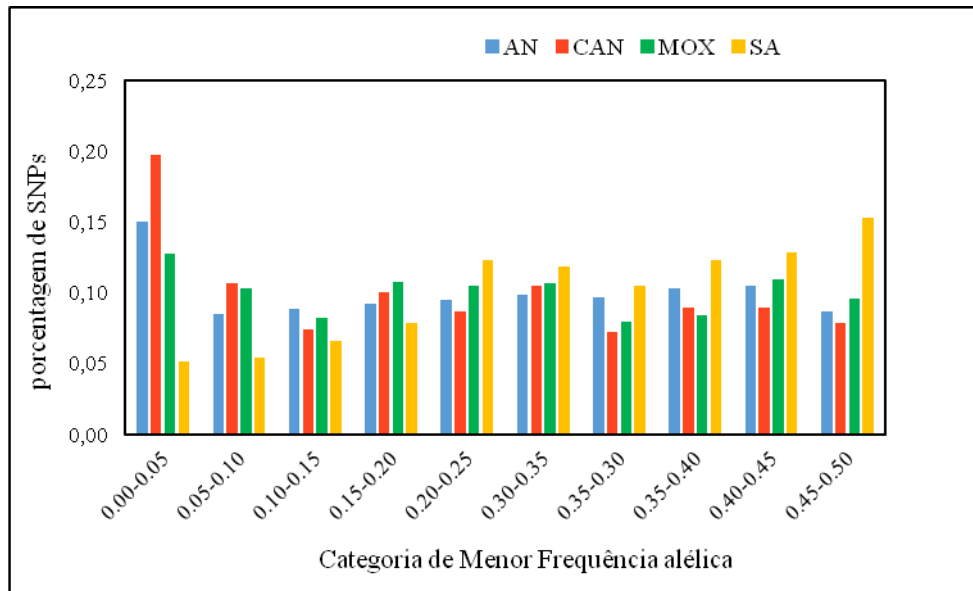


Figura 10 – Distribuição de Menor Frequência alélica por genoma de acordo com as raças caprinas Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen após o controle de qualidade
Fonte: o autor (2018).

Após o controle de qualidade a proporção de SNP com MAF > 0,3 (60%) mostra a existência de diversidade genética nesta população estudada. A distribuição de MAF por grupos genéticos mostrou que, com exceção da raça Saanen, a metade dos SNPs tiveram MAF < 0,3. De forma que, a raça SA apresentou maior diversidade que as demais raças estudadas. Os resultados apresentados por Lashmar et al. (2015), em caprinos da raça Angorá, mostraram que após a filtragem do SNP com baixo MAF, 88,1% dos SNPs foram polimórficos. Segundo Brito et al. (2017), a distribuição do MAF indica a proporção de SNPs com alto polimorfismo (MAF > 0,3). Esses autores mostraram que, em uma população de ovelhas cruzadas neozelandesas, a proporção de SNP com MAF > 0,3 após o controle de qualidade foi de 39,27%.

4.3 Desequilíbrio de ligação

O número de SNPs e LD (r^2) entre marcadores adjacentes para cada cromossomo são apresentados na Tabela 8. A média r^2 entre os SNP adjacentes foi de $0,127 \pm 0,168$.

Tabela 8 - Desequilíbrio médio entre os pares de SNPs adjacentes de acordo com o cromossomo e número de SNPs.

Crom	SNPs	Média r^2	SD (r^2)	Distância média (Mb)	Crom	SNPs	Média r^2	SD (r^2)	Distância média (Mb)
1	3,097	0.133	0.178	50.00	15	1,548	0.126	0.167	49.39
2	2,692	0.135	0.177	49.73	16	1,509	0.123	0.163	49.46
3	2,237	0.133	0.176	49.74	17	1,397	0.121	0.158	49.66
4	2,269	0.133	0.176	49.69	18	1,196	0.122	0.159	49.75
5	2,134	0.132	0.175	49.62	19	1,168	0.125	0.167	49.87
6	2,290	0.133	0.177	49.73	20	1,422	0.121	0.159	49.66
7	2,084	0.131	0.173	49.68	21	1,355	0.122	0.159	49.76
8	2,225	0.133	0.176	49.67	22	1,117	0.124	0.163	50.01
9	1,811	0.132	0.176	49.63	23	971	0.119	0.156	50.23
10	2,000	0.130	0.173	49.76	24	1,270	0.125	0.164	49.73
11	2,037	0.130	0.173	49.74	25	819	0.124	0.164	49.88
12	1,665	0.129	0.171	49.50	26	1,002	0.125	0.164	50.19
13	1,566	0.125	0.166	49.44	27	878	0.125	0.164	50.11
14	1,840	0.132	0.175	49.59	28	876	0.125	0.165	50.14
15	1,548	0.125	0.166	49.39	29	929	0.126	0.167	49.87
Total		0.127	0.168	49.77		47,404			

Fonte: o autor (2018).

Desequilíbrio de ligação (LD) por raça e para todas as raças podem ser visualizados nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

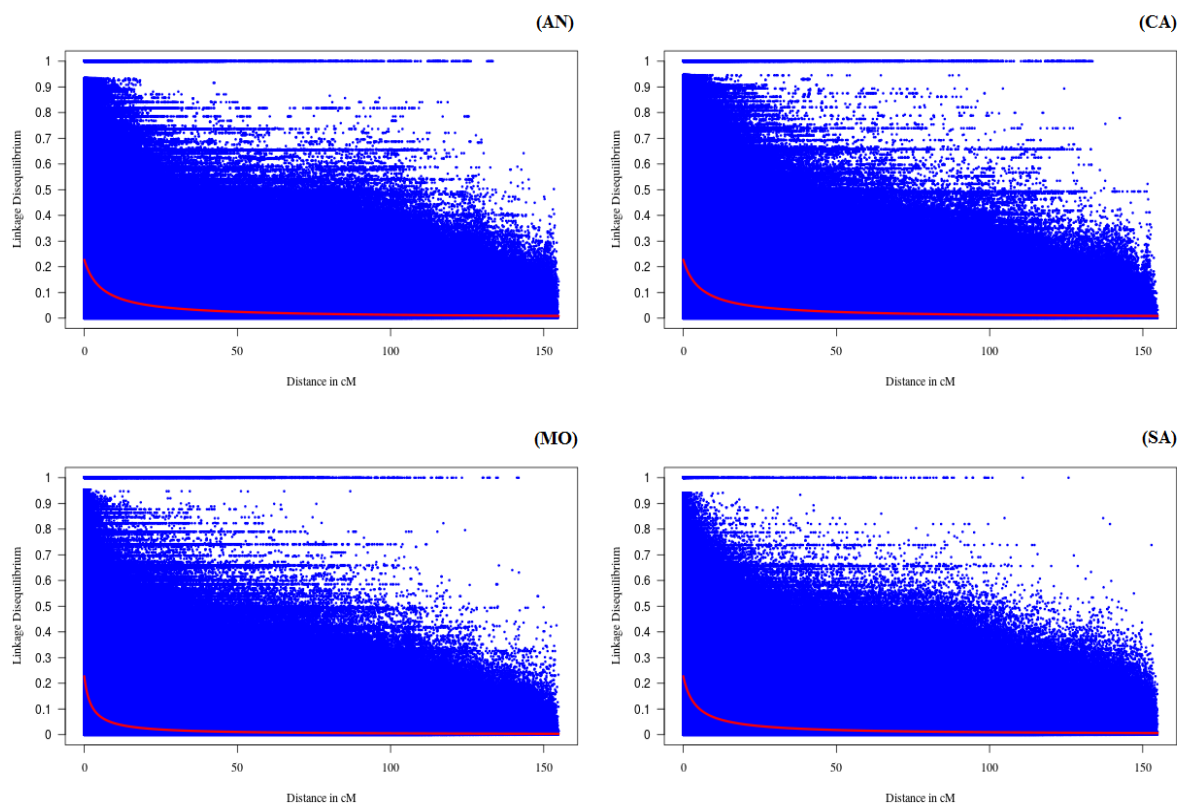


Figura 11 - Declínio do desequilíbrio de ligação para cada raça separadamente: Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen.
Fonte: o autor (2018).

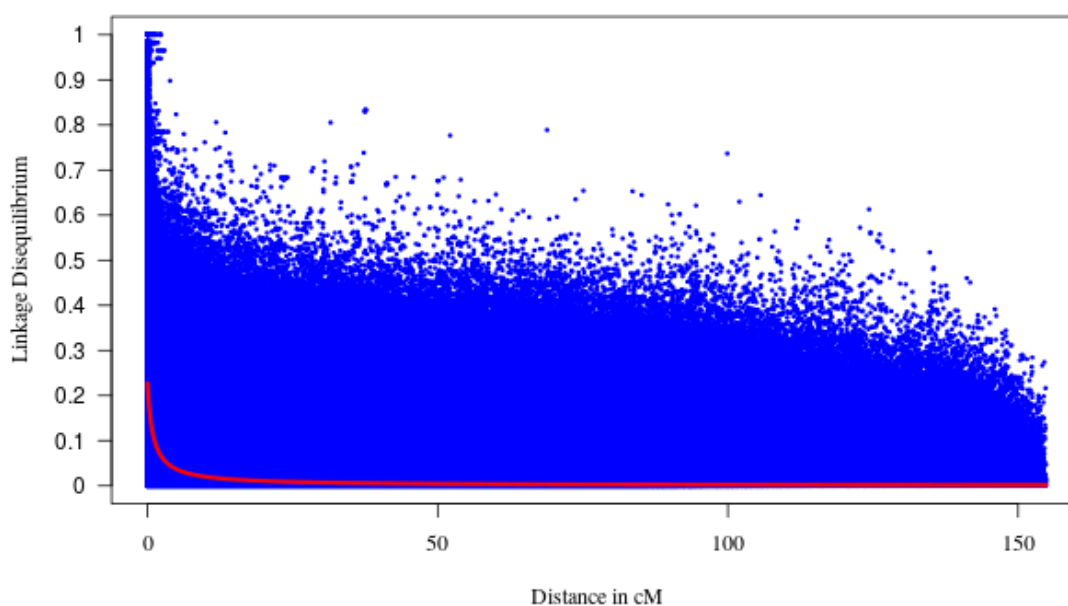


Figura 12 - Declínio do desequilíbrio de ligação para todas as raças caprinas em estudo: Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen.

Fonte: o autor (2018).

No presente estudo a exclusão de SNPs em virtude do LD variou de 27% a 36% entre as raças estudadas, Tabela 9. Os valores de MAF, HWE e Heterozigosidade (HZ) estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 9 - Número de SNP incluídos no teste de desequilíbrio de ligação (LD), número de SNP mantidos após a aplicação do teste LD e porcentagem de SNP excluídos em virtude do LD para as raças Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen

Raça	Antes pruning	Após pruning	Porcentagem de redução (%)
Ang.Nubiana	39.726	25.493	35,83%
Canindé	36.532	23.493	35,69%
Moxotó	38.431	26.511	31,02%
Saanen	44.025	31.875	27,60%

Fonte: o autor (2018).

Tabela 10 - Valores médios de MAF, HWE e HZ antes e após o teste de desequilíbrio de ligação (LD) para as raças Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen

	Antes pruning			Após pruning		
	MAF μ (sd)	HWE μ (sd)	HZ μ (sd)	MAF μ (sd)	HWE μ (sd)	HZ μ (sd)
Anglo	0,281 (0,131)	0,566 (0,315)	0,392 (0,148)	0,277 (0,132)	0,556 (0,311)	0,389 (0,150)
Nubiana	0,275 (0,131)	0,566 (0,316)	0,390 (0,146)	0,272 (0,132)	0,555 (0,312)	0,388 (0,147)
Canindé	0,279 (0,128)	0,567 (0,319)	0,381 (0,137)	0,276 (0,129)	0,558 (0,315)	0,378 (0,138)
Moxotó	0,310 (0,121)	0,567 (0,322)	0,413 (0,133)	0,308 (0,122)	0,556 (0,319)	0,412 (0,134)
Saanen						

Fonte: o autor (2018).

A média r^2 entre os SNP adjacentes foi de $0,127 \pm 0,168$. O desequilíbrio de ligação reduz com o aumento da distância entre os SNPs. Durante os estudos de estrutura de populações e diversidade genética, como por exemplo o uso de análises de componentes principais, o uso de SNPs independentes, obtidos por meio do LD pruning, é imprescindível para obtenção de resultados sem viés. Diante disso, os marcadores que estavam em LD foram removidos e os resultados indicaram a ocorrência de baixo nível médio de LD detectados.

Os valores médios de MAF, HWE e HZ antes e após o teste de desequilíbrio de ligação (LD), pruning, foram semelhantes, indicando que os SNPs excluídos por LD eram similares aos remanescentes.

4.4 Diversidade genética

A diversidade genética dentro das populações foi avaliada como uma medida de heterozigiosidade. A média para H_e foi de 0,347 (variando de 0,314 a 0,396), enquanto a média de H_o foi de 0,354 (variando de 0,330 a 0,402). Nossos resultados mostraram que a heterozigose esperada e observada (H_e ; H_o) foi maior para a raça SA (0,3960; 0,4018) do que AN (0,3408; 0,3446), MO (0,3380; 0,3418) e CA (0,3143; 0,3296), Tabela 11.

Tabela 11 - Heterozigosidade esperada (H_s) e observada (H_o), endogamia (Fis) para as raças Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen

Breed	Expected Heterozygosity (H_e)	Observed Heterozygosity (H_o)	Inbreeding (Fis)
Anglo Nubiana	0.34078949	0.34460925	0.00847701
Canindé	0.31428426	0.32958822	-0.03823605
Moxotó	0.33800652	0.34177168	-0.00788174
Saanen	0.39600685	0.40175759	-0.01279868
Media	0.34727175	0.354431685	-0.016375

Fonte: o autor (2018).

De acordo com Takezaki e Nei (1996) os marcadores devem ter uma heterozigosidade média variando de 0,3 a 0,8 na população para indicar a existência de variabilidade genética. Nossos resultados mostraram que a heterozigose estava dentro desse intervalo. A heterozigosidade esperada da raça Saanen dessa pesquisa foi semelhante àquela ($H_e=0,40$) relatada por Visser et al. (2016) em caprinos da raça Angorá.

A existência de diversidade genética verificada nas raças especializadas (AN e SA), provavelmente, tenha sido devido ao fato de pertencerem a grupos genéticos consolidados, os quais possuem maior número efetivo de animais e reprodutores, contribuindo para baixos índices de endogamia. Além disso, no manejo reprodutivo desses grupos genéticos são efetuados com acasalamentos orientados visando minimizar o coeficiente de endogamia. Por outro lado, em geral, o registro das informações de parentesco entre animais nas raças nativas é precário, acarretando dificuldades no planejamento de acasalamentos visando menor inbreeding das progênies. De forma que, nas populações nativas, os acasalamentos entre indivíduos mais aparentados que a média da população são mais frequentes refletindo em menor variabilidade genética desses grupos.

Entretanto, ambas as H_e e H_o não foram muito diferentes entre si para todas as raças, indicando a não ocorrência de perda ou fixação de alelos. O déficit de heterozigosidade (Fis) variou entre 0,0085 (Anglo Nubiana) e -0,0382 (Canindé), sendo valores reduzidos, revelando também haver considerável diversidade genética nessas populações. Resultados semelhantes foram relatados por Visser et al. (2016), que mostraram um Fis variando entre -0,0029 a -0,051 na África do Sul, em caprinos da raça Angorá franceses e argentinos.

Os valores negativos refletem que a heterozigosidade observada foi maior do que a esperada. A estatística Fis tem importante papel no delineamento de programas de conservação das raças locais, pois indica o nível de diversidade genética entre os grupos. Esses resultados mostraram que a diversidade genética tem se mantido nas raças estudadas.

Principalmente a raça Saanen, a qual embora seja submetida à programa de seleção, apresentou baixo nível de inbreeding. Provavelmente, esse fato seja decorrente do monitorado dos acasalamentos para evitar a ocorrência de altos níveis de endogamia. Valores semelhantes de H_e , H_o e F_{is} (0,3819, 0,3797 e - 0,0027) para a raça Marota, outra raça caprina nativa brasileira, foram reportados por Moura et al. (2015). Nesse caso, também foi verificada a ocorrência de diversidade genética dentro daquela população.

Embora seja difícil comparar esses resultados com os resultados de outras pesquisas, as quais tenham utilizados métodos diferentes. A maioria dessas apresentam valores mais elevados para as heterozigosidades esperadas e observadas, quando comparados com os resultados apresentados nessa pesquisa. Provavelmente, isto pode ser devido ao uso de marcadores com diferentes potenciais de detecção de regiões genômicas. Por exemplo, Ginja et al. (2017), trabalhando com 27 raças caprinas, usando microssatélites (SSR), relataram médias para $H_o=0,591$ e $H_e=0,640$. Dixit et al. (2010), em seis raças caprinas indianas, utilizando análise de microssatélites, revelaram valores mais altos de heterozigosidade esperada, os quais variaram de 0,61 a 0,73. Da mesma forma, em uma pesquisa com raças brasileiras (Azul, Moxotó, Marota, Canindé, Repartida e Graúna), Rocha et al. (2016) revelaram maior diversidade genética, apresentada pela heterozigosidade média esperada (H_e), que variou de 0,57 (Azul) a 0,66 (Repartida). Esses autores também mostraram maior H_e para outros três grupos caprinos: padrão genético indefinido, raças exóticas (Alpina, Anglo Nubiana, Boer e Saanen) e espanholas (Murciana, Murciana-Granadina e Granadina), cujas médias foram de 0,71, 0,66 e 0,68, respectivamente.

Elevados valores de F_{is} (inbreeding) podem ser resultantes dos desvios da frequência genotípica causando a violação do EHW. No presente estudo, os quatro grupos genéticos estudados apresentaram baixos valores de F_{is} e, portanto, o EHW não foi violado.

4.5 Distância genética

Os pares de distância de Nei (DA) entre os grupos raciais foram: 0,172 (AN e CAN); 0,151 (AN e MOX); 0,128 (AN e SA); 0,055 (CAN e MOX); 0,139 (CAN e SA) e 0,118 (MOX e SA). Esses resultados permitiram a construção da árvore Neighbor-joining a partir da matriz de distância genética DA (Figura 13). As raças locais (MO e CA) e raça especializada (SA e AN) apresentaram dois clusters distintos.

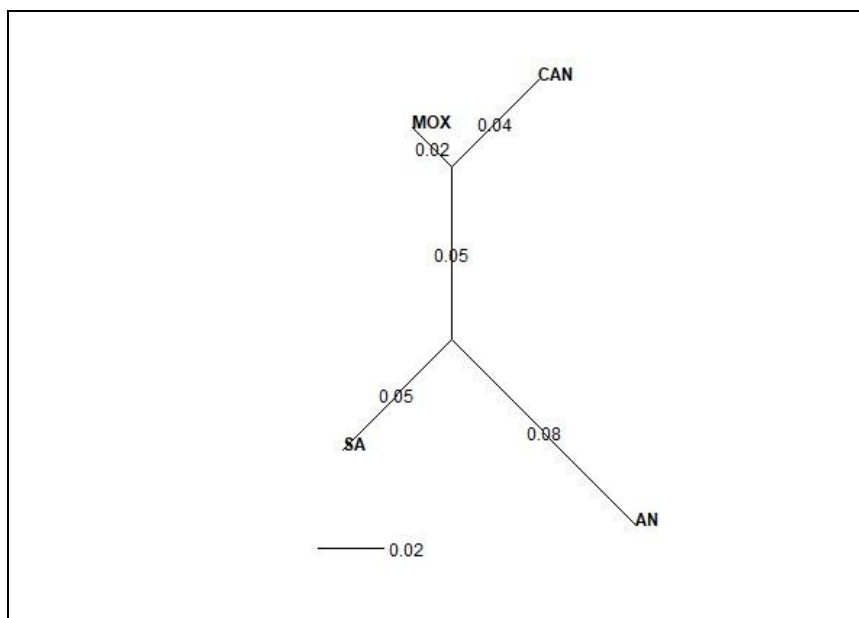


Figura 13 - Árvore filogenética dos grupos genéticos baseada nas distâncias genéticas padrão de Nei.
Fonte: o autor (2018).

4.6 Análise de componentes principais

A estrutura populacional das raças estudadas foi explicada por meio de abordagem multivariada. Os dois primeiros componentes explicaram 84,48% da variabilidade total. O primeiro eixo explicou 62,71% da inércia, enquanto que o segundo eixo explicou 21,77% da inércia, separando as raças locais (CA e MO) das raças especializadas (AN e AS) em grupos distintos, Figura 14.a.

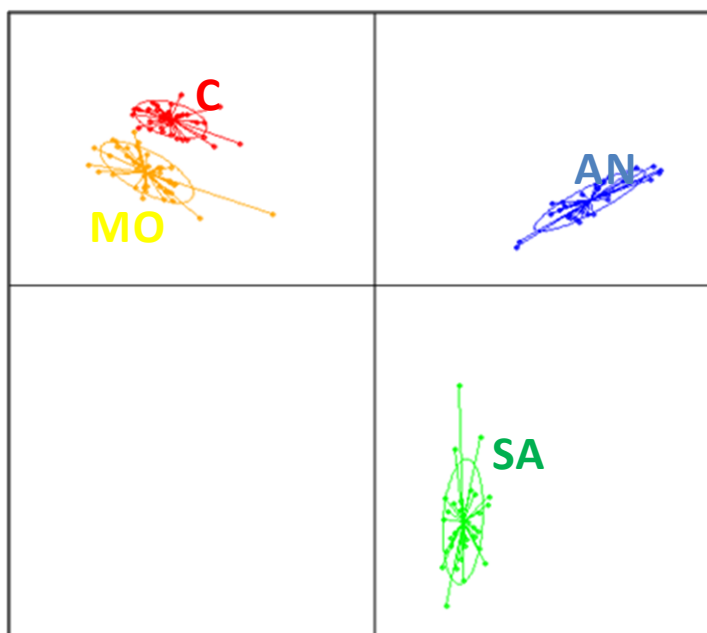


Figure 14.a. Scatter plot of first two Principal component for AngloNubian (Blue) Canindé (Red), Moxotó (Yellow), Saanen (Green).

Fonte: o autor (2018).

O diagrama *scatter plot* tridimensional, com base na matriz de parentesco genômica, permitiu uma inspeção visual mais detalhada da relação genética entre as raças estudadas (Figura 14.b). Os três primeiros componentes explicaram 88,78% da variabilidade total (Figura 14.b). O primeiro eixo (62,71%) distinguiu as raças locais brasileiras das raças especializadas, e o segundo eixo (21,77%) separou AN e SA em grupos distintos. O terceiro explicou 4,30% da variabilidade total e separou CA e MO em grupos distintos.

De modo semelhante, o dendrograma (Figura 15) e *Heatmap* (Figura 16) apresentam diagramas que também permitem a visualização da distinção dos grupos genéticos em estudo.

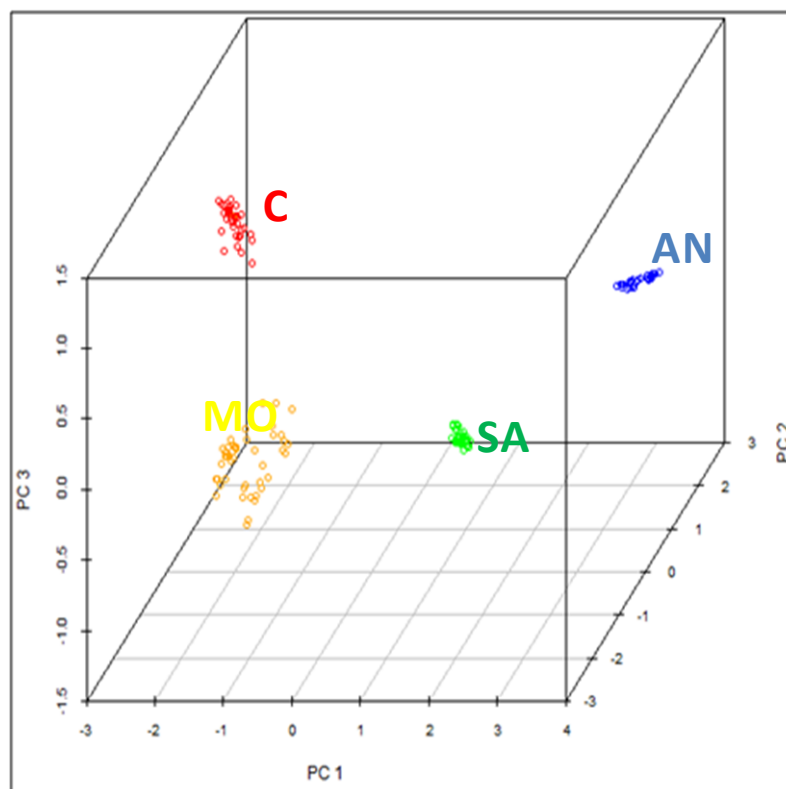


Figura 14.b - *Scatter plot* tridimensional baseado na matriz de parentesco genômica para as raças Moxotó (Amarelo), Canindé (Vermelho), Saanen(Verde) e Anglo Nubiana(Azul).

Fonte: o autor (2018).

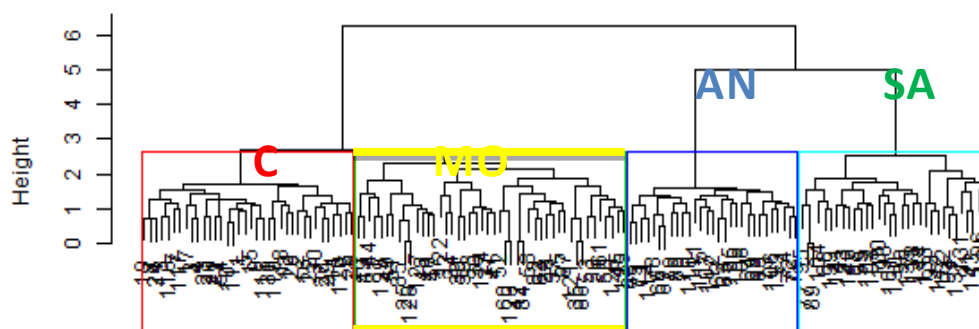


Figura 15 - Cluster baseado na matriz genômica para os caprinos das raças Moxotó (verde), Canindé (Vermelho), Saanen (Azul claro) e Anglo Nubiana (Azul).

Fonte: o autor (2018).

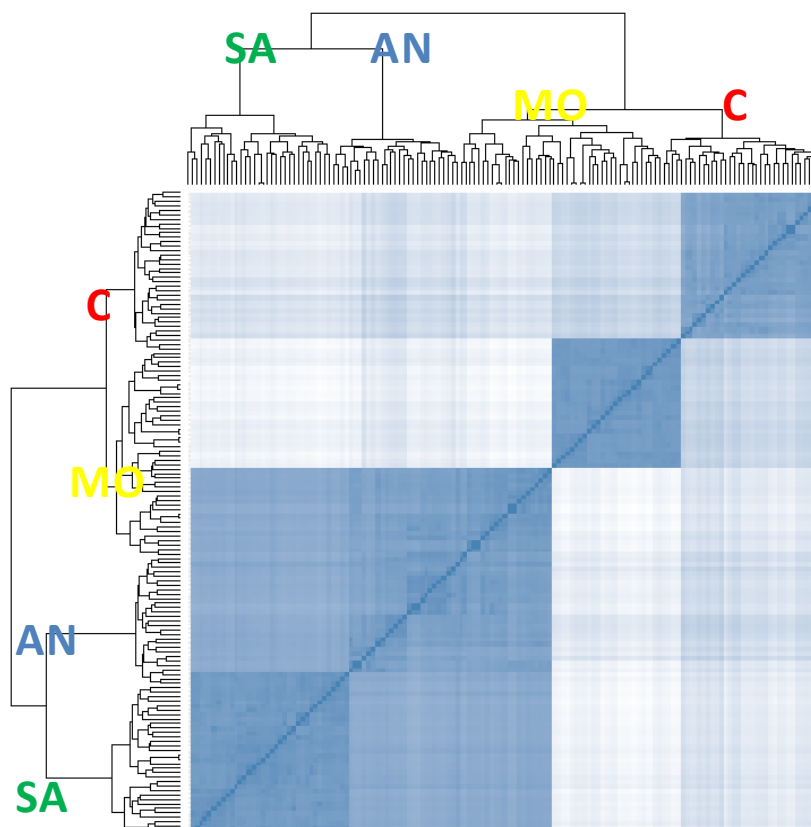


Figura 16 - *Heatmap* baseado na matriz genômica para as cabras Moxotó, Canindé, Saanen e Anglo Nubiana
 Fonte: o autor (2018).

Os valores ótimos para k baseados na estatística Gap e na soma dos quadrados totais foram $k = 4$ de acordo com a estatística ΔK (EVANNO et al., 2005), Figura 17. O valor k foi usado para analisar o Cluster Bayesiano.

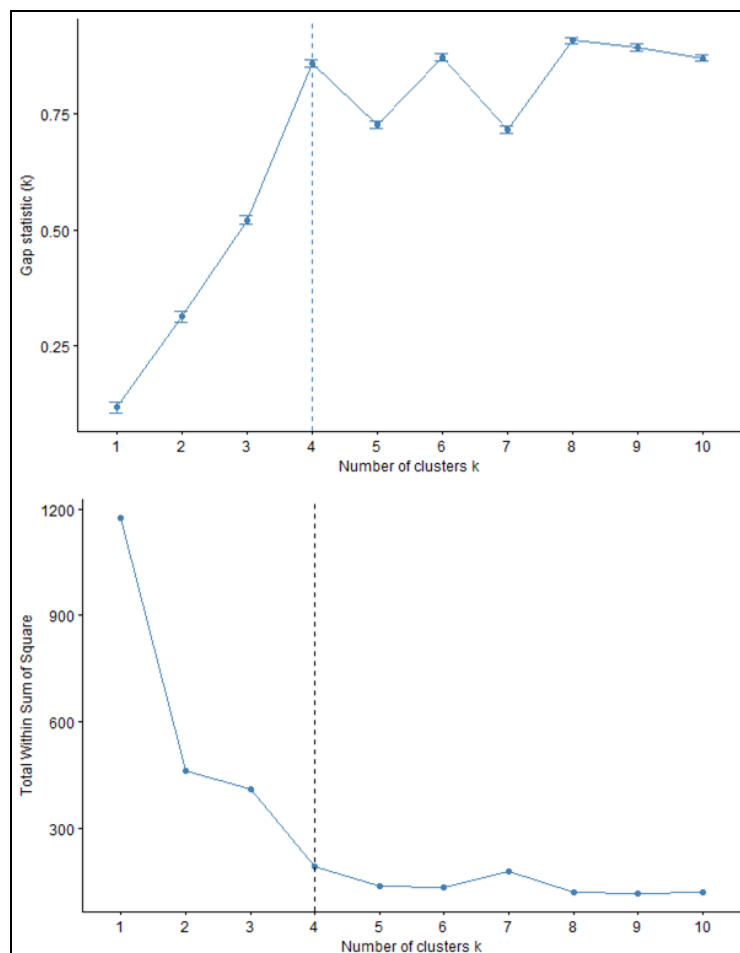


Figura 17 - Número ótimo de cluster com base na estatística Gap e no total na soma do quadrado.

Fonte: o autor (2018).

O agrupamento hierárquico de dados foi implementado pelo software Admixture, que estima a ancestralidade de forma baseada em modelos a partir do painel SNP autossômico formando um conjunto de indivíduos não relacionados. Os dados foram plotados em ordem de ancestralidade fracionária que eles compartilharam com outras raças, Figura 18.

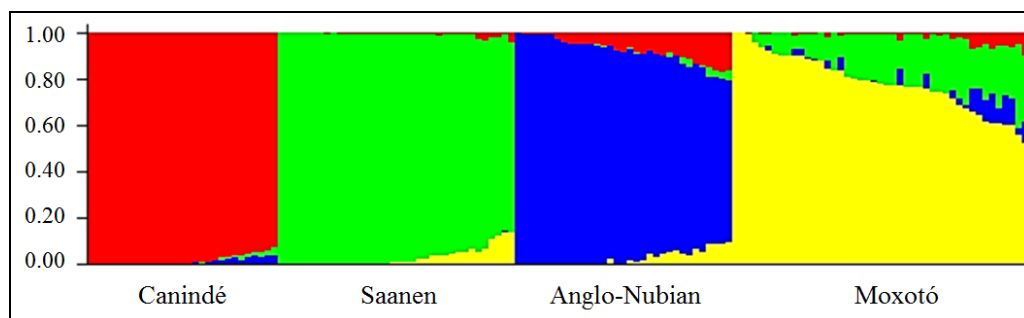


Figura 18 - Estrutura genética estimada para $K = 4$ usando o programa STRUCTURE em quatro raças de caprinos.

Fonte: o autor (2018).

Análise de componentes principais (PCA) foi realizada para inspeção das relações dentro das populações estudadas. Esta análise mostrou que os grupos raciais formaram clusters distintos e populações foram claramente separadas. Esses resultados eram esperados, pois certificam que as raças nativas estão, geneticamente, mais distantes das raças melhoradas e mais próximas entre si. Esse fato pode ser explicado, em virtude de as raças especializadas terem sido introduzidas, mais recentemente, no Brasil do que as raças nativas. De forma que, as raças nativas, durante o período de aproximadamente cinco séculos, ficaram expostas a ação do processo de seleção natural.

Os resultados do diagrama *Scatter plot* mostraram o agrupamento distinto entre as raças nativas brasileiras e as raças especializadas, mas, além disso, mostraram que as raças nativas brasileiras, Moxotó e Canindé, são geneticamente distantes entre si, havendo nítida distinção entre elas. A razão para a distância genética entre essas raças, pode ser resultado do distinto histórico de formação quanto à localização, estrutura genética e diferença entre os grupos genéticos precursores.

Além disso, os resultados mostraram haver distância genética entre as raças Saanen e Anglo Nubiana. Isto também era esperado por que essas raças são oriundas de regiões distintas da Europa. Enquanto a raça Saanen é oriunda da Europa continental, a Anglo Nubiana é oriunda de cruzamentos orientados entre cabras inglesas e carneiros africanos. Essa, provavelmente, pode ser a razão para a distância genética entre essas raças especializadas estudadas.

O agrupamento hierárquico de dados foi implementado pelo software Admixture, que estima a ancestralidade de forma baseada em modelos a partir do painel SNP autossômico formando um conjunto de indivíduos não relacionados. Os dados foram plotados em ordem de ancestralidade fracionária que eles compartilharam com outras raças, Figura 18. Como o gráfico de dispersão multidimensional baseado na matriz de relações genômicas, a análise estrutural mostrou quatro populações individuais alocadas em quatro grupos distintos, como era esperado. Embora haja alguma mistura entre eles, as populações são distintas e não há violação de HWE. Por outro lado, podemos identificar alguma transferência de material genético entre eles. Por exemplo, provavelmente a raça MO teve ascendência comum com SA, e CA talvez recebeu genes da AN.

O agrupamento dos animais em quatro grupos genéticos no cluster mostra que essa topologia foi consistente com os resultados da PCA, evidenciando a presença de material genético comum entre os grupos raciais. Esses resultados revelaram que a raça Saanen, provavelmente, teve participação na formação das raças Moxotó e Canindé. Resultados semelhantes foram apresentados por Rocha et al. (2016) revelando forte influência genética da

raça Saanen sobre as raças locais brasileiras Azul, Moxotó, Canindé, Repartida e Graúna, exceto para a raça Marota. Esses autores relataram ser comum o uso de bodes oriundos de raças exóticas em cabras de raças locais, visando melhorar o potencial leiteiro dessas raças.

4.7 Análise de associação genômica (GWAS)

4.7.1 Validação do teste estatístico com os QQ plots

Os gráficos QQ plots foram elaborados visando verificar a distribuição geral do teste estatístico e avaliar o grau de ajuste do modelo para essa análise. Partindo do princípio que a maioria dos SNPs não estão associados com a característica, o QQ plot correspondente deveria seguir 45° da linha $y=x$ para confirmar o bom ajuste da distribuição de observado para esperado. Nossos resultados para o QQ plots estão apresentados na Figura 19.

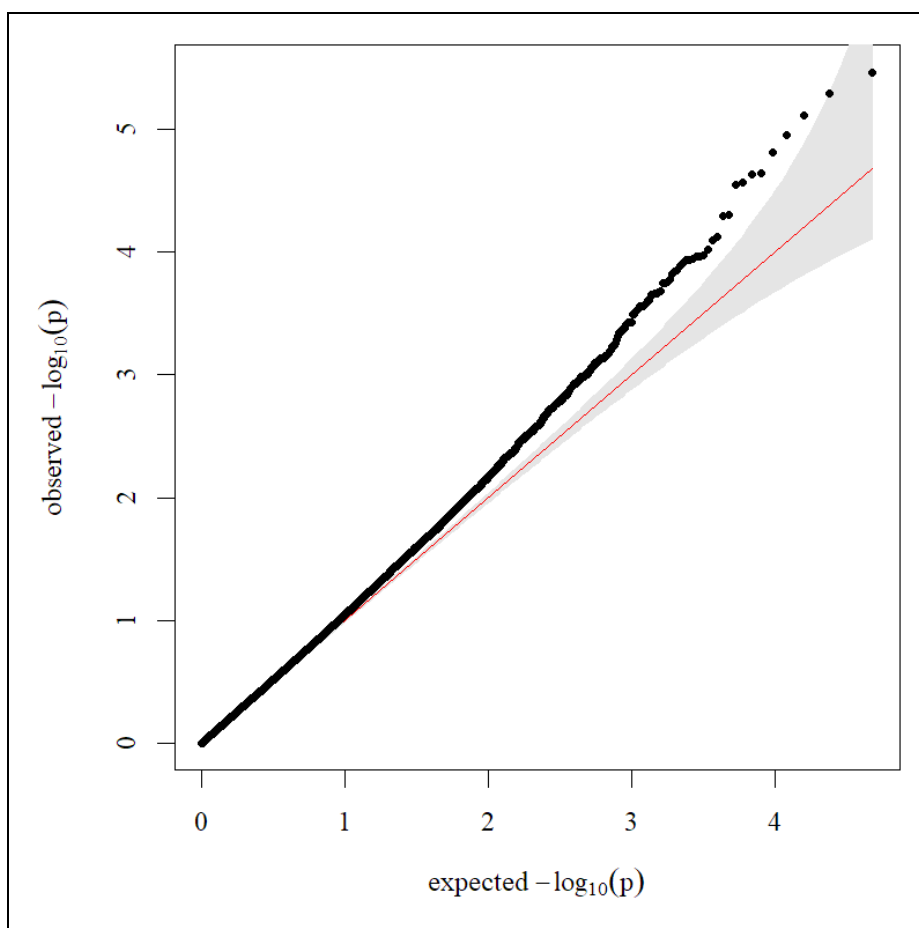


Figura 19 – Quantile-quantile plots do estudo de associação genômica ampla SNP por SNP em cabras Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen.

Fonte: o autor (2018).

4.7.2 Análises de associação genômica ampla – GWAS

As análises de GWAS foram realizadas para todas as raças e a matriz genômica (“G”) não foi incluída nas análises. Em geral, o uso da matriz G de parentesco visa corrigir os dados para os efeitos de subgrupos dentro das populações proporcionando melhor ajuste dos dados para associação entre fenótipo e marcadores moleculares. Entretanto, nesse estudo, devido ao pequeno tamanho amostral, acreditamos que a utilização da matriz G poderia estar removendo grande parte da variabilidade, a qual seria importante para o estudo de associação. O Manhattan plot está apresentado na Figura 20.

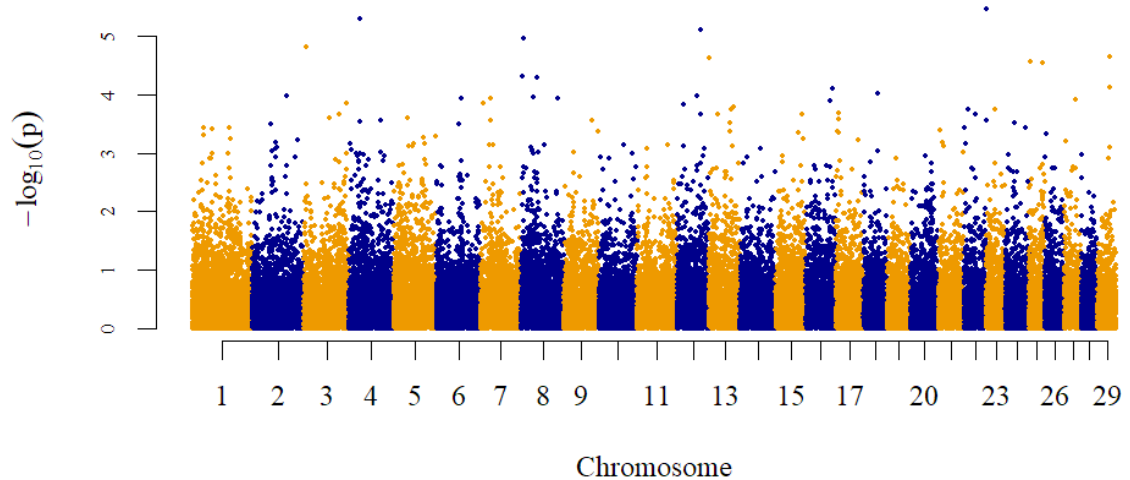


Figura 20 – Genome-wide Manhattan plots do estudo de associação Genoma-ampla das análises SNP por SNP para as quatro raças caprinas: Anglo Nubiana, Canindé, Moxotó e Saanen. O Manhattan plot mostra a combinação entre $[-\log_{10}(p)]$ no eixo y verso a posição do SNP no genoma da cabra o eixo x, ordenado por número do cromossomo. A linha preta representa um p valor de 0,00001 Genome-wide threshold.

Fonte: o autor (2018).

De acordo com o Manhattan plot, considerando um treshold (limite) *p-value* ajustado por Bonferroni ($p=0,05/N^{\circ}$ de marcadores) não houve a presença de SNPs significativamente associados com a prolificidade. Esse fato pode ter sido devido ao pequeno número de observações disponível para as análises.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O painel Goat SNP50 Beadchip foi informativo para as raças Anglo Nubiana, Canindé e Moxotó, devido a sua ampla amostragem no genoma dessas populações permitindo a realização de estudos de diversidade genética, estrutura de populações.

As heterozigosidades esperadas e observadas (H_e e H_o) foram similares entre si para todas as raças gerando baixos coeficientes de endogamia para todas as raças, revelando a existência de diversidade genética nas populações em estudo.

A estrutura genética mostrou que os quatro grupos raciais foram distintos, embora tenha sido identificado a transferência de algum material genético entre eles.

REFERÊNCIAS

- AI, H.; HUANG, L.; REN, J. Genetic Diversity, Linkage Disequilibrium and Selection Signatures in Chinese and Western Pigs Revealed by Genome-Wide SNP Markers. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056001>. **PLoS ONE**. v. 8(2), e56001. 2013.
- ALJUMAAH, R.S. et al. Genetic diversity of Ardi goat based on microsatellite analysis. . doi: 10.5897/AJB12.542. **African Journal of Biotechnology**, v. 11(100), p. 16539-16545, 2012.
- AN, X.P. et al. Association analysis between variants in KITLG gene and litter size in goats. <https://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.12.058>. **Gene**. 558, p. 126-130, 2015.
- AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x>. **Reproduction in Domestic Animals**. 2010.
- ASHBURNER, M. et al. G. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**. v.25, p.25–29, 2000.
- AHLAWAT, S. et al. Genotyping of novel SNPs in BMPR1B, BMP15, and GDF9 genes for association with prolificacy in seven Indian goat breeds. **Anim. Biotechnol.** 27, 199-207, 2016.
- AHLAWAT, S.; SHARMA, R.; MAITRA. Prolificacy in Indian goat breeds is independent of FecB mutation. **Indian Journal of Animal Sciences**, 2015.
- AHLAWAT, S. et al. Association analysis of a novel SNP in GPR54 gene with reproductive traits in Indian goats. **Indian J. Dairy Sci.** 68(1), 2015b.
- AHLAWAT, S.; SHARMA, R.; MAITRA, A. et al. Analysis of coding DNA sequence of GDF9 gene in Indian goats for prolificacy associated markers. **Indian Journal of Animal Sciences**, 2012.
- AHLAWAT, S.; SHARMA, R.; MAITRA, A. Screening of indigenous goats for prolificacy associated DNA markers of sheep. **Gene**, v. 517, n. 1, p. 128–131, 2013.
- ARAUJO, A.M. et al. Genetic diversity between herds of Alpine and Saanen dairy goats and the naturalized Brazilian Moxotó breed. **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 67-74, 2006.
- ARIYARATHNE, H.; LOKUGALAPPATTI L. Single nucleotide polymorphism of candidate genes in non-descript local goats of Sri Lanka. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.12.012>. **Livest Sci**, p. 196:49–54, 2017.

BOONE, E.M. et al. Genetic regulation of hypothalamic cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART) in BxD inbred mice. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.11.074>. **Brain Research**. p. 1-7. 2008.

CAIXETA, E.T.; FERRÃO, L.F.V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas**. ed. Viçosa, MG: UFV, p. 25-42, 2013.

CAETANO, A.R. et al. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, p. 64-71, 2009.

CAETANO, A. et al. Geração de valor genômico. **XXI Ciência para a vida**, p. 62, 2015.

CARDOSO, R.C. et al. Application of hormonal subdoses at acupoint Hou Hai in estrus synchronization protocols of goats. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 3, p. 1135-1142. 2018.

CELESTINO, J.J.H. et al. Steady- state level of kit ligand mRNA in goat ovaries and the role of kit ligand in preantral follicle survival and growth in vitro. **Molecular Reproduction and Development**. V. 77, p. 231-240. 2010.

CEZAR, M.F.; SOUSA, W.H. Avaliação e utilização da condição corporal como ferramenta de melhoria da reprodução e produção de ovinos e caprinos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43, 2006, João Pessol. SBZ. **Anais [...]**. p. 541-566.

CHU, M.X. et al. Polymorphism of gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR) gene and its relationship with prolificacy of lining grey goat. **Journal of Agricultural Biotechnology**. v.17, n.2, p. 218-223, r.23. 2009.

CREPALDI, P.; CORTI, M.; CICOGNA, M. Factors affecting milk production and prolificacy of Alpine goats in Lombardy (Italy). **Small Ruminant Research**, v. 32, p. 83-88, 1999.

DEVENDRA, C. Investments on Pro-poor Development Projects on Goats: Ensuring Success for Improved Livelihoods. Asian-Aust. **J. Anim. Sci**, v. 26(1): p.1-18, 2013.

DIXIT, S.P.; VERMA, N.K.; AGGARWAL, R.A.K. et al. Genetic diversity and relationship among southern indian goat breeds based on microsatellite markers. **Small Ruminant Research**, 2010.

DINIZ, F. A evolução da engenharia da vida: geração de valor genômico. **XXI Ciência para a vida**, p. 62, 2015.

DOAN, R. et al. Whole-Genome Sequencing and Genetic Variant Analysis of a Quarter Horse Mare. **BMC Genomics**, v.13, n.78, p.1471-2164, 2012.

DONG, Y. et al. Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). <https://doi.org/10.1038/nbt.2478>. **Nature biotechnology**. v. 31, p. 135-141, 2013.

DUNGAN, H. M.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Minireview: Kisspeptin Neurons as Central Processors in the Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1282>. **Endocrinology**. 147(3), p.1154 –1158, 2005.

ESTRADA, K.P.S.; RODRIGUEZ, J.M.F. Manejo reproductivo de la cabra. **Sitio Argentino de Producción Animal**, n. 37. BM Editores, 2014.

FENG, T. et al. Polymorphisms of caprine GDF9 gene and their association with litter size in Jining Grey goats. **Mol. Biol. Rep.**, v. 38, p. 5189 – 5197, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. In vivo conservation of animal genetic resources. Roma: FAO, (FAO Animal Production and Health Guidelines, 14), 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. FAOSTAT Production live animals. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QA/E>>. Acesso em: 18 nov. 2016.

FOULKES, A.S. Applied statistical genetics with R: for population based association studies. New York: <https://doi.org/10.1007/978-0-387-89554-3>. **Springer Verlag**. Ebooks. p. 252. 2009.

GEORGE, J.W. et al. Current Concepts of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene Regulation. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.085043>. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**. v.84, p.7–17, 2011.

GINJA, C. et al. Genetic diversity and patterns of population structure in Creole goats from the Americas. **Animal Genetics**. 48(3), 315 - 329, 2017.

GOUDET, J. et al. A package for R to compute and test hierarchical Fstatistics. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00828.x>. **Mol. Ecol.** 5:184–6. 2005.

GONZALEZ STAGNARO, C. et al. Actividad sexual estacional y fertilidad en cabras de razas puras de una zona tropical de Venezuela. **Ciências Veterinárias**, Maracaibo, v. 4(4), p. 223-48, 1974.

GONCALVES, A. L. et al. Avaliação de sistemas de produção de caprinos leiteiros na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, n. 2, p. 366-376, 2008.

GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, J.D. et al. Biotecnologia aplicada ao melhoramento de suínos. X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL. 2013, Uberaba. **Anais [...]**. Uberaba, MG. 2013.

GUO, X. et al. Polymorphism of 5' regulatory region of caprine FSHR gene and its association with litter size in Jining Grey goat. <https://doi.org/10.3906/vet-1105-39>. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** v.37, p.497-503, 2013.

GUNIA, M.; MANDONNET, N.; ALEXANDRE, G. et al. Genetic parameters of litter size in Creole goats and their implication for a breeding programme including adaptation traits. **Advances in Anim. Biosci.** v.1, p.402-403, 2010.

HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed., São Paulo, p. 513, 2004.

HALDAR, A.; PAL, P.; DATTA, M. et al. Prolificacy and Its Relationship with Age, Body Weight, Parity, Previous Litter Size and Body Linear Type Traits in Meat-type Goats. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* v. 27, n. 5, p. 628-634, 2014.

HAMED, A.; MABRROUK, M.M.; SHAAT, I. et al. Estimation of genetic parameters and some non-genetic factors for litter size at birth and weaning and milk yield traits in Zaraibi goats. **Egyptian J. Sheep e Goat Scie**, v. 4, p. 55-64, 2009.

HENDERSON, C.R. Applications of linear models in animal breeding. Ontario: **University of Guelph**. p. 426, 1984.

HEIKAL, H.S.M.; NABY, W.S.H.A.E. Genetic Improvement of Litter Size in Four Goat Breeds in Egypt Using Polymorphism in Bone Morphogenetic Protein 15 Gene. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2017/5.10.410.415>. **Adv. Anim. Vet. Sci.** v. 5, n. 10, p. 410-415, 2017.

HILL, H.G.; ROBERTSON, A. The linkage disequilibrium in finite populations. **Theor. Appl. Genet.**, v. 6, p. 226-231, 1968.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Censo Agropecuário 2017. Disponível em: <<https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/resultados-censo-agro-2017.html>>. Acesso em: 18 set. 2018.

JUENGEL, J.L. et al. Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 Are Essential for Ovarian Follicular Development in Sheep. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007146>. **Biology of reproduction**. v.67, p.1777–1789, 2002.

JHONSTON, S.E. et al. Genome-wide association mapping identifies the genetic basis of discrete and quantitative variation in sexual weaponry in a wild sheep population. **Mol. Ecology**. v. 20, p. 2555–2566, 2011.

KIJAS, J.W. et al. Genome-Wide Analysis of the World's Sheep Breeds Reveals High Levels of Historic Mixture and Strong Recent Selection. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001258>. **PLoS Biol.**, v. 10, n. 2, e. 1001258. 2012.

KIJAS, J.W. et al. International Goat Genome Consortium. Genetic diversity and investigation of polledness in divergent goat populations using 52 088 SNPs. **Anim. Genet.** v. 44, p. 325-335, 2013.

LAI, F.N. et al. Whole-genome scanning for the litter size trait associated genes and SNPs under selection in dairy goat (*Capra hircus*). **Sci. Rep.** v.6, p.1-12, 2016.

LASHMAR, S.F.; VISSER, C.; KOSTER, E.U.M. Validation of the 50K illumina goat SNP chip the south African Angora goat. South African Angora goat. **South African J. of animal science**, v. 45, n. 1, 2015.

LEAL, G.S.; SAMPAIO, D.O.; BESSEGATO, L.F. Avaliação econômico-financeira de produção de leite caprino na zona da mata mineira. <https://doi.org/10.31994/rvs.v9i1.269>. **Revista das Faculdades Integradas Viana Junior.** v. 9, p. 1. 2018.

LIU, R.Y. et al. Genetic Diversity and Origin of Chinese Domestic Goats Revealed by Complete mtDNA D-loop Sequence Variation. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** v. 20, n. 2, p. 178 – 183, 2007.

LI, G. et al. Polymorphism of PRLR and LH β genes by SSCP marker and their association with litter size in Boer goats. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.08.014>. **Livestock Science.** v.136, p.281–286, 2011.

LONG, Y. et al. Molecular characterization and genetic analysis of Gnrh2 and Gthb in different ploidy level fishes. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2009.06.002>. **Progress in Natural Science.** v. 19, p. 1569–1579, 2009.

MARQUES, I.T.O. et al. Caracterização da diversidade genética de ovinos Santa Inês em fazenda do Estado do Piauí. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 16, n. 3, p. 523-534, 2015.

MEKURIAW, G. et al. Polymorphism analysis of kisspeptin (KISS1) gene and its association with litter size in Ethiopian indigenous goat populations. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15750>. **African Journal of Biotechnology.** v.16(22), p. 1254-126, 2017.

MENEZES, L.M. et al. Genetic parameters for reproduction and growth traits in Boer goats in Brazil. **Small Rumin. Res.** v. 136, p. 247-256, 2016.

MINGXING, C. et al. Polymorphism of gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR) gene and its relationship with prolificacy of lining grey goat. **J. Agric. Biotechnol.** v. 17, p. 218-223, 2009.

MIAO, X.; LUO, Q.; Qin, X. Genome-wide transcriptome analysis in the ovaries of two goats identifies differentially expressed genes related to fecundity. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.01.047>. **Gene.** v. 582, p. 69-76, 2016.

MOURA, J.O. et al. Diversidade genética em caprinos localmente adaptados no Brasil utilizando o bead chip 50k. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**, p. 92-97. 2015.

MULDER et al. The InterPro Database, brings increased coverage and new features. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 1, p.315–318, 2003.

NAOR, Z. et al. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): Studies on the GnRH receptor. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.07.001>. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.30, p.10–29, 2009.

NEI, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Proc. Nat. Acad. Sei. USA**, v. 70, n. 12, Part I, p. 3321-3323, 1973.

OLIVEIRA, J. D. et al. Structure and genetic relationships between Brazilian naturalized and exotic purebred goat domestic goat (*Capra hircus*) breeds based on microsatellites. **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 356-363, 2007.

OTSUKA, F. et al. Integral Role of GDF-9 and BMP-15 in Ovarian Function. <https://doi.org/10.1002/mrd.21265>. **Mol. Reprod. Dev.** v.78, p.9–21, 2011.

PEREIRA, J.C.C. Melhoramento genético aplicado à produção animal, 5 ed., Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2008.

PEREIRA, G.L. Estado da arte do sequenciamento genômico na pecuária. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v.29, n.3, 190-199, 2013.

POLLEY, S.; DE, S.; BATABYAL, S. et al. Polymorphism of fecundity genes (BMPR1B, BMP15 and GDF9) in the Indian prolific Black Bengal goat. **ELSEVIER. Small Ruminant Research** v. 85, p. 122–129, 2009.

PURCELL S, NEALE B, TODD-BROWN K, et al. A tool set for whole-genome association and population based linkage analyses. <https://doi.org/10.1086/519795>. **Am. J. Hum. Genet.** 81(3):559–75. 2007.

PRIMO, A.T.; América: Conquista e Colonização: A Fantástica História dos conquistadores Ibéricos e Seus Animais na Era dos Descobrimentos. Edirora Movimento, Porto Alegre, 2004.

RAO, S.; NOTTER, D.R. Genetic analysis of litter size in Targhee, Suffolk and Polypay sheep. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 2113-2120, 2000.

RAJESHA, Transcriptional and translational abundance of Bone morphogenetic protein (BMP) 2, 4, 6, 7 and their receptors BMPR1A, 1B and BMPR2 in buffalo ovarian follicle and the role of BMP4 and BMP7 on estrogen production and survival of cultured granulosa cells. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.04.002>. **Research in Veterinary Science**. v. 118, p. 371–388, 2018.

RIBEIRO et al. Biodiversidad caprina iberoamericana. 1 ed. Colômbia: Universidad Cooperativa de Colombia, v. 300, p. 246, 2016.

R CORE TEAM. 2015. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing.

RIO, H.C. A cabra bravia, sua criação e perspectivas futuras. Reunião Nacional de Caprinicultura e Ovinicultura – **CAPRA**, 2015.

ROCHA L.L. et al. Impact of foreign goat breeds on the genetic structure of Brazilian indigenous goats and consequences to intra-breed genetic diversity. **Small Ruminant Research**, v. 134, p. 28–33, 2016.

RUMINANT GENOME BIOLOGY CONSORTIUM. The International Goat Genome Consortium. 2010. Disponível em :<http://www.ruminants.org/index.php?option=com_content&view=article&id=4:the-goat-champion-is&catid=5&Itemid=2>. Acesso em: 20 nov. 2018.

SALANTI, G.; AMOUNTZA, G.; NTZANI, E. Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. **European Journal of Human Genetics**, v.13, p.840-848, 2005.

SANTIAGO, G.G. et al. Genomewide association study for production and meat quality traits in Canchim beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 95, p. 3381-3390, 2017.

SANTOS, N.P.S.; SARMENTO, J.L.R.; FILHO, E.C.P. Aspectos ambientais e genéticos da prolificidade em caprinos utilizando modelos bayesianos de limiar e linear. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 885-893, 2013.

SARMENTO, J.L.R. et al. Prolificidade de caprinos mestiços no semiárido nordestino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1471-1476, 2010.

SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R.; van den Hurk, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.015>. **Theriogenology**. v. 71, p. 1193–1208, 2009.

SILVA, F.F. et al. **Genômica Aplicada à Conservação de Recursos Genéticos**. Teresina, PI, 2015.

SILVA, N.M.V. Genética molecular na seleção caprina. **Ciência Veterinária Tropical**, Recife, v. 19, n. 1, 2016.

SILVA, K.M. Vantagens e desvantagens da alta prolificidade nos rebanhos. **Embrapa Caprinos e Ovinos**. Publicado em: 13/02/2014. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/caprinos-e-ovinos/busca-de-noticias/-/noticia/1578269/vantagens-e-desvantagens-da-alta-prolificidade-nos-rebanhos>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

SIMÕES, J.; JOÃO, F.; FRANCISCO, P. Variação mensal da prolificidade em cabras da raça Serrana de diferentes ecotipos. Reunião Nacional de Caprinicultura e Ovinicultura – **CAPRA**, 2015.

SOUZA, C.J.H. et al. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRI1B) gene. **Journal of Endocrinology**. v. 169, p. 1-6, 2001.

SOUSA, C.B. et al. Genetic diversity and population structure in Portuguese goat breeds. **Livestock science**, 2011.

SHARMA, P. et al. Polymorphism of BMP4 gene in Indian goat breeds differing in prolificacy. **Gene**, v. 532, p. 140–145, 2013.

SHARMA, R. et al. Identification of novel SNPs in INHBB gene of Indian goat. **Indian Journal of Animal Sciences**. V.85 (1), p.55–59, 2015,

SHARMA, R. AHLAWAT, S; TANTIA, M. S. Novel polymorphism of AA-NAT gene in Indian goat breeds differing in reproductive traits. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, p. 377-380, 2015b.

SHARMA, A.; LEE, S.H.; LIM, D.A. Genome-wide assessment of genetic diversity and population structure of Korean native cattle breeds. **Biomed central Genetics**, 2016.

TAYA, K. et al. Role of inhibin in the regulation of FSH secretion and folliculogenesis in cows. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01532-1](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01532-1). **Animal Reproduction Science**. v. 42, p. 563-570.

TAKEZAKI, N., NEI, M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic tree from microsatellite DNA. **Genetics**, v. 144, p. 389-399, 1996.

THOMAS, N. et al. Molecular cloning, SNP detection and association analysis of 5' flanking region of the goat IGF1 gene with prolificacy. **Anim. Reprod. Sci.** v. 167, p. 8-15, 2016.

TOSSER-KLOPP, G.; BARDOU, P. CABAU, C. Design and characterization of a 52k SNP chip for goats. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086227>. **Journal PLOS**, 2014.

TU, Y.R. et al. Sheep and Goat Breeds in China. **Shanghai Scientific e Technical Publishers**, Shanghai, p. 1–25, 1989.

van Son, M. et al. Genome-wide association study confirm major QTL for backfat fatty acid composition on SSC14 in Duroc pigs. **BMC Genom**, v. 18, p. 369, 2017.

Visser, C. et al. Genetic diversity and Population Structure in South African, French and Argentinian Angora Goats from Genome-Wide SNP Data. **Plos One**, 12, 1-15, 2016.

WADE, C.M. et al. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. **Science**, v.326, n.5954, p.865-867, 2009.

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

WANG, K. et al. A novel indel within goat casein alpha S1 gene is significantly associated with litter size. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.05.119>. **Gene**. v. 671, p. 161-169, 2018.

WANG, Z. et al. Impact of selection for residual feed intake on breeding soundness and reproductive performance of bulls on pasture-based multi-sire mating. **J. Anim. Sci.**, 2012.

- WANG, P.Q. et al. Polymorphisms of the cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART) gene and their association with reproductive traits in Chinese goats. <https://doi.org/10.4238/vol10-2gmr1091>. **Genet. Mol. Res.** v. 10(2), p. 731-738, 2011.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. <https://doi.org/10.1111/j.15585646.1984.tb05657.x>. **Evolution** 38:1358-1370. 1984.
- YANG, W. et al. Polymorphism of the GnRHR gene and its association with litter size in Boer goats. **South Afr. J. Anim. Sci.** v. 41, p. 338-402, 2011.
- YEH, F.C.; YANG, R.; Boyle, T. POPGENE. Version 1.3.1. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada. 1999.
- ZHANG, C. et al. Genetic and phenotypic parameter estimates for reproduction trait in the Boer dam. **Livestock Production Sci.**, v.125, p. 60-65, 2009.
- ZHANG, Q.D. et al. Diversity and population structure of a dominant deciduous tree based on morphological and genetic data. **ABD plants**, 2015.

ANEXOS

ANEXO 1
ARTIGO 1

Título: Advances in molecular genetics techniques applied in selection for litter size in goats (*Capra hircus*): A review

Periódico: Journal of Applied Animal Research

Qualis B2 de acordo com a Classificação de Periódicos Quadriênio 2013-2016.



Angelina Fraga <angelina.fraga@gmail.com>

Journal of Applied Animal Research - Manuscript ID JAAR-2018-0248.R1 has been submitted online

1 mensagem

Journal of Applied Animal Research <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

4 de dezembro de 2018 19:23

Responder a: TAAR-peerreview@journals.tandf.co.uk

Para: lugomeslima.zootecnista@gmail.com, bia_namibia14@hotmail.com, raisa.rios@hotmail.com, breno_melo13@hotmail.com, laysthayse.as@gmail.com, kleibe.silva@embrapa.br, twmurph88@gmail.com, angelina.fraga@gmail.com

04-Dec-2018

Dear Professor Fraga:

Your manuscript entitled "Advances in molecular genetics techniques applied in selection for litter size in goats (<i>Capra hircus</i>): a review" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Applied Animal Research.

Your manuscript ID is JAAR-2018-0248.R1.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/aar> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/aar>.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Applied Animal Research.

Sincerely,
Alyanna Ellazar
Journal of Applied Animal Research Editorial Office

Ativar o
Acesso Cor

Advances in molecular genetics techniques applied in selection for litter size in goats (*Capra hircus*): a review

Journal:	<i>Journal of Applied Animal Research</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Review
Keywords:	Capra hircus, prolificacy, molecular markers, SNP, genome wide

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review Only

Advances in molecular genetics techniques applied in selection for litter size in goats (*Capra hircus*): a review

Luciano Gomes de Lima^a, Namíbia Oliveira Balbino de Souza^b, Raisa Rodrigues Rios^a, Breno de Araújo Melo^a, Lays Thayse Alves dos Santos^b, Kleibe de Moraes Silva^c, Thomas Wayne Murphy^d, Angelina Bossi Fraga^{f,*}

Agrarian Science Center, Federal University of Alagoas, Rio Largo, 57.100-000, Brazil.

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001" and Education Personnel and Research Amparo Foundation of Alagoas State – FAPEAL/Brazil.

*Corresponding author: Professor Angelina Bossi Fraga from the Agrarian Science Center of the Federal University of Alagoas, Rio Largo, 57.100-000, Brazil, Tel. +55-8299341-3092, E-mail address: angelina.fraga@gmail.com, ORCID: 0000-0001-6557-3000

^aDoctoral student in Biotechnology in the Northeastern Network in Biotechnology (known as RENORBIO in Portuguese) at the Federal University of Alagoas, Maceió, 57.010-000, Brazil, Tel. +55-82988499538, E-mail address: lugomeslima.zootecnista@gmail.com

^bMaster student in Animal Science of the Graduation Program from the Agrarian Science Center of the Federal University of Alagoas, Rio Largo, 57.100-000, Brazil, Tel. +55-82 987119165, E-mail address: bia_namibia14@hotmail.com

^cResearch Scientist Brazilian Agricultural Research Corporation - Goats and Sheep, Sobral, 62.010-970, Brazil

^dAssistant Professor of Sheep Production, Department of Animal and Range Sciences, Montana State University, Bozeman 59717, U.S.A

Abstract. Litter size, or prolificacy, in goats is defined as the number of kids born per doe kidding. Improving litter size through selection not only directly enhances producer profitability as more progeny can be marketed but can also increase genetic gains in other traits due to greater selection intensity. However, most traits associated with reproduction have a low heritability and genetic improvement will be slow if selection is based on one or few phenotypic records. In the absence of a genetic evaluation program with extensive pedigrees and performance recording, phenotypic selection for litter size is not promising. Advances in molecular genetics techniques may serve as an alternative to increase genetic progress in prolificacy. Several techniques have been developed to elucidate the mechanisms involved in phenotypic expression on a DNA level. Although recent research has identified genomic regions associated with several production traits in goats, litter size has not been extensively researched. Nevertheless, recent advancements in molecular genetic techniques has created new opportunities for the improvement of litter size in goats. The development of next generation molecular tools to identify genomic genetic variate has become possible to apply the whole-genome scanning technique, genome-wide association study (GWAS) and genomic selection to improve goat prolificacy.

Keywords: *Capra hircus*; prolificacy; genome-wide; Single Nucleotide Polymorphisms; molecular markers

1. Introduction

World goat population has 1.06 billion head having a strategic position in agribusiness scenario and social programs almost around the world. This livestock sector represents an

important source of protein, combating poverty and food insecurity mainly in the countries that hold the largest herds of goats, Asian (58.5%) and Africa (34.5%), FAO (2017).

Although, dairy goats are concentrated in low-income, food deficit countries, where their products are a key food source, they are also present in high-income, technologically developed countries (Pulina et al. 2018). The Mediterranean area is the main goat milk and goat cheese producer (18%) outside of India (22%), which has the greatest goat milk volume of all countries, (Dubeuf et al. 2004). France, Greece, Italy, and Spain are countries that stand out in dairy goat worldview and lead the international market for goat dairy products. These countries have productive models based on the use of specific breeds and “Protected Denomination of Origin” cheeses produced according to traditional recipes and currently appreciated as ingredients of healthy diets. The current production situation shows substantial room for improvement, and relevant increases in milk production (from 30 to 50%) are expected by 2030 (Pulina et al. 2018).

Despite its growth and the recognized socioeconomic value, most of goats rearing in the world presents low productivity indexes due to the low reproductive and productive performance of animals (Devendra 2013). Improvement of reproductive performance in livestock species increases the number of available offspring and total farm revenue. According to Ahlawat et al. (2015a), improving reproductive rate of low producing goat breeds could potentially overcome the gap between demand and production of meat. Thus, prolificacy deserves special attention for selection programs because it can lead to improved profitability. This trait refers to the average number of kids born per doe kidding and has a positive impact on total animals marketed and replacement rate. In general, small ruminants have a greater frequency of multiple births than other domestic livestock species (Hafez and Hafez 2011). Past research has shown that the average litter size in goats is greater than 1, varying from 1.30 to 2.37, Table 1. This characteristic of goats constitutes an excellent

opportunity to increase the income of the productive system by increasing the number of progenies per reproductive cycle.

Due to its variability, which depends on genetic (Hamed et al. 2009) and non-genetic effects (Sarmiento et al. 2010; Haldar et al. 2014), selection for litter size is feasible. Improving litter size in goats also increases the number of animals available for replacements and consequently increases selection intensity. Therefore, improving litter size can also increase annual genetic progress in other economically important goat traits (Sarmiento et al. 2010; Santos et al. 2013). However, the improvement of reproductive traits by traditional selective breeding methods has proven to be difficult due to their sex limited nature and low heritability, which varies from 0.08 to 0.18 (Hamed et al. 2009; Gunia et al. 2010; Santos et al. 2013; Menezes et al. 2016). While rapid rates of genetic progress for growth-related or milk traits have been achieved in small ruminants, a relatively lower rate of progress is possible for traits that are measured later in the life of females, such as reproductive ability (Mrode et al., 2018).

Molecular genetic techniques are promising because they have the ability to analyze genetic variability on the DNA level by detecting causal genes for reproductive characteristics (Ahlawat et al. 2015a). These technologies have progressed rapidly in recent years and have been successfully adapted to animal selection methods. They are used to identify loci responsible for genetic variation in quantitative traits. Major genes have a pronounced phenotype expression and they can be identified from candidate gene studies or genome-wide association study (GWAS). The candidate approach quantifies the association between a trait's phenotypic variation and one or more genes.

Genomic scanning is based on genotyping the whole genome with markers scattered throughout. The association between the marker alleles and the trait phenotypic variation have been established. According to Georges (1999), fine-mapping methods are being devised to

refine the initial map positions of the quantitative trait loci to the point required for marker assisted selection. Marker Assisted Selection (MAS) uses genetic markers which are applied jointly with traditional selection methods to obtain more accurate predictions of genetic merit.

Advances in molecular biology has become possible the discovery of unprecedented levels of genomic variation, and consequently, the development of various single nucleotide polymorphisms (SNPs) chips for genotyping purposes. As a result of these advanced, the molecular information has been incorporated in small ruminants breeding programmes in developed countries to accelerate the rate of genetic progress, Mrode et al. (2018). One of the first studies that utilized the 50K SNP Beadchip in dairy goats revealed many genomic regions associated with economically important traits such as protein and fat yield, Maroteau et al. (2013).

In addition, other approaches have been developed aiming to accelerate genetic progress in goat breeding, such as genomic selection (Mucha et al. 2015; Mucha et al., 2017) and signatures of selection (Brito et al., 2017). This review aims to present some advances of molecular-based methods applied to improvement of litter size in goats.

2. Dense maps of Single Nucleotide Polymorphisms and validation studies

Early research used Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) markers associated with economically important traits of domestic animals. Later, the discovery of the Simple Sequence Repeats (SSR) and development of DNA sequencers made the detection of allelic variations possible. After that, Single Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping decreased the cost and increased the accuracy of discovery. The SNPs markers are based on changes in nitrogenous single chain bases (Adenine, Cytosine, Thymine and Guanine). After identifying the genomes of economically important livestock species and the mapping their

haplotypes, technologies were developed for the mass genotyping of hundreds of thousands of SNPs markers (Caetano 2009).

These advances in molecular genetic techniques provide the development of dense SNP and high-throughput sequencing. Although microsatellite markers have greater polymorphism on a per-marker basis, they are not as abundant as SNPs because they lack sufficient coverage across the genome and have limited automation options (Vignal et al. 2002). Research that investigated genes with a greater effect on the mechanisms involved in goat prolificacy (Ahlawat et al. 2016; Thomas et al. 2016; Ariyaratne et al. 2017) obtained limited results due to narrow approaches because they did not have enough coverage and not had a lot of automation options.

Therefore, the use of SNP genotyping through high-processing platforms allows the generation of information in a single test of millions of base pairs, making this process more advantageous in terms of cost per base and time savings when compared to other marker classes. These techniques have favored studies of association and genetic mapping, genomic selection, diagnostic tests for confirming paternity and individual identification.

The sequencing of the goat genome by Dong et al. (2013) was a significant advancement of molecular genetics in this field. The GoatSNP50 Beadchip's development is an example of this advancement. It has 53,347 equally spaced SNPs and segregates with high to moderate frequency in the Alpine, Boer, Crioulo, Katjang, Saanen and Savana breeds (Tosser-Klopp et al. 2014). This high-processing platform was developed by the International Goat Genome Consortium (IGGC) and gives support to Genome Wide Association Studies (GWAS), prediction of Genomic Breeding Values (GBV), and the incorporation of this information in goat selection programs.

During the development of the genotyping array, only six goat breeds (Alpine, Boer, Crioula, Katjang, Saanen and Savana) were included. Hence, it is necessary to apply

validation studies to different breeds. For instance, Lashmar et al. (2015) validated the use of the GoatSNP50 Beadchip in South African Angora goats, which were explored for fiber production. These authors concluded that 46,983 SNPs (88.1%) of the 53,347 available SNPs were polymorphic ($MAF > 0.05$). After quality control, 3,960 SNPs were filtered for further analysis for violation of Hardy-Weinberg and for call-rate parameter thresholds, leaving 43,759 (82%) to be validated for downstream analysis. Similarly, Moura et al. (2015) showed that the GoatSNP50 Beadchip was effective for the Marota goat, a Brazilian native breed. These authors showed that after quality control, 8,578 SNPs (16.08%) were filtered, leaving 44 769 (83.92%) to be validated for downstream analysis.

3. Major genes for goat prolificacy

The most common methods used to identify genetic markers are candidate genes and genomic scanning. Loci with moderate to large effects on the expression of a quantitative traits are called Quantitative Trait Loci (QTL, Geldermann 1975). The candidate gene approach characterizes the relationship between a sequenced gene of known biological action and the development or physiology of a given trait (Rothschild and Soller 1997). Many regions of the goat genome that are associated with economically important traits were detected after the development of a dense microsatellite linkage map for *Capra hircus* (Vaiman et al. 1996) and linear regression methods to detect QTL in relatives (Koning et al. 1998). Marrube et al. (2007) used microsatellite markers to detect chromosome segments associated with conformation traits in Angora goats. Both Marrube et al. (2007) as well as Caño et al. (2009) also utilized microsatellite markers and found QTLs affecting Angora fleece traits. The segregation of QTL influencing mohair production and preweaning growth traits in South African Angora goats was investigated by Visser et al. (2011, 2013), respectively.

More recently, major genes have also been identified from GWAS using the 50K SNP chip. With the decrease of sequencing and genotyping costs, and the increase of genomic studies in small ruminants, it is expected that many more major genes and causal mutations will be available in the near future (Rupp et al. 2016). GWAS is a technique that uses high density markers located throughout the genome to identify regions associated with a trait, without prior knowledge of mutations responsible for the variation in phenotype. The markers for this type of genomic analysis are SNPs because they allow ease of genotyping on high-definition platforms, although they have a high mutation rate and Mendelian inheritance (Guimarães et al., 2013).

Genome-wide association studies are based on the assumption that a causative mutation for a given phenotype is in linkage disequilibrium (LD) with adjacent markers in the various families of a population. This LD remains even after several generations of genome crosses and recombination, allowing for the use of these markers in a wide scan of the genome, regardless of the design of segregating families. In order to capture all the chromosomal sequences in weak LD with small effects, a high-density map is necessary. The gains of reliability provided by molecular information are lower in sheep and goats than for cattle, which is probably due to rate lower linkage disequilibrium (LD) in small ruminants. This can be resulted from higher effective population size and inclusion of crossbreds in sheep and goats during data analysis. Lower LD indicate that, for some breeds, the addition of new genotypes is mandatory and that a denser SNP panel than the current 50K Beadchip could be beneficial (Rupp et al., 2016).

Several studies of GWAS have already been carried out on some species of domestic animals, such as dairy cattle (Ismail et al. 2017), beef cattle (Santiago et al. 2017), swine (Van Son et al. 2017) and sheep (Berton et al. 2017). Currently, there are already some researches that apply GWAS approaches in goats. For instance, Martin et al. (2016) conducted a GWAS

in French Alpine and Saanen goats using logistic polygenic models and estimated genetic parameters of the presence of supernumerary teats, and Martin et al. (2017) identified two new mutations in *Dgat1* associated with reduced milk fat content. Mucha et al. (2017) investigated the SNPs associated with milk yield and udder, teat, feet, and leg in crossbred dairy goats.

Litter size trait is complex quantitative trait that involves multiple genes and loci incorporating environmental factors, maternal effects such as maternal age, intrauterine environment and others. So, identification of the whole candidate genes and loci associated with prolificacy becomes a challenge of modern genetics. Due to the multiple contribution of genes in the complex quantitative litter size trait, previous studies concentrated on the association of one or few number genotype polymorphism(s) in reproductive related genes such as *KISS*, *GDF9*, *POU1F1* and others may not lead to obvious improvement. High throughput screening for multiple genotype polymorphism combination become more and more important. However, due to the limitation of costing and experimental design, further verification of the newly found variations in large group is necessary Lai et al. (2016).

Several genomic regions with major effects have been associated with litter size in goat using different methods, such as PCR, RFLP, SSR and whole-genome scanning, Table 2.

Currently, whole-genome sequencing and GWAS are used to explore genetic variants strongly associated with production traits. However, numerous potential genes identified by GWAS have not been fully verified. To address this problem, methods which combine GWAS analysis results and MAS to screen for critical genetic variations (Martin et al., 2017) in large livestock populations have been developed, Cui et al. (2018).

Besides the mentioned approaches, Miao et al. (2016) used the RNA-Seq technology to perform genome-wide sequencing of the mRNAs prepared from the ovaries of the Jining Grey goat (high prolificacy) and Laiwu Black goat (lower prolificacy). These authors

predicted 3493 candidates as new genes, and 742 genes were differentially expressed between these two goats. A functional annotation of these genes identified various biological functions and signaling pathways that hold clues as to which genes might be involved in regulating goat fecundity and prolificacy.

4. Genomic Selection on prolificacy in goats

Reproduction traits generally have low heritability and do not exhibit large responses to phenotypic selection. Therefore, inclusion of genetic information of the genes associated with reproductive ability could enhance selection response. In this sense, genomic best linear unbiased predictions (GBLUP) of breeding values can be promising tools for genetic improvement of goat reproductive performance.

Regarding the litter size of goats, selection programs have generally considered only the phenotypic and pedigree information of the animals (Shrestha and Fahmy 2007; Mohammadi et al. 2012; Castañeda-Bustos et al. 2014; Zhou et al. 2014). Due to the low heritability for litter size (0.08 to 0.18), its rate of genetic improvement is slow (Hamed et al. 2009; Gunia et al. 2010; Santos et al. 2013; Menezes et al. 2016). Therefore, the inclusion of genomic information in the genetic evaluation of prolificacy in goats would greatly increase the accuracy of selection. According to Amills et al. (2017), the implementation of these new molecular technologies, such as whole-genome sequencing and genome-wide genotyping, allows for exploration of caprine diversity at an unprecedented scale, thus providing new insights into the evolutionary history of goats. Genomic selection and genome editing can also be applied to the improvement of traits that cannot be modified easily by traditional selection.

In traditional methods of genetic evaluation, breeding values are predicted using only pedigree information, and this results in lower accuracy. On the other hands, genomic evaluation methods can substantially improve the accuracies of GBV estimation when applied

to small ruminants and therefore accelerate response to selection. The basic building blocks for conventional breeding programs for small ruminants in most developing countries are lacking. So, genomic information can help overcome some of the limitations through parent verification using the genomic matrix for estimations of GBV (Mrode et al. 2018).

Indeed, the accuracy of methods that use only phenotypes of the genotyped animals and ignore records of the non-genotyped part of the population (e.g., GBLUP and BLUP-SNP) is limited when the reference population is small, Rupp et al. (2016). Therefore, a single-step approach is the recommended method for such small reference populations. Single-step combine all of available phenotypic, pedigree, and genomic information in a single-step procedure to calculate genomic breeding values (Legarra et al., 2009) avoiding bias in the estimation of GBV due to the preselection of candidates (Rupp et al., 2016).

Using Illumina 50K caprine chip, Mucha et al. (2015) estimated GBV for milk production in crossbreed dairy goats genotyped. They compared two methods for estimation of GBV, BLUP at the single nucleotide polymorphism level (BLUP-SNP) and single-step BLUP. Results showed that single-step approach had higher accuracy of GBV in comparison with BLUP-SNP. In a genetic evaluation study in Spanish goats, Molina et al. (2018) related that the correlation between A (pedigree relationship matrix) and G (genomic relationship matrix) was 0.826, and the correlation between BV and GBV was 0.989. These authors, showed an increase of 1.06% in the average reliability of estimates in the Single Step Genomic BLUP compared to the traditional BLUP evaluation.

5. Future Perspectives

The advancement of molecular genetic techniques has made significant contributions to the progress of animal selection. Whole-genome scanning and genome-wide association

study have shown greater accuracy in identification of major gene related with litter size in goats.

The use of genomic matrix in the estimation of the GBV contribute strongly to accelerate the genetic gain by selection. These approaching can promote great impact for litter size of goats, because they offer quick wins in relationship verification. This can help overcome problem of pedigree inconsistence, once in general, most of small ruminant flock has weak genetic connection due to it unsuitable pedigree. So, GBV prediction provides a greater accuracy in goat litter size selection. This not only results in a greater number of progenies, but also allows higher selection intensity for all other traits considered in a selection program.

Evidence has shown that the use of genomic information in selecting for goat litter size creates the opportunity to increase genetic gains. However, these technologies are underutilized in goats and more multidisciplinary research in this area must be carried out.

References

- Aerts JMJ, Bols PEJ. 2010. Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Futures Prospects. *Reprod. Domest. Anim.* 45:180-187.
- Ahlawat S, Sharma R, Maitra A, 2012. Analysis of coding DNA sequence of GDF9 gene in Indian goats for prolificacy associated markers. *Indian J Anim Sci.* 82:721-725.
- Ahlawat S, Sharma R, Maitra A, Tantia MS. 2015a. Current status of molecular genetics research of goat fecundity. *Small Rumin Res.* 125:34–42.
- Ahlawat S, Sharma R, Maitra A, Raja KN, Verma NK, Tantia MS. 2015b. Prolificacy in

- Indian goat breeds is independent of FecB mutation. *Indian J Anim Sci.* 85:617-620.
- Ahlawat S, Sharma R, Maitra A, Borana K, Tandia MS, Prakash V. 2015c. Association analysis of a novel SNP in GPR54 gene with reproductive traits in Indian goats. *Indian J. Dairy Sci.* 68(1):39-44.
- Ahlawat S, Sharma R, Roy M, Mandakmale S, Prakash V, Tandia MS. 2016. Genotyping of novel SNP in BMPR1B, BMP15, and GDF9 genes for association with prolificacy in seven Indian goat breeds. *Anim Biotechnol.* 27:199-207.
- Amills M, Capote J, Tosser-Klopp G. 2017. Goat domestication and breeding: a jigsaw of historical, biological and molecular data with missing pieces. *Anim Genet.* 48:631–644.
- An XP, Hou JX, Gao TY, Lei YN, Song YX, Wang JG, Cao BY. 2015. Association analysis between variants in KITLG gene and litter size in goats. *Gene.* 558: 126-130.
- Ariyaratne HBPC, Ariyaratne HBS, Lokugalappatti LGS. 2017. Single nucleotide polymorphism of candidate genes in non-descript local goats of Sri Lanka. *Livest Sci.* 196:49-54.
- Bemji MN, Isa AM, Ibeagha-Awemu EM, Wheto M. 2018. Polymorphisms of caprine GnRHR gene and their association with litter size in West African Dwarf goats. *Mol Biol Rep.* 45:63–69.
- Berton MP, De Oliveira Silva RM, Peripolli E, Stafuzza NB, Martin JF, Álvarez MS, Gavinã BV, Toro MA, Banchemo G, Oliveira PS, et al. 2017. Genomic regions and pathways associated with gastrointestinal parasites resistance in Santa Inês breed adapted to tropical climate. *J Anim Sci Biotechnol.* 8:73.

- Boone EM, Hawks BW, Li W, Garlow SJ. 2008. Genetic regulation of hypothalamic cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART) in BxD inbred mice. *Brain Res.* 1194:1-7.
- Brito LF, Kijas J W, Ventura RV, Sargolzaei M, Porto-Neto Laercio, Cánovas A, Feng Z, Jafarikia M, Schenkel F. 2017. Genetic diversity and signatures of selection in various goat breeds revealed by genome-wide SNP markers. *BMC Genomics.* 18:1-20.
- Caetano AR. 2009. SNPs markers : basic concepts, applications in animal breeding and management and perspectives for the future I. *Rev Bras Zootec.* 38:64-71.
- Caño EM, Daverio S, Cáceres M, Debenedetti S, Costoya S, Abad M, Allain D, Taddeo H, Poli MA. 2009. Detection of qtl affecting fleece traits on chi 19 in angora goats. *Trop Subtrop Agroecosyst.* 11:189-191.
- Cardoso RC, Barbosa LP, Souza RS, França CS, Ribeiro Junior MDM, Santana ALA, Jesus RDL, Santos RS. 2018. Application of hormonal subdoses at acupoint Hou Hai in estrus synchronization protocols of goats. *Semin-Cienc Agrar.* 39:1135-1142.
- Castañeda-Bustos VJ, Montaldo HH, Torres-Hernández G, Pérez-Elizalde S, Valencia-Posadas M, Hernández-Mendo O, Shepard L. 2014. Estimation of genetic parameters for productive life, reproduction, and milk-production traits in US dairy goats. *J Dairy Sci.* 97:2462-2473.
- Celestino JJH, Bruno JB, Lima-Verde IB, Matos MHT, Saraiva MV, Chaves RN, Martins FS, Almeida AP, Cunha RMS, Lima LF, Name KPO, Campello CC, Silva JRV, Bão SN, Figueiredo JR. 2010. Steady-state level of kit ligand mRNA in goat ovaries and the role of kit ligand in preantral follicle survival and growth in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 77:231-240.

- Chu MX, Wen XJ, Ran D, Wei LX, Li F, Hui MY, Kui L. 2009. Polymorphism of gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR) gene and its relationship with prolificacy of lining grey goat. *J Agric Biotechnol.* 17:218-223.
- Chu MX, Wu ZH, Feng T, Cao GL, Fang L, Di R, Huang DW, Li XW, Li N. 2011. Polymorphism of GDF9 gene and its association with litter size in goats. *Vet Res Commun.* 35:329–336.
- Cui Y, Yan H, Wang K, Xu H, Zhang X, Zhu H, Liu J, Qu L, Lan X, Pan C. 2018. Insertion/Deletion Within the KDM6A Gene Is Significantly Associated with Litter Size in Goat. *Front. Genet.* 9:1-11.
- Devendra C. 2013. Investments on pro-poor development projects on goats: Ensuring success for improved livelihoods. *Asian-Australas. J Anim Sci.* 26:1-18.
- Dong Y, Xie M, Jiang Y, Xiao N, Du X, Zhang W, Tosser-Klopp G, Wang J, Yang S, Liang J, et al. 2013. Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). *Nat Biotechnol.* 31:135-141.
- Dubeuf JP, Morand-Fehr P, Rubino R. Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Ruminant Res.* 51:165-173.
- Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA. 2006. Minireview: Kisspeptin Neurons as Central Processors in the Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion. *Endocrinology.* 147:1154-1158.
- FAO. 2017. World Agriculture: Towards 2015-2030. A FAO Perspective; [accessed 27 April 2018]. <http://www.fao.org/docrep/005/y4252e/y4252e07a.htm#TopOfPage>.

- Feng T, Geng CX, Lang XZ, Chu MX, Cao GL, Di R, Fang L, Chen HQ, Liu XL, Li N. 2011. Polymorphisms of caprine GDF9 gene and their association with litter size in Jining Grey goats. *Mol Biol Rep.* 38:5189-5197.
- Geldermann H. 1975. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. *Theor Appl Genet.* 46:319-330.
- George JW, Dille EA, Heckert LL. 2011. Current Concepts of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene Regulation. *Biol. Reprod.* 84:7–17.
- Georges M. 1999. Towards marker assisted selection in livestock. *Reprod. Nutr Dev.* 39:555-561.
- Gonçalves AL, Lana RP, Vieira RAM, Henrique DS, Mancio AB, Pereira JC. 2008. Avaliação de sistemas de produção de caprinos leiteiros na Região Sudeste do Brasil. *Braz J Anim Sci.* 37:366-376.
- Guimarães SEF, Lopes PS, Guimarães JD, Nascimento CS, Pinho RO. 2013. Biotechnology Applied to the Improvement of Pigs. 10th Brazilian Symposium on Animal Breeding. Aug 18-23; Uberaba, Brazil.
- Guo X, Li Y, Chu MX, Feng C, Di R, Liu Q, Feng T, Cao G, Huang D, Fang L, Tang Q, Ma Y, Li K. 2013. Polymorphism of 5' regulatory region of caprine FSHR gene and its association with litter size in Jining Grey goat. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 37:497-503.
- Gunia M, Mandonnet N, Alexandre G, Naves M, Phocas F. 2010. Genetic parameters of litter size in Creole goats and their implication for a breeding programme including adaptation traits: *Advances in Anim. Biosci.* 1:402-403.

- Hafez B, Hafez ESE. 2011. *Reprod Anim.*, 7nd ed. Manole (SP).
- Haldar A, Pal P, Datta M, Paul R, Saumen K, Pal Majumdar D, Biswas CK, Pan S. 2014. Prolificacy and its relationship with age, body weight, parity, previous litter size and body linear type traits in meat-type goats. *Asian-Australas. J Anim Sci.* 27:628-634.
- Hamed A, Mabrouk MM, Shaat I, BATA S. 2009. Estimation of Genetic Parameters and Some Non- Genetic Factors for Litter Size at Birth and Weaning and Milk Yield Traits in Zaraibi Goats. *Egyptian J Sheep Goat Sci.* 4:55-64.
- Heikal HSM, Naby WSHAE. 2017. Genetic Improvement of Litter Size in Four Goat Breeds in Egypt Using Polymorphism in Bone Morphogenetic Protein 15 Gene. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 5:410-415.
- Ismail MKA, Brito LF, Miller SP, Sargolzaei M, Grossi DA, Moore SS, Plastow G, Stothard P, Nayeri S, Schenkel FS. 2017. Genome wide association studies and genomic prediction of breeding values for calving performance and body conformation traits in Holstein cattle. *Genet Sel Evol.* 49:82.
- Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, O'Connell AR, Laitinen MPE, Cranfield M, Groome N, Ritvos O, McNatty KP. 2002. Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 Are Essential for Ovarian Follicular Development in Sheep. *Biol. Reprod.* 67:1777-1789.
- Koning D, Visscher P, Knott SA, Haley CS. 1998. A strategy for QTL detection in half-sib populations. *Anim Sci.* 67:257-268.
- Lashmar S, Visser C, Marle-Koster EV. 2015. Validation of the 50k Illumina goat SNP chip in the South African Angora goat. *S. Afr. J Anim Sci.* 45:56-59.

- Lai FN, Zhai HL, Cheng M, Ma JY, Cheng SF, Ge W, Zhang GL, Wang JJ, Zhang RQ, W X, Min LJ, Song jz, Shen W. 2016. Whole-genome scanning for the litter size trait associated genes and SNPs under selection in dairy goat (*Capra hircus*). *Sci. Rep.* 6:1-12.
- Leal G, Sampaio D, Bessegato L. 2018. Avaliação Econômico-Financeira de Produção de Leite Caprino da Zona da Mata Mineira. *Revista Vianna Sapiens.* 9:91-114.
- Legarra A, Aguilar I, Misztal I. 2009. A relationship matrix including full pedigree and genomic information. *J. Dairy Sci.* 92:4656–4663.
- Li G, An XP, Fu MZ, Hou JX, Sun RP, Zhu GQ, Wang JG, Cao BY. 2011. Polymorphism of PRLR and LH β genes by SSCP marker and their association with litter size in Boer goats. *Livest. Sci.* 136:281-286.
- Long Y, Zhong H, Liu S, Tao M, Chen L, Xiao J, Liu Y. 2009. Molecular characterization and genetic analysis of Gnrh2 and Gth β in different ploidy level fishes. *Prog. Nat. Sci.* 19:1569-1579.
- Maekawa R, Lee L, Okada M, Assada H, Shinagawa M, Tamura I, Sato S, Tamura H, Sugino N. 2016. Changes in gene expression of histone modification enzymes in rat granulosa cells undergoing luteinization during ovulation. *J Ovarian Res.* 9:1-9.
- Maitra A, Sharma R, Ahlawat S, Tantia MS, Manoranja R, Prakash V. 2014. Association analysis of polymorphisms in caprine KiSS1 genewith reproductive traits. *Anim Reprod Sci.* 151:71-77.
- Maroteau C, Palhière I, Larroque H, Clément V, Tosser-Klopp G, Rupp R. 2013. QTL detection for traits of interest for the dairy goat industry. 64th Annual Meeting of the Europe Federation of Animal Science. Nantes, France.

- Marrube G, Cano EM, Roldán DL, Bidinost F, Abad M, Allain D, Vaiman D, Taddeo H, Poli MA. 2007. QTL affecting conformation traits in Angora goats. *Small Rumin Res.* 71:255-263.
- Martin P, Palhière I, Tosser-Klopp G, Rupp R. 2016. Heritability and genome-wide association mapping for supernumerary teats in French Alpine and Saanen dairy goats. *J Dairy Sci.* 99:8891-8900.
- Martin P, Palhière I, Maroteau C, Bardou P, Canale-Tabet K, Sarry J, Woloszyn F, Bertrand-Miche, J, Racke I, Besir H, et al. 2017. A genome scan for milk production traits in dairy goats reveals two new mutations in *Dgat1* reducing milk fat content. *Sci Rep.* 7:1872.
- Mekuriaw G, Mwacharo JM, Dessie T, Mwai O, Djikeng A, Osama S, Gebreyesus G, Kidane A, Abegaz S, Tesfaye K. 2017. Polymorphism analysis of kisspeptin (*KISS1*) gene and its association with litter size in Ethiopian indigenous goat populations. *Afr. J. Biotechnol.* 16:1254-1264.
- Menezes LM, Sousa WH, Cavalcanti-Filho EP, Gama LT. 2016. Genetic parameters for reproduction and growth traits in Boer goats in Brazil. *Small Rumin. Res.* 136:247-256.
- Miao X, Luo Q, Qin X. 2016. Genome-wide transcriptome analysis in the ovaries of two goats identifies differentially expressed genes related to fecundity. *Gene.* 582:69-76.
- Mohammadi H, Shahreabak M. 2012. Genetic parameter estimates for growth traits and prolificacy in Raeini Cashmere goats. *Trop Anim Health Prod.* 44:1213-1220.
- Molina A, Muñoz E, Díaz C, Menéndez-Buxadera A, Ramón M, Sánchez M, Carabaño MJ, Serradilla JM. 2018. Goat genomic selection: Impact of the integration of genomic information in the genetic evaluations of the Spanish Florida goats. *Small Rumin. Res.*

163:72-75.

- Moura JO, Campelo JE, Bajay MM, Costa MS, Cavalcante DH, Araújo AM. 2015. Diversidade genética em caprinos localmente adaptados no Brasil utilizando o beadchip 50K. *Actas Iberoam Conserv Anim.* 6:92-97.
- Mrode R, Tarekegn GM, Mwacharo JM, Djikeng A. 2018. Invited review: Genomic selection for small ruminants in developed countries: how applicable for the rest of the world? *Animal.* 12:1333-1340.
- Mucha S, Mrode R, MacLaren-Lee I, Coffey M, Conington J. 2015. Estimation of genomic breeding values for milk yield in UK dairy goats. *J Dairy Sci.* 98:8201-8208.
- Mucha S, Mrode R, Coffey M, Kizilaslan M, Desire S, Conington J. 2017. Genome-wide association study of conformation and milk yield in mixed-breed dairy goats. *J Dairy Sci.* 101:2213-2225.
- Naor Z. 2009. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): Studies on the GnRH receptor. *Front. Neuroendocrin.* 30:10-29.
- Otsuka F, McTavish KJ, Shimasaki S. 2011. Integral Role of GDF-9 and BMP-15 in Ovarian Function. *Mol. Reprod. Dev.* 78:9-21.
- Pulina G, Milán MJ, Lavín MP, Theodoridis A, Morin E, Capote J, Thomas DL, Francesconi AHD, Caja G. 2018. Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *J. Dairy Sci.* 101:6715–6729.
- Rajasha G, Mishra SR, Paul A, Punetha M, Vidyalakshmi GM, Narayanan K, Bag S, Bhure SK, Singh Chouhan V, Maurya VP, Singh G, Sarkar M. 2018. Transcriptional and

- translational abundance of Bone morphogenetic protein (BMP) 2, 4, 6, 7 and their receptors BMPR1A, 1B and BMPR2 in buffalo ovarian follicle and the role of BMP4 and BMP7 on estrogen production and survival of cultured granulosa cells. *Res. Vet. Sci.* 118:371-388.
- Rothschild MF, Soller M. 1997. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. *Probe.* 8:13-20.
- Rupp R, Mucha S, Lorroque H, McEwan J, Conington J. 2016. Genomic application in sheep and goat breeding. *Animal Frontiers.* 6:39-44.
- Santiago GG, Siqueira F, Cardoso FF, Regitano LCA, Ventura R, Sollero BP, Souza MD, Mokry FB, Ferreira ABR., Torres RAA. 2017. Genomewide association study for production and meat quality traits in Canchim beef cattle. *J Anim Sci.* 95:3381-3390.
- Santos NPS, Sarmiento JLR, Pimenta Filho EC, Campelo JEG, Figueiredo Filho LAS, Sousa SC Jr. 2013. Aspectos ambientais e genéticos da prolificidade em caprinos utilizando modelos bayesianos de limiar e linear. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 65:885-893.
- Sarmiento JLR, Filho P, Abreu EC, Ribeiro MN, Sousa JER. 2010. Prolificidade de caprinos mestiços leiteiros no semiárido nordestino. *R Bras Zootec.* 39:1471-1476.
- Sharma R, Ahlawat S, Maitra A, Roy M, Mandakmale S, Tantia MS. 2013. Polymorphism of BMP4 gene in Indian goat breeds differing in prolificacy. *Gene.* 532:140-145.
- Sharma R, Maitra A, Ahlawat S, Roy M, Mandakmale S, Tantia MS. 2015a. Identification of novel SNPs in INHBB gene of Indian goat. *Indian J. Anim. Sci.* 85:55-59.
- Sharma R, Ahlawat S, Tantia MS. 2015b. Novel polymorphism of AA-NAT gene in Indian

- goat breeds differing in reproductive traits. *Iran. J. Veterinary Re.* 16:377-380.
- Shrestha JNB, Fahmy MH. 2007. Breeding goats for meat production. 3. Selection and breeding strategies. *Small Rumin Res.* 67:113-125.
- Silva JRV, Figueiredo JR, Hurk RVD. 2009. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology.* 71:1193-1208.
- Souza CJH, MacDougall C, Campbell BK, McNeilly AS, Baird DT. 2001. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *J. Endocrinol.* 169:R1-R6.
- Taya K, Kaneko H, Takedom T, Kishi H, Watanabe G. 1996. Role of inhibin in the regulation of FSH secretion and folliculogenesis in cows. *Anim. Reprod. Sci.* 42:563-570.
- Thomas N, Venkatachalapathy T, Aravindakshan T, Raghavan KC. 2016. Molecular cloning, SNP detection and association analysis of 5' flanking region of the goat IGF1 gene with prolificacy. *Anim Reprod Sci.* 167:8-15.
- Thomas N, Venkatachalapathy RT, Aravindakshan TV, Kurian E. 2017. Association of a Cac8I polymorphism in the IGF1 gene with growth traits in Indian goats. *J Genet Eng Biotechno.* 15-7-11.
- Tosser-Klopp G, Bardou P, Bouchez O, Cabau C, Crooijmans R, Dong Y, Donnadiu-Tonon C, Eggen A, Heuven HCM, Jamli S. 2014. Design and characterization of a 52K SNP chip for goats. *Plos One.* 9(1):e86227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086227>
- Vaiman D, Schibler L, Bourgeois F, Oustry A, Amigues Y Cribiu, EP. 1996. A genetic

- linkage map of the male goat genome. *Genetics* 144:279-305.
- Van Son M, Enger EG, Grove H, Ros-Freixedes R, Kent MP, Lien S, Grindflek E. 2017. Genome-wide association study confirm major QTL for backfat fatty acid composition on SSC14 in Duroc pigs. *BMC Genom.* 18:369.
- Vignal A, Milan D, Sancristobal M, Eggen A. 2002. A Review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol.* 34:275-305.
- Visser C, Marle-Köster EV, Bovenhuis H, Crooijmans RPMA. 2011. QTL for mohair traits in South African Angora goats. *Small Rumin Res.* 100:8-14.
- Visser C, Marle-Köster EV, Snymanb MA, Bovenhuis HR, Crooijmans PMA. 2013. Quantitative trait loci associated with pre-weaning growth in South African Angora goats. *Small Rumin Res.* 112:15-20.
- Wang PQ, Deng LM, Zhang BY, Chu MX, Hou JZ. 2011. Polymorphisms of the cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART) gene and their association with reproductive traits in Chinese goats. *Genet. Mol. Res.* 10:731-738.
- Wang K, Yan H, Xu H, Yang Q, Zhang S, Pan C, Chen H, Zhu H, Liu J, Qu L, Lan X. 2018. A novel indel within goat casein alpha S1 gene is significantly associated with litter size. *Gene.* 671:161-169.
- Yang W, Tang K, Zhang C, Xu D, Wen Q, Yang L. 2011. Polymorphism of the GnRHR gene and its association with litter size in Boer goats. *S Afr J Anim Sci.* 41:338-402.
- Zhang C, Liu Y, Huang K, Zeng W, Xu D, Wen Q, Yang Z. 2011a. The association of two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in growth hormone (GH) gene with litter size

and superovulation response in goat-breeds. *Genet Mol Biol.* 34:49-55.

Zhang C, Wu CJ, Zeng W, Huang K, Li X, Feng JH, Wang D, Hua GH, Xu DQ, Wen QY, Yang LG. 2011b. Polymorphism in exon 3 of follicle stimulating hormone beta (FSHB) subunit gene and its association with litter traits and superovulation in the goat. *Small Ruminant Res.* 96: 53–57.

Zhou H-L, Gu L-H, Sun Y-Y, Xu T-S, Rong G. 2014. Genetic and phenotypic parameter estimates for growth traits of Hainan Black goat in southern China. *Anim Prod Sci.* 55:447-453.

Table 1 – Average little size in goat according to breed and country

Breed	Country	Little size	Authors
Alpina	Itália	1.60	Gonçalves et al. (2008)
Anglo-Nubiana	Brasil	1.90	Cardoso et al. (2018)
Black Bengal	Índia	1.75	Haldar et al (2014)
Creole	Franch	2.10	Gunia et al. (2010)
Jining Grey	China	2.37	Feng et al. (2011)
Laoshan	China	1.70	Lai et al. (2016)
Crossbreed (Pardo			
Alpino	x Brasil	1.49	Sarmento et al. (2010)
Gurgueia)		1.40	Santos et al. (2013)
Saanem	Brasil	1.50	Leal et al. (2018)
Toggenburg	Brasil	1.75	Leal et al. (2018)
Zaraibi	Egito	1.60	Hamed et al. (2009)

Table 2 – Candidate genes, role of regulatory genes in little size in goat according to breed

GENE	MUTATION	ROLE OF REGULATORY GENES IN LITTLE SIZE	BREED	AUTHORS
AA-NAT	C825T, C1249T	It is a key enzyme associated with melatonin (MLT) biosynthesis being critical for animal reproductive system (Sharma et al. 2015b)	Beetal, Barbari, Black Bengal, Malabari, Osmanabadi, Sangamneri, Jakhrana, Ganjam, Sirohi	Sharma et al. (2015b)
BMP15	G751T, G752C, A757C, G760C, G762A, G762T, G769C, G769A	Regulates granulosa cell proliferation and differentiation by promoting granulosa cell mitosis, suppressing follicle-stimulating hormone receptor expression and stimulating kit ligand expression, all of which play a pivotal role in female fertility in mammals (Juengel et al., 2002)	Zaraibi, Baladi, Damasco, Alpino	Heikal et al (2017)
	G735A, C808G		Barbari, Beetal, Black Bengal, Jakhrana, Osmanabadi, Sangamneri, Ganjam	Ahlawat et al. (2016)
BMPR1B	T242C	Plays an important role for increase in ovulation rate and litter size (Souza et al., 2001)	Barbari, Beetal, Black Bengal, Jakhrana, Osmanabadi, Sangamneri, Ganjam	Ahlawat et al. (2015b;2016)
BMP4	G1534A	Modulate the granulosa cell (GC) function in the follicle of domestic animals (Rajesh et al., 2018)	Barbari, Beetal, Black Bengal, Malabari, Jakhrana, Osmanabadi, Sangamneri, Sirohi, Ganjam	Sharma et al. (2013)
CART	C539A	It is important in the regulation of GnRH secretion and onset of puberty (Boone et al., 2008)	Chuandong White, Guizhou white, Gulin ma	Wang et al. (2011)
CSNS1	CSN1S1	Expressed in goat ovary, which may produce several key hormones changes related to production traits (Wang et al., 2018)	Shaanbei, Cashmere	Wang et al. (2018)
FSHB	A2645G	Plays a key role in the regulation of gonadal function and follicle development in mammals (Aerts and Bols, 2010)	Boer, Matou, Boer–Matou crossbred	Zhang et al. (2011b)

FSHR	T70A, G130C	Relays neuronal signals from the hypothalamus to the gonads and keeps the endocrine balance in the reproductive axis maintaining the follicle growth, development, differentiation, and maturation as well as spermatogenesis (George et al., 2011)	Jining Grey, Boer and Inner Mongolia Cashmere	Guo et al. (2013)
GDF9	G3288A, G423A, A959C, G1189A	Plays a crucial role in early folliculogenesis and its mutations can increase the ovulation and infertility in female mammals (Otsuka et al., 2011)	Jining Grey, Guizhou White, Boer, Lianoning Cashmere	Feng et al. (2011)
	C818T, A959C, G1189A		Barbari, Beetal, Black Bengal, Jakhrana, Osmanabadi, Sangamneri, Ganjam	Ahlawat et al. (2012, 2016)
	C183A, C336T		Jinning Grey, Boer, Wendeng Dairy, Liaoning Cashmere and Beijing native	Chu et al (2011)
GH	A781G, A1575G	This hormone is a peptide hormone that is produced from the anterior pituitary. Acts on the development of small antral follicles in the gonadotrophin-dependent stages and stimulating oocyte maturation (Silva et al., 2009)	Boer, Matou	Zhang et al. (2011a)
GNRHR	G757A	It is a key regulator of the reproductive system, which triggers the synthesis and release of the LH and FSH in the pituitary gland, that in turn regulate the production of gametes and gonadal hormones (Naor, 2009)	Jining Grey, Angora, Boer, Inner Mongolia, Cashmere	Chu et al. (2009)
	G891T, G757A		Boer	Yang et al. (2011)
	A730G, G757A, G891T		Local goats in Sri Lanka	Ariyaratne et al. (2017)
	G29T		West African Dwarf	Bemji et al. (2018)

GPR54	C1122T	G - protein-coupled receptor (GPR54) acts as a cognate receptor for a family of neuropeptides called kisspeptins, which are the peptide products of KiSS1 gene. KiSS1/GPR54 system is considered fundamental gatekeeper of puberty onset in mammals (Ahlawat et al., 2015c)	Black Bengal	Ahlawat et al. (2015c)
IGF1	G224A, G227C	It is a member of somatotrophic axis and plays a key role in proliferation of cells, mitosis, myogenesis, meiosis, differentiation in fetal development and post-natal growth (Thomas et al., 2017)	Attappady Black Malabari	Thomas et al. (2016)
INHBB	G693A, C840T	It is chemical signal of the number of growing follicles in the ovary to the pituitary gland to reduce the secretion of FSH to a level which maintains the species-specific number of ovulations (Taya et al. 1996)	Beetal, Osmanabadi, Sangamneri, Ganjam	Sharma et al. (2015a)
KDM6A	16 bp indel	Encodes a protein that demethylates tri- and dimethylated lysine 27 of histone H3, and can affect gametophyte development, Cui et al. (2018)	Shaanbei white cashmere	Cui et al. (2018)
			Laoshan	Lai et al. (2016)
KITLG	G12654A, G12772A, T12829C	Stimulate primordial follicle activation and follicle growth (Celestino et al., 2010)	Xinong Saanen, Guanzhong	An et al. (2015)
KISS-1	T0950C, C3416T, C3811T, T3963C	kisspeptins stimulate the secretion of gonadotropins from the pituitary by stimulating the release of GnRH from the forebrain after the activation of GPR54, which is expressed by GnRH neurons (Dungan et al., 2006)	Gondar, Woyto Guji	Mekuriaw et al. (2017)
	G296C, G2510A, C2540T		Beetal, Barbari, Black Bengal, Malabari, Osmanabadi, Sangamneri, Jakhrana, Ganjam, Sirohi	Maitra et al. (2014)

LHB	C59A, C543T	confers its specific biologic action and is responsible for the specificity of the interaction with the LH receptor (Long et al., 2009)	Boer	Li et al. (2011)
PRLR	C113T, C59T	Member of the growth hormone/prolactin receptor gene family which is a mediator of prolactin Ahlawat et al. (2015a)	Boer	Li et al. (2011)
SETDB2	C1540T	After ovulation the expression of SETDB2 play potential role in the early stages of luteinization, Maekawa et al. (2016)	Laoshan	Lai et al. (2016)

Arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15), Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B (BMPR1B), Bone morphogenetic proteins 4 (BMP4), Cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART), Alpha-S1-casein (CSNS1), Follicle stimulating hormone beta (FSH β), Follicle stimulating hormone receptor (FSHR), Growth Differentiation Factor 9 (GDF9), Growth hormone (GH), Gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR), G protein-coupled receptors 54 (GPR54), Insulin-like growth factor 1(IGF1), Inhibin (INH β), Lysine demethylase 6A (KDM6A), Kit ligand (KITLG), Kisspeptin (KiSS-1), Luteinizing hormone beta-subunit (LH β) and Prolactin receptor (PRLR), SET domain, bifurcated 2 (SETDB2)

ANEXO 2**ARTIGO 2**

Título: Genetic diversity and population structure study in goats

Periódico: **Journal of Applied Genetics**

Journal of Applied Genetics Formerly known as: Scopus coverage years: from 1996 to
Present Publisher: Springer Berlin ISSN: 1234-1983 E-ISSN: 2190-3883

Qualis B1 de acordo com a Classificações De Periódicos Quadriênio 2013-2016,
1234-1983 JOURNAL OF APPLIED GENETICS B1

14/10/2018

Gmail - JOAG-D-18-00209 - Submission Confirmation for Genetic diversity and population structure study in goats



Angelina Fraga <angelina.fraga@gmail.com>

JOAG-D-18-00209 - Submission Confirmation for Genetic diversity and population structure study in goats

2 mensagens

Journal of Applied Genetics- Editorial Office <em@editorialmanager.com>

14 de outubro de 2018 15:22

Responder a: Journal of Applied Genetics- Editorial Office <madelyn.marciano@springer.com>

Para: ANGELINA BOSSI FRAGA <angelina.fraga@gmail.com>

Dear Mrs FRAGA,

Your submission entitled "Genetic diversity and population structure study in goats" has been received by Journal of Applied Genetics

The submission id is: JOAG-D-18-00209

Please refer to this number in any future correspondence.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://joag.editorialmanager.com/>.

We have sent an e-mail to all co-authors of this submission asking them to confirm their co-authorship. You can see the status of co-authorship confirmations under "Author Status" in your author main menu. Please check with your co-authors in case somebody does not confirm within reasonable time. In case of acceptance, a paper might not be published with outstanding co-author confirmations.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Alternatively, please call us at 001-630-468-7784 (outside the US)/(630)-468-7784 (within the US) anytime from Monday to Friday.

Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oa-funding. Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy> or email dataprotection@springernature.com. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding the Editorial Manager database and the publishing process, please email our publication office, stating the journal name(s) and your email address(es): PublicationOfficeSP1@springernature.com

In compliance with data protection regulations, please contact the publication office if you would like to have your personal information removed from the database.

Angelina Fraga <angelina.fraga@gmail.com>

14 de outubro de 2018 15:22

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=6c6870547a&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1614326082909675577&simpl=msg-f%3A16143260829...> 1/2

14/10/2018

Gmail - JOAG-D-18-00209 - Submission Confirmation for Genetic diversity and population structure study in goats

Para: Luciano Gomes de Lima Gomes <lugomeslima.zootecnista@gmail.com>

[Texto das mensagens anteriores oculto]

--

Dra Angelina Bossi Fraga

Melhoramento Animal-Universidade Federal de Alagoas-Brasil

+55 (084) 9342-3092

14/10/2018 Gmail - JOAG-D-18-00209 - Submission Confirmation for Genetic diversity and population structure study in goats

<https://mail.google.com/mail/u/0?ik=6c6870547a&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1614326082909675577&simpl=msg-f%3A16143260829...> 1/2

Angelina Fraga <angelina.fraga@gmail.com>

JOAG-D-18-00209 - Submission Confirmation for Genetic diversity and population structure study in goats

2 mensagens

Journal of Applied Genetics- Editorial Office <em@editorialmanager.com> 14 de outubro de 2018 15:22

Responder a: Journal of Applied Genetics- Editorial Office <madelyn.marciano@springer.com>

Para: ANGELINA BOSSI FRAGA <angelina.fraga@gmail.com>

Dear Mrs FRAGA,

Your submission entitled "Genetic diversity and population structure study in goats" has been received by Journal of

Applied Genetics

The submission id is: JOAG-D-18-00209

Please refer to this number in any future correspondence.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is

<https://joag.editorialmanager.com/>.

We have sent an e-mail to all co-authors of this submission asking them to confirm their co-authorship. You can see the

status of co-authorship confirmations under "Author Status" in your author main menu. Please check with your co-authors

in case somebody does not confirm within reasonable time. In case of acceptance, a paper might not be published with

outstanding co-author confirmations.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Alternatively, please call us at 001-630-468-7784 (outside the US)/(630)-468-7784 (within the US) anytime from Monday

to Friday.

Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Editorial Office

Journal of Applied Genetics

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your

article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily

comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more

information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish

through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be

organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding.

Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your

information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on

how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacypolicy>

or email dataprotection@springernature.com. If you no longer wish to receive messages from this journal or you

Genetic diversity and population structure study in goats

Luciano Gomes de Lima¹, Namíbia Oliveira Balbino de Souza², Raisa Rodrigues Rios¹, Breno de Araújo Melo¹, Lays Thayse Alves dos Santos², Kleibe de Moraes Silva³, Fernando Brito Lopes⁴, Angelina Bossi Fraga^{5,*}

Acknowledgments The authors would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Level – CAPES/Brazil and Education Personnel and Research Amparo Foundation of Alagoas State – FAPEAL/Brazil.

¹Doctoral student in Biotechnology in the Northeastern Network in Biotechnology at the Federal University of Alagoas, Maceió, 57,010-000, Brazil

²Master student in Animal Science of the Graduation Program from the Agrarian Science Center of the Federal University of Alagoas, Rio Largo, 57,100-000, Brazil

³Research Scientist Brazilian Agricultural Research Corporation - Goats and Sheep, Sobral, 62,010-970, Brazil

⁴Research Scientist Brazilian Estadual University of São Paulo, Jaboticabal, 14,884-900, Brazil

^{5,*} Corresponding author: Professor Angelina Bossi Fraga from the Agrarian Science Center of the Federal University of Alagoas, Rio Largo, 57.100-000, Brazil, Tel. +55-82 99341-3092, E-mail address: angelina.fraga@gmail.com, ORCID: 0000-0001-6557-3000

Genetic diversity and population structure study in goats

Abstract

This study was carried out to study the genetic diversity and population structure in goats. A total of 127 goats were genotyped (29 AngloNubian, 30 Canindé, 36 Moxotó and 32 Saanen). For quality control, genotypes were edited using call rate < 0.98 , minor allele frequency < 0.05 , and deviation from Hardy-Weinberg proportions ($p < 10^{-6}$). The Single Nucleotide Polymorphic markers in high linkage disequilibrium ($r^2 > 0.90$) were also removed, remaining 25,493 for AngloNubian, 23,493 for Canindé, 26,511 for Moxotó and 31,875 for Saanen. Population structure and genetic diversity study was based on observed heterozygosity (H_o), expected Heterozygosity (H_s), inbreeding coefficient (F_{is}) and principal component (PC) analysis. The expected and observed heterozygosity (H_e and H_o) were lower for all breeds, indicating genetic diversity in these breeds. The PCA analysis grouped samples as follows: the first PC split local breeds and specialized breeds into two distinct groups; the second PC separated the specialized Saanen and AngloNubian breeds. Goat SNP50 panel can be used satisfactorily for genetics studies with Brazilian native goat breeds.

keywords: Goat SNP50, *Capra hircus*, Genotyping, Brazilian local breed goats

1 Introduction

Goats have an important role in providing foods of animal origin for man, such as milk, meat and skin, and are present in varied regions around the world, with 55%, 39% and 3.8%, 1,7 and 0,5 live animals distributed in Asian, African, Americas, Europe and Oceania (FAO 2018). The local goat breeds are particularly important in this function because, due to of their rusticity, they provide food for the populations that are in the marginal regions around the world, lacking the ideal conditions for agriculture. In general, local genetic resources in their evaluation process, underwent natural selection action, over time, acquiring remarkable rusticity, survival capacity and reproduction in the intertropical regions. In Brazil, especially in the semi-arid regions of the Northeast, selection natural's process was fundamental to ensure the reproduction and survival of these small ruminants, including the Moxotó and Canindé creole goat breeds.

The adaptive skills acquired during this process made these genetic resources important gene pools for rusticity. On the other hand, the Saanen and AngloNubian breeds, among the several goat breeds around the world, were submitted to artificial selection for milk production (Saanen) and milk and meat production (AngloNubian). These two specialized breeds were one of the main breeds introduced in Brazil aiming at the modernity of production systems. The Saanen breed originates in Switzerland and has a high potential for milk production. The AngloNubian breed was selected for multiple purposes, being exploited for milk, meat and skin. With the modernization of production systems, aiming for greater productivity, most of the native breeds are threatened or in genetic drift by several factors. Among these factors are increasing substitution of genetic local resources for specialized breeds and in discriminated use of local breeds in crosses (Oliveira et al. 2017; Ginja et al. 2017). The local breed goats are in the process of genetic dilution and lack conservation programs that guarantee the survival of these important genetic reservoirs (Ribeiro et al., 2016). The study of genetic diversity and population structure contributes to create conservation strategies for these genetic resources. Knowledge of genetic diversity within and between breeds provides new insight into the structure and relationships of population, and it is essential for developing conservation and breeding programs, Martínéz et al. (2012).

The characterization of available genetic resources and information on diversity and genetic structure is important for conservation of goat germplasm, and presently have been considered

by FAO as one of the strategic priorities to the development of plan for the management of animal genetic resources. Several studies have shown the nuclear genetic diversity using molecular markers, mainly microsatellites (Araújo et al., 2006; Liu et al., 2007; Ajmone-Marsan et al. 2014; Ginja et al., 2017 and Silva et al., 2017). In recent years, the development of high-density panels, Single Nucleotide Polymorphisms (SNP), for domestic animal genotyping has shown to play an indispensable role in genomic studies of diversity and population structure. Several authors related it in cattle (Sharma et al., 2016; Martínéz et al., 2017), pigs (Ai et al., 2013), sheep (Brito et al., 2017a; Ajmone-Marsan et al., 2014) and goats (Brito et al., 2017b).

These studies in goat became more informative after sequencing the genome of this species (Dong et al., 2013) and the development of specific high-density panels (Tosser-klopp et al., 2014) contributing to plan conservation of genetic resources. The Goat SNP50 Beadchip Goat SNP50 high-throughput genotyping microarrays were consolidated by collaboration between two working groups: The International Goat Genome Consortium (IGGC) and Illumina Inc. (San Diego, California). This platform consisted of 53,347 SNPs, uniformly spaced throughout the genome, and secreted with high and moderate frequency in the Alpine, Boer, Crioulo, Katjang, Saanen and Savana breeds (Tosser-klopp et al., 2014).

The objective of this research was to validate the Goat SNP50 Beadchip for AngloNubian and Brazilian local breeds (Moxotó and Canindé), besides to evaluate the efficiency of this platform in the study of genetic diversity and population structure among and within breeds Saanen, AngloNubian, Moxotó and Canindé.

2 Methods

Animals and genotyping

This work was led in Brazilian Agricultural Research Corporation - Goats and Sheep, Sobral city, Ceará state from Brazil, which geographic coordinates were 3°42' of South Latitude and 40°21' East Longitude, and 83 meters of sea level. The climate is of Savana type known for AW, following the Koppen classification of A, with approximately 96.28 mm rain per year and annual average temperature of 28°C, ranging from 24°C (minimum) to 31.3°C (maximum) and average relative humid of 77.2%. The total number of goats used in this work were 127 according, Table 1. These goats were raised under semi-extensive conditions, with mating period, and had medication and vaccination to control worms and others diseases. They received concentrated, bulky foods and supplementation of silage and hay.

Blood samples were collected from goats, via intravenous puncture using Vacuntainer®. Animals' DNA was extracted from the blood by Chelex resin method 100 (WALSH et al. 1991). Goat genotyping was performed by "Deoxi Biotechnology Ltda" using a high-density panel with 50k SNPs, Beadchip GoatSNP50 (Tosser -klopp et al., 2014). Phenotypic information consisted of records of the animal's identity, breed, birthday, calving type (single, double or greater) and number of calving per female.

Quality control of genomic data

In order to make genotype information more reliable, quality control was performed in 53,347 SNPs, total number available at the beginning of the analysis, using PLINK (Purcell et al., 2007) and R® software, version 3.4.0 (R core Team 2017). In the first filtration, the 3,660 monomorphic or unknown position SNPs were eliminated, and 49,687 SNPs were maintained. For quality control, the following exclusion criteria were adopted for SNPs: MAF (Minor Allele Frequency) minor than 0.05; Call Rate of 98% and those that were not according to the expected proportions of HWE (Hardy-Weinberg equilibrium), $p < 10^{-6}$.

Linkage disequilibrium analysis

Linkage disequilibrium (LD) analysis between the markers was implemented using PLINK software. The r^2 parameter (Hill and Robertson, 1968) presents a square correlation between alleles of two separated SNP loci. The r^2 is defined by the following formula:

$$r^2 = \frac{D^2}{f(A_i)f(B_i)f(A_j)f(B_j)}$$

where,

$f(A_i)$, $f(B_i)$, $f(A_j)$ and $f(B_j)$ are the observed frequencies of the alleles A_i , B_i , A_j and B_j , respectively, and i and j are markers.

$$D = \frac{N}{N-1} \left[\frac{4N_{AABB} + 2(N_{AABb} + N_{AaBB}) + N_{AaBb}}{2N} - 2 * f(A) * f(B) \right]$$

where N is the total number of animals, and N_{AABB} , N_{AABb} , N_{AaBB} and N_{AaBb} are the corresponding numbers of genotypes AABB, AABb, AaBB and AaBb, respectively.

Study of genetic diversity and population structure

The observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity estimates were calculated according to Nei (1973) as implemented in POPGENE software (Yeh et al., 1999). F-statistics were determined as explained by Weir and Cockerham (1984) using the Adegenet HIERFSTAT

(Goudet, 2005). The testes for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium were based on ' p ' values according to F_{is} statistic.

Genetic variation between pairs of the breeds was measured using angular genetic distance (D_A) (Nei et al., 1983). Neighbor-joining (NJ) methodology using the Plink software (Purcell et al. 2007) to construct the phylogenetic tree relationships.

The population structure study was carried out using the multivariate approach, the principal component (PC) analysis. The multidimensional scale was used to obtain a view of the genetic structure of studied breeds. This method was implemented using the PLINK software (Purcell et al. 2007), and the R® software version 3.4.0 (R core Team 2018) was used for the plot. The genetic clusters were elaborated using the package R® Adegenet. The first three PC are the most informative and were plotted on a three-dimensional scatter diagram to allow visual inspection of the relationship between the breeds.

3 Results

Validation study

Initially 49,687 SNPs were included for each breed and after quality control 79.95% (AN), 73.52% (CA), 77.35% (OM), 88.60% (SA) SNPs were maintained for the analyzes (Table 2). The call rate for the Anglo Nubian, Canindé, Moxotó and Saanen breeds were 94.79%, 92.42%, 90.36% and 94.57%, respectively. Therefore, the average call rate for all the breeds studied was 93.04%.

Genotypes

The number of SNPs per chromosome varied from 3.129 (Chromosome 1) to 822 (Chromosome 25), and they are spread in all genome, Figure 1. MAF distribution of SNP after quality control shows that mean MAF for all of genotypes was 0.286 and for each breed was 0.281, 0.275, 0.279 and 0.310 para AN, CA, MO e SA, respectively.

The results showed that after quality control the proportion of SNP with $MAF > 0.3$ was approximately 60%, indicating great genetic diversity in the study population, Figure 2. The MAF distribution per breed group (Figure 3) showed that nearly 50%, 56% and 53% of SNP presented $MAF < 0.3$ for AN, CAN and MOX, respectively. Whereas, SA breed presented approximately 62% of SNP with $MAF > 0.3$, indicated greater diversity than the others breed studied.

Linkage disequilibrium

The values of number of SNPs and LD (r^2) between adjacent markers for each chromosome are presented in Table 3. The mean r^2 between SNP adjacent was 0.127 ± 0.168 . Linkage disequilibrium (LD) by breed and for all breed studied is presented in Figures 4 and 5, respectively.

In the present study the exclusion of SNPs by LD varied from 27% to 36% among the studied breeds, Table 3. The MAF, HWE and Heterozygosity (HZ) without LD or with LD values are presented in Table 4.

Genetic diversity

Genetic diversity within populations was accessed as a measure of heterozygosity. The mean for H_e was 0.347 (varying from 0.314 to 0.396), while the mean H_o was 0.354 (varying from 0.330 to 0.402), Table 5.

The pairwise population of Nei's distance (D_A) was 0.172 for (AN and CAN), 0.151 (AN and MOX), 0.128 (AN and SA), 0.055 (CAN and MOX), 0.139 (CAN and SA) and 0.118 (MOX

and SA). These results allowed the construction of Neighbor-joining tree from the D_A genetic distance matrix (Figure 3). The local breed goat (MO and CA) and specialized breed (SA and AN) presented two distinct clusters.

Principal component

Population structure of the studied breeds was explained using multivariate approach. Principal component analysis (PCA) was performed to visualize relationships within populations studied. This analysis showed that the breed groups formed distinct clusters and clearly separated populations. The first two components explained 84.48% of the total variability (Figure 7). The first axis explained 62.71% of the inertia and distinguished native breeds the specialized breeds. The second axis explained 21.77% of the inertia and also separated AN and SA in distinct groups. Considering a three-dimensional analysis, we included the third main component in order to obtain more details about the genetic distance between the populations studied. The three-dimensional Scatter plot diagram was based on genomic relationship matrix allowing a more detailed visual inspection of the genetic relationship between the breeds studied (Figure 8, 9 and 10).

The first three components explained 88.78% of the total variability (Figure 8). The first axis (62.71%) distinguished Brazilian local breeds of the specialized breeds the second axis (21.77%) separated AN and SA in distinct groups. The third explained 4.30% of the total variability and separated CA and MO in distinct groups.

The optimum k-values based in Gap statistic and total within sum of square was $k=4$ according to ad hoc ΔK statistic (Evanno et al., 2005), Figure 11. The k value was using to analyze the Bayesian Cluster.

The hierarchal clustering of data was implemented by Admixture software, which estimates the ancestry in a model-based manner from the autosomal SNP panel for a set of unrelated individuals. The data was plotted in order of fraction ancestry that they shared with another breeds, Figure 12.

4 Discussion

Validation study

During the exclusion of SNP, observing each control criterion, it is possible that event overlap occurred. In other words, it is possible that a SNP has been deleted for more than one criterion, such as for Call rate and MAF, simultaneously.

Quality control is an important step in the use of SNP genomic data because its execution removes potential sources of bias, either by sampling error or by errors in laboratory procedures. The average call rate obtained (93.04%) indicated a greater loss of genetic information for the subsequent analyzes. On the other hand, higher average call rates were reported by kijas et al. (2013), Lashmar et al. (2014) and Tosser-Klopp et al. (2014), which were 99.5%, 99.6%, 99.9%, respectively, making them more informative.

Genotypes

In a validation study of Beadchip GoatSNP50 for South African Angora goats, exploited for wool production, Lashmar et al. (2015) showed that of 53,347 initial SNPs, 43,759 (82%) remained for subsequent analyzes. The quality control criteria were: exclusion of SNP with call rate <0.98 ; with MAF <0.05 and SNPs that violated EHW ($P <0.001$). Similarly, Moura et al. (2015) in a local breed Brazilian goat, showed that after quality control, of the total of 53,347 initial SNPs, 8,578 SNP (16.08%) were excluded, leaving 44,769 (83.92%) for the following analyzes. The criteria used by these authors were: call rate <0.95 ; MAF <0.05 and 1.36% discarded due to violation of EHW.

Validation study of the present research showed that the Goat SNP50 Beadchip panel was informative, due to its extensive sampling in the genome of the populations studied, allowing for genetic diversity studies, Genome-wide Association (GWAS) and genomic selection.

The results presented by Lashmar et al. (2014), in Angora goats, showed that after filtering out SNP with low MAF, 88.1% of SNP provided to be polymorphic. According to Brito et al. (2017), MAF distribution indicates the proportion of SNPs with high polymorphism (MAF >0.3). These authors showed that in a New Zealand multi-breed sheep population the proportion of SNP with MAF >0.3 after quality control was 39.27%.

Linkage disequilibrium

LD levels indicate the minimum number of markers for successful genomic prediction (Brito et al, 2017). At the average markers spacing in the HD SNP chip (~ 50) the LD (r^2) was 0.127. The LD decreases with increasing distance between SNPs. The LD test is important because it aims to inactivate the SNPs that are in linkage disequilibrium to avoid the sources of deviation from the analysis, keeping only the markers (SNPs) independent. However, the results indicated a low LD level detected even when analyzed at small distances. The similarity between MAF, HWE and HZ before and after LD test, pruning, can indicate that the exclusion of SNPs by LD was not very strong for any of the breeds.

Genetic diversity

According to Takezaki and Nei (1996) markers should have an average heterozygosity ranging from 0.3 to 0.8 in the population to be useful for measuring genetic variation if they. Our results have shown that expected and observed heterozygosity (H_e ; H_o) were higher for breeds SA (0.3960; 0.4018) than AN (0.3408; 0.3446), MO (0.3380; 0.3418) and CA (0.3143; 0.3296), Table 5. Visser et al. (2016) related approximated value for H_e (0.40) in Angora Goats when compared with us result for H_e (0.3960) in SA.

The differences between the H_e showed in this research can indicate there is greater genetic diversity in specialized breeds. This can be explained by the fact that the specialized breeds belong to consolidated genetic groups, which have more effective numbers of animals and breeders. This contributes to the reduction of inbreeding, because in these herds, mating is oriented in order to minimize the inbreeding coefficient. On the other hand, relationship information among local breed animals is precarious, became difficult the planning of mating for lower inbreeding of the progenies. Thus, in local populations, mating between individuals more closely related than the average population is more frequent, reflecting lower genetic variability of these groups.

Both H_e and H_o were not very different from each other for all races indicating no loss or fixation of alleles. The heterozygosity deficit (F_{is}) ranged from 0.0085 (AngloNubian) to -0.0382 (Canindé) which reduced values revealed the existence of genetic diversity in these populations. Similar results were related by Visser et al. (2016), which showed F_{is} varying from -0.0029 to -0.051 in South Africa, French and Argentinian Angora goats.

The negative values reflect that the observed heterozygosity was higher than expected. F_{is} statistic plays an important role in the design of conservation programs of local breeds, since it indicates the level of genetic diversity between the groups. These results showed that genetic diversity has been maintained in the breeds studied. Mainly the Saanen breed, which although submitted to the selection program, presented low level of inbreeding. Probably, this fact is due to the monitoring of the mating to avoid the occurrence of high levels of inbreeding. Similar values of H_e , H_o and F_{is} (0.3819, 0.3797 and -0.0027) for Marota breed, another Brazilian local breed goat, were reported by Moura et al. (2015). In this case, the occurrence of genetic diversity within that population was also verified.

In general, it is hard to compare these results with the results from the other researches, which used different methods. Most of them present higher values for observed and expected heterozygosity than ours results, probably because the molecular genetic markers used are different. For instance, Ginja et al. (2017), working with 27 goat breeds, using microsatellite

(SSR) as a molecular marker, reported $H_o= 0.591$ and $H_e= 0.640$. Dixit et al. (2010), in six Indian goat breeds using microsatellite (SSR) loci analysis, revealed higher values expected heterozygosity, which varied from 0.61 to 0.73. Similarly, in a research with Brazilian local breed goats (Azul, Moxotó, Marota, Canindé, Repartida and Graúna), Rocha et al. (2016) revealed that H_e ranged from 0.57 (Azul) to 0.66 (Repartida). These authors also showed higher H_e for other three goat groups: undefined genotype standard, exotic breeds (Alpina, AngloNubian, Boer and Saanen) and Spanish (Murciana, Murciana-Granadina and Granadina), which average H_e were 0.71, 0.66 and 0.68, respectively.

High F_{is} values may be due to deviations of the genotype frequency causing EHW violation. In the present study, the four genetic groups studied presented low F_{is} values and, therefore, EHW was not violated.

Principal components

The PCA analysis showed that the breed groups were clearly separated forming distinct clusters. These results were expected because specialized breeds have been introduced more recently in Brazil than ancestral breeds that formed the Brazilian local breeds. In addition, by indiscriminate crossbreed these local genetic resources, during the period of approximately five centuries, suffered natural selection.

These results showed distinct grouping between the Brazilian local breeds and specialized breeds. Moreover, the diagram also showed that Brazilian local breeds, Moxotó and Canindé, are genetically distant from each other. This can be explained by distinct formation history of breed, such as location, genetic structure and differences between the ancestral genetic groups. The genetic distance between the Saanen and AngloNubian breeds was also expected due to the differences between the regions of origin of each. While the Saanen breed comes from continental Europe, AngloNubian comes from crosses between English goats and African buck.

As the Scatter plot multidimensional based on genomic relationship matrix, the structure analyses showed four individual populations allocated into four distinct cluster, as was expected. Although, there is some admixture between of them, the populations are distinct, and there is no HWE violation. On the other hand, we can identify some transfer of genetic material between of them. For instance, probably the MO breed had common ancestry with SA, and CA maybe received genes from the AN.

The clustering of animals into four genetic distinct groups shows that this topology was consistent with the results of the PCA, evidencing the presence of genetic material common

among the breed groups. These results indicate that Saanen breed probably participated in the formation of the Moxotó and Canindé breed, Figure 12. Similar results were presented by Rocha et al. (2016) revealing strong genetic influence of the Saanen breed on Brazilian local breeds, such as Azul, Moxotó, Canindé, Repartida and Graúna.

4 Conclusion

The Goat SNP50 Beadchip panel was informative for AngloNubian, Canindé and Moxotó breeds due to their wide sampling in the genome of these populations allowing studies of genetic diversity, population structure and GWAS.

The expected and observed heterozygosity (H_e and H_o) were similar for all breeds, generating very low coefficient of inbreeding for all breeds, revealing genetic diversity in population groups studied.

PCA analysis and genetic structure showed that four distinct group breeds and were identified some transfer of genetic material between of them, probably because de introduction of specialized goats a long time ago and their participation on formation process of Brazilian local breed goat.

Compliance with Ethical Standards: This research was approved by the "Ethics Committee on the Use of Animals of Embrapa Goats and Sheep", with registration N° 002/2017 (attached 1) for use of live animals during the experiment.

Studies with human participants or animals: This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

5 References

- Ajmone-Marsan P (2014) The characterization of goat genetic diversity: Towards a genomic approach. *Small Rumin Res* 121:58-72. <https://doi.org/10.1016/2014.06.010>
- Ai H, Huang L, Ren J (2013) Genetic Diversity, Linkage Disequilibrium and Selection Signatures in Chinese and Western Pigs Revealed by Genome-Wide SNP Markers. *PLoS ONE* 8(2): e56001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056001>

- Araujo AM, Guimarães SEF, Machado TMM, et al (2006) Genetic diversity between herds of Alpine and Saanen dairy goats and the naturalized Brazilian Moxotó breed. *Genet Mol Biol* 29 (1):67-74. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000100014>
- Brito LF, Mcewan JC, Miller SP, et al (2017.a) Genetic diversity of a New Zealand multi-breed sheep population and composite breeds' history revealed by a high-density SNP chip. *BMC Genet* 18(25). <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0492-8>
- Brito LF, Kijas JW, Ventura RV, et al (2017.b) Genetic diversity and signatures of selection in various goat breeds revealed by genome-wide SNP markers. *BMC Genomics* 18:229. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3610-0>
- Dixit SP, Verma NK, Aggarwal RAK, et al (2010) Genetic diversity and relationship among southern Indian goat breeds based on microsatellite markers. *Small Rumin Res* 91:153-159. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.02.015>
- Dong Y, Xie M, Jiang Y, et al (2013) Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). *Nat Biotechnol* 31:135–141. <https://doi.org/10.1038/nbt.2478>
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Ginja C, Gama LT, Martínez a, et al (2017) Genetic diversity and patterns of population structure in Creole goats from the Americas. *Anim Genet* 48(3):315-329. <https://doi.org/10.1111/age.12529>
- Goudet J (2005) Hierfstat, a package for r to compute and test hierarchical Fstatistics. *Mol Ecol* 5:184–6. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00828.x>
- Hill WG, Robertson A (1968) The linkage disequilibrium in finite populations. *Theor Appl Genet* 38(6):226-31. <https://doi.org/10.1007/BF01245622>
- Kijas JW, Ortiz JS, McCulloch R, et al (2013) International Goat Genome Consortium. Genetic diversity and investigation of polledness in divergent goat populations using 52 088 SNPs. *Anim Genet* 44:325-335. <https://doi.org/10.1111/age.12011>
- Lashmar SF, Visser C, Marle-Köster EV (2015) Validation of the 50k Illumina goat SNP chip in the South African Angora goat. *S Afr J Anim Sci* 1:56-59. <https://doi.org/10.4314/sajas.v45i1.7>

- Liu RY, Lei CZ, Liu SH, et al (2007) Genetic Diversity and Origin of Chinese Domestic Goats Revealed by Complete mtDNA D-loop Sequence Variation. *Asian-Aust J Anim Sci* 20 (2):178-183. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.178>
- Lashmar S, Visser C, Marle-Koster E V (2015) Validation of the 50k Illumina goat SNP chip in the South African Angora goat. *S Afr J Anim Sci* 45:56–59. <https://doi.org/10.4314/sajas.v45i1.7>
- Martínez AM, Gama LT, Cañón J, et al (2017) Genetic Footprints of Iberian Cattle in America 500 Years after the Arrival of Columbus. *PLoS ONE* 7(11): e49066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049066>
- Moura JO, Campelo JE, Bajay MM, Costa MS, Cavalcante DH, Araújo AM (2015) Diversidade genética em caprinos localmente adaptados no Brasil utilizando o Beadchip 50k. *Actas Iberoam Conserv Anim* 6:92–97
- Nei M (1973) Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proc Natl Acad Sci* 70:3321-3323
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al (2007) a tool set for whole-genome association and population based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81(3):559–75. <https://doi.org/10.1086/519795>
- R Core Team. (2017) A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.rproject.org/>(accessed 13 October 2018)
- Ribeiro MN, Arandas JKG, Nascimento RB et al (2016) Recursos genéticos de caprinos de raças locais do Brasil. In: Bayona JEV, Martínez LZ, Bermejo JVD, Galván GR (ed) *Biodiversidad caprina ibero-americana*, 1th ed. Universidad Cooperativa de Colombia, Bogota, pp 189-206
- Rocha LL, Filho ECP, Filho MAG, et al (2016) Impact of foreign goat breeds on the genetic structure of Brazilian indigenous goats and consequences to intra-breed genetic diversity. *Small Rumin Res* 134:28–33. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.002>
- Sharma A, Lee SH, Lim D, et al (2016) A genome-wide assessment of genetic diversity and population structure of Korean native cattle breeds. *BMC Genetics* 17(139):1-9. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0472-z>
- Silva NMV, Filho PEC, Arandas JKG, et al (2017) Polymorphism of mitochondrial DNA in the Brazilian Canindé goat breed. *Genet Mol Res* 16(2). <https://doi.org/10.4238/gmr16029656>
- Takezaki N, Nei M (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic tree from microsatellite DNA. *Genetics* 144:389-399

Tosser-Klopp G, Bardou P, Bouchez O, et al (2014) Design and characterization of a 52K SNP chip for goats. *PLoS One* 9:1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086227>

Visser C, Lashmar SF, Marle-Köster EV, et al (2016). Genetic diversity and Population Structure in South African, French and Argentinian Angora Goats from Genome-Wide SNP Data. *PLoS ONE* 12:1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154353>

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R, et al (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10(4):506-513

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370. <https://doi.org/10.1111/j.15585646.1984.tb05657.x>

Yeh FC, Yang R, Boyle T (1999) POPGENE. Version 1.3.1. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.

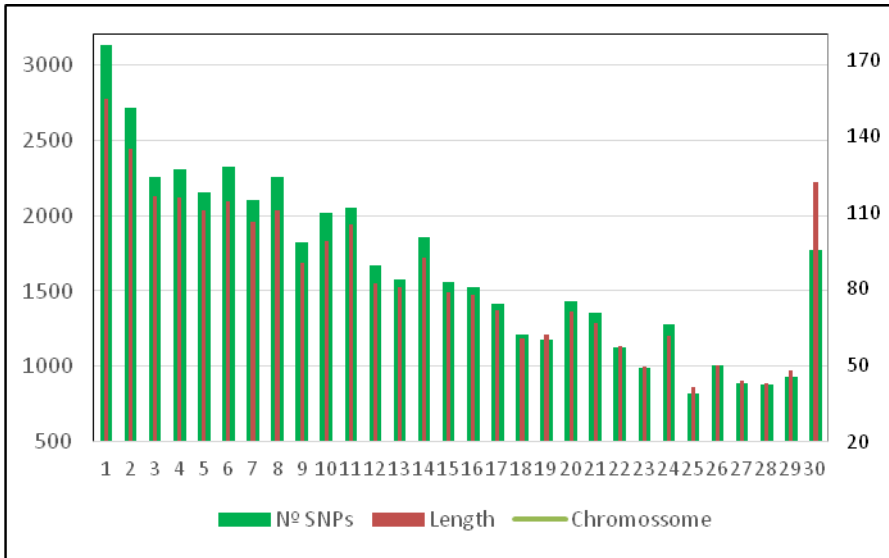


Figure 1 – Number of SNP (green bars) and length of chromosome spanned (red bars) per chromosome in goats

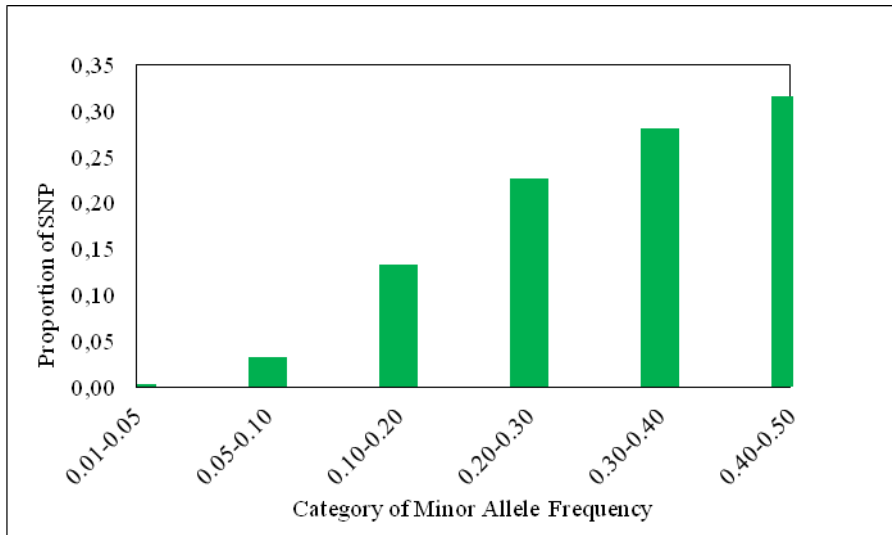


Figure 2 – Minor allele frequency (MAF) distributions for whole genome after quality control of goats

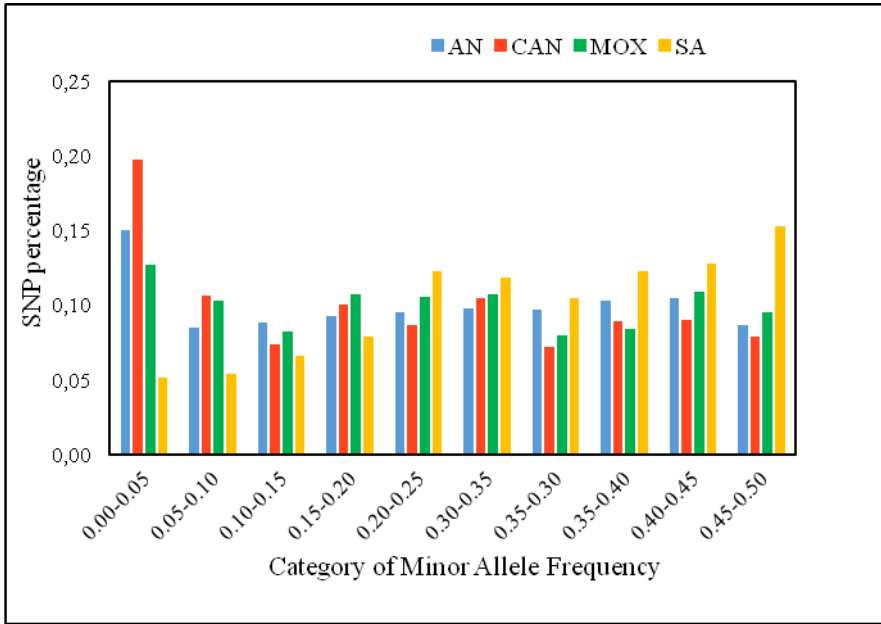


Figure 3 – Minor allele frequency (MAF) distributions for whole genome after quality control of goats per breed group

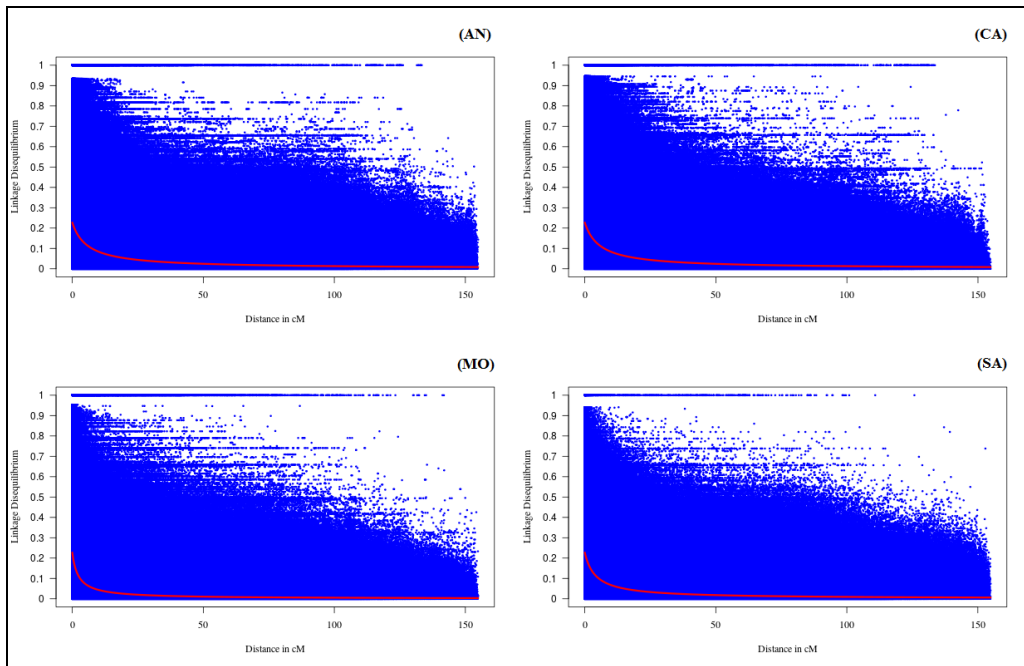


Figure 4 – Decline of linkage disequilibrium (LD) for each breed: AngloNubian (AN), Canindé (CA), Moxotó (MO) and Saanen (SA)

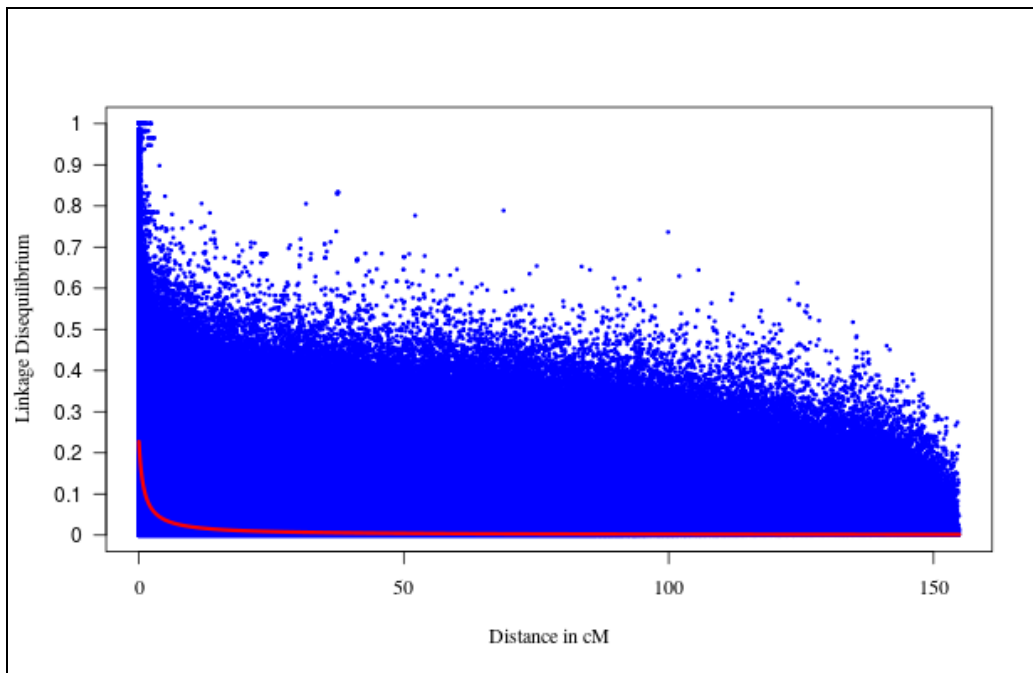


Figure 5. Decline of linkage disequilibrium (LD) for all breed: given distances for all animals studied

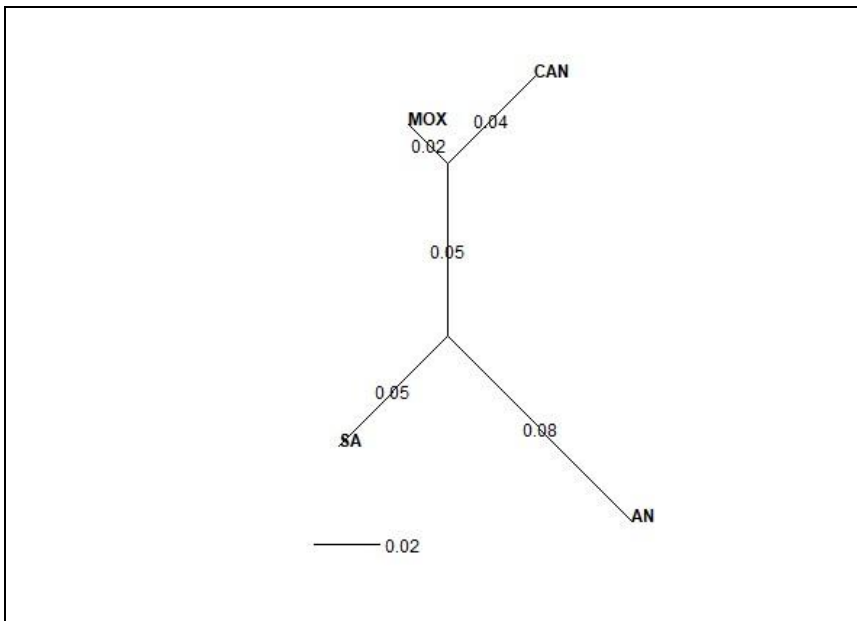


Figure 6. Neighbour-joining phylogenetic radial tree based on Nei's standard genetic distances. Numbers indicate the proportion of bootstrap replicates sharing the labelled node in a bootstrap resampling of 1000 trees.

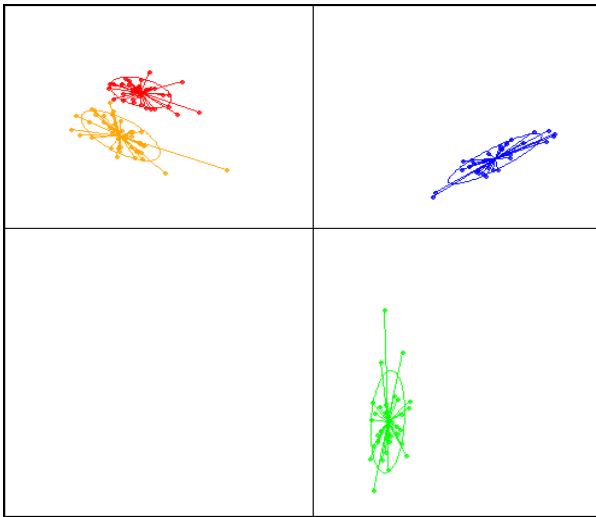


Figure 7. Scatter plot of first two Principal component for AngloNubian (Blue) Canindé (Red), Moxotó (Yellow), Saanen (Green)

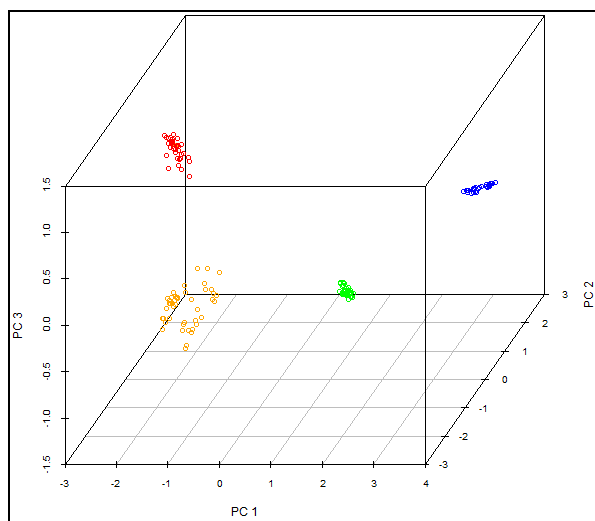


Figure 8. Scatter plot three-dimensional plot based on the genomic relationship matrix for the Moxotó (Yellow), Canindé (Red), Saanen (Green) and AngloNubian (Blue) goats

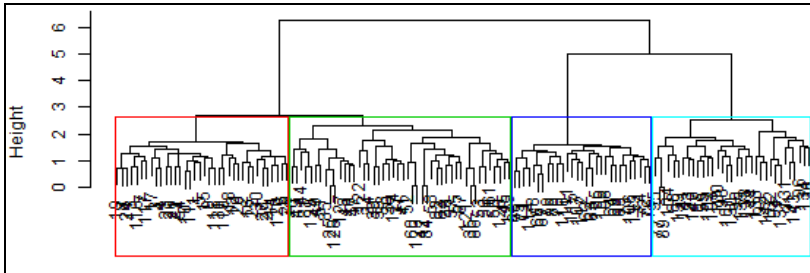


Figure 9. Cluster based on the genomic relationship matrix for the Moxotó (Yellow), Canindé (Red), Saanen (Green) and AngloNubian (Blue) goats

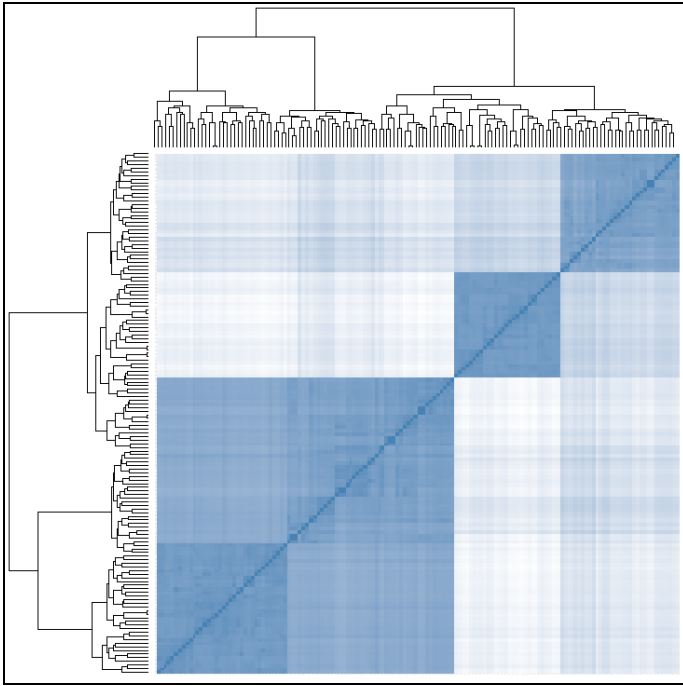


Figure 10. Heatmap based on the genomic relationship matrix for the Moxotó (Yellow), Canindé (Red), Saanen (Green) and AngloNubian (Blue) goats

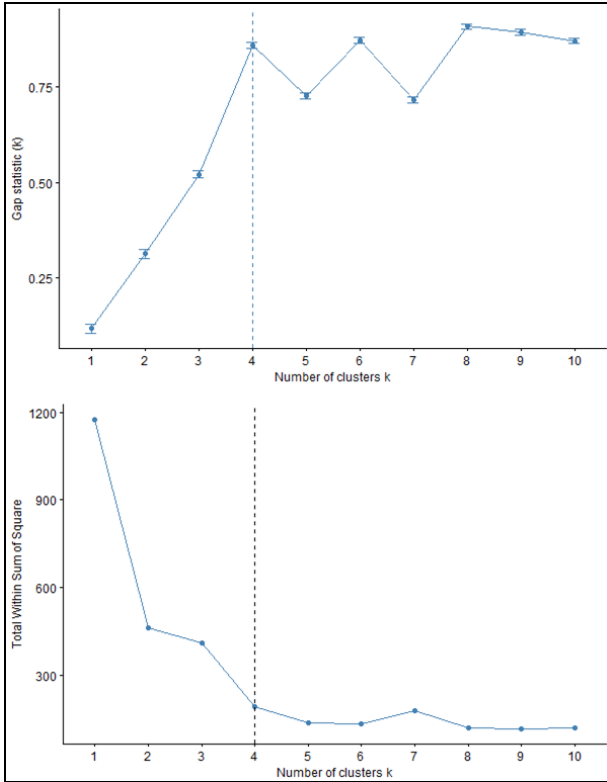


Figure 11. Optimum cluster number based on Gap statistics and total squared sum

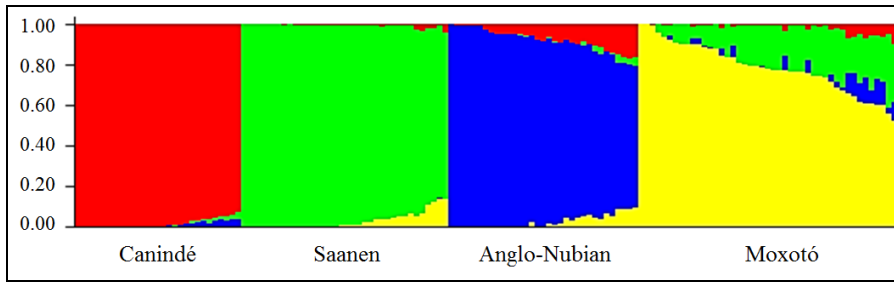


Figure 12. Estimated genetic structure for $K = 4$ obtained on STRUCTURE program on four goat breeds

Table 1 Goat number according to breed, source and aptitude

Breed	Code	N	Source	Aptitude
AngloNubian	AN	29	England	Meat and Milk
Canindé	CA	30	Brazil	Meat and Milk
Moxotó	MO	36	Brazil	Meat and Milk
Saanen	SA	32	Switzerland	Milk

Table 2 Number of SNPs initially included, number of SNPs excluded according to each quality control criterion (Call rate, MAF and HWE) and number of SNPs maintained after quality control for breed goat

Breed	SNP included	Call Rate <0.98	MAF <.05	HWE <0.001	SNP excluded	SNP maintained
AN	49.687	2.323	7.765	1.598	9.961	39.726
CA	49.687	3.499	9.690	1.454	13.155	36.532
MO	49.687	4.479	6.685	1.366	11.256	38.431
SA	49.687	2.404	3.061	1.596	5.662	44.025

Table 3 Linkage disequilibrium mean between adjacent SNPs pairs according to Chromosome and number of SNPs

Chr.	SNPs	Mean r^2	SD(r^2)	Mean dist.Mb	Chr.	SNPs	Mean r^2	SD(r^2)	Mean dist.Mb
1	3,097	0.133	0.178	50.00	15	1,548	0.126	0.167	49.39
2	2,692	0.135	0.177	49.73	16	1,509	0.123	0.163	49.46
3	2,237	0.133	0.176	49.74	17	1,397	0.121	0.158	49.66
4	2,269	0.133	0.176	49.69	18	1,196	0.122	0.159	49.75
5	2,134	0.132	0.175	49.62	19	1,168	0.125	0.167	49.87
6	2,290	0.133	0.177	49.73	20	1,422	0.121	0.159	49.66
7	2,084	0.131	0.173	49.68	21	1,355	0.122	0.159	49.76
8	2,225	0.133	0.176	49.67	22	1,117	0.124	0.163	50.01
9	1,811	0.132	0.176	49.63	23	971	0.119	0.156	50.23
10	2,000	0.130	0.173	49.76	24	1,270	0.125	0.164	49.73
11	2,037	0.130	0.173	49.74	25	819	0.124	0.164	49.88
12	1,665	0.129	0.171	49.50	26	1,002	0.125	0.164	50.19
13	1,566	0.125	0.166	49.44	27	878	0.125	0.164	50.11
14	1,840	0.132	0.175	49.59	28	876	0.125	0.165	50.14
15	1,548	0.125	0.166	49.39	29	929	0.126	0.167	49.87
					All	47,404	0.127	0.168	49.77

Table 4 SNPs number included in the linkage disequilibrium (LD) test, SNPs number maintained after LD test and SNPs percentage excluded due to LD for goats

Goat breed	Without LD pruning	With LD pruning	Reduction (%)
Anglo Nubian	39.726	25.493	35,83%
Canindé	36.532	23.493	35,69%
Moxotó	38.431	26.511	31,02%
Saanen	44.025	31.875	27,60%

Table 5 MAF, HWE and HZ average before and after the linkage disequilibrium (LD) test for goats

Goat Breed	Without LD pruning			With LD pruning		
	MAF μ (sd)	HWE μ (sd)	HZ μ (sd)	MAF μ (sd)	HWE μ (sd)	HZ μ (sd)
Anglo	0,281 (0,131)	0,566 (0,315)	0,392 (0,148)	0,277 (0,132)	0,556 (0,311)	0,389 (0,150)
Nubian	0,275 (0,131)	0,566 (0,316)	0,390 (0,146)	0,272 (0,132)	0,555 (0,312)	0,388 (0,147)
Canindé	0,279 (0,128)	0,567 (0,319)	0,381 (0,137)	0,276 (0,129)	0,558 (0,315)	0,378 (0,138)
Moxotó	0,310 (0,121)	0,567 (0,322)	0,413 (0,133)	0,308 (0,122)	0,556 (0,319)	0,412 (0,134)
Saanen						

Table 6 Expected and observed heterozygosity (He and Ho), inbreeding (Fis) for AngloNubian, Canindé, Moxotó and Saanen goats

Breed	Expected Heterozygosity (He)	Observed Heterozygosity (Ho)	Inbreeding (Fis)
AngloNubian	0.34078949	0.34460925	0.00847701
Canindé	0.31428426	0.32958822	-0.03823605
Moxotó	0.33800652	0.34177168	-0.00788174
Saanen	0.39600685	0.40175759	-0.01279868
Mean	0.34727175	0.354431685	-0.016375

ANEXO 3



Caprinos e Ovinos

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA / CNPC

CERTIFICADO DE CREDENCIAMENTO E AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PROTOCOLO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Caprinos e Ovinos, em reunião realizada no dia 23 de maio de 2017 e com base na legislação nacional vigente (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), deliberou por autorizar a realização do projeto: *Estudos de associação ampla do genoma (GWAS) para identificação de SNPs relacionados à prolificidade em caprinos* - protocolo nº 002/2017, sob a responsabilidade do Dr. Kleibe de Moraes Silva, desde que respeitada a descrição da metodologia apresentada à CEUA. Qualquer alteração no projeto, intencional ou acidental, que repercuta negativamente na saúde e/ou bem-estar dos animais em experimentação, deverá ser comunicada imediatamente à CEUA. Informamos que, conforme disposto na legislação vigente, os membros da CEUA deverão ter livre acesso ao local de execução dos experimentos.

Este certificado é válido até o dia 31/07/2019, data de término projeto. Se for necessário a prorrogação deste prazo, o pesquisador deverá requisitar, anteriormente a esta data, o pedido de prorrogação desta autorização, apresentando a sua justificativa e o tempo necessário para concluir o projeto. O pedido deve ser acompanhado do relatório com as atividades realizadas. Ressaltamos que este pedido será avaliado pela CEUA, podendo ser aceito ou não.

Concluído o projeto o pesquisador deverá ser encaminhar uma cópia digital e outra impressa do relatório final do projeto à CEUA.

Sobral, CE 02 de junho de 2017.

Dra. Alice Andrioli Pinheiro
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 cnpc.ceua@embrapa.br
 Embrapa Caprinos e Ovinos

