**Diversidade genética em populações de gado de elite associadas a biotecnologias reprodutivas**

Wilder Hernando Ortiz Vega^{1*}, Celia Raquel Quirino¹, Aylton Bartholazzi Junior¹, Caroline Marçal Gomes David¹, Julia Gazzoni Jandim¹, Raquel Varella Serapião², Clara Slade Oliveira³

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense, CCTA-LRMGA, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

²Empresa de pesquisa agropecuária do Rio de Janeiro-PESAGRO, Campo experimental Santa Mônica, Valença, RJ, Brasil.

³Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária, Embrapa Gado de Leite, Campo experimental Santa Mônica, Valença, RJ, Brasil

*Autor correspondente: wilortvet@yahoo.es

Resumo: O atual manejo reprodutivo em populações de elite envolve utilização de tecnologias de reprodução assistida visando maior ganho genético. Porém, o ganho genético pode estar acompanhado de perda da diversidade nas populações de origem e na sua descendência. Utilizando abordagens da genética e ecologia de populações baseadas em marcadores microssatélites, nós avaliamos a diversidade genética entre e dentro de populações de vacas participantes em programas comerciais de produção de embriões. A endogamia dentro de populações variou de zero até 8%. Análise molecular da variância mostrou variação de 1% entre populações, 8% entre indivíduos e 91% dentro de indivíduos. Medidas de riqueza alélica mostraram reduzido número de alelos raros variando de 0.21 até 1.06 nas populações. O método de agrupamento bayesiano utilizado evidenciou a falta de estrutura nas populações analisadas; identificaram-se 2 clusters principais agrupando as três populações. Baixa diversidade genética entre populações de vacas associadas a programas de produção *in vitro* de embriões foi evidenciada. Níveis de endogamia variáveis dentro das populações foram observados. Abordagens da genética populacional assim como de diversidade ecológica podem ser implementadas na tentativa de estimar de maneira mais abrangente a diversidade genética em populações animais de interesse na pecuária.

Palavras-chave: doadoras, endogamia, heterozigosidade, microssatélites, oócitos, OPU-PIVE.

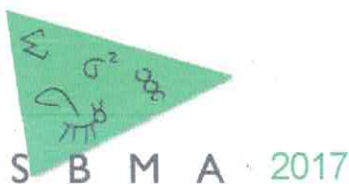
Genetic diversity in elite cattle populations associated with reproductive biotechnologies

Abstract: The current reproductive management of elite populations involves the use of assisted reproductive technologies, seeking to obtain the greatest genetic gain. However, this genetic gain can be accompanied by loss of diversity in the populations of origin and their descendants. Using genetic and ecological approaches for the study of populations based on microsatellite markers, we assessed the genetic diversity between and within populations of cows used in commercial embryo production programs. Endogamy within populations varied from zero to 8%. Molecular of variance analysis showed variation of 1% between populations, 8% between individuals and 91% within individuals. Measures of allele frequencies showed a reduced number of rare alleles, ranging from 0.21 to 1.06 in the populations. The Bayesian method utilized indicated a lack of structure in the populations analyzed, identifying two main clusters in the three populations. Low genetic diversity between cow populations associated with programs for *in vitro* production of embryos was evidenced. Variable levels of endogamy within the populations were observed. Population genetics as well as ecological diversity approaches can be implemented in an attempt to estimate the genetic diversity in livestock populations more thoroughly.

Keywords: donor's, heterozygosity, inbreeding, microsatellite, oocyte, OPU-IVF

Introdução

O uso de tecnologias de reprodução assistida (Art's) mediadas pela fêmea tais como, a múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET) e a punção folicular guiada por ultrassom (OPU) seguida de fertilização *in vitro* e transferência de embriões (IVFET), tem como principal impacto a disseminação do ganho genético e a redução do intervalo de gerações nas populações envolvidas (Dassonneville et al., 2012). Estudos recentes utilizando modelos de simulação estocásticos e determinísticos mostraram que o ganho genético obtido com a utilização de Art's mediadas pela fêmea em populações bovinas pode ser significativo (Pedersen et al., 2012). No entanto, devido a um menor número de progenitores contribuírem com a geração seguinte, o ganho genético adicional pode estar acompanhado de um



aumento na endogamia intrapopulacional e na descendência com a consequente redução da diversidade genética (Pedersen et al., 2012).

Considerando que, suficiente variação genética é necessária nas populações de animais, tanto para adaptação e resistência como para a melhoria genética contínua de características de importância econômica, o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade genética em populações de fêmeas de elite utilizadas na produção comercial de embriões bovinos.

Material e Métodos

As amostras foram coletadas de vacas doadoras de oócitos da raça Gir Leiteiro em três propriedades de municípios localizados no estado de Rio de Janeiro, Brasil. Campos dos Goytacazes (Pop. 1, n=6), Rio das Flores (Pop. 2, n= 17) e Valença (Pop. 3, n=27). O DNA genômico foi obtido a partir de foliculos capilares de pelos da cauda dos animais, utilizando o NucleoSpin tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) seguindo as instruções do fabricante. As concentrações de DNA foram medidas com espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000-Thermo Science). A genotipagem foi realizada utilizando 19 marcadores tipo microssatélite (BM1818, BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, ETH30, INRA23, INRA63, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, TGLA53, TGLA57, CSSM66, ETH152, INRA05, INRA172 e AE129) utilizando sequenciador capilar (MegaBACE 1000 DNA Analysis System – GE Healthcare).

Utilizando o software GenAlEx versão 6.502; estimaram-se: número de alelos diferentes (Na), número efetivo de alelos (Ne), número privativo de alelos (Np), porcentagem de loci polimórficos (PI), índice de Shannon (SI), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He) e índice de fixação (F). Para avaliar a distribuição da diversidade genética e estimar os componentes de variância das populações, a análise molecular de variância (AMOVA) baseada em loci de microssatélites foi calculada.

As medidas riqueza alélica populacional (AR) e riqueza alélica privativa (pAR) para os 19 marcadores foram estimadas mediante o método de rarefação (independente do tamanho amostral) utilizando o software HP-RARE 1.0. Foi realizada análise de variância (ANOVA) para medidas de riqueza alélica envolvendo os 19 marcadores. Diferenças estatísticas entre populações foram avaliadas com o teste SNK utilizando PROOC MIXED do SAS 9.2 (Inst., Inc., Cary, NC).

Foi realizada análise da estrutura populacional utilizando modelo baseado em agrupamento bayesiano. Para esta utilizou-se o programa STRUCTURE 2.3.4. A simulação foi realizada utilizando o modelo de ancestralidade por mistura (admixture) com frequências correlacionadas e período de burn-in de 200.000 rodadas seguidas de 500.000 interações MCMC (Markov Chain Monte Carlo).

Resultados e Discussão

Os resultados do nosso estudo (Tabela 1) sugerem que as populações estudadas apresentam níveis variáveis de heterozigose baseados nas suas diferentes frequências alélicas. Geneticamente, essas diferenças nas frequências dos locos avaliados indicam pressão de seleção também variável (natural ou artificial) em cada população, que podem levar à fixação de alguns alelos homozigotos (caso da Pop.3 com endogamia de 8%) (Cruz, 2008). Deve-se ressaltar que o tipo de pressão de seleção aplicado pelo uso de biotecnologias reprodutivas como OPU-IVFET, pode modificar rapidamente as frequências gênicas e alélicas nas populações devido à redução do intervalo de gerações.

Tabela 1. Resumo dos índices de diversidade (médias) em três populações de vacas doadoras de oócitos através dos 19 loci

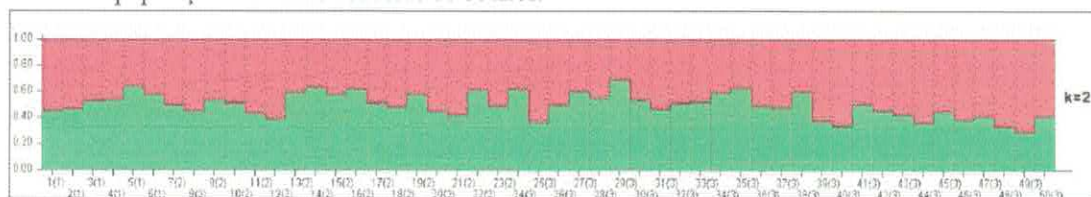
População	Na	Ne	Np	AR	pAR	PI	Ho	He	F	SI
Pop. 1	3,53	2,51	0,11	3,53	0,21	0,95	0,59	0,54	-0,10	0,98
Pop. 2	4,95	2,93	0,53	4,30	0,61	1,00	0,64	0,60	-0,07	1,17
Pop. 3	6,11	3,19	1,58	4,77	1,06	1,00	0,57	0,62	0,08	1,29
Total	4,86	2,87	2,22	4,20	1,88	0,98	0,60	0,59	-0,03	1,15

Na= Número de alelos diferentes; Ne= Número efetivo de alelos; Np= Número privativo de alelos; AR= riqueza alélica; pAR= Riqueza alélica privativa; PI= Porcentagem de loci polimórficos; Ho= Heterozigosidade observada; He= Heterozigosidade esperada; F= Índice de fixação e SI= Índice de informação de Shannon

Considerando o conceito de riqueza alélica e as diferenças estatísticas apresentadas entre populações (Pop.1 e Pop.3), pode-se dizer que, o menor valor encontrado na primeira população, indica menor chance de adaptação e persistência no longo prazo, uma vez que os limites de seleção são determinados pela composição alélica inicial e não pela heterozigosidade, (um alelo raro que é perdido em um evento fundador provavelmente não afetará muito a heterozigosidade, mas a perda reduz a riqueza alélica) (Greenbaum et al., 2014). A distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações executada na AMOVA revelou que, 8% da variação total foi devida a diferenças entre os indivíduos dentro das populações e 91% devido à heterozigosidade nos indivíduos. Já a variação entre populações representou apenas 1% da variação total, não apresentando um claro padrão de diferenciação entre populações. Esta baixa diversidade pode ser decorrente de ancestrais comuns no estabelecimento das populações (Idênticos por descendência) (Slatkin, 1985).

A abordagem bayesiana utilizada na estruturação da população identificou o $K=2$ como o número mais provável de clusters (ou subpopulações) nos indivíduos estudados (Figura 1). Na plotagem é possível apreciar que a maior parte da população apresenta similar distribuição dos grupos genéticos (em verde e vermelho na Figura 1), com proporções variando aproximadamente de 30 até 60%.

Figura 1. Atribuição de agrupamento baseado em modelo bayesiano para 50 animais representando três populações de vacas doadoras de oócitos.



Cada indivíduo é representado no gráfico por uma barra vertical dividida em K segmentos coloridos (vermelho e verde) correspondentes a K clusters genéticos. O comprimento de cada segmento é proporcional à participação do indivíduo no agrupamento de cor correspondente. Número da população entre parênteses, número individual fora do parêntese. Os números no eixo Y mostram o coeficiente de associação / atribuição. Análise realizada no software STRUCTURE.

Conclusão

Vacas doadoras de oócitos associadas a programas de produção *in vitro* de embriões apresentaram baixo padrão de diferenciação genética entre populações. Dentro das populações apresentaram-se diferentes níveis de diversidade indicando manejo genético e dos acasalamentos não padronizados. Sugere-se a utilização de ferramentas de direcionamento dos acasalamentos que utilizem medidas de diversidade e riqueza genética em populações de elite dedicadas à produção de material genético de interesse em produção animal. Novos estudos avaliando o efeito dos níveis de endogamia sobre características de interesse na produção *in vitro* de embriões são necessários.

Literatura citada

- CRUZ, C.D. Programa GENES diversidade genética. <http://www.genetec.com.br>
- GREENBAUM, G; TEMPLETON, A.R; ZARMI, Y; BAR-DAVID, S. Allelic richness following population founding events - A stochastic modeling framework incorporating gene flow and genetic drift. **PLoS One.**; v.9, p.1–23, 2014.
- PEDERSEN, L.D; KARGO, M; BERG, P; VOERGAARD, J; BUCH, L.H; SØRENSEN, A.C. Genomic selection strategies in dairy cattle breeding programmes: Sexed semen cannot replace multiple ovulation and embryo transfer as superior reproductive technology. **J. Anim. Breed. Genet.**, v.129, p.152–63, 2012.
- SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Ann. Rev. Eco. Syst.**; v.16, p.393–430, 1985.
- VAN ARENDONK, J.A.M. The role of reproductive technologies in breeding schemes for livestock populations in developing countries. **Livest. Sci.**, v.136, p.29–37, 2011.