

Voltar

APLICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NA CONSERVAÇÃO E MELHORAMENTO DE UM REBANHO DA RAÇA SANTA INÊS

SAMUEL R PAIVA¹, DANIELLE A. DE FARIA PAIVA², VANESSA C. SILVÉRIO², CONCEPTA MCMANUS³, AMAURY A. OLIVEIRA⁴, JORGE A DERGAM⁵, SIMONE E. F. GUIMARÃES⁶, MÁRIO S. PEREIRA⁷, ANDREA A. DO EGITO¹, HYMERSON C. AZEVEDO³, RAIMUNDO N.B. LÔBO⁸, MARIA S. M. ALBUQUERQUE¹, SÍLVIA R. CASTRO¹, ARTHUR DA S. MARIANTE¹

¹ Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório Genética Animal, final Av.W5 Norte, 70770-900, Brasília-DF; E-mail: samuel@cenargen.embrapa.br

² Estagiária, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório Genética Animal, final Av.W5 Norte, 70770-900, Brasília-DF;

³ Professora, Universidade de Brasília, Faculdade Agronomia e Veterinária, CP 04508, CEP 70910-900, Brasília- DF;

⁴ Pesquisador, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Caixa Postal 44, CEP 49025-040, Aracaju- SE;

⁵ Professor, Universidade Federal de Viçosa, Departamento Biologia Animal, 36571-000, Viçosa-MG;

⁶ Professora, Universidade Federal de Viçosa, Departamento Zootecnial, Laboratório de Biotecnologia Animal, 36571-000, Viçosa-MG;

⁷ Técnico, Universidade Federal de Viçosa, Departamento Zootecnial, Laboratório de Biotecnologia Animal, 36571-000, Viçosa-MG;

⁸ Pesquisador, Embrapa Caprinos, Sobral-CE.

RESUMO O objetivo deste trabalho foi caracterizar a distribuição da variabilidade genética dentro de um Núcleo de Conservação da raça Santa Inês a partir do uso de marcadores moleculares. Foram utilizados 17 locos em 191 indivíduos do rebanho de Santa Inês da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Sergipe. Os resultados obtidos mostraram que existe variabilidade genética significativa existente dentro do núcleo com valores de Heterozigosidade média observada de 0,702 e de conteúdo de informação polimórfica (PIC) de 0,704. Outras análises intrapopulacionais mostraram que 29% dos locos analisados não estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,01$) e apresentaram excesso de homocigotos ($p < 0,05$). A partir do índice de proporção de alelos compartilhados entre todos os indivíduos analisados, foi feito um dendrograma para estimar quais seriam os animais mais próximos ou mais distantes dentro do rebanho, com especial atenção para os 10 machos reprodutores. Três agrupamentos principais foram identificados e em todos existe pelo menos um reprodutor do rebanho. Esse tipo de análise é importante, pois irá auxiliar o manejo reprodutivo do rebanho bem com servirá de ferramenta complementar para os programas de melhoramento clássico que se iniciaram dentro deste Núcleo de Conservação.

PALAVRAS-CHAVE genética da conservação, microssatélites, ovinos, *Ovis aries*, recursos genéticos animais, variabilidade genética

MOLEULAR MARKERS APPLIED IN CONSERVATION AND BREEDING OF SANTA INES FLOCK

ABSTRACT The objective of this study was to characterize the genetic variability distribution within the one Conservation Nucleus of Santa Inês sheep breed utilizing molecular markers. Seventeen loci were utilized in 191 individuals of the Conservation Nucleus of Embrapa Tabuleiros Costeiros, located in Sergipe. The results showed that there is a significant genetic variability within the herd with a mean heterozygosity of 0.702 and polymorphic information content (PIC) of 0.704. Other intrapopulational analyses showed that 29% of the analyzed loci are not in Hardy-Weinberg equilibrium ($p < 0.01$) and present homozygous in excess ($p < 0.05$). In order to estimate which animals were more related and less related within the herd, with emphasis on the 10 rams, a dendrogram was done, using the proportion index of alleles shared among all analyzed individuals. Three main groups were identified and it was found that in each one of them exists at least one sire. This type of analysis is very important because besides helping in the reproductive management, it can be used as a complementary tool on the animal breeding program that already has started within this Conservation Nucleus.

KEYWORDS animal genetic resources, conservation genetics, genetic variability, microsatellites, ovine, *Ovis aries*

INTRODUÇÃO

Os ovinos deslançados contribuem como fonte importante de carne em muitos países de América Latina e, nos últimos anos, o consumo de carne ovina no Brasil vem se intensificando (Furusho et al., 1995). Tal fato estimula o desenvolvimento de pesquisas com objetivo de melhorar práticas de manejo, alimentação e raças para obtenção de um produto de melhor qualidade. Dentre as raças naturalizadas deslançadas existentes no Brasil, a Santa Inês é que se apresenta em vasta expansão atualmente.

A utilização de marcadores moleculares para auxiliar o melhoramento animal clássico é uma realidade, principalmente após o estabelecimento de metodologias de replicação específica do DNA como a Reação em Cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction” - PCR), bem como no aumento da capacidade de processamento de dados pela informática. Dentre as várias aplicações existentes destas metodologias, destaca-se a caracterização molecular de rebanhos de uma determinada raça para manter a diversidade genética máxima e auxiliar no desenvolvimento de sistemas de produção sustentáveis, uma vez que não é possível prever com objetividade quais características podem ser necessárias no futuro para a produção de ovinos no Brasil.

Dessa forma, esse estudo teve como objetivo caracterizar um rebanho de conservação da raça Santa Inês por meio de marcadores de microssatélites altamente polimórficos de modo a otimizar tanto a conservação do rebanho bem como o seus programas de manejo e melhoramento genético.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 191 amostras (10 reprodutores e 181 matrizes) de sangue de animais da raça Santa Inês pertencentes ao Núcleo de Conservação dessa raça localizado na Embrapa Tabuleiros Costeiros, Sergipe. O DNA foi extraído a partir de um protocolo não orgânico com NaCl. Para as reações de PCR foram utilizados até o momento 17 locos de microssatélites em todos os indivíduos, de modo que a grande maioria foi recomendada pela FAO (“Food and Agriculture Organization”) e ISAG (“International Society of Animal Genetics”). São eles: OarFCB20, ILSTS05, OarFCB48, ILSTS11, ILSTS87, INRA35, OarCP20, INRA63, OarAE129, OarFCB304, OMHC1, OarHH35, OarJMP29, INRA23, MAF65, MAF214 e BM827. As genotipagens foram realizadas em Seqüenciador Automático “ABI Prism” 310 e analisadas a partir do software Genescan (“Applied Biosystems”). Uma vez obtidas as frequências alélicas para todos os locos, foram estimados parâmetros genéticos populacionais do rebanho a partir dos programas Genepop (Raymond e Rousset, 1995) e Cervus (Marshall et al., 1998). Adicionalmente, foram estimadas duas probabilidades de exclusão de paternidade (PE), onde na PE1, foi estimada a chance de exclusão quando se conhece apenas o genótipo do filho e do possível progenitor, enquanto que na PE2, se conhece o genótipo de um dos verdadeiros pais além do genótipo do filho e do possível progenitor.

Uma outra estratégia para extrair informação de genótipos individuais é a análise de distâncias entre indivíduos baseadas na proporção de alelos compartilhados por eles. Dessa forma, uma matriz foi criada para todos 191 indivíduos a partir do programa MICROSAT (Minch et al., 1996) e um dendrograma foi posteriormente obtido pelo algoritmo de agrupamento “Neighbor joining”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da variabilidade intra-racial (Tabela 1) demonstrou que o Núcleo de Conservação da raça Santa Inês apresentou altos valores de heterozigosidade observados para a maioria dos locos, bem como de conteúdo de informação polimórfica (PIC). Tais valores reforçam a importância do uso de marcadores microssatélites, visto a qualidade da informação que pode ser extraída. Cinco dos 17 locos utilizados (29 %) não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,01$). Tais valores são relativamente excelentes em se tratando de espécies de animais domésticos onde as práticas de seleção artificial são constantes. Na mesma linha de pensamento o rebanho da Embrapa Tabuleiros Costeiros apresentou baixos índices de consangüinidade com um valor médio de Fis de 1 %. Apenas quatro dos 17 locos (23,5 %) apresentaram índices de consangüinidade significativamente elevados de forma os mesmos estão com um excesso de homozigotos (Tabela 1). Estes resultados são muito importantes e a partir deles várias medidas práticas podem ser tomadas como seleção de um painel dos principais locos que poderão ser utilizados para monitoramento da variabilidade genética de rebanhos de ovinos Santa Inês do Brasil bem como na recomendação de manejo reprodutivo, pelo monitoramento dos valores de Fis. Pariset et al.

(2003), estudando vários rebanhos de uma raça nativa da Itália, identificaram a partir dos valores de F_{is} , rebanhos altamente consanguíneos e promoveram o manjo genético de forma tanto a conservar a raça como aumentar seu nível de produtividade.

O painel utilizado permitiu também confirmar a viabilidade desses marcadores para serem utilizados em de testes de exclusão de paternidade dentro do rebanho, visto que os mesmos tiveram probabilidades conjuntas de exclusão de paternidade (PE1, PE2) de 99,97 % e 99,99 % respectivamente. Um dos pontos chaves para o sucesso de um programa de melhoramento é a correta informação do pedigree do rebanho. Dessa forma, uma hipótese interessante que está sendo testada nesse rebanho é estimar, por meio desses marcadores moleculares, a taxa de erros de paternidade dentro do rebanho.

O dendrograma obtido pelas análises inter-individuais mostraram claramente a formação de três grupos principais (A, B e C) dentro do rebanho. De modo que o número de reprodutores presentes em cada grupo foi, respectivamente, cinco, quatro e um. Segundo Arranz et al. (2001), esse tipo de análise é extremamente importante, pois mostra a variabilidade genética dos indivíduos sem impor a formação de grupos artificiais (ex., famílias, grupos, populações.). Tais resultados serão utilizados na prática para auxiliar no descarte de reprodutores bem como na implantação de sistemas de rotação de reprodutores entre e dentro dos grupos estabelecidos de forma a maximizar a variabilidade genética existe. Os resultados ainda poderão servir de ferramenta para os programas de melhoramento clássico que se iniciam nesse rebanho.

CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados confirmam a utilidade dos marcadores microssatélites como ferramenta para auxiliar programas de conservação e melhoramento animal tanto da raça Santa Inês, bem como para outras raças de ovinos brasileiras. Projetos futuros visarão agregar novos Núcleos de conservação e melhoramento para formar um sistema integrado de conservação e uso da raça Santa Inês.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARRANZ J.J., BAYÓN Y., SAN PRIMITIVO F.. 2001. Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. **Genet. Sel. Evol.** v.33, p.529-542.
2. FURUSHO, I.F., PEREZ, J.R.O, e OLIVEIRA, M.V.M.. 1995 Avaliação do desenvolvimento de cordeiros Santa Inês e cruzas Texel x Santa Inês e Texel x Bergamácia até o desmame, In: **Anais... XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Brasília, DF, 17 a 21 de julho de 1995, pp. 441-442.
3. MARSHALL T.C., SLATE J., KRUK L & PEMBERTON J.M.. 1998. Statistical Confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v.7(5), p.639-655.
4. MINCH, E., RUIZ-LINARES, A., GOLDSTEIN, D., FELDMAN, M., CAVALLI-SFORZA, L.L.. 1996. Microsat(version 1.5b): a computer programme for calculating various statistics on microsatellite allele data. Disponível em <<http://lotka.stanford.edu/microsat.htm>>. Acessado em novembro de 2004.
5. PARISSET, L., SAVARESE, M.C., CAPPUCCHIO, I., VALENTINI, A.. 2003. Use of microsatellites for genetic variation and inbreeding analysis in Sarda sheep flocks of central Italy. **J. Anim. Breed. Genet.**, 120: 425-432.
6. RAYMOND, M.L. & ROUSSET, F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49, 1280-1283.

TABELA 1 Locos de microssatélites utilizados; número de alelos por loco (N); localização dos locos no genoma ovino (cromossomos - Cr); heterozigosidade observada (Het.Obs); heterozigosidade esperada (Het.Esp.); conteúdo de informação polimórfica (PIC); valores de probabilidade para Equilíbrio de Hardy-Weimberg (EHW); probabilidades de exclusão 1 (PE1) e 2 (PE2) e índice de consangüinidade (F_{is}) para 17 loci de microssatélites analisados no núcleo de conservação da raça Santa Inês da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Locos	N	Cr.	Het. Obs	Het. Esp.	PIC	EHW ^a	PE1	PE2	F_{is}
INRA23	9	1	0,832	0,834	0,812	0,4153	0,501	0,671	0,002

OarFCB20	13	2	0,899	0,708	0,670	0,0147	0,311	0,491	-0,271
BM827	7	3	0,578	0,607	0,581	0,0965	0,222	0,408	0,048
OarHH35	9	4	0,698	0,813	0,785	0,0000	0,453	0,629	0,141*
OarAE129	7	5	0,464	0,665	0,612	0,0000	0,247	0,414	0,302*
ILSTS87	12	6	0,886	0,844	0,823	0,6980	0,518	0,685	-0,050
ILSTS05	10	7	0,746	0,812	0,783	0,0003	0,449	0,625	0,082*
ILSTS11	6	9	0,727	0,701	0,651	0,0416	0,283	0,456	-0,037
INRA35	7	12	0,811	0,803	0,773	0,7569	0,435	0,612	-0,011
INRA63	12	14	0,766	0,805	0,780	0,0008	0,451	0,627	0,049
MAF65	8	15	0,963	0,828	0,802	0,9999	0,479	0,652	-0,163
MAF214	4	16	0,465	0,427	0,344	0,9049	0,091	0,177	-0,088
OarFCB48	9	17	0,693	0,735	0,691	0,3386	0,332	0,507	0,057
OarFCB304	13	19	0,753	0,728	0,686	0,8017	0,331	0,506	-0,035
OMHC1	11	20	0,739	0,760	0,738	0,2377	0,397	0,583	0,027
OarCP20	6	21	0,626	0,683	0,650	0,0000	0,286	0,471	0,083*
OarJMP29	10	24	0,793	0,818	0,790	0,2446	0,459	0,634	0,030
MÉDIA	9	-	0,732	0,740	0,704		0,99968	0,99999	0,010

^asignificativo $p < 0,01$; * excesso de homozigotos $p < 0,05$