



## IV WORKSHOP DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE LEITE

Juiz de Fora, Minas Gerais | 24 de Julho de 2009



### **Avaliação da diversidade genética em rebanhos da raça guzerá por meio de dados moleculares**

Karina Braz Bernardo<sup>1</sup>; Lívia Cestaro Santiago<sup>1</sup>; Karla Gasparini dos Santos<sup>1</sup>; Isabella Silvestre Barreto Pinto<sup>1</sup>; Rafael Steinberg da Silva<sup>2</sup>; Robert Domingues<sup>1</sup>; Maria Raquel Santos Carvalho<sup>2</sup>; Ana Luisa Sousa Azevedo<sup>1</sup>; Marco Antonio Machado<sup>1</sup>; Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto<sup>1</sup> e Rui da Silva Verneque<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

**Resumo:** No Brasil, a raça Guzerá (*Bos indicus*) vem sendo intensamente utilizada em cruzamentos, levando a redução no tamanho efetivo da população, fato que levou a FAO (*Food and Agriculture Organization*) a incluí-la como recurso genético a ser preservado. Objetivando avaliar e monitorar a variabilidade genética desta raça, amostrou-se 384 animais mais representativos da raça (10% da população), localizados em Minas Gerais e Espírito Santo, que foram analisados com 11 marcadores moleculares microssatélites. Amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA e este foi quantificado e qualificado por nanoespectrofotometria. O DNA foi amplificado por PCR e seu produto submetido à eletroforese capilar no equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os genótipos foram analisados utilizando o programa Fragment Profiler (GE Healthcare). Testou-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg (programa GENEPOP versão 3.4) e a heterozigosidade (programa FSTAT). Encontrou-se 150 alelos na população numa média de 13,6 alelos por marcador. O menor número de alelos encontrados foi oito e o maior 21, nos marcadores NRDIKM004 e DIK5183 respectivamente. A elevada heterozigosidade observada (0,708) e esperada (0,745), sugerem a existência de alta diversidade genética na população em estudo. A maioria dos locos microssatélites encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto o loco DIK4513. A população estudada demonstrou ter grande variabilidade genética, apesar da ampla utilização de animais de genética superior resultantes dos programas de melhoramento desta raça.

**Palavras-chave:** *Bos indicus*, endogamia, heterozigosidade, melhoramento, microssatélite

### **Assessment of genetic diversity in Guzera cattle herds using molecular data**

**Abstract:** In Brazil, the Guzerá breed (*Bos indicus*) has been intensively used in crosses, leading to reduction in effective population size, which led the FAO (Food and Agriculture Organization) to include this breed as a genetic resource to be preserved. To evaluate and monitor the genetic variability a total of 384 animals were sampled in the Estates of Minas Gerais and Espírito Santo (ca. 10% of the population) and genotyped with 11 microsatellite markers. DNA was extracted from blood samples and its concentration and quality were analyzed by nano spectrophotometry. DNA was amplified by PCR and submitted to capillary electrophoresis in the MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Genotypes were scored using the Fragment Profiler program (GE Healthcare). The Hardy-Weinberg equilibrium was tested using GENEPOP program version 3.4 and heterozygosity was calculated using FSTAT program. A total of 150 alleles were found in the population resulting an average of 13.6 alleles per marker. The lowest number of alleles was found in marker NRDIKM004 (8) and the highest number was found in marker DIK5183 (21). The high observed (0.708) and expected (0.745) heterozygosity suggests the existence of high genetic diversity in the population under study. Most microsatellite loci were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium, except marker DIK4513.

**Keywords:** *Bos indicus*, breeding, inbreeding, heterozygosity, microsatellite

### Introdução

A raça Guzerá (*Bos indicus*) equivale na Índia a Kankrej, sendo criada principalmente em terras baixas e secas, em solos arenosos e sem árvores. Desta forma, a rusticidade do Guzerá foi desenvolvida ao longo dos séculos nas condições adversas da região de origem, o que favoreceu sua adaptação a várias regiões do mundo.

No Brasil, o Guzerá veio com as primeiras importações de zebu, em torno de 1870 e se adaptou de forma satisfatória às condições climáticas brasileiras, revelando sua alta capacidade para produção de carne e leite. O Guzerá foi a raça indiana mais utilizada até 1930 para formação de raças indu-brasileiras. Devido a sua dupla aptidão e rusticidade a raça vem sendo intensamente utilizada em cruzamentos o que leva a redução no tamanho efetivo da população. Essa redução, em conjunto com o valor biológico da raça, fez com que a FAO (*Food and Agriculture Organization*) incluísse, em 1991, o Guzerá como recurso genético a ser preservado. A implantação do Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para leite, em 1994, fez aumentar a preocupação em torno da preservação dos recursos genéticos da raça, pois as metodologias nele empregadas (seleção baseada em teste de progênie e núcleo MOET) aumentam a endogamia, reduzem a introgressão de novas variantes genéticas e aumentam a utilização de touros ou linhagens de maior valor econômico.

Com o objetivo de avaliar e monitorar a variabilidade genética na raça foram selecionados 11 marcadores microssatélites baseados na heterozigosidade e número de alelos dos marcadores. Foram amostrados 10% do total de animais mais representativos da raça, localizados em Minas Gerais e Espírito Santo, totalizando 384 animais.

### Material e Métodos

Amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA. No caso da extração a partir do sangue, foram coletados dois tubos à vácuo (4,5 mL com EDTA), por via endovenosa e através de decantação ou de centrifugação foi obtido um anel de células brancas nesse tubo, que foi retirado com uma pipeta e transferido para microtubos de dois mL. As amostras de sêmen foram centrifugadas para obtenção do *pellet* utilizado para a extração do DNA. O processo de extração de DNA utilizou duas soluções-tampão, sendo a primeira o tampão de lise (sacarose, MgCl, Tris-HCl e Triton X-100), que atua rompendo membranas e liberando todo o conteúdo da célula. A segunda é o tampão de extração (Tris-HCl, EDTA, NaCl, SDS e RNase A), que degrada a membrana nuclear expondo o DNA, além de promover a degradação do RNA. A primeira fase da extração de DNA se inicia com sucessivas lavagens com tampão de lise até a obtenção de um precipitado branco (leucócitos). Este precipitado foi então ressuscitado com 800 uL de tampão de extração e 16 uL de DTT 10% (antioxidante). As amostras foram então mantidas em banho maria a 37°C por duas horas para degradação do RNA total. Para degradar restos celulares e proteínas, adicionou-se 40uL de Proteinase K (20mg/ml), sendo as amostras mantidas a 50°C *overnight*. Durante a segunda fase da extração, ocorre a eliminação de proteínas utilizando fenol e clorofórmio. Adicionou-se uma vez de fenol e clorofórmio e mais duas lavagens apenas com clorofórmio, que atua retirando o fenol e ao mesmo tempo promovendo a desproteínização. Para a precipitação do DNA adicionou-se Acetato de Sódio 3M (NaOAc) e Isopropanol. O acetato de sódio é um sal que atua anulando parcialmente a carga do DNA, que é negativa, e favorecendo assim sua precipitação. O isopropanol é um álcool que desidrata o DNA, fazendo com que este se separe da solução. Logo após as amostras são acondicionadas à temperatura de -20°C por no mínimo duas horas. Na terceira fase de extração é obtido um *pellet* por centrifugação que foi hidratado com Etanol 70%. Após nova centrifugação desprezou-se o sobrenadante. Os *pellets* foram mantidos à temperatura ambiente para secagem por até 30 min e então foram ressuscitados em 500uL de TE (Tris-HCl e EDTA). A quantificação e análise da qualidade do DNA foi feita utilizando o equipamento NanoDrop ND1000.

As amostras de DNA foram amplificadas pela PCR, cujas reações foram preparadas contendo 20 mM Tris-HCl pH 8.3 e 50 mM KCl; de 1,5 a 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, de acordo com o primer; 0,2 mM de dNTPs; 0,5 unidade de Taq polimerase; 0,10 ou 0,20 uM de

primers específicos dos microssatélites analisados. O volume final da reação foi de 10  $\mu$ L e estas foram preparadas em placas de 96 reações sendo posteriormente amplificadas no termociclador ABI9700. O produto da PCR foi submetido à eletroforese capilar no equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare). A precipitação dos fragmentos de DNA oriundos da PCR foi realizada utilizando-se acetato de amônio e etanol 96% e posteriormente foram ressuspensos em água Milli-Q. Para a injeção foram preparadas *multiplex* de PCR, contendo marcadores de diferentes fluoróforos e tamanhos, evitando sobreposição. As análises dos genótipos foram feitas usando o programa *Fragment Profiler* (GE Healthcare). Os 11 marcadores microssatélites utilizados foram: ILSTS093, BM1237, BM7169, BMS2252, JAB8, NRDIKM004, DIK4593, MNS-20, DIK5183, DIK4513, DIK5300, sendo destes distribuídos em três *multiplex*.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado por meio do programa GENEPOP versão 3.4 e a heterozigosidade calculada utilizando o programa FSTAT.

### Resultados e Discussão

Os distintos tipos de marcadores moleculares disponíveis atualmente diferenciam-se por sua tecnologia em revelar quais são as variabilidades em nível de DNA, e assim detectar diferenças entre indivíduos. Os marcadores microssatélites foram utilizados porque são aqueles que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo dentre os marcadores moleculares. Devido a este fato, toda e qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de associação e mapeamento genético. Os microssatélites são muito mais frequentes e distribuídos ao acaso, permitindo maior abrangência do genoma em estudo. Estas e outras características fazem com este tipo de marcador molecular seja ideal para o mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação discriminação de genótipos e estudos de genética de populações.

A análise estatística detectou 15 populações, sendo que os 11 marcadores microssatélites, utilizados neste trabalho, geraram um total de 150 alelos na população amostrada da raça Guzerá, obtendo-se uma média de 13,6 alelos por marcador. O menor número de alelos encontrados foi oito e o maior 21, nos marcadores NRDIKM004 e DIK5183 respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1** - Número de alelos encontrados na população de Guzerá para os marcadores microssatélites

Marcador	Cromossomo	Nº de alelos encontrados
ILSTS093	6	14
BM1237	10	14
BM7169	11	15
BMS2252	12	13
JAB8	15	16
NRDIKM004	20	8
DIK4593	21	10
MNS-20	22	9
DIK5183	25	21
DIK4513	26	17
DIK5300	28	13

A maioria dos locos microssatélites encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto o loco DIK4513. A elevada heterozigosidade observada (0,708) e a esperada (0,745), sugerem a existência de alta diversidade genética na população em estudo (Tabela 2).

**Tabela 2** - Estimativa da heteroziguidade da população de Guzerá

Marcador	Cromossomo	Heteroziguidade observada	Heteroziguidade esperada
ILSTS093	6	0.838	0.798
BM1237	10	0.554	0.553
BM7169	11	0.740	0.742
BMS2252	12	0.864	0.791
JAB8	15	0.752	0.762
NRDIKM004	20	0.695	0.693
DIK4593	21	0.612	0.663
MNS-20	22	0.764	0.806
DIK5183	25	0.749	0.860
DIK4513	26	0.436	0.753
DIK5300	28	0.784	0.778

Vale ressaltar que um dos aspectos mais importantes do estudo da evolução da raça Guzerá é a análise da variabilidade genética das populações e do seu comportamento ao longo das gerações. Esses aspectos procuram descrever a composição genética das populações bem como sua resposta frente à atuação de fatores tais como o tipo de cruzamento, o tamanho da população, mutação, migração e os vários tipos de seleção.

#### **Conclusões**

Os marcadores moleculares microssatélites se mostraram eficientes ferramentas na detecção de polimorfismo nas populações da raça Guzerá. No entanto, outros dez marcadores microssatélites deverão ser analisados visando obter um maior poder de discriminação e conseqüentemente, maior confiabilidade nos dados.

A população estudada demonstrou ter grande variabilidade genética, apesar da ampla utilização de animais de genética superior resultantes dos programas de melhoramento desta raça.

#### **Agradecimentos**

Agradecemos ao apoio oferecido pelo CNPq e pela FAPEMIG. Agradeço à Embrapa Gado de Leite pela oportunidade e confiança e aos amigos do Laboratório de Genética Molecular pelo ótimo ambiente de trabalho.

#### Literatura citada

- FAO. (1992) *The Management of Global Animal Genetic Resources*. FAO Anim. Prod. Health Paper. United Nations, Roma, Italy.
- FAO. (1995) *World Watch List for Domestic Animal Diversity*. 2ed. FAO, Rome, Italy.
- Khatkar, M.S., Thomson, P.C., Tammen, I., Raadsma, H.W. (2004) Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genet. Sel. Evol.*, **36**:163-190.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. p. 999.
- V.M. Penna; V. J. M. Melo; R.L. Teodoro; R.S. Verneque; M.G.C.D. Peixoto. **Situação atual e potencialidades da raça Guzerá na pecuária leiteira nacional**.
- Vercesi Filho, A.E., Faria, F.J.C., Madalena, F.E. et al. (2002) Endogamia e tamanho efetivo populacional na raça Guzerá. In: Reunião Anual da SBZ, 39, 2002, Recife. Anais ... Caucaia-CE : Nordeste Digital Line s/a. CD.