



## VII Simposio Brasileiro de Melhoramento Animal

São Carlos, SP, 10 e 11 de julho de 2008

### Uso de marcadores moleculares como ferramenta no manejo reprodutivo de um rebanho de conservação

Samuel Rezende Paiva<sup>1</sup>, Gabriel Botta Barretto<sup>2</sup>, Carlos José Hoff de Souza<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e-mail:samuel@cenargen.embrapa.br

<sup>2</sup>Estudante Medicina Veterinária, UPIS, e-mail: bibilkis@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Pesquisador da Embrapa Pecuária Sul, e-mail: csouza@cppsul.embrapa.br

**Resumo** – Muitos rebanhos de ovinos apresentam dificuldades de manter um registro zootécnico adequado e, conseqüentemente, um controle total de pedigree do rebanho. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de marcadores moleculares como uma forma de auxiliar o manejo reprodutivo de um rebanho de conservação da raça ovina Crioula Lanada. Foram analisados 11 marcadores microssatélites em 157 animais do núcleo de conservação da raça Crioula Lanada, localizadas na Embrapa Pecuária Sul, Bagé – RS. O rebanho apresentou um média de nove alelos, a heterozigosidade esperada foi 0,7482, a heterozigosidade observada foi de 0,6539 e o índice de consangüinidade ( $F_{IS}$ ) foi de 5,88%. Concomitantemente, dentro do rebanho, foi observada uma média do coeficiente de coancestralidade molecular de 0,3044 e 0,3682 do índice de kinship. As estimativas de coancestralidade médias obtidas pelos locos de microssatélites se mostraram uma excelente ferramenta para o auxilio dos acasalamentos do rebanho de modo que se espera que ocorra uma diminuição média dos níveis de endogamia.

**Palavras-chave:** Manejo Reprodutivo, Microssatélites, *Ovis aries*, recursos genéticos animais

### Use of molecular markers as tool for assist of reproduction management in livestock flocks

**Abstract** – The need of new tools, to assist on the management of rare or endangered breeds of livestock, mainly related to a better orientation on the breeding management. The objective of this study is to confirm the use of molecular markers as tool to promote an adequate reproductive management on a preservation flock of Crioula Lanada Sheep. It was analyzed using 11 microsatellite markers in 157 animals from the preservation flock of Crioula Lanada, located at Embrapa Pecuária Sul, in Bagé-RS. Regarding the total diversity of the flock it was observed a mean of nine alleles, the expected and observed heterozygosity were 0.7482 and 0.6539, respectively and inbreeding index of 5.88%. In addition, it was observed a mean of the Coancestrality coefficient of 0.3044 and a kinship coefficient of 0.3682. The coancestrality coefficient values obtained by microsatellites loci showed to be an excellent tool to assist on the reproduction management and it will be expected a reduction in the average inbreeding of the flock.

**Keywords:** Animal Genetic Resources, microsatellite, *Ovis aries*, reproductive management

### Introdução

O Brasil possui varias raças de animais domésticos que se desenvolveram a partir de outras raças trazidas pelos portugueses e outros povos europeus logo após o descobrimento. Estes animais se adaptaram aos mais variados ambientes brasileiros e hoje são conhecidas como raças naturalizadas, locais ou localmente adaptadas. A partir de 1982 foi criado na Embrapa Pecuária Sul o núcleo de conservação da raça Crioula Lanada. O núcleo foi formado por 36 ovelhas e três carneiros, número que na época representava 15,6% da população conhecida. Com o passar dos anos mais animais foram introduzidos no rebanho.

Para aperfeiçoar o manejo destas raças em conservação, há a necessidade da implantação de um correto controle zootécnico dos rebanhos, principalmente relacionados ao manejo reprodutivo. Em geral, estes rebanhos são compostos por poucos indivíduos, o que aumenta as chances de cruzamento de indivíduos aparentados e, conseqüentemente, a consangüinidade do rebanho. Níveis elevados de endogamia têm como principal efeito a aumento da homozigose, que por sua vez, pode levar ao processo de “Depressão Endogâmica” que pode reduzir sensivelmente a produtividade de um rebanho (Breda et al; 2004). Programas de conservação têm como um dos objetivos principais manter a variabilidade genética dos rebanhos por meio da redução dos efeitos da consangüinidade.

As situações acima descritas somadas ao aumento das necessidades de produtividade na área agropecuária tornaram-se necessário a implantação de novas ferramentas para auxiliar o manejo zootécnico das populações. Os marcadores moleculares podem auxiliar na identificação de indivíduos geneticamente semelhantes principalmente quando não existe um rigoroso controle zootécnico dentro do rebanho, de maneira a auxiliar na escolha dos animais permanecerem no rebanho e até mesmo subsidiar acasalamentos, de modo a desenvolver um “manejo genético” desta População. No Brasil poucos estudos foram desenvolvidos com esta temática (Spritze et al, 2003).

Dada à importância dos níveis de endogamia sobre as características produtivas e reprodutivas e a possibilidade do uso de marcadores moleculares no auxílio do controle zootécnico este trabalho tem como objetivo validar locos de microssatélites como uma forma de promover um manejo reprodutivo adequado em um rebanho de conservação.

### Material e Métodos

As amostras de DNA foram obtidas a partir de amostras de sangue de 157 ovinos, pertencentes ao Núcleo de Conservação da raça Crioula Lanada, localizada na Embrapa Pecuária Sul, Bagé – RS, sendo 10 carneiros e 147 ovelhas.

Para as reações de PCR foram usados 11 locos de microssatélites (Tabela 1) que foram amplificados em três sistemas de *multiplex*. As reações de PCR foram realizadas a partir da utilização do Kit Qiagen Master Mix usando o programa de amplificação recomendado pelo fabricante.

Os produtos amplificados foram submetidos ao seqüenciador automático (ABI3700) com eletroforese capilar a partir da detecção das fluorescências específicas contidas nos oligonucleotídeos (primers) usados. A leitura dos alelos e posterior genotipagem de cada loco foi realizada a partir dos softwares GeneScan e Genotyper (Applied Biosystems).

Tabela 1- Locos usados e seus respectivos índices de diversidade genética obtidos para um rebanho da raça Crioula Lanada. Número de alelos (A), número de indivíduos analisados por loco (N), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), Conteúdo de informação polimórfica (PIC), probabilidade de exclusão de paternidade quando se conhece um dos pais e possui três genótipos (PE1), probabilidade de exclusão de paternidade quando não se conhece um dos pais e dois genótipos (PE2).

Loco	A	N	Ho	He	PIC	PE1	PE2
<b>D5S2</b>	7	154	0,656	0,803	0,769	0,579	0,401
<b>ILSTS11</b>	6	154	0,734	0,755	0,712	0,649	0,472
<b>INRA35</b>	11	156	0,840	0,824	0,797	0,353	0,175
<b>INRA63</b>	9	152	0,697	0,711	0,666	0,691	0,517
<b>MAF214</b>	3	143	0,378	0,530	0,426	0,860	0,766
<b>OARAE129</b>	13	152	0,395	0,774	0,748	0,593	0,411
<b>OARCP49</b>	11	150	0,567	0,562	0,584	0,770	0,617
<b>OARFCB304</b>	10	149	0,745	0,832	0,808	0,509	0,337
<b>OARHH35</b>	11	155	0,813	0,829	0,806	0,508	0,337
<b>OLADRB</b>	12	142	0,852	0,862	0,843	0,445	0,284
<b>SPS113</b>	6	149	0,517	0,660	0,615	0,749	0,574

Após a análise das frequências alélicas para todos os locos, foram feitas análises prévias dos parâmetros genéticos populacionais do rebanho de modo a obter informações para um melhor direcionamento das análises, para estas análises foram utilizados os programas Molkin (Gutiérrez & Goyache, 2004) e Cervus.

### Resultados e Discussão

Em termo de diversidade total do rebanho foi observada uma média de 9 alelos, uma heterozigosidade esperada de 0,7482 uma heterozigosidade observada de 0,6539 e um índice de consangüinidade ( $F_{IS}$ ) de 0,0588. Para corroborar com este resultados, foi observada uma média no coeficiente de coancestralidade molecular e distância média de kinship de 0,3044 e 0,3682, respectivamente. Os valores de coancestralidade molecular média nas fêmeas variam de 0,1941 a 0,3353 enquanto dos machos variaram de 0,2212 a 0,2602. O índice de fixação entre as populações de fêmeas ( $F_{st}$ ) foi de 0,0389. As fêmeas foram organizadas em ordem crescente de coancestralidade média e depois foram divididas em cinco grupos (famílias) de tamanho semelhante (três grupos de vinte e nove animais e dois grupos de trinta animais). Desta forma, foram formados três grupos de coancestralidade molecular mediana (em torno de 0,24), um com baixo valor (0,2160) e outro com maior valor (0,2877).

Após a definição das famílias foi realizado o calculo do índice de coancestralidade molecular média entre as cinco famílias de fêmeas e os dez reprodutores do rebanho para definição dos acasalamentos (Tabela 2). Foram escolhidos reprodutores que apresentavam menores valores de coancestralidade molecular média em relação a uma determinada família de fêmeas. Prioridade de reprodutores foi dada às populações com maiores valores de coancestralidade molecular (Tabela 2). Ou seja, o reprodutor 4 apresentou, em geral, os menores valores de coancestralidade média com todas as famílias de fêmeas, contudo, ele foi selecionado para ser usado na população 5 que possui o maior valor de coancestralidade molecular média de todas as famílias de fêmeas.

Tabela 2- Coancestralidade molecular média entre as cinco famílias de fêmeas e os dez reprodutores da raça ovina Crioula Lanada. Em negrito, os cruzamentos sugeridos para serem realizados.

	Família Fêmeas 1	Família Fêmeas 2	Família Fêmeas 3	Família Fêmeas 4	Família Fêmeas 5
<b>Reprodutor 1</b>	0,2132358	0,2535963	0,2353448	<b>0,2316919</b>	0,2284849
<b>Reprodutor 2</b>	0,2134535	<b>0,2321404</b>	0,255721	0,2456145	0,2295034
<b>Reprodutor 3</b>	0,2396552	0,2529454	<b>0,2507663</b>	0,2515278	0,2468055
<b>Reprodutor 4</b>	0,207062	0,211503	0,2288401	0,2198485	<b>0,2146212</b>
<b>Reprodutor 5</b>	0,2029258	0,2703065	0,2202978	<b>0,2336027</b>	0,2237205
<b>Reprodutor 6</b>	0,2264368	0,2617816	<b>0,2543103</b>	0,2605303	0,2707997
<b>Reprodutor 7</b>	0,2144113	0,2454284	0,2272727	0,2279798	<b>0,2088721</b>
<b>Reprodutor 8</b>	0,2405608	<b>0,2478144</b>	0,2758621	0,2454882	0,2519192
<b>Reprodutor 9</b>	<b>0,2099181</b>	0,2528387	0,2677116	0,2579209	0,255665
<b>Reprodutor 10</b>	<b>0,2141318</b>	0,2830973	0,2593904	0,2880952	0,328373

Álvarez, et al (2007), estudando como modelo uma raça espanhola de ovino, observaram que a utilização de marcadores microssatélites pode ser uma ferramenta adicional eficaz para o auxílio do manejo de rebanhos apenas quando o pedigree dos animais é desconhecido ou incompleto. Outros autores obtiveram resultados semelhantes (ex., Fernández, et al., 2005).

### Conclusões

Os resultados obtidos com locos de microssatélites demonstraram a possibilidade da formação de uma estratégia de acasalamento de forma a otimizar os níveis de endogamia dentro de rebanhos. Desta forma esta estratégia poderá ser utilizada como ferramenta adicional tanto em rebanhos de conservação como em comerciais principalmente naqueles que ainda não possuem um completo controle genealógico de seus animais. Os resultados serão validados após a genotipagem da progênie oriunda destes cruzamentos para verificar se houve um incremento dos índices populacionais na geração seguinte.

### Literatura Citada

- ÁLVAREZ, I.; ROYA, L.J.; GUTIÉRREZ, J. P.; FERNÁNDEZ, I.; ARRANZ, J.J.; GOYACHE, F. Relationship between genealogical and microsatellite information characterizing losses of genetic variability: empirical evidence from the rare Xalda sheep breed. **Livestock Science**, 2007.
- BREDA, F.C.; EUCLYDES, R.F.; PEREIRA, C.S.; TORRES, R. de A.; CARNEIRO, P.L.S.; SARMENTO, R.L.; FILHO, R. de A. T.; MOITA, A.K.F. Endogamia e limite de seleção em populações selecionadas obtidas por simulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.2017-2025, 2004.
- EGITO, A.A.; MARIANTE, A. da S.; ALBUQUERQUE, M. do S. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**, v.51, p.39-52, 2002.
- FERNÁNDEZ, J.; VILLANUEVA, B.; PONG-WONG, R.; TORO, M.A. Efficiency of the use of pedigree and molecular marker information in conservation programs. **Genetics**, v.170, p.1313-1321, 2005.
- GUTIÉRREZ, J.P.; GOYACHE, F.A **Computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry**. Universidad Complutense de Madrid, 2004.
- SPRITZE, A.; EGITO, A.A.; MARIANTE, A. da S.; McMANUS, C. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.10, p.1157-1164, 2003.