

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA POR ANÁLISE DE ADN DAS RAÇAS OVINAS MERINA BRANCA E MERINA PRETA

Relatório realizado no âmbito do PRODER - Subacção n.º 2.2.3.2. "Componente Animal" - Acção
2.2.3 "Conservação e Melhoramento de Recursos Genéticos"

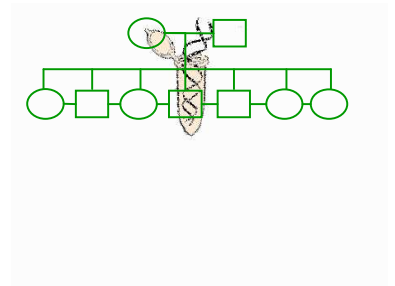
Maria do Mar Oom

2013

Maria do Mar Oom

LABORATÓRIO DE GENÉTICA APLICADA

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
Departamento de Biologia Animal/Centro de Biologia Ambiental
Campo Grande, C2- 3º Piso
1749-016 Lisboa
mmoom@fc.ul.pt
Tel: +351 7500000; Fax: +351 7500028



INTRODUÇÃO

A caracterização genética por análise de ADN é uma acção incluída no PRODER – Subprograma 2 “Gestão Sustentável do Espaço Rural”, Medida 2.2 “Valorização de Modos de Produção”, Subacção n.º 2.2.3.2. “Conservação e Melhoramento de Recursos Genéticos-Animal” - e que visa, entre outros aspectos, a determinação de parâmetros que revelem a variabilidade genética das populações/raças envolvidas com base na análise de marcadores genéticos previamente seleccionados.

Esta acção é de extrema importância uma vez que, sob o ponto de vista genético, os programas de conservação dos Recursos Genéticos Animais (RGA) têm como principal objectivo travar o aumento da consanguinidade nas populações e manter a variabilidade genética em níveis elevados para que as mesmas possam subsistir e evoluir face às pressões de selecção a que podem estar submetidas e às constantes alterações ambientais e condições de manejo particulares (e.g. Allendorf and Luikart 2007), incluindo processos de cruzamento entre raças num passado próximo ou mais recuado no tempo.

Nas últimas décadas, os RGA, em geral, têm sido alvo de uma prática de selecção cada vez mais intensiva, no sentido de aumentar a produtividade e o progresso genético, de forma a que melhor se adequem às necessidades de mercado, sem que seja acautelada, na maioria dos casos, a preservação da diversidade genética das populações. Esta pressão de selecção tem levado, muito frequentemente, a um aumento da consanguinidade e à conseqüente erosão do património genético existente.

É importante realçar que, tendo em vista a manutenção da variabilidade genética a longo prazo, diversos estudos têm demonstrado ser mais importante evitar a erosão dessa variabilidade dentro de cada raça do que tentar preservar a raça a todo o custo, uma vez que, numa dada região geográfica, a variabilidade intra-racial tem-se revelado muito mais significativa do que a variabilidade inter-racial (Gama, 2010). No entanto, e numa estratégia global de conservação, dever-se-á investir na garantia da sobrevivência das raças consideradas “em risco”, assegurando, simultaneamente, a manutenção da variabilidade genética intra-

racial. É importante perceber se a crescente eficácia dos programas de selecção não está a comprometer a desejada minimização da erosão genética intra-racial, inevitável, por si só, em populações de efectivo muito reduzido.

Há muito que se reconhece que uma avaliação detalhada da variabilidade genética com base em dados moleculares, na maioria dos casos baseada na variabilidade de um painel alargado de microssatélites (marcadores neutros disseminados pela molécula de ADN), é essencial para um gestão efectiva dos RGA, embora deva ser complementada por outros tipos de avaliações, nomeadamente a análise demográfica com base em dados genealógicos (também esta objecto de uma Acção incluída no PRODER) (e.g. Groeneveld e tal., 2010).

As raças ovinas Merina Branca e Merina Preta, objecto deste relatório, foram consideradas “em risco” pelo Programa PRODER, revisto em 2012.

MATERIAL E MÉTODOS

Este relatório centra-se na análise genética de 50 reprodutores das raças ovinas Merina Branca e Merina Preta (de acordo com que consta no Plano de Conservação/Melhoramento Genético Animal aprovados para ambas as raças). Seleccionaram-se animais pertencentes a rebanhos fundadores de ambas as raças, tendo a escolha incidido nos indivíduos mais velhos, de ambos os sexos, supostamente não aparentados.

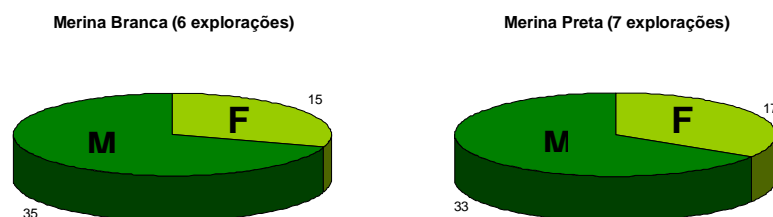


Figura 1. Amostras utilizadas em ambas as raças, com indicação do sexo (M: Macho; F: Fêmea) e do nº de explorações incluídas.

O perfil genético dos animais amostrados foi determinado com base na análise de um painel de 19 *loci* (microsatélites) que são utilizados por rotina no laboratório *Xenética Molecular - Xenética Fontao* (Lugo, Espanha), nos quais 10 correspondem aos 14 que foram incluídos no painel recomendado pela ISAG¹ para a realização de testes de paternidade nesta espécie (a **bold**) (ISAG 2012 Sheep and Goats Workshop Report, ISAG Conference, Cairns, Austrália, 2012, <http://www.isag.us/committees.asp>), estando alguns incluídos no painel recomendado pela FAO para caracterização de RGA_n (em itálico) (FAO, 2011):

CSRD247, FCB20, HSC, ILSTS005, ILSTS008, ILSTS011, INRA006, INRA023, INRA049, INRA063, INRA132, INRA172, MAF065, MAF214, McM042, OarAE129, OarCP49, SPS113, SPS115

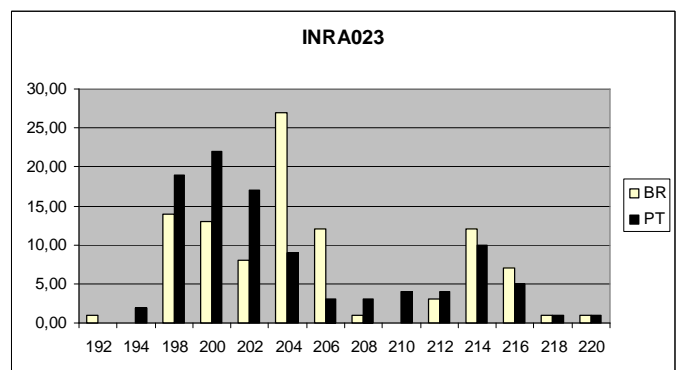
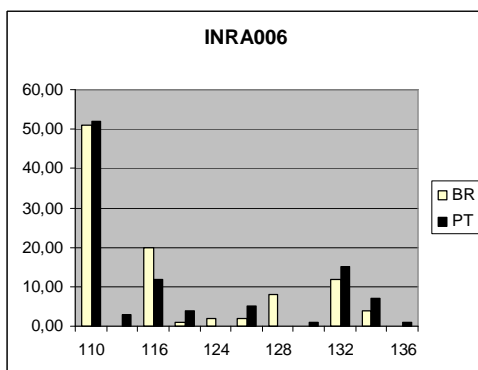
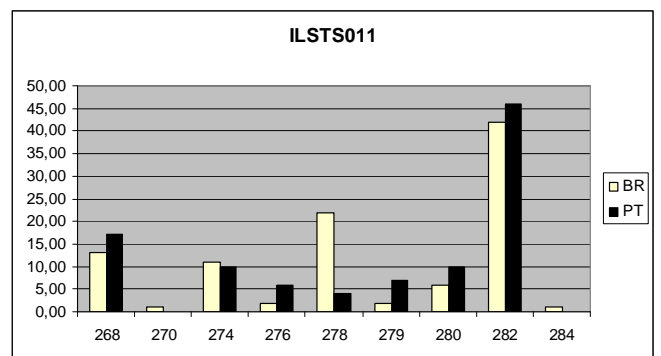
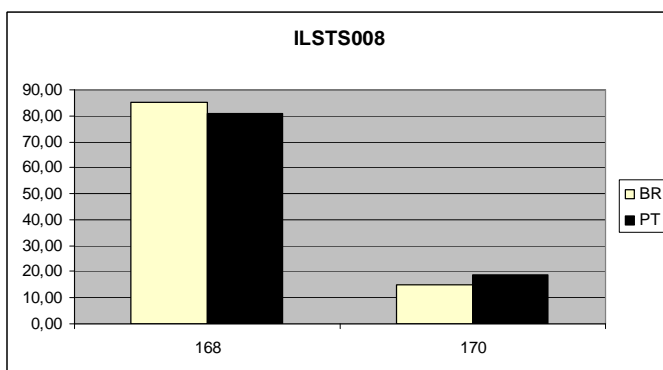
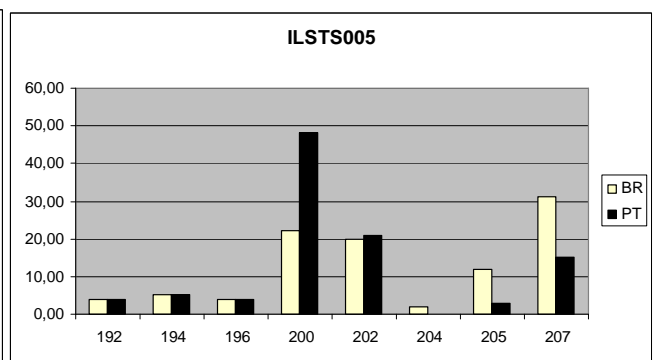
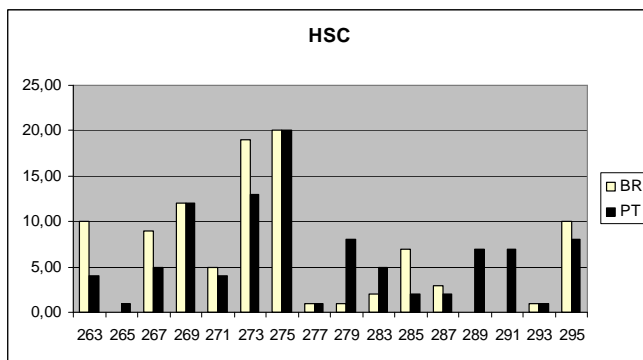
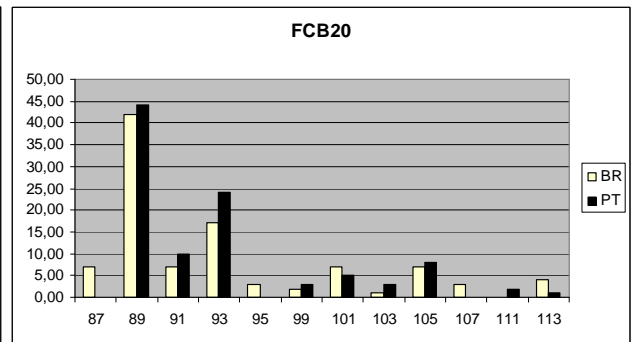
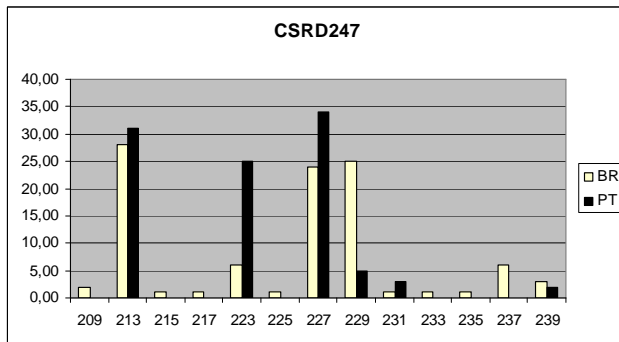
Os dados assim obtidos foram analisados através de *software* específico (CERVUS, Kalinowski, *et al.*, 2007, Genepop, Raymond and Rousset, 1995 e FSTAT (Goudet, 2002) de modo a avaliar os parâmetros genéticos mais usuais neste tipo de estudos: riqueza alélica ou número de alelos (NA), frequências alélicas, heterozigotia observada (H_o) (proporção de heterozigóticos), heterozigotia esperada (H_e) (probabilidade de dois alelos, tirados ao acaso numa população, serem diferentes), desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), conteúdo de informação polimórfica (PIC) (medida de avaliação do poder informativo de um determinado *locus*), probabilidade de exclusão de paternidade com os dois progenitores conhecidos (PE) e coeficiente de deficiência de heterozigóticos (F_{is}).

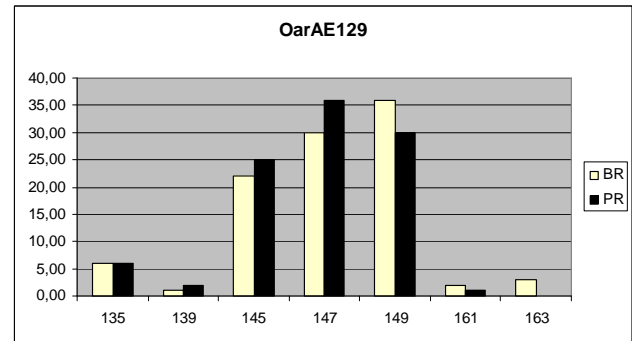
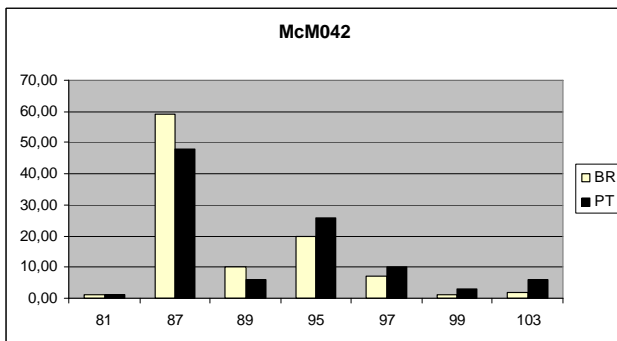
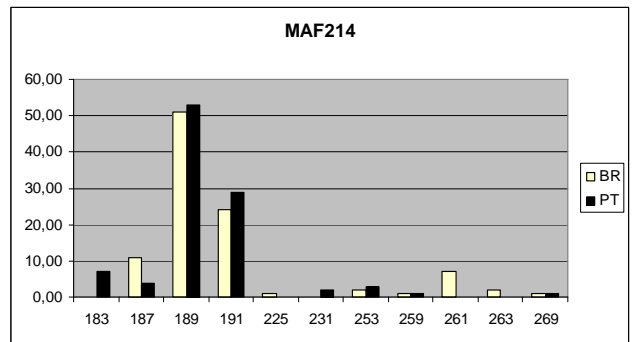
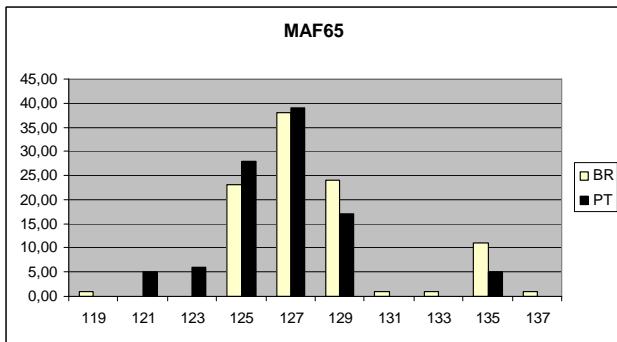
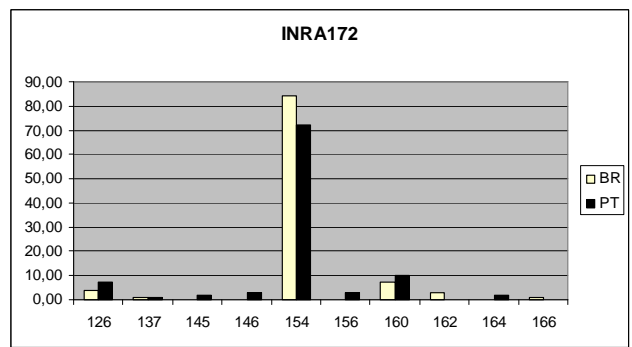
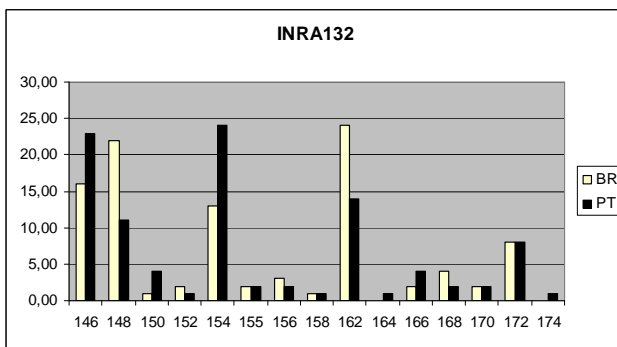
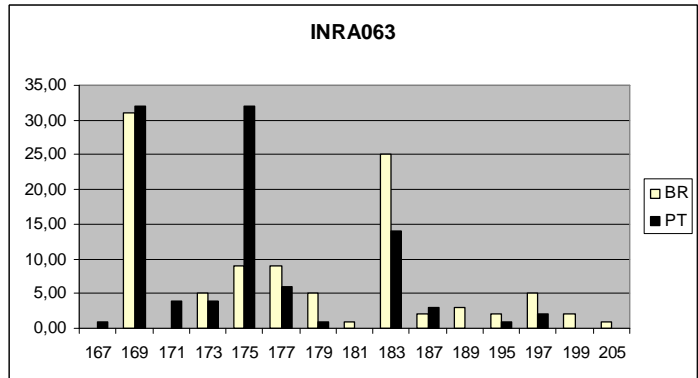
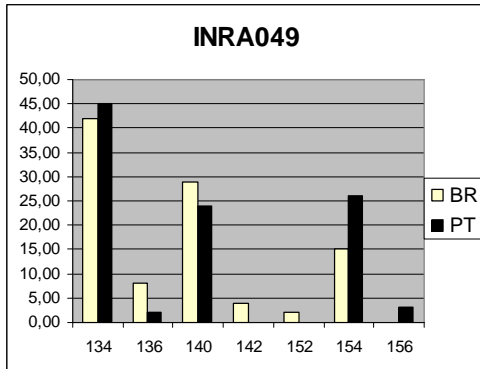
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste relatório, como já referido, foram analisados os genótipos de 50 indivíduos de cada raça, considerados como fundadores dos efectivos existentes, com base na análise de 19 microsatélites.

As frequências alélicas de cada *locus* analisado em cada raça estão representadas na Figura 2, sob a forma de histogramas.

¹ Internacional Society for Animal Genetics (<http://www.isag.us/>)





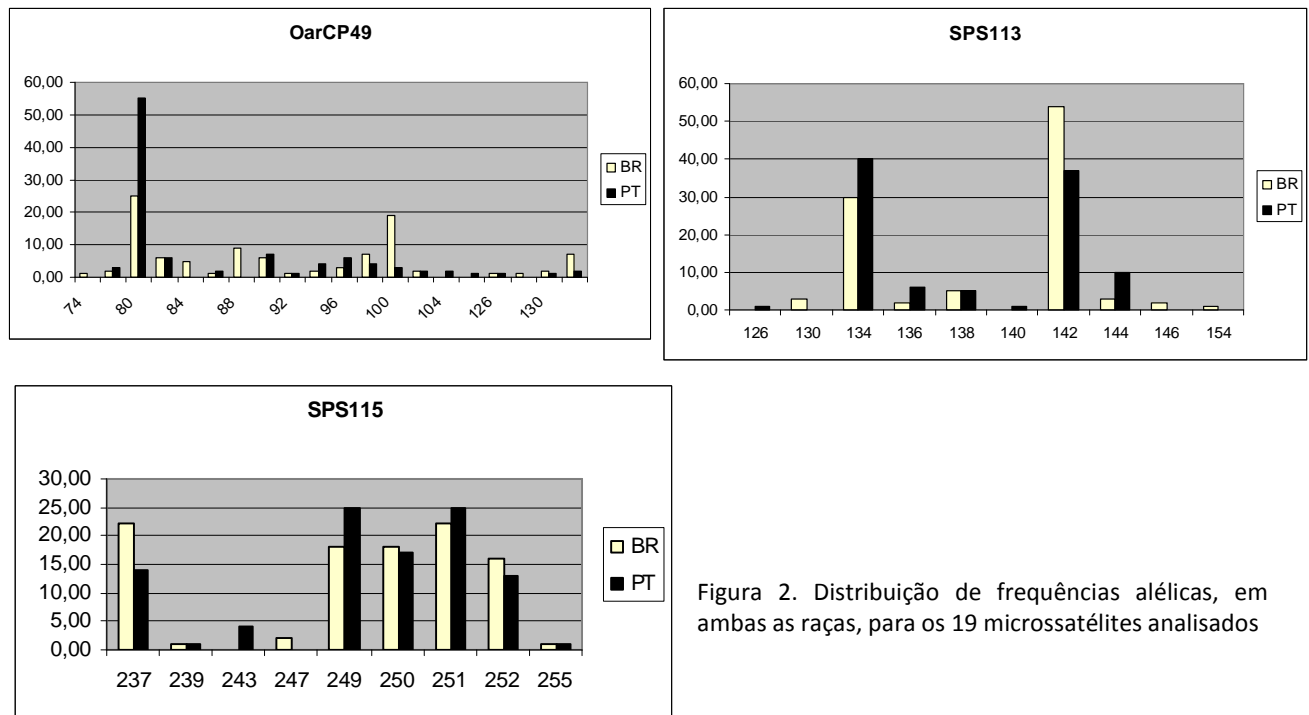


Figura 2. Distribuição de frequências alélicas, em ambas as raças, para os 19 microssatélites analisados

Para ambas as raças, em geral, verifica-se uma frequência mais elevada para os mesmos alelos, se bem que se evidenciem alguns alelos exclusivos para cada uma delas, embora em baixa frequência e, por isso, em risco de se perderem para sempre em gerações futuras. Esta elevada diversidade genética nas duas raças evidencia-se, também, na Tabela 1, nomeadamente através dos valores obtidos para a riqueza alélica em cada *locus* (NA) e o respectivo valor médio, assim como nos valores encontrados para a heterozigotia esperada (He). Estes valores enquadram-se dentro dos limites obtidos para os mesmos parâmetros em estudos realizados em raças ovinas portuguesas, aproximando-se alguns dos valores superiores indicados, em particular no que respeita à raça Merina Branca e comparativamente com outras raças produtoras de lã incluídas nesses trabalhos. Efectivamente, Russo-Almeida (2007) aponta um intervalo de 6,9 - 9,1 para os valores de MNA (média de NA), 0,729 - 0,782 para He e 0,663 - 0,747 para Ho, na análise de 20 microssatélites em 14 raças, incluindo a Merina Branca e a Merina Preta. Já Santos-Silva *et al.* (2008), na análise de 25 microssatélites em 6 raças portuguesas de ovinos de lã grossa, referem um intervalo de 6,4 - 9,1 para o MNA, 0,37 - 0,86 para He e 0,37 - 0,87 para Ho. Não se encontraram desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg para os *loci* analisados.

Locus	NA		PIC		He		Ho		% Homozigóticos	
	BR	PT	BR	PT	BR	PT	BR	PT	BR	PT
CSR247	13	6	0,763	0,671	0,800	0,729	0,720	0,760	28	24
FCB20	11	9	0,751	0,694	0,779	0,735	0,820	0,640	18	36
HSC	13	16	0,860	0,888	0,881	0,906	0,900	0,900	10	10
ILSTS005	8	7	0,766	0,660	0,803	0,703	0,700	0,620	30	38
ILSTS008	2	2	0,222	0,260	0,258	0,311	0,260	0,300	74	70
ILSTS011	9	7	0,709	0,702	0,749	0,737	0,700	0,700	30	30
INRA006	8	9	0,642	0,656	0,683	0,689	0,720	0,680	28	32
INRA023	12	13	0,833	0,846	0,858	0,869	0,820	0,860	18	14
INRA049	6	5	0,662	0,612	0,716	0,678	0,700	0,520	30	48
INRA063	13	11	0,795	0,734	0,824	0,775	0,900	0,740	10	26
INRA132	13	15	0,822	0,829	0,849	0,855	0,860	0,800	14	20
INRA172	6	8	0,276	0,446	0,290	0,469	0,280	0,480	72	52
MAF214	9	8	0,623	0,574	0,671	0,633	0,660	0,620	34	38
MAF065	8	6	0,688	0,690	0,740	0,739	0,760	0,860	24	14
McM042	7	7	0,556	0,642	0,602	0,691	0,520	0,600	48	40
OarAE129	7	6	0,680	0,661	0,734	0,721	0,700	0,760	30	24
OarCP49a	18	16	0,859	0,667	0,880	0,685	0,760	0,660	24	34
SPS113	8	7	0,557	0,633	0,619	0,694	0,680	0,720	32	28
SPS115	8	8	0,784	0,780	0,820	0,816	0,820	0,800	18	20
Média	9.42±3.6	8.74±3.8	0,676	0,666	0,714±0,04	0,707±0,03	0,699±0,02	0,685±0,02	30,11	31,47

Tabela 1 – Parâmetros genéticos obtidos para os 19 *loci* analisados em ambas as raças: Número de Alelos (NA), Heterozigotia Esperada (He), Heterozigotia Observada (Ho), % de Homozigóticos ((1-Ho)x100) e Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC).

Os valores de PIC revelaram que os microssatélites utilizados são detentores de uma elevada informação polimórfica, embora ligeiramente inferiores aos valores encontrados por Russo-Almeida (2007) para as mesmas raças (BR – 0.731; PT – 0.728), conduzindo a uma probabilidade de exclusão de falsas paternidades (PE) de 100%, tornando o painel utilizado perfeitamente eficaz em controlos de filiação (Tabela 2).

A título comparativo, todos os parâmetros avaliados apresentaram valores bastante superiores aos encontrados na raça equina Sorraia, criticamente ameaçada, para um conjunto de 22 microssatélites, (NA- 3.3, Ho - 0.450, He - 0.465, PIC - 0.415) (Luís *et al.*, 2007).

Locus	PE	
	BR	PT
CSRD247	78,4	64,9
FCB20	80,0	71,8
HSC	90,2	93,4
ILSTS005	78,7	67,4
ILSTS008	18,6	21,1
ILSTS011	72,9	73,5
INRA006	66,0	69,2
INRA023	87,3	88,7
INRA049	65,6	57,4
INRA063	83,6	75,6
INRA132	85,9	87,0
INRA172	28,4	47,2
MAF214	63,0	56,6
MAF065	67,8	69,1
McM042	56,0	64,8
OarAE129	54,5	63,4
OarCP49a	90,9	74,1
SPS113	54,5	62,2
SPS115	79,9	79,8
TOTAL	100,0	100,0

Tabela 2. Valores de PE para os 19 loci analisados em ambas as raças.

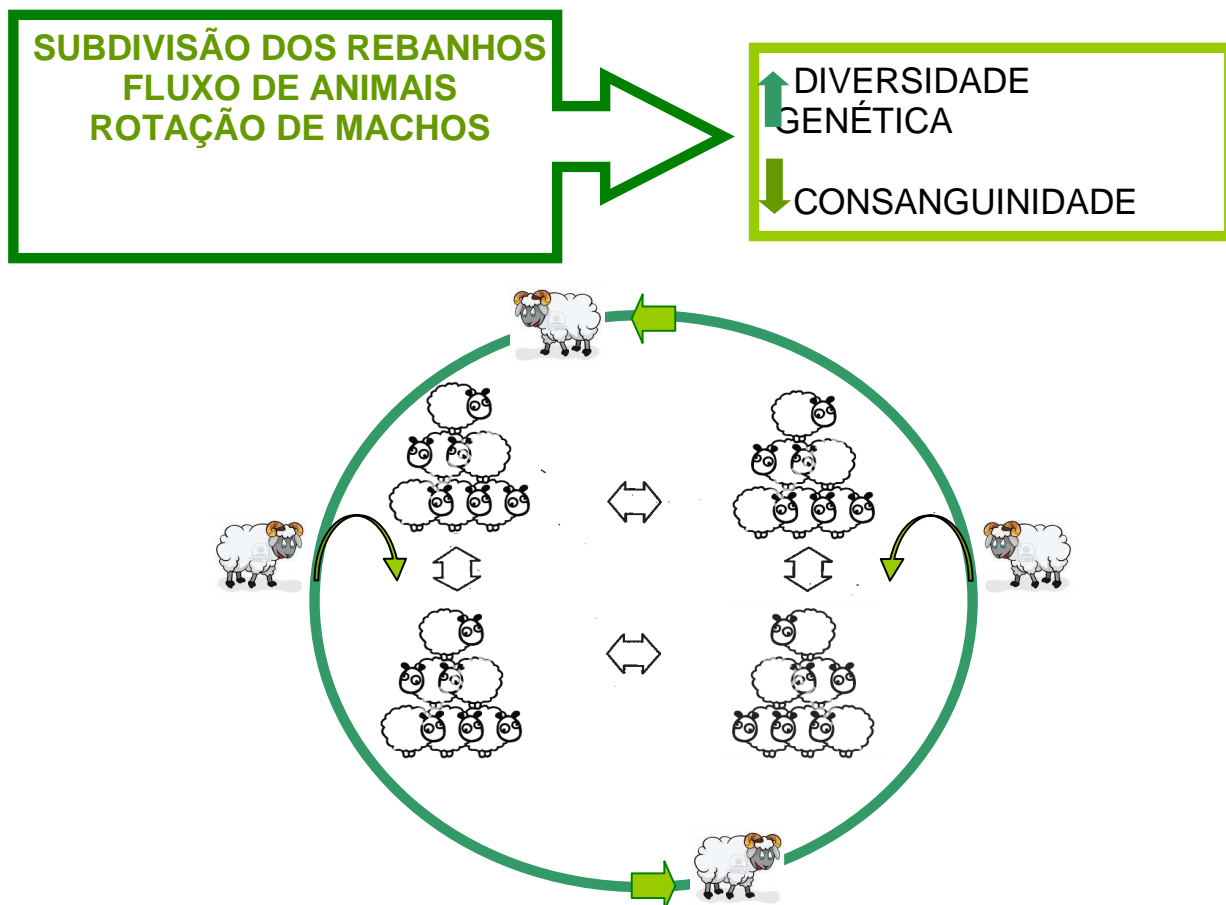
Locus	F _{is} BR	F _{is} PT
CSRD24	0.101	-0.043
FCB20a	-0.053	0.130
HSCa	-0.022	0.007
ILSTS0	0.129	0.120
ILSTS0	-0.010	0.035
ILSTS0	0.066	0.050
INRA00	-0.054	0.014
INRA02	0.044	0.011
INRA04	0.022	0.235
INRA06	-0.094	0.046
INRA13	-0.013	0.065
INRA17	0.034	-0.024
MAF214	0.016	0.021
MAF65a	-0.027	-0.165
McM042	0.138	0.132
SPS113	-0.099	-0.038
SPS115	0.000	0.020
Média	0.021	0.031*

Tabela 3. Valores de F_{is} para os 19 loci analisados em ambas as raças (de acordo com Weir e Cockerham, 1984)

Para avaliar o nível de consanguinidade nas duas raças analisadas recorreu-se ao cálculo do parâmetro F_{is} (coeficiente de deficiência de heterozigóticos, que indica a correlação entre alelos dentro dos indivíduos, relativamente aos da respectiva população) (Tabela 3). Na sua maioria, sobretudo na raça Merina Preta, os valores obtidos foram positivos, indicando um défice de heterozigóticos e denunciando, assim, a existência de algum índice de consanguinidade. No entanto, e no que se refere aos valores médios apurados para cada raça, apenas na raça Merina Preta esse desequilíbrio apresenta algum significado estatístico (*), embora baixo ($p < 0.05$).

Sendo a amostra considerada neste relatório constituída apenas por animais tidos como fundadores e, supostamente, não relacionados entre si, é natural a análise não revelar a existência de níveis de consanguinidade muito significativos. Este facto é realçado quando comparamos os valores de F_{is} encontrados por Russo-Machado (2007) para estas mesmas raças, com base numa amostra que se pretendeu tão representativa quanto possível da população existente, mas em que se evitou a

inclusão de animais relacionados entre si: 0.045 para a raça Merina Branca e 0.125 para a raça Merina Preta, valores superiores aos apurados para as amostras incluídas no presente relatório. A selecção intensiva e o uso de poucos machos reprodutores pode conduzir a um aumento rápido da consanguinidade e à perda de variabilidade genética numa dada raça, o que se pretende evitar num programa de conservação e melhoramento. Nesse sentido, a prática de uma rotação intensiva de carneiros entre os vários rebanhos, e a utilização de um maior número possível destes animais entre os disponíveis, será uma boa estratégia para salvaguarda da variabilidade genética existente em ambas as raças.



Em análises posteriores, com base em amostras representativas da variabilidade actual das duas raças, será fundamental avaliar o *coeficiente de parentesco médio molecular* de cada indivíduo, que nos indicará, dentro de cada população, quais os indivíduos prioritários para a reprodução no sentido

de uma maior retenção da variabilidade genética existente e de minimizar a consanguinidade. Estão já disponíveis programas informáticos capazes de nos facultar essa informação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allendorf, F. W., G. Luikart (2007). *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing, Malden, MA, USA.

FAO (2011). *Molecular genetic characterization of animal genetic resources*. FAO Animal Production and Health Guidelines. No. 9. Rome. Italy.

Gama, L.T. (2010). Raças em risco vs. genes em risco. *Congresso de Ciências Veterinárias (Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, 2002)*, SPCV, Oeiras, 10-12 Out., pp. 127-128

Goudet, J. (2002). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2) [Internet]. Available from: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.

Kalinowski, S.T., Taper, M.L. , Marshall, T.C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1006. [doi: 10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x)

Luís, C., Cothran, E.G., Oom, M.M. (2007). Inbreeding and genetic structure in the endangered Sorraia horse breed: implications for its conservation and management. *J.Hered.*, 98: 232–237.

Raymond, M., Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered.* 86:248–249.

Russo-Almeida, P.A. (2007). Diversidade genética e diferenciação das raças portuguesas de ovinos com base em marcadores de DNA – microssatélites: uma perspectiva de conservação. Dissertação de Doutoramento. UTAD, Vila Real, Portugal.

Santos-Silva, F., Ivo, R.S., Sousa, M.C.O., Carolino, M.I., Ginja, C., Gama, L.T. (2008). Assessing genetic diversity and differentiation in Portuguese coarse-wool sheep breeds with microsatellite markers. *Small Ruminant Research*, 78: 32–40.

Weir B.S., Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38: 1358–1370.