

DIVERSIDADE GENÉTICA EM CAPRINOS LOCALMENTE ADAPTADOS NO BRASIL UTILIZANDO O BEADCHIP 50K

Moura J.O.^{1*}, Campelo J. E.G.¹, Bajay M.M.², Costa M.S.¹,
Cavalcante D.H.¹, Araújo A.M.³

¹Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portella. UFPI. *jeaneprofessora@hotmail.

²Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da Universidade Estadual de São Paulo - USP. São Paulo. Brasil.

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Meio Norte. Teresina. Piauí. Brasil

RESUMO

Foram estimados os parâmetros populacionais com objetivo de avaliar a variabilidade genética do rebanho de conservação da raça Marota através de *BeadChips* de SNPs. Amostras de sangue de 76 caprinos Marota, pertencentes ao Núcleo de Conservação da Embrapa foram coletadas e enviadas ao laboratório privado para genotipagem utilizando o *BeadChip* de Caprino (*Illumina* Inc., San Diego, California). Do conjunto de dados submetidos ao controle de qualidade, 83,92% dos SNPs permaneceram nas análises estatísticas. O rebanho de conservação genética da Embrapa Meio Norte apresentou valores de Heterozigidade observada (H_o) igual a 0,3819 e Heterozigidade esperada (H_e) igual a 0,3797. Adicionalmente, a análise mostrou índice de fixação próximo de zero ($F_{IS} = -0,00265$), indicando variação dos SNPs dentro da população. Os resultados indicam que o estado de conservação do núcleo pode ser monitorado por meio deste microarranjo de *BeadChip*.

Palavras chave: Conservação; SNP; Marcadores moleculares; Marota.

GENETIC DIVERSITY IN BRAZILIAN LOCAL ADAPTED GOATS USING 50K BEADCHIP

ABSTRACT

Estimation of population parameters through *BeadChips* SNPs was applied to evaluate the genetic variability loss in the Embrapa's nucleus of Marota local breed. The blood sample of 76 Marota goats of the Embrapa's Conservation Nucleus were collect and then sent to genotyping in a private laboratory, using the *Illumina Goat BeadChip* (Illumina Inc., San Diego, California). The quality control of the data set showed that 83.92% of the SNPs remain for the statistics analysis. The genetic conservation herd of Embrapa Meio Norte revels Heterozygosity observed (H_o) equal to 0.3819 and Heterozygosity expected (H_e) equal to 0.3797 values . In addition, the analysis showed fixation index near zero ($F_{IS} = -0.00265$), indicating existence of variation in the SNPs within the population. The results show that the nucleus conservation status can be monitored by *BeadChip* microarray.

Keywords: Conservation; SNP; Molecular markers; Marota.

INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta raças de animais domésticos originados a partir de animais trazidas pelos portugueses na época do Brasil colônia. Ao longo do tempo esses animais foram submetidas à seleção natural em diferentes ambientes, desenvolvendo características adaptadas a eles (Barros et al., 2011; Mariante et al., 2011), passando a ser conhecidas como raças “crioulas”, “locais” ou “naturalizadas”. Atualmente a maioria dessas raças encontra-se ameaçada de extinção, principalmente devido a cruzamentos indiscriminados com animais de raças exóticas, que passaram a ser importados no final do século XIX (Mariante et al., 2011). Nessa situação encontram-se os caprinos da raça Marota, nativa do semiárido do Nordeste brasileiro, se apresenta como fonte de genes favoráveis a se adequar às adversidades desse ecossistema, portanto deve merecer atenção por ser considerado material genético importante para manutenção da biodiversidade da espécie no país (Araújo et al., 2009). A conservação e o melhoramento genético de animais dependem da diversidade da espécie considerada, sendo que a diversidade é resultado da variabilidade entre raças (interracial) e dentro de raças (intrarracial). A esse respeito, é importante o conhecimento do número de indivíduos da raça e sua variabilidade, caso haja indícios de risco de extinção, pois essas informações são indispensáveis para o gerenciamento do futuro da raça (Machado et al., 2008).

No estudo da variabilidade genética das populações as características usadas como marcadores podem ser fenotípicas ou moleculares (Machado et al., 2008). Os marcadores moleculares surgiram como uma ferramenta para estudos genéticos (Curi et al., 2013). Dentre estes, os marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) caracterizam-se por apresentar mutações em base única na cadeia de bases nitrogenadas, normalmente são bialélicos, podem ser encontrados em regiões codificadoras ou com funções regulatórias de genes, são abundantes e apresentam distribuição homogênea pelo genoma. Plataformas para detecção de milhares a centenas de milhares dessas variações no DNA (*Chips* de SNPs de alta densidade) foram criadas e estão sendo utilizadas (Pereira et al., 2013). Em 2010 o IGGC (*International Goat Genome Consortium*) criou um *Chip* Internacional de SNP para caprino, constituído por 53.347 SNPs igualmente espaçados e segregando com alta a moderada frequência nas raças Alpina, Boer, Crioulo, Katjang, Saanen e Savanna (Tosser-Klopp et al., 2014). Diante do exposto, objetivou-se avaliar esta plataforma de microarranjos de SNPs para estimar a diversidade genética do rebanho do Núcleo de Conservação da raça Marota no Estado do Piauí.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com normas do comitê de ética da UFPI. Foram genotipados 69% dos 111 animais pertencentes ao Núcleo de Conservação da raça caprina Marota, mantido pela Embrapa Meio Norte no município de Castelo-PI. Foi realizada a coleta de 3 mL de sangue de cada animal com uso de um tubo *vacutainer*, contendo fluoreto de sódio e EDTA, que preservam a morfologia celular mantendo a qualidade das amostras. O sangue foi coletado por punção à vácuo na veia jugular, identificado e acondicionado em caixa térmica com gelo seco e enviado para um laboratório particular, onde foi realizada a extração de DNA e a genotipagem das amostras. Para genotipagem das amostras foi utilizado o *BeadChip* SNP 50K da *Illumina* para caprino. Nas análises estatísticas fez-se avaliação da qualidade dos marcadores e das amostras. Dentre os critérios de qualidade e seus limites de exclusão para os SNPs foi avaliado o *Call Rate*, que é a proporção de SNPs identificados, e a Frequência do Menor Alelo (MAF). SNPs com *Call Rate* <95% e com MAF <0,05% foram identificados e excluídos da análise estatística. Para a amostra os critérios e limites foram: *Call Rate* <90%, desvio de heterozigidade acima de três desvios padrões (>3DP) em relação à média, genótipos idênticos (>99,5%) e erro de identificação do sexo, no caso de indivíduos identificados como machos apresentarem genótipos heterozigotos para marcadores no cromossomo “X”. Os *sigletons* foram identificados e excluídos da análise. Foi realizado o teste de Fisher pelo programa

PLINK (Purcell et. al., 2007) para verificar se cada loco encontra-se de acordo com as proporções esperadas no Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram descartados SNPs com proporção de dados perdidos superior a 5% e com frequência do menor alelo (MAF) inferior a 5%. Frequência alélica, Heterozigosidade observada (H_o), Heterozigosidade esperada (H_e), Coeficiente de Consanguinidade Intrapopulacional (F_{IS}) foram calculados utilizando-se os pacotes para a plataforma R: Adegenet (Jombart & Solymos, 2008) e HIERFSTAT (Goudet, 2005). A estruturação genética do rebanho foi verificada individualmente utilizando-se as estatísticas de Nei (1973, 1987). A interpretação dos resultados foi realizada como descrito para as estatísticas F de Wright (1931), por serem análogas às estatísticas de Nei (Holsinger e Weir, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do conjunto de dados submetidos ao controle de qualidade, 83,92% dos SNPs permaneceram nas análises estatísticas conforme detalhamento a seguir. O *call rate* considerado para este estudo foi de 99,95%, de modo que nenhuma amostra foi excluída do estudo. Dos 53.347 SNPs iniciais, 14,39% foram descartados do conjunto de dado por apresentarem $MAF < 0,05$. Ainda, 1,44% foram descartados por apresentarem proporção de dados perdidos superior a 5% e 1,36% descartados por não estarem segundo as proporções esperadas do Equilíbrio de Hardy Weinberg. O núcleo de conservação genética da Embrapa Meio Norte apresentou valores de H_o igual a 0,3819 e H_e igual a 0,3797, esses valores são muito próximos, indicando que não está ocorrendo perda ou fixação de alelos. O F_{IS} encontrado foi negativo e próximo de zero ($F_{IS} = -0,00265$), o que também demonstra haver diversidade na população de caprinos Marota, visto que o F_{IS} mede o grau de endogamia do indivíduo em relação à subpopulação. Assim, não havendo indícios de perda acentuada de diversidade genética dentro da população, significa que o núcleo de conservação está mantendo a variabilidade genética. O resultado obtido nesta análise, que indica manutenção da variabilidade genética, também foi constatado por Costa et al. (2008), em um estudo com marcadores de microsatélites feito neste mesmo rebanho. Barros et al. (2011), avaliou a estrutura genética da mesma população com base em dados de pedigree e também observou baixos valores de endogamia. Diante do exposto, o *BeadChip* caprino 50K da *Illumina* possui características favoráveis para a avaliação de diversidade genética em caprinos da raça Marota, possibilitando estudos futuros mais aprofundados devido a ampla amostragem do genoma.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o estado de conservação do núcleo pode ser monitorado por meio do *BeadChip* caprino 50K da *Illumina*, uma vez que este microarranjo foi informativo na população de caprinos Marota, uma das raças caprinas brasileiras localmente adaptadas.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Meio Norte, por ter disponibilizado o rebanho; Ao Instituto Federal do Piauí (IFPI) pelo auxílio financeiro, através do programa PROAGRUPAR.

BIBLIOGRAFIA

- Araújo A.M., Boffa L.M., Almeida M.J.O., Abreu U.P., Cavalcante D.H., Leal T.M. & Paiva S.R. 2009. Crescimento e Mortalidade em um Rebanho de Conservação de Caprinos Marota no Brasil. *Revista Científica de Produção Animal*, v. 11, n. 2, p.103-109.
- Barros E.A., Ribeiro M.N., Almeida, M.J.O. & Araújo, A.M. 2011. Estrutura populacional e variabilidade genética da raça caprina Marota. *Archivos de Zootecnia*, v.60, n.231, p.543-552.
- Costa M.S., Araújo A.M., Moraes J.B., Cunha R.M.S., Campelo J.E.G., Lima S.E.F., Oliveira J.A., Almeida G.M., Silva F.R. & Almeida M.J.O. 2008. Caracterização genética de caprinos Marota no Estado do Piauí por meio de microssatélites de DNA. In: Embrapa Meio-Norte-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 7, São Carlos.
- Curi R.A., Meira C.T., Beltrán N.A.R., Silva J.A.I.V. & Mota M.D.S. 2013. Seleção assistida por marcadores para o melhoramento do desempenho de equinos em corridas. *Boletim de Indústria Animal*, v.70, n.1, p.88-102.
- Goudet J. 2005. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. In: NORUM, S. *Molecular Ecology Notes*. v.5. p.184-186.
- Holsinger K.E. & Weir B.S. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting Fst. *Nature Reviews Genetics*, v.10, p.639-650.
- Jombart T. & Solymos P. 2008. Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, v.24, p.1403-1405.
- Machado T.M.M., Pires L.C. & Araujo A.M. 2008. Conservação e melhoramento genético de caprinos com o auxílio de caracteres morfológicos e biométricos. In: *Caprinos e Ovinos. Tecnologias para produção lucrativa no Nordeste*. ed. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, p. 363 -379.
- Mariante A.S., Albuquerque M.S.M. & Ramos A.F. 2011. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 2, p. 64-68.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 70, p.3321-3323.
- Nei, M. 1987. Phylogenetic trees. In: *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, p. 287-326.

- Pereira G.L., Rosa K.O., Curi R.A., Regitano L.C.A. & Mota M.D.S. 2013. Estado da arte do sequenciamento genômico na pecuária. *Ars Veterinaria*, v. 29, n. 3, p. 190-199.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., Bakker, P. I. W., Daly, M. J., and Sham, P. C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*, v. 81, n. 3, p. 559-575, 2007.
- Tosser-Klopp G., Bardou P., Bouchez O., Cabau C., Crooijmans R., Dong Y., Donnadieu-Tonon C., Eggen A., Heuven H.C.M., Jamli S., Jiken A. J., Klopp C., Lawley C. T., McEwan J., Martin P., Moreno C. R., Mulsant P., Nabihoudine I., Pailhoux E., Palhière I., Rupp R., Sarry J., Sayre B. L., Tircazes A., Wang J., Wang W. & Zhang W. 2014. Design and characterization of a 52K SNP chip for goats. *PLoS one*, v. 9, n. 1, p. e86227.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, v.16, p.97-159.