

**JEANE DE OLIVEIRA MOURA**

**GENÔMICA POPULACIONAL, DIVERSIDADE GENÉTICA E INTROGRESSÃO  
GÊNICA EM REBANHOS DE CONSERVAÇÃO DE CAPRINO NATURALMENTE  
ADAPTADO NO BRASIL**

**TERESINA-PI/2016**

**JEANE DE OLIVEIRA MOURA**

**GENÔMICA POPULACIONAL, DIVERSIDADE GENÉTICA E INTROGRESSÃO  
GÊNICA EM REBANHOS DE CONSERVAÇÃO DE CAPRINO NATURALMENTE  
ADAPTADO NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí  
(UFPI), como requisito para obtenção do grau de  
Doutor em Ciência Animal. Área de Concentração:  
Ciências Agrárias

**TERESINA-PI/2016**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**M929g** Moura, Jeane de Oliveira

Genômica populacional, diversidade genética e introgressão  
gênica em rebanhos de conservação de caprinos naturalmente  
adaptado no Brasil / Jeane de Oliveira Moura - 2016.  
62 f.: il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal  
do Piauí, Teresina, 2016.

Orientação: Prof. Dr. José Elivalto Guimarães Campelo

1. Conservação *in situ* 2. Extinção 3. Marota 4. Microarranjos  
5. Variabilidade

**CDD 636.39083**

GENÔMICA POPULACIONAL, DIVERSIDADE GENÉTICA E  
INTROGRESSÃO GÊNICA EM REBANHOS DE CONSERVAÇÃO DE  
CAPRINO NATURALMENTE ADAPTADO NO BRASIL

JEANE DE OLIVEIRA MOURA

Tese aprovada em: 13/12/2016

Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. José Elivalto Guimarães Campelo (Presidente) / DZO/CCA/UFPI

  
Profa. Dra. Adriana Mello de Araújo (Externo) / EMBRAPA

  
Prof. Dr. José Lindenberg Rocha Sarmiento (Interno) / DZO/CCA/UFPI

  
Prof. Dr. Fábio Barros Brito (Externo) / CCN/UFPI

  
Prof. Dr. Marcos Maximiliano Bajay (Externo) / ESALQ/USP

  
Dra. Tânia Maria Leal (Externa) / EMBRAPA

**“A persistência é o menor caminho do êxito”.**

*Charles Chaplin*

*Aos meus pais, José Afonso Lima de Moura e Juliêta Alvares de Oliveira Moura, exemplos de trabalho e honestidade.*

*Aos meus filhos, Jean Francisco Moura Carvalho e José Francisco Macêdo de Carvalho Júnior (in memória), razão maior da minha existência.*

*A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.*

*Dedico.*

## **Agradecimentos**

À Deus, pelo existir;

À Universidade Federal do Piauí – UFPI e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrária da Universidade Federal do Piauí, pela realização do curso;

Aos Docentes do Curso de Doutorado em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrária da Universidade Federal do Piauí, pelos ensinamentos;

À Embrapa Meio-Norte, por ter permitido o estudo em animais pertencentes ao grupo de conservação de caprinos Marota, por ela mantido, e por ter contribuído na realização das coletas;

Ao Instituto Federal do Piauí, por ter apoiado financeiramente esse trabalho;

À minha família, que sempre me incentivou;

Ao meu orientador, o Prof. Dr. José Elivalto Guimarães Campelo, pela dedicação, paciência e disponibilidade na orientação;

À Dra. Adriana Melo de Araújo, pela co-orientação e ajuda na elaboração da tese;

Ao Dr. Miklos Maximiliano Bajay, por ter feito as análises estatística desse trabalho;

Aos doutores José Lindenberg Rocha Sarmiento, Fábio Barros Britto, Márcio da Silva Costa e a Dra. Tânia Maria Leal, por suas sugestões;

Aos colegas do Doutorado, de forma especial a Diego Helcias Cavalcante, pelos momentos de estudo e troca de conhecimento;

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

*Obrigada!*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1 Grupo genético caprino Marota .....	14
2.2 Marcadores moleculares .....	15
2.3 Uso de Marcadores Moleculares na conservação de recursos geneticos.....	19
2.4 Medidas de diversidade genética .....	20
2.5 Estrutura populacional .....	22
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS: .....</b>	<b>25</b>
<b>4 CAPÍTULO I: Genômica populacional e introgressão gênica em rebanhos de caprino naturalmente adaptado ao Brasil.....</b>	<b>29</b>
4.1 Resumo .....	30
4.2 Introdução.....	30
4.3 Material e Métodos .....	31
4.4 Resultado e Discussão .....	34
4.5 Conclusões.....	40
4.6 Agradecimentos .....	40
4.7 Referências.....	40
<b>5 CAPÍTULO II: Diversidade em caprino naturalizado no Brasil e manejo genético em rebanhos de conservação .....</b>	<b>43</b>
5.1 Resumo .....	44
5.2 Introdução.....	44
5.3 Material e Métodos .....	45
5.4 Resultado e Discussão.....	48
5.5 Conclusões.....	55
5.6 Agradecimentos .....	55
5.7 Referências.....	55
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>57</b>
<b>7 ANEXOS .....</b>	<b>58</b>
7.1 Rotinas do R usadas nesse trabalho.....	59



## LISTAS DE FIGURAS

### Revisão de Literatura

<b>Figura 1</b> - Espécime de caprino Marota mostrando características da raça.....	14
<b>Figura 2</b> - <i>Chip</i> SNP .....	17
<b>Figura 3</b> - Genotipagem com tecnologia <i>Infinium</i> da <i>Illumina</i> .....	18

### Capítulo I

<b>Figura 1</b> - Diagramas de Venn mostrando SNPs fixados (MAF=0) e em comuns (área sobreposta) entre caprinos Marota (M) e Anglonubiano (A): A) Caprinos Marota pertencentes aos rebanhos particular e institucional com os Anglonubianos; B) Caprinos Marota pertencentes ao rebanho particular (M_P) com os Anglonubianos; C) Caprinos Marota pertencentes aos rebanhos institucional (M_I) com os Anglonubianos.....	36
<b>Figura 2</b> - Valor de $\Delta K$ mostrando pico de maior probabilidade para haver dois grupos ( $K = 2$ ) .....	37
<b>Figura 3</b> - Gráfico da estrutura populacional estimada com 47.398 SNPs considerando dois grupos de animais ( $K = 2$ ). Cada indivíduo é uma coluna, a cor é a composição, representando a fração de cada grupo genético. (C é o rebanho institucional e F o rebanho particular).....	38
<b>Figura 4</b> - Dispersão dos animais em Plano carteziano com os dois primeiros Componentes Principais estimados com dados de SNPs: (1 - Animais Anglonubiano; 2 - Marota do rebanho institucional; 3 - Marota do rebanho particular) .....	39

### Capítulo II

<b>Figura 1</b> - Dispersão dos animais em plano cartesiano formado pelo primeiro e segundo componentes principais. O círculo E representa os animais do rebanho de conservação institucional e o círculo F os animais do rebanho Particular. ....	51
<b>Figura 2</b> - Dendrograma de similaridade de 18 machos (M) e 45 fêmeas (F), estimado com método de agrupamento UPGMA, a partir da matriz de distância de Nei, com dados genômicos do rebanho institucional do caprino Marota. O quadrado indica animal selecionado por distância genética e o círculo o selecionado de forma aleatória. R1, R2 e R3 representam os ramos formados .....	52

## LISTAS DE TABELAS

### Capítulo I

**Tabela 1** - Alelos de Menor Frequência (MAF) no rebanho de conservação do caprino Marota e no rebanho da raça Anglonubiana, determinados através de dados obtidos com *Chip* SNP caprino 50K .....35

### Capítulo II

**Tabela 1** - Parâmetros populacionais estimados com dados obtidos por de análises genéticas realizadas em animais de dois rebanhos Marota: um institucional (estratificado em adulto e cria) e outro particular, no Piauí.....49

**Tabela II** - Coeficiente de consanguinidade de cada reprodutor e média do coeficiente de consanguinidade das 10 fêmeas, selecionados com os critérios do Manejo I e do Manejo II, respectivamente, para uma estação de monta simulada com os dados do rebanho institucional de conservação do caprino Marota .....53

**RESUMO:** O caprino Marota apresenta rusticidade, porém, ao sacrificar seu desempenho produtivo durante o processo de adaptação ao calor, se expõe a risco de perda de identidade por erosão genética ou por manejo sem controle de consanguinidade. Diante do exposto, objetivou-se: Analisar a estrutura genômica populacional e a variabilidade genética de caprinos Marota em dois rebanhos de conservação no Piauí, um institucional e outro particular; Investigar ocorrência de erosão genética provocada pela raça Anglonubiana nesses rebanhos; Discutir manejo genético em rebanhos de conservação, visando manter variabilidade e baixa consanguinidade. Para isso, foram genotipados 86 caprinos do grupo genético Marota, 76 pertencentes ao rebanho de conservação institucional mantido pela Embrapa Meio Norte em Castelo-PI e 10 pertencentes a um rebanho particular localizado em Elesbão Veloso-PI. Para averiguar a introgressão de genes da raça Anglonubiana nas populações estudadas, foram genotipados 10 animais Anglonubianos pertencentes ao rebanho institucional mantido pela Universidade Federal do Piauí em Teresina-PI. A diversidade genética foi analisada através dos valores obtidos para Heterozigosidade observada ( $H_o$ ), Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), coeficiente de consanguinidade intrapopulacional ( $F_{IS}$ ), diferenciação genética entre subpopulações ( $F_{ST}$ ), e das análises de alelos de menor frequência (MAF). Na avaliação da estratificação dos rebanhos utilizou-se Análise de Componentes Principais (ACP) e análises do programa *Structure*. Discutiu-se um modelo de manejo para estação de monta com base em dados genômicos do rebanho Marota institucional, considerando-se que os reprodutores sejam selecionados pela maior distância em dendrograma e dentre os de menor consanguinidade, através da simulação de 10 pares de acasalamentos de cada reprodutor, onde 3 reprodutores e 30 matrizes foram escolhidos de acordo com o referido manejo (Manejo I) e 3 reprodutores e 30 matrizes de forma aleatória (Manejo II). Valores de  $H_o$  e  $H_e$  nos animais adultos, respectivamente, iguais a 0,372 e 0,405 e  $F_{IS}$  igual a 0,08 indicam baixo risco de perda/fixação de genes no rebanho institucional; porém recomenda precaução em relação ao risco de consanguinidade. Diferenciação genética alta ( $F_{ST}=0,16$ ) foi observada entre os grupos Marota e o Anglonubiano, indicando-os como fonte de diversidade genética para a caprinocultura da região. A análise da estratificação indicou existência de duas populações, confirmada pela ACP, que detectou a presença material genético Anglonubiano nos rebanhos Marota. O rebanho particular compartilhou maior número de SNPs fixados com o rebanho Anglonubiano (1024) do que o rebanho de conservação institucional (741), o que pode indicar situação mais grave de introgressão. A simulação dos acasalamentos mostrou que a média do coeficiente de consanguinidade do casal no Manejo I ( $3,5\pm 2,6$ ) foi estatisticamente inferior ao valor encontrado para o Manejo II ( $5,7\pm 4,0$ ), indicando eficiência do Manejo I no que se refere ao controle da endogamia. Conclui-se que: Há elevado nível de polimorfismo e diferenciação genética alta entre caprinos Marota e Anglonubianos; Existe variabilidade genética nos rebanhos Marota analisados, porém com indício de consanguinidade e de introgressão gênica da raça Anglonubiana; Em rebanho com pequeno tamanho efetivo e onde a reposição é feita com animais do próprio rebanho, a definição de acasalamentos com base em critérios genéticos acurados é opção para controle de consanguinidade.

**Palavras-chave:** conservação *in situ*, extinção, Marota, microarranjos, variabilidade

**ABSTRACT:** The Marota goat presents rusticity, but when sacrificing its productive performance during the process of adaptation to the heat, it exposed itself to the risk of identity loss by genetic erosion or by management without consanguinity control. Against the foregoing, the objectives of this study were: Analyzing the population genomic structure of Marota goats in two conservation herds in Piauí, one institutional and another private; Investigating occurrence of genetic erosion caused by the Anglonubian breed in these herds; Verifying the genetic variability in these herds and to discuss genetic handling in conservation herds in order to maintain variability and low inbreeding. For this, 86 goats from the Marota genetic group were genotyped, 76 belonging to the institutional conservation herd maintained by Embrapa Meio Norte in Castelo-PI and 10 belonging to a particular flock located in Elesbão Veloso-PI. To investigate the genes introgression of the Anglonubian breed in the studied populations, 10 of these animals were genotyped belonging to the institutional herd maintained by the Federal University of Piauí in Teresina-PI. The genetic diversity was analyzed through the values obtained for observed Heterozygosity ( $H_o$ ), expected Heterozygosity ( $H_e$ ), coefficient of intrapopulation inbreeding ( $F_{IS}$ ), genetic differentiation among subpopulations ( $F_{ST}$ ), and of the analysis of lower frequency alleles (MAF). Principal Component Analysis (PCA) and Structure program analyzes were used in the evaluation of the herds stratification. A management model for a breeding season based on genomic data of the conservation herd was discussed, considering that the breeding herders are selected by the largest distance in dendrogram, among those of lower consanguinity, through the simulation of 10 pairs of mating of each breeder, where 3 breeders and 30 matrices were chosen according to the handling referred (Management I) and 3 breeding herds and 30 matrices were selected randomly (Management II).  $H_o$  and  $H_e$  values in adult animals, respectively, equal to 0.372 and 0.405 and  $F_{IS}$  equal to 0.08 indicate low risk of loss / fixation of genes in the institutional herd; however, it is recommended caution regarding the risk of consanguinity. High genetic differentiation ( $F_{ST} = 0.16$ ) was observed between Marota and Anglonubian groups, indicating them as a source of genetic diversity for goat breeding of the region. The analysis of the stratification indicated the existence of two populations confirmed by the ACP that complementing the results of the Structure, detected the presence of Anglonubian genetic material in the Marota herds. The private herd shared a greater number of SNPs fixed with the Anglonubian herd (1024) than the herd of institutional conservation (741), which may indicate a more serious introgression situation. The mating simulation showed that the average of the consanguinity coefficient of the couple in Management I ( $3.5 \pm 2.6$ ) was statistically lower than the value found for Management II ( $5.7 \pm 4.0$ ), showing the efficiency of the Management I concerning the control of inbreeding. It can be concluded that: the Illumina goat SNP 50K Chip shows efficiency for population structure analysis in Marota goats; the analyzes carried out by the Structure program and the Analysis of Principal Components complement each other to detect gene introgression; in the Marota goat populations there is genetic variability, however, with evidence of consanguinity and presence of Anglonubian race genes; the use of genomic information is a viable option to assist in the management of animals in conservation herd in situ with a small effective size.

**Keywords:** *in situ* conservation, extinction, Marota, microarrays, variability

## 1 INTRODUÇÃO

Vários grupos de animais domésticos de origem portuguesa foram introduzidos no Brasil durante o período colonial e tornaram-se precursores de grupos genéticos atuais. Por terem sido selecionadas em diferentes ambientes, apresentam características de adaptação a ecossistemas específicos do país e são conhecidas como grupos naturalizados. Porém, a adaptação a ambientes hostis à produção animal refletiu em baixa produtividade destes animais quando comparados às raças exóticas, o que tem contribuído para a expansão de raças de expressão comercial em ambientes, que outrora, eram utilizados para produção de raças locais (EGITO; MARIANTE; ALBUQUERQUE, 2002).

Nesse perfil se enquadra o grupo caprino Marota (ALMEIDA, 2007), que está sob risco de extinção, sendo mantido pela Embrapa Meio Norte em Núcleo de Conservação *in situ* localizado no semiárido do Piauí.

Diante do cenário, que apresenta perspectiva de mudança climática com elevação de temperatura nas áreas tropicais, os recursos genéticos formados nesse ecossistema ganham importância como fonte potencial de combinações de genes que podem ser únicas (BARROS *et al.*, 2011) e relacionadas à rusticidade, por terem sido moldadas pela natureza em resposta a intempéries ambientais e/ou de natureza sanitária.

Na perspectiva de uso atual ou futuro, esses animais podem contribuir com suas características (TORO; FERNÁNDEZ; CABALLERO, 2009), justificando, portanto, serem merecedores de atenção especial quanto à garantia de manutenção de sua variabilidade genética e de sua identidade como grupos genéticos desse ambiente, principalmente, devido ao risco de erosão genética imposto pela introgressão de raça Anglonubiana, que prevalece nos rebanhos do nordeste (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Em rebanhos de conservação o maior risco se deve à perda de unicidade genética provocada pela redução de variabilidade em decorrência de consanguinidade, que põe em risco a população (KELLER; WALLER, 2002). Sendo assim, rebanho de conservação deve apresentar variabilidade genética (EGITO; MARIANTE; ALBUQUERQUE, 2002) e a constatação de indícios de consanguinidade ou de déficit de heterosigiosidade devem ser vistas como um sinal de alerta de que é necessário recorrer a medidas práticas que inibam a perda da variabilidade genética.

Como o Brasil é um país onde limitações financeiras comprometem a conservação de raças em risco de extinção, a caracterização genética destas no seu ambiente de criação ganha ainda mais importância, principalmente, se for atrelada a alternativas de manejo genético, pois poderá contribuir com a manutenção ou até mesmo com a ampliação da variabilidade genética. A relevância disso vem do fato que os rebanhos de conservação geralmente apresentam pequeno tamanho efetivo de população, o que expõe a raça a riscos de endogamia (FALCONNER; MACKAE, 1996),

Dentre as opções técnicas disponíveis para ampliação de variabilidade genética em rebanhos de conservação, segundo Silva Filho (2012), a mais usual seria a introdução de progenitores de outros rebanhos, porém, preferencialmente que não tenham relação de parentesco direta com os indivíduos do rebanho de conservação. Uma segunda opção seria interferir no manejo genético do rebanho, de forma a selecionar progenitores tanto com base em critérios que contemplem indicadores de desempenho influenciáveis pelo ambiente, como também incluir um indicador de variabilidade genética, indiferente às condições ambientais.

Sabendo-se que as tecnologias disponíveis em genética molecular podem contribuir de forma eficiente para a conservação dos grupos genéticos de animais em risco de extinção e que a utilização de microarranjos de DNA vem sendo útil desde a caracterização do nível de diversidade genética (COSTA, 2014) até a identificação de genes associados a funções biológicas (RESENDE *et al.*, 2008; CURI *et al.*, 2013), objetivou-se:

Analisar a estrutura genômica populacional de caprinos Marota em dois rebanhos de conservação no Piauí, um institucional e outro particular; Investigar ocorrência de erosão genética provocada pela raça Anglonubiana nesses rebanhos; Averiguar a variabilidade genética nesses rebanhos e discutir manejo genético em rebanhos de conservação, visando manter variabilidade e baixa consanguinidade.

A Tese está dividida em dois capítulos:

Capítulo I, **Genômica populacional e introgressão gênica em rebanhos de caprino naturalmente adaptado ao Brasil**, obedecendo as normas editoriais da Revista **Ciência Agrônômica** (ISSN 0045-6888), à qual será submetido para publicação;

Capítulo II, **Diversidade em caprino naturalizado no Brasil e manejo genético em rebanhos de conservação**, elaborado de acordo com as normas editoriais da **Revista Archivos de Zootecnia** (ISSN 0004-0592), à qual será submetido à publicação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Grupo genético caprino Marota

Diferentes raças caprinas (*Capra hircus*) estão espalhadas em todo o mundo, devido a sua tolerância a vários ambientes e por apresentarem adaptabilidade à dieta pobre em nutrientes. Sua produção de carne, leite e pele é importante fonte de renda, principalmente em países em desenvolvimento (LIN *et al.*, 2013).

Os primeiros caprinos que chegaram ao Brasil foram trazidos pelos colonizadores portugueses. Foram criados sem práticas zootécnicas adequadas e sem seleção direcionada para o aumento ou manutenção da produção. Esses caprinos multiplicaram-se desordenadamente, passaram por um processo de seleção natural e originaram os tipos étnicos encontrados atualmente no país (BARROS *et al.*, 2011).

O grupo genético Marota (Figura 1), também denominado de Curaçá, foi formado sob forte pressão de seleção do ambiente semiárido, sendo encontrado principalmente nos sertões da Bahia, Pernambuco e Piauí (ALMEIDA, 2007).



Fonte: Magda Cruciol (EMBRAPA)

Figura 1 – Espécime de caprino Marota mostrando características da raça

Os caprinos desse grupo apresentam como principais características a cabeça ligeiramente grande, chifres desenvolvidos, orelhas pequenas, pescoço delgado, corpo alongado, membros fortes e aprumados e pelagem branca ou baía (MEDEIROS *et al.*, 1995) (Figura 1).

Sua pequena altura e reduzida massa corporal permitem o ajuste mais adequado a ambientes com baixa oferta de alimento, sendo apropriados à exploração na região semiárida (BARROS, 2009), tratando-se, portanto, de um material genético importante para manutenção da biodiversidade dos animais domésticos (ARAÚJO *et al.*, 2009).

Além de apresentarem elevada rusticidade, facilidade de manejo e resistência às altas temperaturas encontradas na região semiárida, esses caprinos apresentam aptidão para produção de pele e carne, além de terem vocação leiteira (McMANUS; PAIVA; LOUVANDINI, 2010).

## 2.2 Marcadores moleculares

Todas as informações necessárias para coordenação da estrutura e função da célula estão contidas no material genético. Comparando o material genético de dois indivíduos é possível observar diferenças entre eles. Essas variações podem ser utilizadas como marcas, as quais são denominadas como marcadores moleculares (SOUZA, 2012).

Com o desenvolvimento das tecnologias de Genética e de Biologia Molecular, surgiram diversos tipos de marcadores moleculares. O princípio do uso desses marcadores é baseado no dogma central da Biologia Molecular (O DNA é transcrito em RNAm e este é traduzido em Proteínas) e na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA, geralmente, refletem em diferenças fenotípicas (FALEIRO, 2007).

Segundo Curi *et al.* (2013), os marcadores moleculares surgiram como uma ferramenta importante no sentido de impulsionar estudos genéticos e podem estar associados a características de interesse econômico. Apresentam como vantagens: poder ser obtido grande número de polimorfismos genéticos, identificação de genótipos sem influência ambiental (ARAÚJO *et al.*, 2009) e possível detecção de tais polimorfismo em qualquer estágio do desenvolvimento (FALEIRO, 2007).

Do ponto de vista molecular, as regiões repetidas (microssatélites e minissatélites), as inserções e deleções (*InDels*) e os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), são as principais variações existentes na molécula de DNA (CURI *et al.*, 2013).

Do ponto de vista funcional, existem dois tipos de marcadores de DNA. O primeiro, formado por segmentos expressos, com baixo grau de polimorfismo, mas de alta conservação evolutiva. O segundo, constituído por segmentos sem função biológica, com alto polimorfismo e pouco conservado (SILVESTRE, 2012; TORO; FERNÁNDEZ; CABALLERO, 2009).

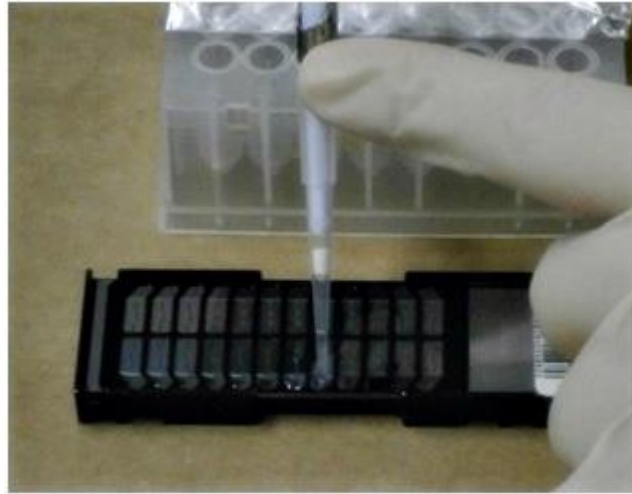


Marcadores moleculares SNPs têm como princípio a variação única na cadeia de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina) (COSTA, 2014) e para que um polimorfismo seja considerado um SNP e não uma mutação, essa variação deve ocorrer em pelo menos 1% da população. Eles são a forma mais comum de variação do DNA (RESENDE *et al.*, 2008).

Os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou com funções regulatórias, porém são geralmente encontrados em espaços intergênicos, sem função definida (CAETANO, 2009; COSTA, 2014); são predominantemente bialélicos (CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013; REGITANO; VENERONI, 2009; TORO; FERNÁNDEZ; CABALLERO, 2009); estão distribuídos uniformemente pelo genoma e vêm sendo utilizados para elaboração de mapas genéticos, para medir a estrutura genética de populações ou para realizar estudos funcionais (COSTA, 2014).

Em comparação com outros marcadores, os SNPs têm como vantagens, a baixa taxa de mutação, a facilidade de genotipagem (CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013; REGITANO; VENERONI, 2009; RESENDE *et al.*, 2008) e a possibilidade de detecção de elevada quantidade de polimorfismos entre alelos de determinado gene. Como desvantagens, a necessidade do conhecimento prévio da sequência do gene de interesse e o elevado custo relacionado à infra-estrutura da técnica (FALEIRO, 2007).

O desenvolvimento de metodologias para genotipar milhares de SNPs em um único ensaio facilitou a realização de pesquisas em várias áreas. *Chip* SNP (Figura 2), contendo em média mais de 50.000 SNPs, já foram produzidos para humanos, bovinos, ovinos, equinos, suínos e caninos. Em algumas espécies, novos *Chips*, contendo maiores números de SNPs estão em desenvolvimento. Isso reflete o grande uso da tecnologia e as necessidades de aplicações específicas de cada setor (CAETANO, 2009). Sendo que, em 2010 o IGGC (*Intenacional Goat Genome Consortium*) propôs a criação de um *Chip* SNP específico para caprino, de densidade moderada (50-60K) e segregando com alta a moderada frequência nas raças Alpina, Boer, Crioulo, Katjang, Saanen e Savanna (TOSSER-KLOPP *et al.*, 2014).

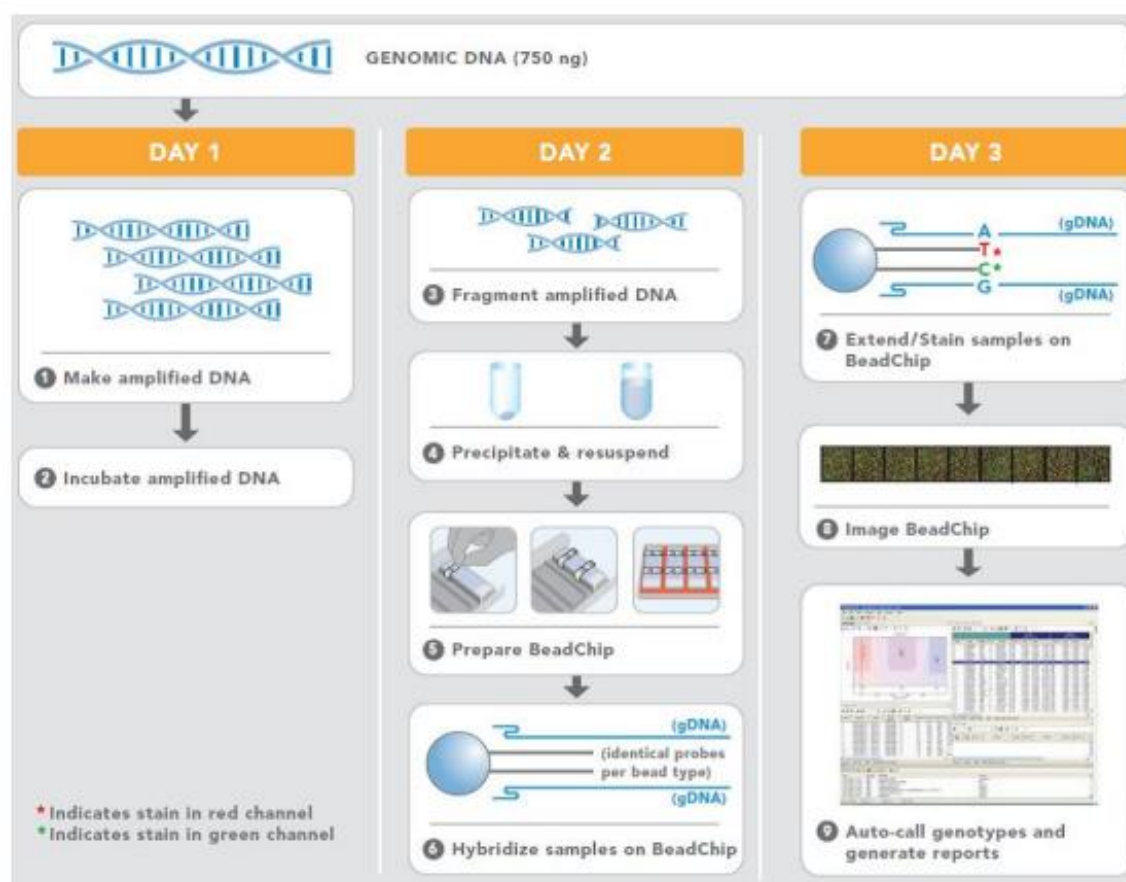


Fonte: Márcio da Silva Costa

Figura 2 – *Chip* SNP

*Chips* SNP são lâminas sólidas, nas quais fragmentos de DNA de fita simples, denominados de sondas, são depositados e imobilizados de forma ordenada e em áreas específicas, chamadas de *spots*. Na lâmina, cada *spot* contém milhões de cópias de um único e determinado transcrito que pode, posteriormente, ser identificado. O princípio da técnica baseia-se na hibridização por complementaridade das moléculas de ácido nucleico, que ocorre entre a sonda depositada na lâmina e o DNA extraído das amostras a serem analisadas e comparadas (GIACHETTO, 2010).

De acordo com *Illumina* (2013) o protocolo de genotipagem consiste das principais etapas (Figura 3):



Fonte: (<http://www.illumina.com>)

Figura 3 – Genotipagem com tecnologia *Infinium* da *Illumina*

(1) Amplificação isotérmica do DNA – Inicialmente, o DNA é desnaturado e neutralizado com NaOH. Em seguida, é amplificado a 37°C;

(2) Incubação do DNA amplificado – O DNA amplificado é incubado por um período de 24 horas no equipamento *Illumina Hybridization Oven*;

(3) Fragmentação do DNA amplificado – As amostras amplificadas são fragmentadas por processo enzimático;

(4) Precipitação e ressuspensão do DNA – Após a fragmentação enzimática, é adicionado isopropanol ao DNA das amostras e esta é centrifugada a 4°C por 20 minutos. Em seguida é removido o isopropanol e o DNA é ressuspendido em tampão de hibridação;

(5) Preparação do *Chip* – A plataforma de genotipagem é preparada para a hibridação e as amostras são aplicadas ao *Chip* e incubadas a 48°C por 24 horas;

(6) Hibridização das amostras no *Chip* – Durante esse processo os fragmentos de DNA das amostras se hibridizam com as sequências do DNA que se encontram ligadas ao *Chip*;

(7) Extensão e coloração das amostras no *Chip* – Após a hibridação é realizada a lavagem do *Chip* e o DNA não hibridado é removido. O procedimento de lavagem dura aproximadamente 20 min.

Em seguida, o *Chip* é submetido a processo de coloração durante 2 horas e 45 minutos, realizada em equipamento específico com umidade e temperatura controladas. Após a coloração, os *Chips* são colocados em local protegido para secagem durante 2 horas e 45 minutos;

(8) Visualização das imagens do *Chip* – Depois de secos, os *Chips* são levados para o equipamento *Illumina iScam*, para genotipagem a partir da interpretação dos picos de luz emitidos por moléculas de fluoróforos ligadas ao *Chip*, ao serem excitadas por laser emitido pelo aparelho.

(9) Geração de dados – Os dados gerados passam pelo software *Genome Studio Data Analysis*, para a leitura e conversão da intensidade de fluorescência em genótipos de SNPs.

### **2.3 Uso de marcadores moleculares na conservação de recursos genéticos**

Observa-se o desaparecimento de uma variedade de animais quando estas são trocadas ou absorvidas por outras mais produtivas. Para modificar essa situação, é necessária percepção de que os recursos genéticos de uma região constituem um patrimônio cultural e biológico único (BARROS *et al.*, 2011).

Raças especializadas passaram a substituir as raças nativas no mundo inteiro. Esta situação aumenta a preocupação a respeito da erosão dos recursos genéticos (FAO, 2007), visto que a diversidade genética das raças nativas, provavelmente contribuirá com as características de interesse atual ou futuro (TORO; FERNÁNDEZ; CABALLERO, 2009).

Raças locais são consideradas essenciais para programas de melhoramento genético por apresentarem, por exemplo, genes para resistência a condições adversas. Logo, é grande a necessidade de se buscar formas eficientes de conservação desses recursos.

A diversidade dos recursos naturais tem sido alvo de interesse de cientistas e de cidadãos conscientes dos efeitos negativos produzidos pela perda da variabilidade genética em consequência do uso de poucas raças de certas espécies, sendo que a conservação da biodiversidade seria uma medida no sentido de evitar a perda de diversidade filogenética (TABERLET *et al.*, 2008).

Nos programas de conservação o inventário, a caracterização e a documentação dos dados dos animais são elementos importantes (ARAÚJO *et al.*, 2009), e o uso de marcadores

moleculares tem se mostrado eficiente para quantificar a diversidade genética, sendo utilizados para detectar diferenças entre indivíduos pertencentes a uma determinada população (MENEZES *et al.*, 2006).

Informações moleculares também podem ser utilizadas para atribuir indivíduos a um grupo genético, principalmente quando não há informação genealógica ou quando é difícil detectar diferenças fenotípicas, e segundo Toro; Fernández e Caballero (2009), a conservação da raça enfatiza manutenção da raça pura. Nesse contexto, marcadores moleculares podem detectar se ocorreu introgressão ou cruzamento num determinado grupo animal.

Existem várias tecnologias de genética molecular que podem ser usadas para fornecer informações úteis aos programas de conservação. Cada tecnologia apresenta vantagens e desvantagens. A tecnologia a ser usada vai depender do objetivo do estudo, da infraestrutura disponível, dos recursos financeiros, da disponibilidade de recursos humanos treinados e do nível de conhecimento molecular da espécie a ser estudada (FALEIRO, 2007).

Painéis de SNPs surgiram como uma ferramenta para estudo de seleção e associação genômica, porém essa tecnologia tem se mostrado muito útil para o estudo de estrutura e conservação das populações (HERRERO-MEDRANO *et al.*, 2013)

## 2.4 Medidas de diversidade genética

O estudo da diversidade genética permite gerar informações importantes para melhor gestão das populações. Dentre os parâmetros mais utilizados, nesse estudo, estão à estimativa da frequência alélica, Heterozigosidade observada ( $H_o$ ), Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), desvio do Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW), estatística F e distância genética (BAJAY, 2009).

### Frequência alélica

A frequência de um alelo representa a proporção deste em relação ao total de alelos de um mesmo locus cromossômico. É calculada com base na contagem direta dos alelos encontrados, considerando a população em equilíbrio de Hardy Weinberg (ROCHA, 2009).

### Heterozigosidade

A Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) é uma maneira de medir a variabilidade genética (TORO; FERNÁNDEZ; CABALLERO, 2009). É definida como divergência genética de Nei (NEI, 1973) esperada segundo princípios do Equilíbrio de Hardy Weinberg (BAJAY, 2009). A

Heterozigosidade esperada de um determinado *locus* indica a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto no referido *locus* e depende do número de alelos existente para esse *locus* e de sua frequência. Pode ser calculada de acordo com a equação:

$$H_e = 1 - \sum(p_i^2)$$

$p_i$  = frequência alélica estimada do *i*ésimo alelo

A Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) é a proporção de indivíduos heterozigotos encontrados na amostra da população. É obtida pela razão entre o número total de indivíduos heterozigotos encontrados e o número total de indivíduos existentes na população. Em populações em Equilíbrio de Hardy Weinberg, a heterozigosidade esperada de um *locus* é igual à heterozigosidade observada (MENEZES *et al.*, 2006). Pode ser obtida pela equação:

$$H_o = 1 - \sum p_{ii}$$

$p_{ii}$  = frequência estimada do homozigoto *ii*

#### Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A lei de Hardy-Weinberg foi formulada em 1908, por Hardy e Weinberg, independentemente. Segundo essa lei, uma população está em equilíbrio quando é uma população grande, com acasalamentos aleatórios, onde não há mutação, seleção, deriva genética, migração, e onde as frequências alélicas e genotípicas se mantêm constante ao longo das gerações. Logo, desvio significativo no EHW pode indicar que a população está subdividida; ou que existe endogamia significativa, ou fluxo gênico de outra população (MENEZES *et al.*, 2006).

Como em uma população em EHW as frequências alélicas não se alteram ao longo das gerações, podem-se estabelecer as frequências genotípicas ao longo das gerações posteriores (COSTA, 2014).

#### Índice de Fixação de Wright ou Estatística F

Definido como desvio na população dos indícios de heterozigosidade (BAJAY, 2009), o índice de Fixação de Wright mede o grau de fixação gênica resultante da endogamia. Parte do princípio da existência de uma metapopulação constituída de várias subpopulações. As estatísticas  $F$ ,  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  e  $F_{IT}$ , são definidas, respectivamente, como redução da heterozigosidade

dentro das subpopulações, redução de heterozigosidade entre subpopulações e redução da heterozigosidade na população total (BARROS *et al.*, 2011).

O coeficiente de consanguinidade intrapopulacional ( $F_{IS}$ ) expressa existência de acasalamentos aleatórios dentro da subpopulação.  $F_{IS}$  com valor maior do que zero, indica a ocorrência de indivíduos aparentados (BARROS, 2009). É estimado com base na  $H_e$  e  $H_o$ , como mostra a equação abaixo:

$$F_{IS} = 1 - (H_o / H_e)$$

O coeficiente de consanguinidade entre subpopulações ( $F_{ST}$ ) representa a proporção de diversidade genética atribuída às diferenças de frequências alélica entre as subpopulações (HOLSINGER, WEIR, 2009) e é usado para medir as distâncias entre elas. Seu valor está entre 0, indicando que não há diferenças genéticas entre as subpopulações, e 1, indicando fixação de diferentes alelos entre as subpopulações (WRIGHT, 1965). Quanto mais próximo de 1 é o valor do  $F_{ST}$ , maior a diferenciação entre as subpopulações.

Valores de  $F_{ST}$  entre 0 e 0,05 considera-se baixo; entre 0,05 e 0,15 considera-se moderado, entre 0,15 e 0,25 considera-se alto, acima de 0,25 considera-se muito altos (HARTL; CLARK, 2010). Pode ser calculado pela equação:

$$F_{ST} = (H_T - H_e) / H_T$$

$H_T$  = heterozigosidade esperada na população total assumindo que não ocorra subdivisão

O coeficiente de endogamia da população total ( $F_{IT}$ ) mede a existência de endogamia na população total. Valores de  $F_{IT}$  negativo ou próximo de zero, indicam a existência de variabilidade genética na população (WRIGHT, 1965). Pode ser obtido pela equação:

$$(F_{IT})^2 = (F_{IS})^2 + (F_{ST})^2$$

## 2.5 Estrutura populacional

O conhecimento da estrutura populacional permite a compreensão de como se processa a evolução dessa população. Para conhecer a estrutura populacional é imprescindível entender os fatores que interferem nesta, principalmente quando esta faz parte do patrimônio genético de uma determinada região. A estrutura de uma população é determinada pela frequência de seus genes que, por sua vez, é afetada por migração, mutação, seleção, deriva genética e amostragem. A forma e a intensidade de como atuam essas forças depende da quantidade de animais

fundadores, de sua diversidade genética e da forma como esses animais são usados para a reprodução ao longo das gerações (BARROS, 2009).

No estudo da estrutura genética de populações são utilizadas medidas de distâncias genéticas (NEI, 1987). Existem diversas medidas de distâncias genéticas, tais como: as distâncias de Nei (NEI, 1973), distância Euclidiana ou de Rogers (ROGERS, 1972), distância de Kimura 2-parâmetros (KIMURA; OHTA, 1978), distância de Reynolds (REYNOLDS; WEIR; COCKERHAM, 1983), distância de Tamura e Nei (TAMURA; NEI, 1993), entre outras. A utilização de cada método depende da fonte de dados que se pretende analisar.

#### A análise de componentes principais (ACP)

A análise por componentes principais é uma das abordagens mais empregadas para estudo de estrutura de população a partir de dados genéticos e tem por base a análise de uma matriz de covariância/correlação entre os marcadores (LAWSON *et al.*, 2012). É um método de análise multivariada que consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais. Está associada à ideia de redução de massa de dados, com menor perda de informação. Nela procura-se redistribuir a variação observada nos eixos originais de forma a se obter um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados. Esta técnica pode ser utilizada para geração de índices e agrupamento de indivíduos. A análise agrupa os indivíduos de uma população segundo a variação de suas características (VARELLA, 2008) fenotípicas ou genotípicas.

O software *Structure* criado por Pritchard, Stephens e Donnelly (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), tendo por base um modelo para inferir a estrutura de população usando dados genotípicos, pode ser aplicado à maioria dos marcadores genotípicos normalmente utilizados no estudo de estrutura populacional, incluindo SNPs, microssatélites, RFLP e AFLPs. Na análise é assumido um modelo em que existem K populações, cada uma é caracterizada por um conjunto de frequências alélicas em cada locus. Ao ser amostrada essa população, os indivíduos são atribuídos, probabilisticamente, a uma população ou a mais populações se seu genótipo indicar que eles estão misturados ou são diferentes (PRITCHARD; WEN; FALUSH, 2010), fornecendo, assim, informação sobre a diversidade genética observada e sobre o número de populações ancestrais subjacentes (GRASSO *et al.*, 2014).

A variabilidade entre duas populações pode ser calculada com o uso de ferramentas matemáticas que traduzem essas diferenças. Os métodos empregados para cálculos de distâncias



genéticas utilizam a diferença das frequências alélicas em diferentes populações. Se não há diferenças, a distância entre duas populações é zero (ARAÚJO, 2004).

Os métodos mais comumente empregados na análise dos dados obtidos com *Chips* SNP são a construção de agrupamentos, a busca de genes diferencialmente expressos e a busca por grupos de genes capazes de discriminar tipos biológicos diferentes. Sendo que a construção de agrupamentos a partir de dados numéricos, obtidos experimentalmente, encontra-se em uma área da estatística denominada de análise multivariada e consiste em um método para agrupar os dados de acordo com uma medida de similaridade (GIACHETTO, 2010).

Um dos métodos mais utilizados no processo de agrupamento é o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), método de agrupamento hierárquico que se baseia no agrupamento sucessivo de pares de táxons, de acordo com o nível de similaridade, definindo distância entre grupamento como a distância média entre os pares de táxons. O fundamento desse método é comparar os táxons mais semelhantes e agrupá-los (SILVESTRE, 2012).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. J. O. **Caracterização de caprinos da raça Marota no Brasil**. 2007. 150 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2007.
- ARAÚJO, A. M. **Paternidade e diversidade genética em caprinos no Brasil por meio de microssatélites de DNA**. 2004. 90 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- ARAÚJO, A. M. *et al.* Crescimento e mortalidade em um rebanho de conservação de caprinos Marota no Brasil. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 11, n. 2, 2009.
- BAJAY, M. M. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização do germoplasma de mamona (*Ricinus communis* L.)**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2009.
- BARROS, E. A. **Estrutura populacional e variabilidade genética do núcleo de conservação da raça Marota no Piauí**. 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.
- BARROS, E. A. *et al.* Estrutura populacional e variabilidade genética da raça caprina Marota. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, n. 231, p. 543-552, sep. 2011.
- CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectiva para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 64-71, jul. 2009. Número especial.
- CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 2013. p. 25-42.
- COSTA, M. S. **Associação genômica ampla e replicação de estudo para características de crescimento em bovinos da raça Nelore**. 2014. 80 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2014.
- CURI, R. A. *et al.* Seleção assistida por marcadores para o melhoramento do desempenho de equinos em corridas. **Boletim de Indústria Animal**, Odessa, v. 70, n. 1, p. 88-102, 2013.
- EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Arquivos de Zootecnia**, v. 51, p. 39-52, 2002.
- FALCONNER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. Edinburgh: Longman Group Limited, 1996. 464p.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicado a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 120p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture**. Rome, 2007. 511p.

GIACHETTO, P. F. **A tecnologia de microarranjos na identificação de genes de interesse na bovinocultura**. Campinas, SP: Embrapa Informática Agropecuária, 2010. 35 p.

GRASSO, A. N. *et al.* Genomic variation and population structure detected by single nucleotide polymorphism arrays in corriedale, merino and creole sheep. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 389-395, jun. 2014.

HARTL, D. L.; A. G., CLARK. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HERRERO-MEDRANO, J. M. *et al.* Conservation genomic analysis of domestic and wild pig populations from the Iberian Peninsula. **BMC Genetics**, v. 14, n. 106, p. 106-119, jan. 2013.

HOLSINGER, K. E.; WEIR, B. S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting  $F_{ST}$ . **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 9, p. 639-650, set. 2009.

ILLUMINA infinium HTS assay: manual protocol. 2013. Disponível em: <[http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/humanomniexpress-24/infinium\\_hts\\_assay\\_manual\\_protocol\\_experienced\\_user\\_card\\_15045737\\_a.pdf](http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/humanomniexpress-24/infinium_hts_assay_manual_protocol_experienced_user_card_15045737_a.pdf)>. Acesso em: 26 jun. 2016.

KELLER, L. F.; WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 5, p. 230-241, maio, 2002.

KIMURA, M.; OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 75, n. 6, p. 2868-2872, june, 1978.

LAWSON, D. J. *et al.* Inference of population structure using dense haplotype data. **Plos Genetics**, v. 8, n. 1, jan. 2012.

LIN, B. Z. *et al.* Genetic diversity and structure in Asian native goat analyzed by newly developed SNP markers. **Animal Science Journal**, v. 84, n. 8, p. 579-584, aug. 2013.

McMANUS, C.; PAIVA, S.; LOUVANDINI, H.; **Caprinos no Brasil**. 2010. Disponível em: <[http://inctpecuaria.com.br/images/informacoes-tecnicas/serie\\_tecnica\\_caprinos.pdf](http://inctpecuaria.com.br/images/informacoes-tecnicas/serie_tecnica_caprinos.pdf)>. Acesso em: 19 fev. 2015.

MEDEIROS, L. P. *et al.* **Caprinos: princípios básicos para sua exploração**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995.

MENEZES, M. P. C. *et al.* Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1336-1341, jul./ago. 2006.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. Phylogenetic trees. In:\_\_\_\_\_. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. p. 287-326.

- OLIVEIRA, D. F. *et al.* Desenvolvimento ponderal e características de crescimento de caprinos da raça Anglonubiana criados em sistema semi-intensivo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, p. 256-265, 2009.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, jun. 2000.
- PRITCHARD, J. K.; WEN, X.; FALUSH, D. **Documentation for structure software**: version 2.3. Chicago: University of Chicago, 2010.
- REGITANO, L. C. A.; VENERONI, G. B. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À PRODUÇÃO ANIMAL, 2., São Carlos, 2009. **Anais...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009. p.16-34
- RESENDE, M. D. V. *et al.* Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 56, p. 63-77, jan./jun. 2008.
- REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short- term genetic distance. **Genetics**, Austin, v. 105, n. 3, p. 767-779, nov. 1983.
- ROCHA, L. L. da. **Estudo genético de populações caprinas locais e exóticas através de marcadores microssatélites**. 2009. 151 f. Tese (Doutorado integrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal da Paraíba, Recife, 2009.
- ROGERS, J. B. **Measures of genetic similarity and genetic distance**: studies in genetics VII. University of Texas Publication 7213. 1972.
- SILVA FILHO, E. **Caracterização da variabilidade genética por marcadores microssatélites nos bovinos da raça pé duro em rebanho de conservação e de bovinos da raça tabapuã em rebanho sob seleção**. 2012. 77 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.
- SILVESTRE, E. de A. **Caracterização genética de caprinos da raça Anglonubiana no estado do Piauí**. 2012. 53 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.
- SOUZA, M. M. **Avaliação dos efeitos de polimorfismos e da origem parental de alelos na expressão de genes candidatos à característica maciez da carne em bovinos da raça Nelore**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.
- TABERLET, P. *et al.* Are cattle, sheep, and goats endangered species? **Molecular Ecology**, v. 17, n. 1, p. 275–284, jan. 2008.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology Evolution**, v. 10, n. 3, p. 512-526, maio, 1993.

TORO, M.; FERNÁNDEZ, J.; CABALLERO, A. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. **Livestock Science**, v. 120, n. 3, p. 174–195, 2009.

TOSSER-KLOPP, G. *et al.* Design and characterization of a 52K SNP *Chip* for goats. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. 86-227, jan. 2014.

VARELLA, C. A. A. **Análise de componentes principais**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <[http://www. ufrrj. br/institutos/it/deng/varella/Downloads](http://www.ufrrj.br/institutos/it/deng/varella/Downloads)>. Acesso em: 08 jan. 2016.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. **Evolution**, Lancaster, v. 19, n. 3, p. 395- 420, sep. 1965.

## **4 CAPÍTULO 1**

**Genômica populacional e introgressão gênica em rebanhos de caprino  
naturalmente adaptado ao Brasil**

## Genômica populacional e introgressão gênica em rebanhos de caprino naturalmente adaptado ao Brasil

**RESUMO:** Objetivou-se aplicar informações obtidas com o uso *Chip* SNP caprinos 50K da *Illumina* no estudo da estrutura genômica populacional em dois rebanhos de caprinos Marota, um particular e outro de conservação institucional, ambos localizados no Piauí, e na investigação de indícios de erosão genética provocada pela raça Anglonubiana nesses rebanhos. Para isso 86 animais Marotas e 10 Anglonubianos foram genotipados. A diversidade genética foi analisada comparando-se alelos de menor frequência (MAF) nos rebanhos. A estrutura populacional e diferenciação genética foram avaliadas utilizando-se o programa *Structure*, Análise de Componentes Principais (ACP) e o índice de fixação ( $F_{ST}$ ). A diferenciação genética alta ( $F_{ST}=0,16$ ) foi observada na população Marota em relação à população Anglonubiana. O rebanho particular compartilhou maior número de SNPs fixados com o rebanho Anglonubiano (1024) do que o rebanho de conservação institucional (741). Os resultados da ACP, juntamente com os da análise do *Structure*, mostraram a presença de genes Anglonubianos nos rebanhos Marota. Logo, conclui-se que elevado nível de polimorfismo e diferenciação genética alta entre caprinos Marota e Anglonubianos caracterizam esses animais como fonte de diversidade genética para a caprinocultura da região; o *Chip* SNP caprino 50K da *Illumina* mostra-se eficiente para análise de estrutura populacional em caprinos Marota; Há indício de introgressão gênica da raça Anglonubiana nos rebanhos de caprinos Marotas analisados.

**Palavras-chave:** *Chip* SNP. Estrutura populacional. Recursos genéticos. Rebanho associado. Conservação.

## INTRODUÇÃO

Os caprinos chegaram ao Brasil, trazidos por colonizadores portugueses, e passaram a ser criados à margem de práticas zootécnicas e sem seleção direcionada para a produção. Foram multiplicados desordenadamente e, submetidos a processo de seleção natural, deram origem aos vários tipos étnicos encontrados atualmente no país (BARROS *et al.*, 2011).

Dentre esses, está o grupo genético Marota, naturalmente adaptado à região semiárida do Brasil, logo se apresenta como fonte de genes favoráveis a se adequar às adversidades

desse ecossistema (ARAÚJO *et al.*, 2009), justificando, portanto, a necessidade da manutenção de sua identidade como grupos genéticos desse ambiente.

A erosão genética é uma ameaça para grupos em risco de extinção, que apresentam tamanho populacional pequeno, como o grupo caprino Marota. O maior perigo é imposto pela introgressão de raças comerciais, como a raça Anglonubiana no nordeste.

Animais desse grupo genético estão presentes na maioria dos rebanhos da região nordeste, evidenciando sua capacidade de adaptação a ambiente quente (SANTOS *et al.*, 2005) e sua importância regional (OLIVEIRA *et al.*, 2009; SILVESTRE *et al.* 2015).

A conservação de recurso genético animal preconiza a manutenção da raça pura e as tecnologias disponíveis nas áreas de genética molecular contribuem para a conservação dos grupos genéticos de animais em risco de extinção (ARAÚJO *et al.*, 2009), mostrando eficiência para quantificar a diversidade genética dos animais (MENEZES *et al.*, 2006) e para detectar a ocorrência de introgressão ou cruzamentos num determinado grupo (TORO; FERNÁNDEZ; CABALLERO. 2009).

Foi com o objetivo de facilitar os estudos genéticos sobre caprinos que, em 2010, o IGGC (*INTERNATIONAL GOAT GENOME CONSORTIUM*) propôs a criação de um *Chip* SNP, específico para caprino, de densidade moderada (50-60K) e segregando com alta a moderada frequência nas raças Alpina, Boer, Crioulo, Katjang, Saanen e Savanna (TOSSER-KLOPP *et al.*, 2014), fato esse que marcou positivamente as pesquisas genéticas sobre a espécie (LASHMAR; VISSER; VAN MARLE-KÖSTER, 2015).

Essa tecnologia vem sendo útil desde a caracterização do nível de diversidade genética (KIJAS *et al.*, 2013), até a identificação de genes associados a funções biológicas específicas e importantes (ARAÚJO; CAETANO, 2016; KIJAS *et al.*, 2013; RESENDE *et al.*, 2008).

Diante disso, objetivou-se aplicar informações obtidas com o uso do *Chip* SNP caprino 50K da *Illumina* no estudo da estrutura genômica populacional do caprino Marota em dois rebanhos, um institucional de conservação *in situ* e outro particular associado, e na investigação de indícios de erosão genética provocada pela raça Anglonubiana nesses rebanhos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Declaração de ética

Todos os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com normas do comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal do Piauí, número de registro 058/14.



## Rebanhos analisados

Foram utilizadas, nas análises, amostras de 86 caprinos do grupo genético Marota. Destes, 76 foram amostrados do rebanho institucional de conservação *in situ*, mantido pela Embrapa Meio Norte, localizado no município Castelo do Piauí-PI (latitude 05°19'20" sul e longitude 41°33'09" oeste). Outros 10 animais Marota foram amostrados de um rebanho particular, localizado no município de Elesbão Veloso-PI (latitude 06°12'07" sul e longitude 42°08'25" oeste), sendo este um rebanho que está em formação, recebendo eventualmente animais de outros rebanhos, inclusive do institucional de conservação *in situ*.

Diante da participação expressiva de animais da raça Anglonubiana em rebanhos do nordeste do Brasil, foram genotipados 10 animais dessa raça pertencentes ao rebanho institucional da UFPI e localizado em Teresina-PI (05°02'39,95" sul, longitude 42°47'03,70" oeste), para averiguar a ocorrência de introgressão de genes dessa raça nos rebanhos estudados.

## Coleta de sangue, extração do DNA e genotipagem

Foi coletado 3 ml de sangue de cada animal por punção a vácuo da veia jugular. O tubo utilizado continha fluoreto de sódio, inibidor glicolítico, e EDTA, para preservar a morfologia celular e manter a qualidade da amostra.

O procedimento de isolamento de DNA foi realizado com uso de *Kit* de extração *AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep* (Cód. AP-MN-BL-GDNA-50).

Foi realizada a genotipagem das 96 amostras utilizando o *Chip* SNPs caprino 50K da *Illumina*, contendo 53.347 SNPs uniformemente espaçados nos cromossomos. O *Chip* foi fabricado de acordo com a tecnologia *Infinium* da *Illumina*<sup>TM</sup>, usando a plataforma *iScan*.

O protocolo de genotipagem foi seguido conforme o estabelecido pelo fabricante (*ILLUMINA*, 2013), onde foram realizadas, as seguintes fases: 1) Amplificação isotérmica do DNA; 2) Incubação das amostras (*over night*); 3) Fragmentação das amostras; 4) Precipitação e ressuspensão do DNA fragmentado; 5) Preparação do *Chip*; 6) Hibridização (*over night*); 7) Extensão enzimática de uma única base; 8) Visualização das imagens na plataforma *iScan* e 9) Resultados gerados e armazenados em planilhas.

## Controle de Qualidade dos dados

Para o controle de qualidade da genotipagem utilizou-se a versão 1.9 do programa *Plink* (*PURCELL et al.*, 2007), visto que a utilização de procedimentos de controle de qualidade em

estudos com *Chips* SNPs tem a função de remover erros laboratoriais de genotipagem e de chamada dos genótipos (ANDERSON *et al.*, 2010).

Eliminaram-se das análises as amostras com *Call Rate* inferior a 80% e os seguintes critérios foram aplicados para identificar marcadores moleculares informativos para cada grupo caprino: nas análises de diversidade genética foram utilizados SNPs com *Call Rate* maior que 90%; nas análises de estrutura genética de população, utilizaram-se SNPs comuns a esses dois grupos genéticos que apresentavam *Call Rate* superior a 90%, Alelos de Menor Frequência (MAF) superior a 1% e que estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EWH), determinado pelo teste exato de Fisher com 1.000 permutações, a uma probabilidade maior que 5%.

### **Análise de Diversidade e da Estrutura genética de populações**

Os Índices básicos de diversidade genética, incluindo a porcentagem de marcadores polimórficos e as frequências alélicas, foram calculados utilizando-se o pacote *hierfstat* (versão 0.04-22, 2005) da plataforma R (The R Project for Statistical Computing, versão 3.2.3) (GOUDET, 2005).

As frequências alélicas foram obtidas para cada grupo. Com base no MAF, procedeu-se a identificação de alelos raros (MAF menor do que 0,01) e fixados (MAF igual a zero) nos rebanhos. Alelos polimórficos foram definidos como aqueles que apresentaram MAF entre 0,01 e 0,50. Além desta classificação, também se definiram os alelos como altamente polimórficos quando apresentaram valores de MAF entre 0,30 e 0,50. Uma análise comparativa foi usada para identificar SNPs fixados, raros ou polimórficos no genoma de cada grupo genético. Essas análises foram realizadas utilizando o programa Plink versão 1.9 (PURCELL *et al.*, 2007).

A diferenciação genética entre os grupos foi calculada utilizando o  $F_{ST}$  (WRIGHT, 1965), obtido através do pacote *hierfstat* do programa R (GOUDET, 2005).

Para identificar a presença de subdivisão entre e dentro das populações, e de indícios de erosão genética provocada pela raça Anglonubiana nas populações Marota analisadas, utilizou-se o programa *Structure* versão 2.3.3 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), com o número de grupos (K) variando de dois a nove. Dez corridas de 10.000 interações após uma corrida de 10.000 interações foram realizadas para cada K. O modelo amostral usado no programa foi o *Admixture* sem informações das populações *a priori*. O número mais provável de grupos genéticos, formados pelos dados apresentados, foi estimado pelo método  $\Delta K$  (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005).

Para complementar os resultados do *Structure* quanto à quantificação de erosão genética, a relação entre os rebanhos foi aferida por Análise de Componentes Principais (PATTERSON; PRICE; REICH, 2006), estimados a partir da matriz de distância Euclidiana e obtidos com o pacote ape do programa R (PARADIS; CLAUDE; STRIMMER, 2004)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Controle de qualidade e análise de diversidade

Constatou-se que todas as amostras apresentaram *Call Rate* maior que 80%, não violando esse critério estabelecido como controle de qualidade, logo, nenhuma amostra foi excluída das análises e os 96 animais foram usados no estudo.

Em relação aos marcadores, tanto nas amostras dos caprinos Marota como nas amostras do Anglonubiano foi elevado o número de SNPs com *Call Rate* superior a 90%, constatando-se, respectivamente, que 98,97% e 97,79% dos 53.347 SNPs que compõem o *Chip* utilizado, não violaram esse critério de qualidade.

Embora os caprinos Marota e os Anglonubianos não estejam incluídos entre os que foram genotipados para a construção do *Chip* SNP caprino 50K lançado pela *Illumina* (ILLUMINA, 2011), os valores elevados do *Call Rate* das amostras e dos marcadores mostraram que o referido *Chip* apresentou boa qualidade de genotipagem, confirmando a sua abrangência para caracterizar a diversidade genética em caprinos.

Com isso, esses animais se juntam a outros grupos caprinos que também não estão na base de sua construção, mas cuja genotipagem foi considerada de boa qualidade, contribuindo para reduzir a escassez de informação genômica nesta espécie. A título de exemplo, citam-se os resultados de Tosser-Klopp *et al.* (2014), que validaram o mesmo *Chip* para caprinos das raças Angorá, Jinlan e Skopelos. Citam-se também Kijas *et al.* (2013), que utilizaram com sucesso o mesmo *Chip* para estudos de diversidade em caprinos das raças Boer, Cashmere e Rangelang, além da validação do referido *Chip* em cabras Angorá do sul da África, feita por Lashmar, Visser e Van Marle-Köster (2015).

A porcentagem de SNPs polimórficos ( $0,01 < \text{MAF} < 0,5$ ) apresentada pelos animais Marota e pelo Anglonubiano foi, 97,8% e 99,4%, respectivamente. Analisando-se numa perspectiva ampla, o nível de polimorfismo alto (Tabela 1) está dentro da faixa de variação apresentada na literatura por Kijas *et al.* (2013) em populações australianas de caprinos da raça Boer (97,1%), Cashmere (98%) e Rangeland (99,6%), e por Lashmar, Visser e Van

Marle-Köster (2015), que testaram a eficiência do *Chip* em cabras Angorá sul africanas e observaram 88,1% de SNP polimórfico.

**Tabela 1-** Alelos de Menor Frequência (MAF) no rebanho de conservação do caprino Marota e no rebanho da raça Anglonubiana, determinados através de dados obtidos com *Chip* SNP caprino 50K.

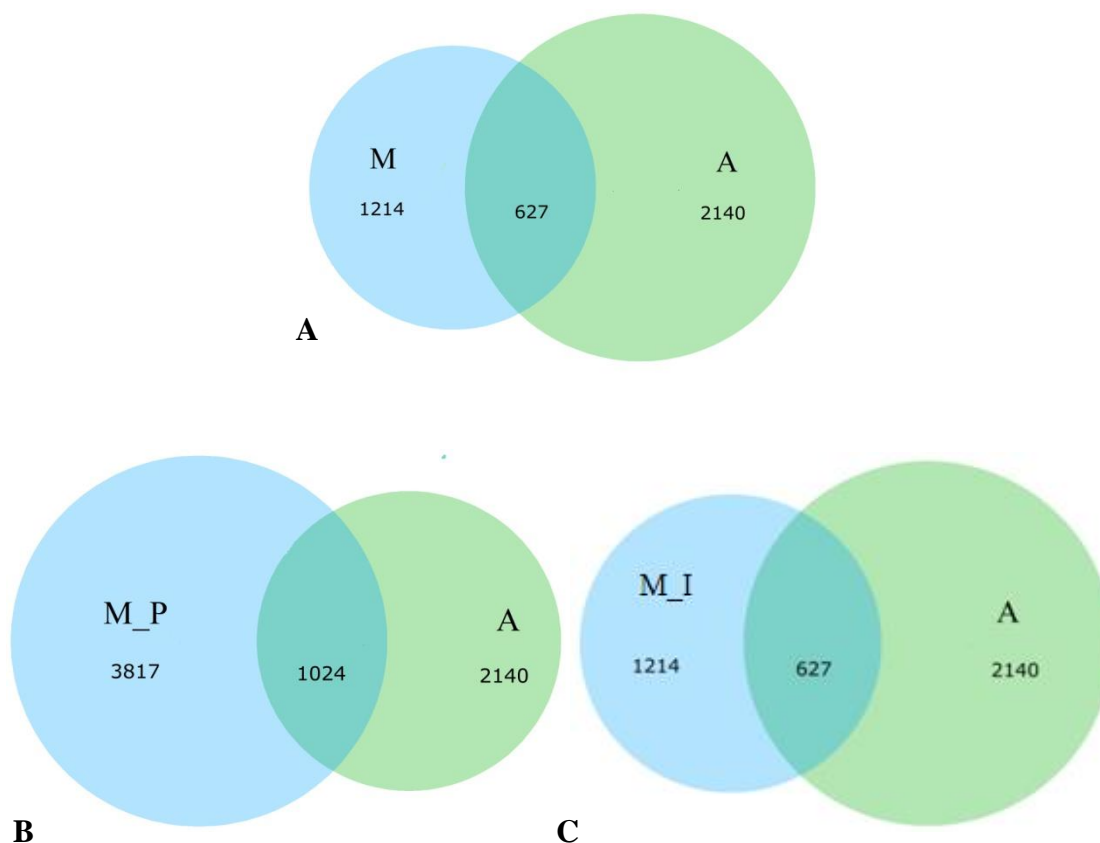
Caprinos	Alelos	Quantidade do alelo de Menor Frequência – MAF						
		Min	Máx	Mediana	Média	Variância	DP	SNPs
Marota	Todos	0,000	0,500	0,244	0,242	0,023	0,151	53.040
	Raros	0,006	0,007	0,000	0,002	0,000	0,000	865
	Polimórficos	0,012	0,500	0,256	0,254	0,021	0,145	52.175
	Altamente Polimórficos	0,300	0,500	0,401	0,401	0,003	0,055	20.893
Anglonubiana	Todos	0,000	0,500	0,300	0,279	0,020	0,143	53.040
	Raros	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Polimórficos	0,050	0,500	0,300	0,294	0,017	0,131	53.040
	Altamente Polimórficos	0,300	0,500	0,400	0,391	0,004	0,063	28.672

Min e Max são os valores mínimos e máximos do MAF, respectivamente. DP – Desvio Padrão.

Já quando se consideram apenas os SNPs altamente polimórficos ( $0,3 < \text{MAF} < 0,5$ ), os caprinos Anglonubianos se destacam em relação aos caprinos Marota, apresentando 53,7% de seus SNPs como sendo altamente polimórficos em relação a 39,2%, encontrados nos caprinos Marota (Tabela 1). O manejo reprodutivo pode justificar esses valores, pois o rebanho de conservação institucional é fechado com reposição interna, enquanto ocorre troca de reprodutores a cada dois anos no rebanho Anglonubiano, além de monta controlada sem favorecer a endogamia.

Observa-se que apenas os animais Marota apresentaram SNPs com alelos raros ( $\text{MAF} < 0,01$ ) (Tabela 1). Se considerarmos que em uma amostra menor é mais difícil encontrar alelos raros, a pequena quantidade de animais amostrados no rebanho Anglonubiano pode ter contribuição expressiva para esse resultado. Para complementar essa discussão, o diagrama de Venn (Figura 1) mostra SNPs fixados que são únicos e que são comuns aos dois grupos de animais.

**Figura 1** - Diagramas de Venn mostrando SNPs fixados (MAF=0) e em comuns (área sobreposta) entre caprinos Marota (M) e Anglonubiano (A): A) Caprinos Marota pertencentes aos rebanhos particular e institucional com os Anglonubianos; B) Caprinos Marota pertencentes ao rebanho particular (M\_P) com os Anglonubianos; C) Caprinos Marota pertencentes aos rebanhos institucional (M\_I) com os Anglonubianos.



A quantidade de SNPs fixados e exclusivos (587) encontrados nos animais Marota, bem inferior a 1.513 dos Anglonubiano (Figura 1A), pode ter influência do processo de seleção ao qual foram submetidos, pois segundo McManus, Paiva e Louvandini (2010), no caprino Marota a resposta à seleção natural ocorreu com sacrifício do desempenho produtivo para se adequar ao ambiente de criação, o que não ocorreu com o Anglonubiano.

Outro aspecto a se considerar, em relação ao caprino Marota, é que utilizam animais de reprodução incorporados do próprio rebanho, com a reposição priorizando os de padrão racial bem definido, e segundo Silvestre *et al.* (2015), esse procedimento leva à fixação de alelos, principalmente em rebanhos pequenos.

O número de SNPs fixados, encontrado no rebanho Marota particular (3.817) (Figura 1 B), maior que o observado no rebanho Marota institucional (1.811) (Figura 1C), pode ser atribuído ao fato do rebanho particular apresentar menor tamanho efetivo, sendo formado, em

2014, por cerca 33 animais, destes apenas 2 machos, o que contribui para a ocorrência de deriva genética.

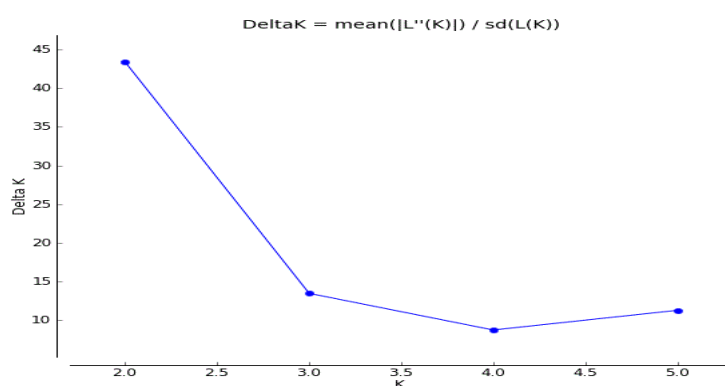
Há também a perspectiva desse resultado ter influencia da ocorrência de introgressão gênica a partir da raça Anglonubiana, que prevalece nos rebanhos do Piauí (CASTELO BRANCO, 2010), principalmente no rebanho particular, que apresentou 1.024 SNPs fixados que foram compartilhados com o Anglonubiano (Figura 1B), superior à quantidade de SNPs fixados compartilhado entre o rebanho institucional e o Anglonubiano (741) (Figura 1C).

O valor do  $F_{ST}$  igual a 0,16 é um indício de que a diferenciação genética é considerável entre os animais Marota e os Anglonubianos. Portanto, pode ser visto como indício consistente que o caprino Marota se apresenta como fonte de diversidade genética para a caprinocultura na região. Para essa afirmação, considerou-se como referência os resultados apresentados por Grasso *et al.* (2014) que, comparando raças de ovinos Crioula, Corriedale e Merino, constataram maior diferenciação genética entre animais Crioulo e animais de raças comerciais do que comparando animais de raças comerciais entre si.

### Estrutura de população e erosão genética

Para a avaliação mais detalhada da variabilidade nos caprinos Marota, analisou-se a estrutura da população utilizando-se 47.398 SNPs presentes nos dois grupos amostrados, que apresentaram  $MAF > 1\%$ ,  $CR > 90\%$  e estavam em EHW. Observa-se na Figura 2, pelo método  $\Delta k$  (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005), que há duas populações nos dados analisados.

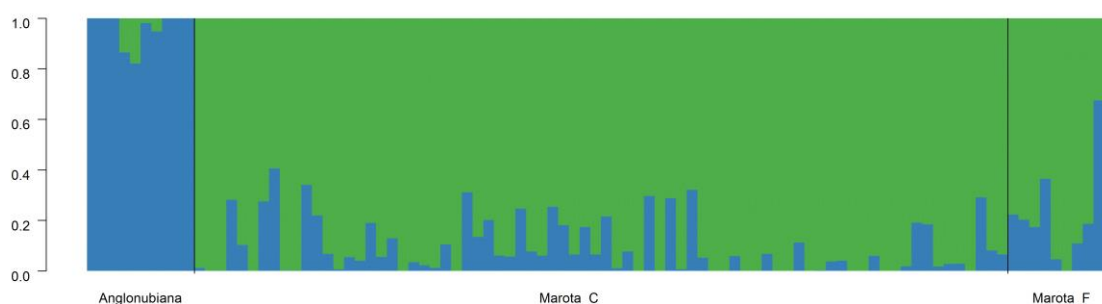
**Figura 2.** Valor de  $\Delta K$  mostrando pico de maior probabilidade para haver dois grupos ( $K = 2$ )



Na Figura 3 são apresentados os agrupamentos fornecidos pelo programa *Structure* com base em método Bayesiano, assumindo que existem duas populações ( $K=2$ ). Segundo Grasso *et al.* (2014), o programa *Structure* permite a alocação dos indivíduos em grupos com base

nas suas semelhanças genéticas, fornecendo, assim, informação sobre a diversidade genética observada e sobre o número de populações ancestrais subjacentes.

**Figura 3.** Gráfico da estrutura populacional estimada com 47.398 SNPs considerando dois grupos de animais ( $K = 2$ ). Cada indivíduo é uma coluna, a cor é a composição, representando a fração de cada grupo genético. (C é o rebanho institucional e F o rebanho particular).



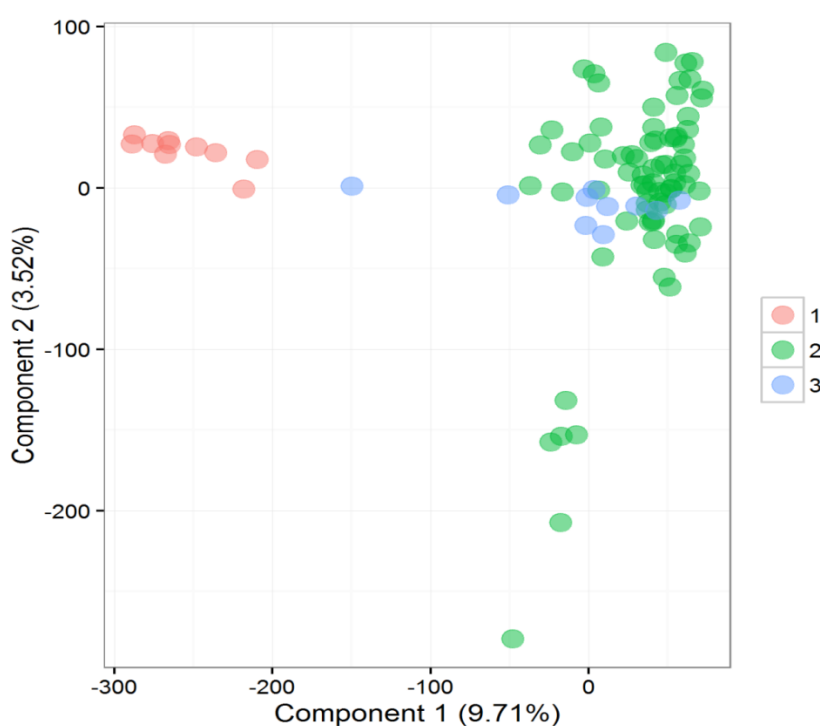
Considerando-se que existem dois grupos de animais ( $K=2$ ), os rebanhos Marota e Anglonubiano foram claramente diferenciados. Além disso, observa-se que a variabilidade constatada pode ser associada a uma origem genética específica, no caso aqui estudado, à introgressão de genes da raça Anglonubiana nos rebanhos Marota (Figura 3).

A introgressão detectada foi mais acentuada no rebanho particular, com 9 em 10 animais apresentando indício de possuir genes da raça Anglonubiana, enquanto no rebanho institucional de conservação a proporção correspondeu a 52 animais em 76 amostrados. Por se tratar de rebanho de conservação, é importante a afirmação de Núñez-Domínguez *et al.* (2016), que o risco de erosão genética está incluído entre os fatores a serem considerados para a conservação e uso sustentável de recursos zoogenéticos.

A possibilidade de desenvolvimento de *Chip* SNP com menor densidade para baratear genotipagem, sem perda de qualidade, e a visualização, no gráfico, da proporção de introgressão gênica, em cada animal, que no rebanho Marota institucional variou de 0 até 40% e no rebanho particular de 0 a 70%, torna o uso de *Chip* SNP e do programa *Structure* ferramentas úteis para o monitoramento da ocorrência de erosão genética em rebanhos de animais em risco de extinção. Uma recomendação de natureza similar a essa foi relatada por Cardoso (2016), para determinar a proporção das raças paternas presente num animal sintético, com a argumentação de que o conhecimento preciso da composição do animal cruzado possibilitará avaliar qual será a proporção de cada raça mais adequada para a máxima produção em ambientes específicos.

Observa-se na Figura 4 que a dispersão dos animais em plano cartesiano, formado pelos dois primeiros componentes principais, separou bem os dois grupos genéticos, que explicaram juntos 13,25% (9,71% e 3,52%, respectivamente) da variação, similarmente ao verificado com o *Structure*.

**Figura 4**—Dispersão dos animais em Plano carteziado com os dois primeiros Componentes Principais estimados com dados de SNPs: (1 - Animais Anglonubiano; 2 - Marota do rebanho institucional; 3 - Marota do rebanho particular).



Observa-se também que, apesar do rebanho institucional de conservação *in situ* ser fechado, alguns animais se dispersaram, indicando tratar-se de rebanho com certo grau de diversidade genética. Porém, ao se avaliar esse resultado com os obtidos pelo *Structure*, uma das causas da variação se mostra evidente a nível individual, que é a presença de genes Anglonubiano nos dois rebanhos Marota.

A título de ilustração, observa-se que um animal Marota do rebanho particular se aproximou mais dos animais da raça Anglonubiana (Figura 4), indicando haver maior participação dessa raça na sua composição.

Também se pode considerar uma possível ocorrência de introgressão de genes oriundos de outras raças no rebanho particular, pois este está em formação com a introdução de animais



de outros rebanhos, feita geralmente sem análise genética mais apurada, às vezes apenas com a exigência de que o animal apresente características fenotípicas padrão do caprino Marota.

### CONCLUSÕES

1. O nível de polimorfismo e diferenciação genética constatada apresenta o caprino Marota com potencial para ser fonte de diversidade genética para caprinocultura da região;
2. O *Chip* SNP caprino 50K da *Illumina* mostra-se eficiente para análise de estrutura populacional em caprinos Marota, grupo genético naturalmente adaptado ao ambiente semiárido do Brasil;
3. Há indício de introgressão gênica da raça Anglonubiana nos rebanhos de caprinos Marota analisados;
4. É importante o monitoramento dos risco de ocorrência de erosão genética com uso de informações genômicas em rebanhos de raças em risco de extinção.

### AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Piauí, à Embrapa Meio Norte e ao proprietário da fazenda Faveira, o senhor José Ferreira Dantas Filho, por terem permitido análises em seus rebanhos, e ao Instituto Federal do Piauí por ter ajudado financeiramente, através do programa PROAGRUPAR, para realização desse trabalho.

### CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesse, que poderia ser entendido como prejudicial para a imparcialidade da pesquisa relatada.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, C. A. *et al.* Data quality control in genetic case-control association studies. **Nature protocols**, v. 5, n. 9, p. 1564-1573, 2010.

ARAÚJO, A. M. *et al.* 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, 2009.

ARAÚJO, R. O.; CAETANO, A. R. Low density genomic data for animal breeding: critical analysis and perspectives of the GoldenGateBeadxpress technology. **Ciência Rural**, v. 46, n. 11, p. 2005-2011, 2016.

BARROS, E. A. *et al.* Estrutura populacional e variabilidade genética da raça caprina Marota. **Archivos de Zootecnia**, v. 60, n. 231, p. 543-552, 2011.

CARDOSO, F. R. The use of genomic tools in cattle breeding and production. In: 53º CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, \_\_\_\_\_ 2016. Gramado. RS. **Anais de Palestras...** Gramado: SBZ Divulgação eletrônica. 2016.

CASTELO BRANCO, J. F. **Caracterização fenotípica, sistema de produção, distribuição geográfica e aceitação do caprino Nambi no estado do Piauí.** 75f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

GOUDET, J. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 184-186, 2005.

GRASSO, A. N. *et al.* Genomic variation and population structure detected by single nucleotide polymorphism arrays in Corriedale, Merino and Creole sheep. **Genetics and molecular biology**, v. 37, n. 2, p. 389-395, 2014.

ILLUMINA. Frequently Asked Questions: International Goat Consortium *BeadChip*. 2011. Disponível em: <[http://snp.toulouse.inra.fr/~sigenae/50K\\_goat\\_snp\\_chip/Goat\\_consortium\\_FAQ\\_082211.pdf](http://snp.toulouse.inra.fr/~sigenae/50K_goat_snp_chip/Goat_consortium_FAQ_082211.pdf)>. Acesso em: 12 mar 2015.

ILLUMINA. *Illumina* Infinium HTS Assay, Manual Protocol. 2013. Disponível em: <[http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/humanomniexpress-24/infinium\\_hts\\_assay\\_manual\\_protocol\\_experienced\\_user\\_card\\_15045737\\_a.pdf](http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/humanomniexpress-24/infinium_hts_assay_manual_protocol_experienced_user_card_15045737_a.pdf)>. Acesso em: 26 jun. 2016.

KIJAS, J. W. *et al.* Genetic diversity and investigation of polledness in divergent goat populations using 52.088 SNPs. **Animal Genetics**, v. 44, n. 3, p. 325-335, 2013.

LASHMAR, S. F.; VISSER, C.; VAN MARLE-KÖSTER, E. Validation of the 50k *Illumina* goat SNP *Chip* in the South African Angora goat. **South African Journal of Animal Science**, v. 45, n. 1, p. 56-59, 2015.

MENEZES, M. P. C. *et al.* Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1336-1341, 2006.

McMANUS, C.; PAIVA, S.; LOUVANDINI, H. **Caprinos no Brasil**. Publicado em animal.unb.br. 2010. 17 p. Disponível em: <[http://inctpecuaria.com.br/images/informacoes-tecnicas/serie\\_tecnica\\_caprinos.pdf](http://inctpecuaria.com.br/images/informacoes-tecnicas/serie_tecnica_caprinos.pdf)>. Acesso em: 19 de fev. 2015.

NÚÑEZ-DOMÍNGUEZ, R. *et al.*, La adaptabilidad de los recursos zoogenéticos Criollos, base para enfrentar los desafíos de la producción animal. **Archivos de Zootecnia**, v. 65, n. 251, p. 461-468, 2016.

OLIVEIRA, D. F. *et al.* Desenvolvimento ponderal e características de crescimento de caprinos da raça Anglonubiana criados em sistema semi-intensivo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 2, p. 256-265, 2009.

PARADIS, E.; CLAUDE, J.; STRIMMER, K. 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. **Bioinformatics**, v. 20, n. 2, p. 289-290, 2004.

PATTERSON, N.; PRICE, A.; REICH, D. Population Structure and Eigen analysis. **PLoS Genetics**, v. 2, n. , p. e190, 2006.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959. 2000.

PURCELL, S. *et al.* 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.

RESENDE, M. D. V. *et al.* Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 56, p. 63-77, 2008.

SANTOS, F. C. B, *et al.* Adaptability of exotic goat and naturalized to the climatic conditions of the tropic semi-arid Brazilian northeast. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 142-149, 2005.

SILVESTRE, E. D. A, *et al.* A note on the distribution of genetic diversity of Anglo-Nubian goats in central-northern farms of Piauí, Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 44, n. 4, p. 155-160, 2015.

TORO, M.; FERNÁNDEZ, J.; CABALLERO, A. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. **Livestock Science**, v. 120, n. 3, p. 174–195, 2009.

TOSSER-KLOPP, G. *et al.* Design and characterization of a 52K SNP *Chip* for goats. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86227, 2014.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. **Evolution**, Lancaster, v. 19, n. 3, p. 395- 420, 1965.

## 5 CAPÍTULO II

**Diversidade em caprino naturalizado no Brasil e manejo genético em rebanhos de conservação**

## Diversidade em caprino naturalizado no Brasil e manejo genético em rebanhos de conservação

**Resumo:** Objetivou-se avaliar diversidade genética em caprinos Marota no Piauí e explorá-la em discussão de manejo genético de animais em rebanho de conservação. Utilizando-se *Chip* SNP caprino 50K genotipou-se 76 animais do rebanho de conservação institucional e 10 de um rebanho particular. Avaliou-se a dispersão dos animais por Análise de Componentes Principais (ACP). Simularam-se acasalamentos definidos por maior distância no dendrograma e menor consanguinidade (Manejo I) para discussão de manejo de animais para reprodução, em relação a fazer ao acaso (Manejo II). Valores altos de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) nos animais adultos ( $H_o=0,372$  e  $H_e=0,405$ ) e nas crias ( $H_o=0,359$  e  $H_e=0,374$ ) e média do coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) igual a 6,4% indicam ser baixo o risco de perda/fixação de genes no rebanho de conservação institucional. O rebanho particular apresentou variabilidade genética ( $H_o=0,374$  e  $H_e=0,498$ ), porém com gravidade em relação à endogamia ( $F_{IS}= 22,7\%$ ). A ACP indicou semelhança genética entre os dois rebanhos. A simulação de 10 pares de acasalamentos de cada reprodutor indicou que a média do coeficiente de consanguinidade do casal no Manejo I ( $3,5\pm 2,6\%$ ), foi estatisticamente inferior à média dos pares acasalantes do Manejo II ( $5,7\pm 4,0\%$ ), pelo teste F ( $P<0,05$ ). Concluiu-se que existe variabilidade genética nos rebanhos analisados, porém com indício de consanguinidade; e que em rebanho com pequeno tamanho efetivo e reposição feita com animais do próprio rebanho, a definição de acasalamentos com base em critérios genéticos acurados, é opção para controle de consanguinidade.

**Palavras-chave:** Marota, microarranjos, recursos genéticos, risco de extinção, SNP

### Introdução

Os caprinos trazidos para o país no período da colonização portuguesa foram submetidos à seleção natural e originaram raças com características peculiares de adaptação, sendo conhecidos como “raças ou grupos genéticos locais” (Mariante *et al.* 2011, p. 64). Durante o processo de adaptação às condições adversas do semiárido do nordeste perderam características de desempenho produtivo, o que levou a terem importância apenas regional (Egito *et al.* 2002, p. 40), ou como provável fonte de genes de adaptação a ambiente quente.

Um exemplo típico é o caprino do grupo genético Marota, que, segundo Araújo *et al.* (2009, p. 105) representa um material genético importante para manutenção da biodiversidade dos animais domésticos. Apesar de sua importância, esses animais encontram-se em risco de extinção e vem sendo mantido em programa institucional de conservação *in situ* no semiárido do Piauí.

Geralmente as raças em risco de extinção são mantidas em pequenas populações. Nelas pode ser vista como principal agravante a perda de variabilidade pela consanguinidade. Caso ocorra, o uso de elevada pressão de seleção, visando maior desempenho em características de importância econômica,

mesmo justificado pela conservação com utilização comercial, também implicará em perda de variabilidade.

Assim, esses dois fatores podem ser potencialmente danosos para a perda da identidade desses animais como genótipos com adaptação a ambientes extressantes e que, segundo Barros *et al.* (2011, p. 543), constituem um patrimônio biológico e cultural que podem ser únicos e relacionadas à rusticidade adquirida em resposta a intempéries ambientais, merecendo atenção especial para a garantia da manutenção de sua variabilidade e da sua identidade como grupos genéticos desse ambiente.

No Brasil, há limitações financeiras que comprometem a conservação de raças em risco de extinção, e, por ser pequeno o número de animais em rebanhos de conservação, estes devem, verdadeiramente, representar a variabilidade genética do grupo. Assim, a caracterização genética de animais em rebanho de conservação ganha ainda mais importância, principalmente, se for utilizada para auxiliar o manejo genético do rebanho, pois poderá contribuir com a manutenção ou até mesmo com a ampliação da variabilidade genética de forma eficiente.

Dentre as opções técnicas disponíveis para ampliação de variabilidade genética em rebanho de conservação, Silva Filho (2012, p. 51) chama atenção para a introdução de progenitores de outros rebanhos, porém, preferencialmente que não tenham relação de parentesco direta com o rebanho em questão e que sejam provenientes de rebanhos onde não existam indícios de erosão genética e onde a consanguinidade esteja controlada. Quando isso não pode ocorrer, outra opção seria interferir no manejo dos animais, selecionando progenitores tanto com base em critérios de desempenho, características influenciáveis pelo ambiente, como também incluir indicador de variabilidade genética indiferente a variações ambientais, como o marcador molecular do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), pois, segundo Curi *et al.* (2013, p. 92) é a forma de variação mais comum encontrada no DNA.

Logo, a constatação de aumento da consanguinidade ou de déficit de heterozigosidade, com base nesses marcadores, deve ser vista como um sinal de alerta de que é necessário recorrer a medidas práticas que inibam a perda da variabilidade, para impedir a perda de informação genética.

Diante disso, objetivou-se analisar a variabilidade genética em dois rebanhos de criação do caprino Marota no Piauí, mensurada com *Chip* SNP caprino 50K, e sua utilização para auxiliar o manejo genético em rebanhos de conservação, visando manter variabilidade e baixa consanguinidade.

## **Material e Métodos**

Os procedimentos metodológicos realizados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Piauí, onde o projeto encontra-se cadastrado com o número 058/14.

Avaliou-se o rebanho de conservação *in situ* institucional mantido pela Embrapa Meio Norte no estado do Piauí e, para servir como parâmetro de comparação relativo à diversidade genética, avaliou-se também um rebanho particular formado com base na aquisição de animais do rebanho institucional.

O rebanho do Núcleo de Conservação genética institucional está localizado no município de Castelo do Piauí (latitude 05°19'20" sul e longitude 41°33'09" oeste), sendo composto por 111 animais, dos quais 76 foram utilizados nesse estudo. Amostrou-se 18 machos e 45 fêmeas em idade reprodutiva, independentemente da relação de parentesco, além de crias (13 crias) contemporâneas no primeiro semestre de 2014.

O rebanho privado avaliado, localiza-se no município de Elesbão Veloso-PI (latitude 06°12'07" sul e longitude 42°08'25" oeste) e na data de coleta dos dados se encontrava formado por 32 animais, dos quais 1 macho e 9 fêmeas foram amostrados de forma aleatória para participar do estudo.

A extração de DNA foi realizada a partir de sangue coletado diretamente na veia jugular, utilizando-se tubo *Vacutainer* contendo fluoreto de sódio, que é um inibidor glicolítico, e EDTA, que preserva a morfologia celular. O procedimento de isolamento de DNA foi realizado com uso de *Kit* de extração *AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep*.

Em seguida, foi realizada a genotipagem das 86 amostras utilizando-se o *Chip* de SNPs caprino 50K da *Illumina*. No protocolo de genotipagem foram seguidas as etapas e passos estabelecidos pelo fabricante (*Illumina*, 2013), que estão numeradas a seguir: 1) Amplificação isotérmica do DNA; 2) Incubação das amostras (over night); 3) Fragmentação das amostras; 4) Precipitação e ressuspensão do DNA; 5) Preparação do *BeadChip*; 6) Hibridização (over night); 7) Extensão enzimática de uma única base; 8) Visualização das imagens na plataforma *iScan* e 9) Resultados gerados e armazenados em planilhas.

Foram excluídos das análises marcadores SNPs pertencentes aos cromossomos sexuais, com *Call Rate* menor que 95%, com Alelo de Menor Frequência (MAF) inferior a 5% e que se mostraram em desequilíbrio de Hardy Weinberg, determinado pelo teste exato de Fisher com 1000 permutações e considerando  $P < 5\%$ .

Para a exclusão de determinada amostra os critérios foram: apresentar *Call Rate*  $< 90\%$ , ou seja, apresentar menos de 90% de genótipos determinados pelo painel de genotipagem; apresentar heterozigosidade acima de três desvios padrões 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.

Para avaliação da qualidade dos dados e para calcular o coeficiente de consanguinidade individual dos animais utilizou-se o programa *Plink* versão 1.9 (Purcell *et al.*, 2007).

A heterozigosidade observada ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), foram calculados utilizando-se o pacote hierfstat (versão 0.04-22, 2005) da plataforma R (The R Project for Statistical Computing, versão 3.2.3) (Goudet, 2005).

Na perspectiva de recomendar a permuta de animais entre os rebanhos, a diversidade genética dos dois rebanhos foi avaliada com a utilização da Análise de Componentes Principais (ACP), utilizando-se a Matriz de Distância Euclidiana obtida através do pacote Adegenet (versão 2.0.1) da Plataforma R (The R Project for Statistical Computing, versão 3.2.3) (Jombart & Ahmed, 2011).

A matriz de Distância de Nei foi obtida e usada na construção de dendrograma do rebanho institucional, com os animais estratificados em macho e fêmea, utilizando-se o Pacote Poppr (versão 2.1.0) do R (Kamvar *et al.*, 2014.) e o método de agrupamento UPGMA (Sokal & Michener, 1958). A consistência dos nós foi estimada utilizando-se o critério de *Bootstraps* com 1.000 reamostragens.

Levando-se em consideração que pode ocorrer redução de variabilidade como consequência do incremento na consanguinidade ou pela aplicação da pressão de seleção elevada, visando maior desempenho em características de importância econômica, além do fato de que a reposição, se feita com machos e fêmeas do próprio rebanho, é um procedimento que implica em aumento de consanguinidade, utilizou-se a dispersão dos animais no dendrograma, feito com dados das análises genômicas realizadas em animais do rebanho de conservação institucional, e o coeficiente de consanguinidade individual desses animais, para dar suporte à discussão sobre descarte, reposição e a forma de acasalamentos para rebanhos de conservação.

Para isso, considerou-se a realização de uma Estação de monta com cinco reprodutores, simulando o que tem sido feito no rebanho de conservação institucional, e duas situações de manejo:

#### Manejo I:

Para valorizar a capacidade de adaptação dos animais ao ambiente de criação, considerou-se que dois reprodutores (40% dos reprodutores utilizados) fossem selecionados com base no desempenho em características influenciadas pelo ambiente (produção, reprodução ou sanidade) para serem acasalados com qualquer fêmea do rebanho.

Para contemplar a variabilidade genética e contribuir para o controle da endogamia, que é o maior problema em rebanhos de conservação, considerou-se que os outros três reprodutores (60% dos reprodutores utilizados no manejo) fossem escolhidos dentre os de menor coeficiente de consanguinidade e que ocupassem posições em ramos distantes no dendrograma, obtido com base em dados moleculares, que são indiferentes a alterações no ambiente.

Na seleção de fêmeas, consideraram-se critérios semelhantes aos empregados na seleção dos machos, mas com menor pressão de seleção, aceitando-se mais de uma fêmea por ramo do dendrograma para adequar a relação macho/fêmea do rebanho.



## Manejo II:

Considerou-se a escolha dos cinco reprodutores feita ao acaso para serem acasalados aleatoriamente, através de sorteio, com as matrizes disponíveis, manejados como reprodutores múltiplos como ocorre no rebanho institucional de conservação do Marota.

Para a discussão das vantagens do Manejo I em relação ao Manejo II, escolheram-se três reprodutores e trinta matrizes do rebanho com base na maior distância no dendrograma, dentre os de menor coeficiente de consanguinidade individual (Manejo I), e três reprodutores e trinta matrizes por sorteio (Manejo II). Simulou-se o acasalamento de cada reprodutor com 10 matrizes, considerando-se entre eles a maior distância gráfica no dendrograma (Manejo I) e entre os animais escolhidos por sorteio (Manejo II).

Em seguida, considerando-se que a consanguinidade dos filhos é igual à média da consanguinidade dos pais, calculou-se a média dos coeficientes de consanguinidade do par reprodutor-matriz de cada acasalamento e realizou-se a análise de variância, considerando os dois manejos como tratamentos com 30 repetições (cada um dos três reprodutores com 10 matrizes). Compararam-se as médias pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

As análises de controle de qualidade da genotipagem dos caprinos Marota mostraram, como resultados, que 44.768 SNPs (83,91%) dos 53.347 que compõem o *Chip* utilizado, foram polimórficos e não violaram os critérios de qualidade estabelecidos; e que todas as 86 amostras estavam de acordo com os critérios estabelecidos, logo foram incluídas nas análises genômicas de caracterização da diversidade genética nos dois rebanhos.

Constataram-se elevados valores para  $H_o$  e  $H_e$  nos animais do rebanho de conservação institucional, tanto nos adultos ( $H_o = 0,372$  e  $H_e = 0,405$ ) como nas crias ( $H_o = 0,359$  e  $H_e = 0,374$ ) (Tabela I). Esses valores podem ser indicativo de variabilidade genética no rebanho, reafirmando resultado obtido por Costa *et al.* (2008, p. 4) com a utilização de marcadores microsatélites, o que pode ser visto como indício de que não está ocorrendo perda ou fixação significativa de alelos no rebanho. Porém, o fato do valor de  $H_o$  nas crias ser um pouco menor que o observado nos adultos pode ser um indicativo de deriva genética, mostrando o risco de diminuição da heterozigosidade de uma geração para outra.

**Tabela I.** Parâmetros populacionais estimados com dados obtidos por análises genéticas realizadas em animais de dois rebanhos Marota: um institucional (estratificado em adulto e cria) e outro particular, no Piauí.

Parâmetro populacional	Rebanho Institucional		Rebanho Particular
	Adultos	Crias	
Número de animais analisados	63	13	10
Heterozigosidade observada ( $H_o$ )	0,372	0,359	0,374
Heterozigosidade esperada ( $H_e$ )	0,405	0,374	0,498
$F_{IS}$	0,086	0,042	0,227

$F_{IS}$  - Coeficiente de Consanguinidade Intrapopulacional

Valores do  $F_{IS}$  observados nos animais adultos e nas crias, respectivamente, iguais a 0,086 e 0,042 (Tabela I), apesar de baixos, indicam que não convém considerar que a frequência de homozigotos na população está em equilíbrio em relação ao esperado para situação de acasalamento ao acaso. Porém, Barros *et al.* (2011, p. 551) avaliaram a estrutura genética desse rebanho utilizando dados de genealogia e não constatarem existência de consanguinidade ( $F_{IS} = -0,22$ ), resultado que consideraram em desacordo com a estreita base genética encontrada no rebanho analisado.

A esse respeito, Joaquim (2016, p. 18) justificou a constatação de maior valor para o coeficiente de consanguinidade obtido com dados genômicos em relação ao estimado com dados de pedigree, e baixa correlação entre eles, atribuindo esses resultados à ocorrência de efeito de recombinação gênica a partir de segmentos de homozigose, que não é considerado nas estimativas obtidas a partir de pedigree, além de falhas devido a erros de identificação do animal no pedigree.

A indicação de que existe diversidade nesse rebanho, mas com incerteza quanto aos riscos de perda acentuada ou não de variabilidade genética, significa que o núcleo institucional de conservação de caprinos Marota está atendendo à sua destinação, porém deve-se considerar o risco de ocorrência de consanguinidade. Assim, os resultados retratam de forma ampla o reflexo que o manejo com uso de reprodutores múltiplos (cinco animais por estação de monta) e com acasalamentos aleatórios, vem exercendo na composição genética do rebanho de conservação institucional.

A média da consanguinidade individual verificada no rebanho institucional foi 6,4% e, apesar de baixa, pode ser considerada como referência do risco de acasalamentos livres resultarem em perda ou fixação de genes no rebanho. Nesse sentido, Rodrigues *et al.* (2009, p. 106), analisando a importância da estrutura populacional para definição de planos de conservação, constataram a tendência de incremento na consanguinidade associada a tamanho efetivo de população pequeno, fato que também se verifica no rebanho institucional de conservação do caprino Marota.

A constatação da existência de consanguinidade no rebanho de conservação analisado se assemelha a resultados verificados em outras pesquisas, das quais recomendações estão disponíveis na

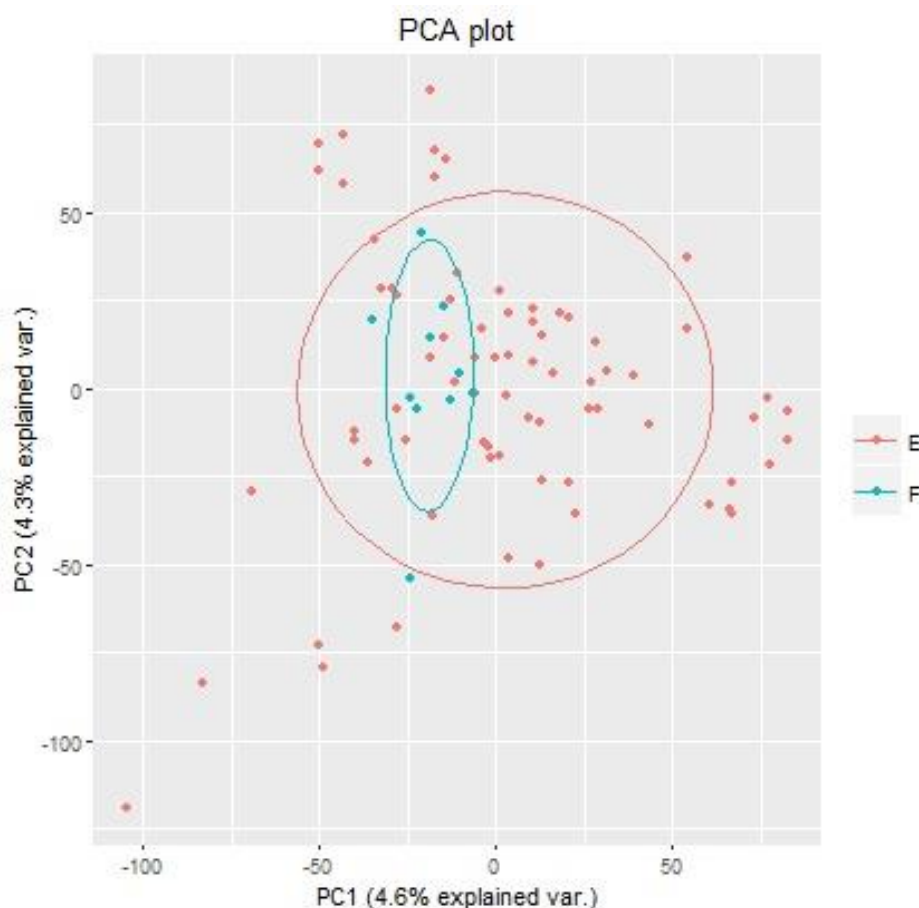
literatura, apresentadas como tecnologias com potencial para ampliação de variabilidade genética em pequenas populações.

Rodrigues *et al.* (2009, p. 107) recomendam recorrer a manejo reprodutivo com controle das famílias. De forma similar, Adán *et al.* (2007, p. 590), com base em resultados com ovinos da raça Ovella Galega, afirmaram que o controle de acasalamentos garante a manutenção do nível de consanguinidade. Em suínos Piau foi conseguido bom resultado com o controle reprodutivo baseado numa metodologia de acasalamento entre animais com menor coancestralidade, mantendo as famílias fundadoras (Veronese *et al.* 2014, p. 51).

A utilização do Algoritmo Modelo de evolução diferencial, apresentado por Santos *et al.* (2016, p. 749), também pode ser útil para rebanhos de conservação, pois explora a variabilidade genética e o desempenho, mas priorizando menor risco de consanguinidade e coancestralidade, definidos numa função objeto a ser maximizada por algoritmos diferenciais.

A introdução de progenitores do rebanho particular no rebanho institucional não é uma opção viável para ampliação de sua variabilidade genética, embora o rebanho particular apresente valores de  $H_o$  e  $H_e$  (0,374 e 0,498, respectivamente) similares aos observados nos animais adultos do rebanho institucional (0,372 e 0,405, respectivamente), mas elevado valor do  $F_{IS}$  (0,227) (Tabela I), indicando a existência de consanguinidade. Porém, o rebanho particular apresenta animais provenientes do rebanho institucional na sua composição, logo, existe relação de parentesco direta entre animais desses rebanhos.

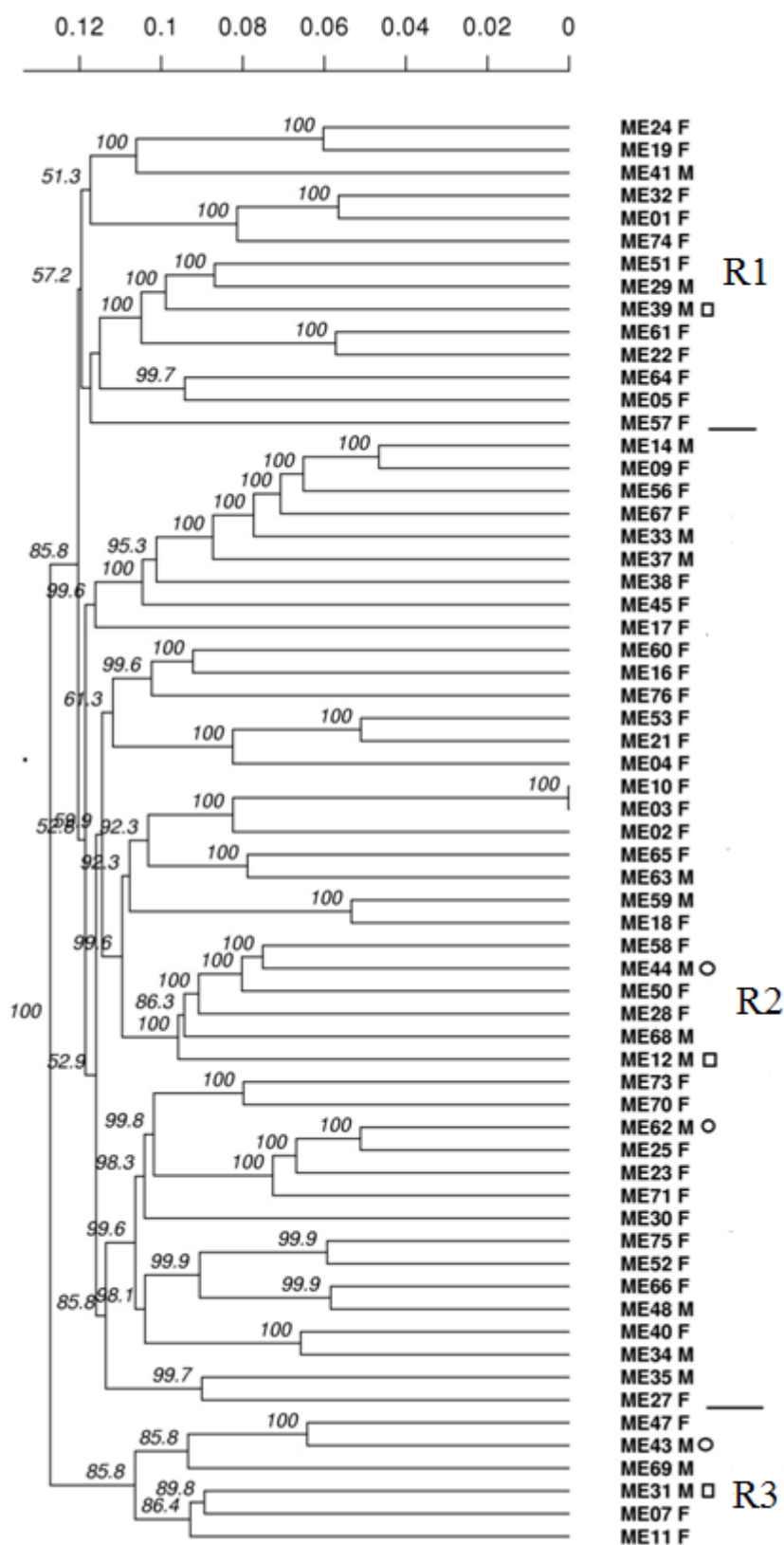
Essa afirmação pode ser complementada ao se levar em consideração a dispersão dos animais dos dois rebanhos, apresentada em plano cartesiano formado pelos dois primeiros componentes principais, que explicaram juntos 8,9% (o primeiro componente explicou 4,6% e o segundo explicou 4,3%) da variação (Figura 1), pois segundo Patterson *et al.* (2006, p. 2075), a Análise de Componentes Principais permite detectar a estrutura de duas populações mesmo com nível pequeno de diferenciação.



**Figura 1.** Dispersão dos animais em plano cartesiano formado pelo primeiro e segundo componentes principais. O círculo E representam os animais do rebanho de conservação institucional e o círculo F os animais do rebanho particular.

Observa-se que o círculo F, que representa os animais do rebanho particular, está dentro do círculo E, representando os animais do rebanho institucional, indicando semelhança genética entre os dois rebanhos, o que pode ser explicado pelo fato do rebanho particular ter sido originado com alguns animais provenientes do rebanho institucional. Também se observa maior dispersão entre os animais do rebanho institucional, que pode ser atribuída a maior quantidade de animais amostrados desse rebanho (76 animais) em relação ao rebanho particular (10 animais) (Figura 1).

A dispersão de 18 machos e 45 fêmeas, que corresponde a animais em idade reprodutiva do rebanho institucional analisados no ano de 2014, está apresentada na forma de dendrograma (Figura 2). Os quadrados indicam a posição dos três reprodutores escolhidos de acordo com os critérios do Manejo I e os círculos, a posição dos reprodutores escolhidos de acordo com os critérios do Manejo II. Esses reprodutores estão identificados na Tabela II, com os seus respectivos coeficientes de consanguinidade individual.



**Figura 2.** Dendrograma de similaridade de 18 machos (M) e 45 fêmeas (F), estimado com método de agrupamento UPGMA, a partir da matriz de distância de Nei, com dados genômicos do rebanho institucional do caprino Marota. O quadrado indica animal selecionado por distância genética e o círculo o selecionado de forma aleatória. R1, R2 e R3 representam os ramos formados.

**Tabela II.** Coeficiente de consanguinidade de cada reprodutor e média do coeficiente de consanguinidade das 10 fêmeas, selecionados com os critérios do Manejo I e do Manejo II, respectivamente, para uma estação de monta simulada com os dados do rebanho institucional de conservação do caprino Marota.

Ramo do dendrograma e Nº do reprodutor selecionado no Manejo I e no II, respectivamente	Estratégia de Manejo I		Estratégia de Manejo II	
	Reprodutor	Matriz	Reprodutor	Matriz
	Consanguinidade (%)		Consanguinidade (%)	
Ramo 1 (39); Ramo 2 (44)	0,0	3,4 ± 2,7	10,87	6,9 ± 3,7
Ramo 2 (12); Ramo 2 (62)	0,0	3,5 ± 2,5	0,0	4,6 ± 3,6
Ramo 3 (31); Ramo 3 (43)	0,0	3,5 ± 2,8	12,95	5,5 ± 4,4
Média dos animais selecionados	0,0	3,5±2,6	7,94±6,0	5,6±3,9
Média de acasalamentos simulados	<b>3,5±2,6<sup>b</sup></b>		<b>5,7±4,0<sup>a</sup></b>	
Média do rebanho (%)	4,4±4,0	6,0±3,7	4,4±4,0	6,0±3,7

\* Ramo do dendrograma e número do reprodutor selecionado de acordo com o Manejo I e com o Manejo II (Figura 2);

\*\* Manejo I – Machos (Nº 39, 12 e 31) e fêmeas selecionados para Estação de monta, com base na maior distância em dendrograma, dentre os animais de menor coeficiente de consanguinidade;

\*\* Manejo II - Machos (Nº 44, 43 e 62) e fêmeas selecionados e acasalados ao acaso;

\*\*\* Média de consanguinidade dos acasalamentos simulados com mesma letra não diferem pelo teste F (P>0,05).

A intensidade de seleção praticada com base nos dados moleculares nos machos foi de 16,67 % (3 em 18) e nas fêmeas foi de 66,67% (30 em 45). Com essas pressões de seleção, a média do coeficiente de consanguinidade dos reprodutores selecionados foi zero e das matrizes foi 3,5±2,6%. Já a média do coeficiente de consanguinidade de todos os machos do rebanho foi 4,4±4,0%, sendo inferior a 6,0±3,7%, valor apresentado pelas fêmeas (Tabela II).

Como o incremento de consanguinidade é função do sexo menos representado, nesse caso os machos, é possível que o fato da consanguinidade média das fêmeas ter sido mais elevada, equipare o impacto dos dois sexos na consanguinidade média da progênie.

Nessa situação, ganham importância à escolha de fêmeas para a estação de monta e o direcionamento dos acasalamentos com critérios que visem o aumento da variabilidade e a diminuição da consanguinidade, pois, segundo Marques *et al.* (2015, p. 528), a presença de meias irmãs num rebanho formado com prevalência de fêmeas, justifica a consanguinidade positiva dentro do rebanho e implica no aumento dos riscos de endogamia via matriz no rebanho.

Na seleção praticada por sorteio de machos e fêmeas para uma Estação de monta (estratégia de Manejo II), a média do coeficiente de consanguinidade dos machos foi igual a 7,94±6,0 e das fêmeas igual a 5,6±3,9%. Nesse manejo, a média do coeficiente de endogamia nas fêmeas foi 60,0% superior ao percentual obtido para as fêmeas do Manejo I.

Ao se considerar a simulação de 10 pares de acasalamentos de cada reprodutor, constatou-se que a média do coeficiente de consanguinidade do casal no Manejo I ( $3,5 \pm 2,6\%$ ), foi estatisticamente inferior à média dos pares acasalantes do Manejo II ( $5,7 \pm 4,0\%$ ) (Tabela 2), pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

Esses resultados mostram ser pequena a contribuição da escolha aleatória de animais de reprodução para controlar a endogamia em rebanhos com situação semelhante ao rebanho institucional. Consequentemente, pode-se considerar como uma demonstração da funcionalidade dos painéis de marcadores nos estudos de conservação genética, bem como, da importância do uso dessa tecnologia molecular para auxiliar o manejo genético em rebanhos de conservação.

Alem disso, é possível que os reprodutores selecionados com base em critérios de divergência genética, se forem acasalados apenas com fêmeas de ramos mais distantes deles no dendrograma, ou seja, acasalamento associativo negativo, teoricamente, poderia ampliar a variabilidade genética, pois, como mencionado por Neves *et al.* (2009, p. 1.203), o acasalamento associativo negativo tende reduzir a variabilidade de índices zootécnicos esperados na progênie, sendo indicado quando o valor intermediário ou a maior uniformidade do produto são pretendidos. Essa é uma estratégia usada por criadores que procuram complementaridade funcional com características diferentes, consequentemente, quanto maior for a presença de animais heterozigotos, menor será a variabilidade fenotípica, porém maior será a variabilidade genética, importante em rebanhos de conservação.

Considera-se também que a dispersão dos animais no dendrograma obtido com dados moleculares, pode ser utilizada para orientar a seleção para reposição e para descarte de animais em rebanhos de conservação nos quais a opção principal seja recorrer à reposição de machos e fêmeas com animais do próprio rebanho, prática que leva ao aumento da consanguinidade da progênie, como foi verificado nesse estudo (Tabela 2). Nesse caso, convém descartar animais geneticamente semelhantes que se apresentam no mesmo ramo do dendrograma, com elevado coeficiente de consanguinidade individual.

Diante da previsibilidade de redução de custo da genotipagem pela automação tecnológica (Pereira *et al.* 2013, p. 197) e da possibilidade de confecção de *Chips* de menor densidade e portanto mais baratos, considera-se que a sua utilização no manejo em rebanhos de conservação *in situ*, fechados e com pequeno efetivo de população, pode se tornar uma forma simples e prática de manter a variabilidade genética em rebanhos dessa natureza, mesmo com a utilização de múltiplos reprodutores.

Como o equilíbrio entre o ganho genético e a taxa de endogamia é difícil de equacionar em programas de melhoramento (Santos 2015, p. 25), possivelmente também o seja em programas de conservação, pois a variância genética diminui linearmente com o aumento da endogamia. Mas, segundo Kinghorn (2011, p. 9), é possível controlar a endogamia ao direcionar os acasalamentos sem comprometer o mérito predito da progênie.

## Conclusões

Existe variabilidade genética nos rebanhos analisados, porém com indício de consanguinidade;

Em rebanho com pequeno tamanho efetivo e onde a reposição é feita com animais do próprio rebanho, a definição de acasalamentos com base em critérios genéticos acurados é opção para controle de consanguinidade.

## Agradecimentos

A Embrapa Meio Norte e ao senhor José Ferreira Dantas Filho, por autorizarem a análise dos rebanhos de conservação de caprinos Marota;

Ao Instituto Federal do Piauí pela colaboração financeira com recursos do Programa de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica (ProAGRUPAR).

## Referências Bibliográficas

Adán, S; Fernández, M; Justo, JR; Rivero, CJ; Rois, D & Lama, J 2007, 'Análisis de la información genealógica em la raza ovina Ovella galega', *Archivos de Zootecnia*, vol. 56, nº 1, pp. 587-592.

Araújo, AM; Beffa, LM; Almeida, MJO; Abreu, UP; Cavalcante, DH; Leal, TM & Paiva, SR 2009, 'Crescimento e mortalidade em um rebanho de Conservação de Caprinos Marota no Brasil', *Revista Científica de Produção Animal*, vol. 11, nº 2, pp. 103-109.

Barros, EA; Ribeiro, MN; Almeida, MJO & Araújo, AM 2011, 'Estrutura populacional variabilidade genética da raça caprina Marota', *Archivos de Zootecnia*, vol. 60, nº 2, pp. 543-552.

Costa, MDS; Araújo, AM; Moraes, JDB; Cunha, RMS; Campelo, JEG; Lima, SEF; Oliveira, JA; Almeida, GM.; Silva, FR. & Almeida, MDO 2008, 'Caracterização genética de caprinos Marota no Estado do Piauí por meio de microssatélites de DNA', *VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal*, São Carlos, pp. 1-4

Curi, RA; Meira, CT; Beltrán, NAR; Silva, JAIV & Mota, MDS 2013, 'Seleção assistida por marcadores para o melhoramento do desempenho de equinos em corridas', *Boletim de Indústria Animal*, vol. 70, nº 1, pp. 88-102.

Egito, AA; Mariante AS & Albuquerque, MSM 2002, 'Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais', *Arquivo de Zootecnia*, vol. 51, nº 193-194, pp. 39-52.

Goudet, J 2005, 'Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F- statistics', *Molecular Ecology Resources*, vol. 5, nº 1, pp. 184-186.

*Illumina. Illumina Infinium HTS Assay. 2013, Manual Protocol*, acessado em 26 de junho de 2016, <[http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/humanomniexpress-24/infinium\\_hts\\_assay\\_manual\\_protocol\\_experienced\\_user\\_card\\_15045737\\_a.pdf](http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/humanomniexpress-24/infinium_hts_assay_manual_protocol_experienced_user_card_15045737_a.pdf)>.

Joaquim, LB 2016, 'Estrutura genômica de uma população de suínos base Landrace', Dissertação, Universidade Estadual Paulista, Brasil.



- Jombart, T & Ahmed, I 2011, 'Adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data', *Bioinformatics*, vol. 27, nº 21, pp. 3070–3071.
- Kamvar, ZN; Tabima, JF & Grünwald, NJ 2014, 'Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction', *PeerJ*, v. 2, p. e281.
- Kinghorn, BP 2011, 'An algorithm for efficient constrained mate selection', *Genetics Selection Evolution*, vol. 43, nº 1, pp. 1-9.
- Mariante, AS; Albuquerque, MSM & Ramos, AF 2011, 'Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros', *Revista Brasileira Reprodução Animal*, vol. 3, nº 2, pp. 64-68.
- Marques, ITO; Sarmiento, JLR; Biagiotti, D; Vale, KAG; Carvalho, KSS & Britto, FB 2015, 'Caracterização da diversidade genética de ovinos Santa Inês em fazendas do Estado do Piauí', *Revista Brasileira de Saúde e Reprodução Animal*, vol. 16, nº 3, pp. 523-534.
- Neves, HHR; Carvalheiro, R; Cardoso, V & Alberto, L 2009, 'Acasalamento dirigido para aumentar a produção de animais geneticamente superiores e reduzir a variabilidade da progênie em bovinos', *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 38, nº 7, pp. 1201-1204.
- Patterson, N; Price, A & Reich, D 2006, 'Population Structure and Eigen analysis', *PLoS genetics*, vol. 2, nº 12, p. e190.
- Pereira, GL; Rosa, KO; Curi, RA; Regitano, LCA. & Mota, MDS 2013, 'Estado da arte do sequenciamento genômico na pecuária', *ARS Veterinária*, vol. 29, nº 3, pp. 190-199.
- Purcell, S; Neale, B; Todd-Brown, K; Thomas, L; Ferreira, MAR; Bender, D; Maller, J; Sklar, P; Bakker, PIW; Daly, MJ & Sham, PC 2007, PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*, vol. 81, nº 3, pp. 559-575.
- Rodrigues, DS; Ribeiro, MN; Oliveira, SMP; Lima, FAM; Villarroel, ABS; Pacheco, ACL & Santos, LH 2009, 'Estrutura populacional de um rebanho da raça Morada Nova como contribuição para a conservação', *Ciência Animal*, vol. 19, nº 1, pp. 103-110.
- Santos, NPS; Sarmiento, JLR; Carvalheiro, R; Campelo, JEG; Sousa, WH; Filho, LASF; Neto, AAR & Biagiotti, D 2016, 'Contribuição genética ótima aplicada à seleção de ovinos Santa Inês', *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 51, nº 6, pp. 745-750.
- Santos, NPS 2015, 'Contribuição genética ótima e seleção de acasalamentos em ovinos Santa Inês utilizando evolução diferencial', Tese, Universidade Federal do Piauí, Brasil.
- Silva Filho, E. 2012. Caracterização da variabilidade genética por marcadores microssatélites nos bovinos da raça Pé Duro em rebanho de conservação e de bovinos da raça Tabapuã em rebanho sob seleção. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal do Piauí, Brasil.
- Sokal, RR & Michener, CD 1958, 'A statistical method for evaluating systematic relationships', *University of Kansas Science Bulletin*, vol. 38, nº 22, pp. 1409-1438.
- Veroneze, R; Lopes, PS; Guimarães, SEF; Guimarães, JD; Costa, EV; Faria, VR & Costa, KA 2014, 'Using pedigree analysis to monitor the local Piau pig breed conservation program', *Archivos de Zootecnia*, vol. 63, nº 241, pp. 45-54.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Banco de dados do caprino Marota precisa ser enriquecido com mais informações genômicas (genotipagem de mais animais) e de fenótipos relacionados à rusticidade, expressas na forma de resistência a verminose (OPG, Famacha); também de indicadores de adaptação a agentes estressores do ambiente (temperatura retal, frequências respiratória e cardíaca), para estudos de associação genômica com resistência a verminoses e a condições ambientais adversas.

A participação da sociedade de forma direta na conservação de recursos genéticos em risco de extinção via rebanho de conservação *on Farm*, se associado a rebanho de conservação institucional, pode formar parcerias com grande potencial para atender bem aos objetivos conservacionistas. Benefícios diretos contribuirão certamente para motivar a participação da sociedade, entre os quais não pode faltar normatização técnica adequada e garantia de assessoramento como forma de manter a diversidade genética nos rebanhos.

Para aprimorar os trabalhos na área de conservação de recursos genéticos e visando alocação de recursos públicos e de políticas públicas relativas à conservação desses recursos, considera-se viável estabelecer como critério a sua submissão a uma análise de quantificação do nível de erosão genética utilizando *Chips* SNPs, e análises com *Structure* e Componentes Principais, como forma de garantia do padrão genético diferenciado.

Atrela-se a isso, a necessidade de criação de *Chips* de baixa densidade, de forma a baratear a sua utilização no monitoramento da variabilidade e do nível de erosão em rebanhos de conservação, dentre os quais o do caprino Marota. Inovações tecnológicas na área de informática também são necessárias, como tornar a proposta de manejo dessa pesquisa num aplicativo de multimídia incorporada em software.

## 7 ANEXOS

## 7.1 ROTINAS DO PROGRAMA R USADAS NESSE TRABALHO

```

setwd("C:/Users/Miklos/Dropbox/Jeane/2016")
setwd("/data1/jbaldin/miklos/cap")
setwd("~/Artigos 2015/Cap")

update.packages(ask = F)
.libPaths()
packageDescription("adegenet")["Version"]
update.packages(lib.loc = "/home/jbaldin/R/x86_64-suse-linux-gnu-library/3.1", repos = "http://cran.r-project.org")

install.packages("devtools", dependencies = T, lib="/home/jbaldin/R/x86_64-suse-linux-gnu-library/3.1")

library(adegenet)
library(poppr)
library(hierfstat)
library(diveRsity)
library(PopGenKit)
library(vegan)
library(ape)
library(ggplot2)

cap.genind <- read.genepop("cap2.gen", ncode = 3L, quiet = TRUE)
cap.genind <- read.structure("cap2.str", onerowperind=FALSE, n.ind=96, n.loc=45600, col.lab=1, col.pop=2, ask=FALSE,
quiet=TRUE)

#visualize missing data
info_table(cap.genind, plot = TRUE)
cap.genind$pop

cap.summ <- summary(cap.genind)
names(cap.summ)
mean.hobsT <- mean (cap.summ$Hobs)
mean.hobsT
mean.hexpT <- mean (cap.summ$Hexp)
mean.hexpT
n.pop <- seppop(cap.genind)
mean.hobs <- do.call("c", lapply(n.pop, function(x) mean(summary(x)$Hobs)))
mean.hobs[is.nan(mean.hobs)] <- NA
mean.hobs
barplot(mean.hobs)

mean.hexp <- do.call("c", lapply(n.pop, function(x) mean(summary(x)$Hexp)))
mean.hexp[is.nan(mean.hexp)] <- NA
mean.hexp
barplot(mean.hobs)

```

```

library(hierfstat)
wc <- wc(cap.genind)
wc$FST
wc$FIS
basic <- basic.stats(cap.genind)
basic$overall
mean (basic$Fis[,1], na.rm=TRUE)
mean (basic$Fis[,2], na.rm=TRUE)
mean (basic$Ho[,1], na.rm=TRUE)
mean (basic$Ho[,2], na.rm=TRUE)
mean (basic$Hs[,1], na.rm=TRUE)
mean (basic$Hs[,2], na.rm=TRUE)

library (doParallel)

cap.genlight <- read.PLINK('plink.raw', quiet = FALSE, parallel = T, n.cores = 7)
glNA(cap.genlight)
glSum(cap.genlight)
glMean(cap.genlight)
x <- glSim(cap.genlight, ploidy=2)
x <- as.snpclone(cap.genlight, parallel = require("parallel"), n.cores = 7)

#Revolution Analytics (2012). doParallel: Foreach parallel adaptor for the parallel package. R
cl <- makeCluster(50)
registerDoParallel(cl)
system.time({cap2fst <- diffCalc (infile="cap2.gen", outfile = 'fst_cap2', para = T, fst = TRUE, pairwise = TRUE,
bs_locus = TRUE, bs_pairwise = TRUE, boots = 1000)})
stopCluster(cl)
cap2basic <- divBasic(infile = "cap2.gen", outfile = 'outbasiccap2.gen', gp = 3, bootstraps = 1000, HWExact = T)

convert('cap2.gen', ndigit = 3)
# convert to .arp
bootstrapHet('nancycatsc.arp', ndigit = 2, nrepet = 1000)
# Ho, He (confidence interval)

x <- read.table('angloB.txt')
y <- read.table('macap.txt')

```

```

x <- read.delim('angloB.txt')
y <- read.delim('macap.txt')

mydf<-data.frame(x,y)
library(dplyr)
library(tidyr)

res <- mydf %>%
  gather(key,value,1:2) %>%
  group_by (value) %>%
  tally

res <- mydf %>%
  gather(key,value,1:2) %>%
  group_by (value) %>%
  tally %>%
  filter (n>1)

write.table(res, file="mafzeroshared", sep="\t")

Sys.setenv(JAVA_HOME="C:/Program Files/Java/jdk1.8.0_51/")
Sys.getenv("JAVA_HOME")

#C:\Program Files\Java\jdk1.8.0_51\bin

library(rJava)
library(venneuler)
v <- venneuler(c(Anglonubiana=2140, Marota=1214, "Anglonubiana&Marota"-657))
v <- venneuler(c(Anglonubiana=2140, Marota_F=3817, "Anglonubiana&Marota_F"-1024))
v <- venneuler(c(Anglonubiana=2140, Marota_E=1811, "Anglonubiana&Marota_E"-741))
F 3817
AF 1024
E 1811
AE 741
tiff("Venn_AM_E.tif", width=8, height=8, units="in", res=300)
plot(v)
dev.off()

```





