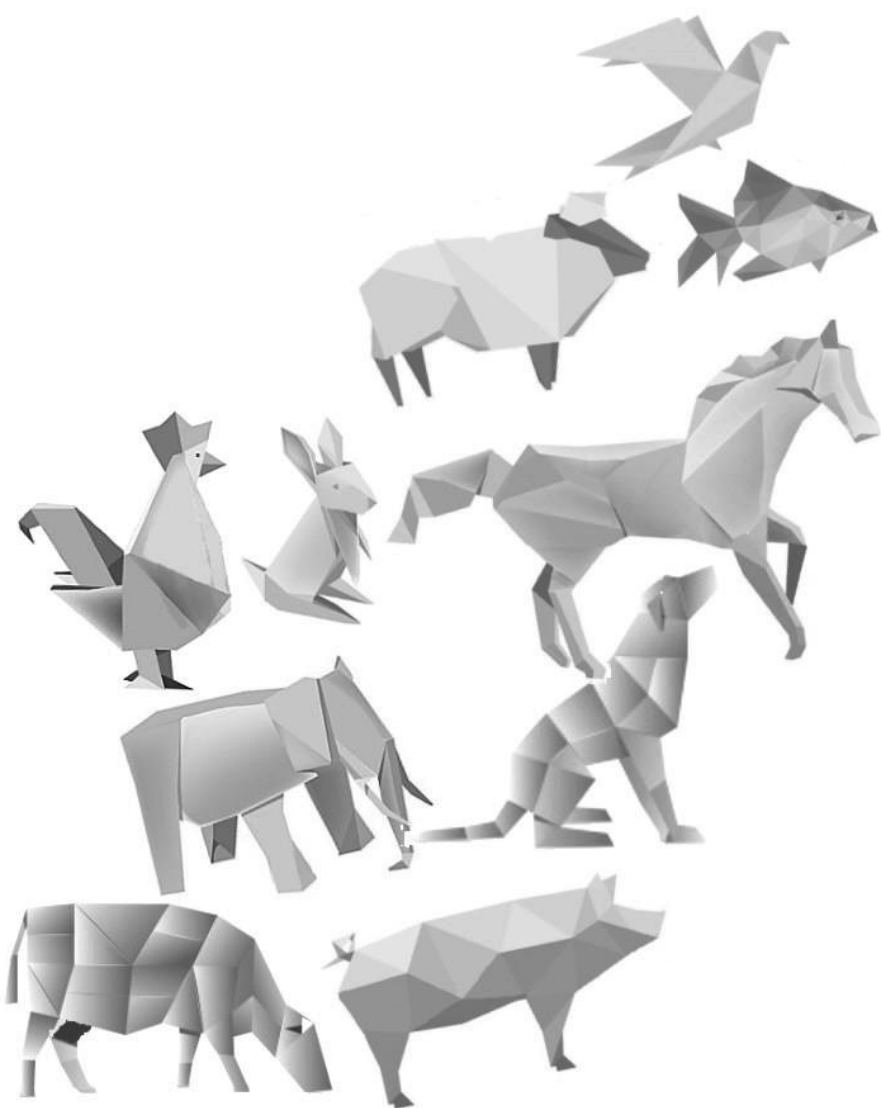


Ano III, Nº1 - 2018

ISSN: 0872 - 7098

Revista Portuguesa de Zootecnia



Associação Portuguesa de Engenharia Zootécnica



Ficha Técnica

Director:

Divanildo Outor Monteiro

Editor:

Ana Sofia Santos

Editor adjunto:

Mariana Almeida

Propriedade:

Associação Portuguesa de Engenharia
Zootécnica (APEZ)

Apartado 60, 5001-909 Vila Real

Composição e Montagem:

Telma Pinto

Design Gráfico:

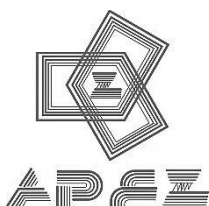
Mariana Almeida e Telma Pinto

Contactos:

Apartado 60,
5001-909 Vila Real

rpz@apez.pt

912 239 527



A publicação deste número foi possível graças ao apoio da Comissão Científica do XX ZOOTECH – 20º Congresso Nacional de Zootecnia.

EFEITO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO GENE DA HORMONA DE CRESCIMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE LEITE EM OVELHAS DAS RAÇAS SALOIA E ASSAF

Marques^{1,2}, MR, Belo¹, A.T., Pereira³, E.A., Belo^{1,*}, C.C.

¹ Unidade Estratégica de Investigação e Serviços em Produção e Saúde Animal, INIAV IP, Fonte Boa, Vale de Santarém. rosario.marques@iniav.com; ² Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, 1300-477 Lisboa.; ³ DRAPC – Rua Amato Lusitano, lote 3, 6000-150 Castelo Branco

INTRODUÇÃO

As hormonas do eixo somatotrópico, entre as quais a hormona de crescimento (GH), desempenham um importante papel na regulação da produção leiteira em ruminantes. Vários estudos permitiram estabelecer associações entre polimorfismos genéticos do gene *GH* e a produção/qualidade do leite em bovinos (Falaki et al., 1996; Lagziel et al., 1996; Mullen et al., 2011; Waters et al., 2012). Em ovinos e caprinos foi identificada elevada variabilidade genética no gene *GH*, nomeadamente nas raças ovinas Serra da Estrela (Marques *et al.*, 2006; Marques et al., 2014), Merino da Beira Baixa (Santos et al., 2004) e Sarda (Vacca et al., 2013), e nas raças caprinas Algarvia (Malveiro et al., 2001) e Serrana (Marques et al., 2003b), tendo sido possível estabelecer associações significativas entre os polimorfismos encontrados quer com a produção, quer com a qualidade do leite. Este estudo teve como objetivo, avaliar a variabilidade genética do gene *GH* e o seu efeito sobre a produção de leite em ovelhas da raça Saloia (raça autóctone) e da raça Assaf (raça “exótica” de grande potencial leiteiro), ambas exploradas na área geográfica do fabrico do queijo de Nisa DOP.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi colhido sangue a 89 ovelhas da raça Saloia (um criador) e a 199 ovelhas da raça Assaf (dois criadores). A extração de ADN foi realizada a partir de 300 µl de sangue usando o “Puregene DNA Isolation kit” (Gentra Systems). Os cinco fragmentos de ADN contendo

os exões do gene *GH* foram analisados por PCR-SSCP (Orita *et al.* (1989 a, b), técnica que permite detetar alterações da conformação do DNA monocatenário por modificações na sua mobilidade, aquando da separação electroforética em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes. As condições de amplificação dos fragmentos de ADN e da eletroforese foram as estabelecidas para a raça Merino da Beira Baixa (Santos *et al.* 2004).

Neste estudo procurou-se averiguar a existência de possíveis associações entre os polimorfismos encontrados nos exões 1, 2, 3, 4 e 5 do gene *GH* ovino e os caracteres produtivos medidos em cada ovelha ao longo de 7 lactações: produção de leite normalizada para uma lactação de 150 dias (P150), produção total de leite (Ptotal) e duração da lactação (DurL). Os animais que apresentaram padrões conformacionais com frequências inferiores a 5% das ovelhas com lactações válidas em cada exão não foram considerados na análise estatística. Foi usado um modelo linear misto para determinar possíveis associações entre os padrões conformacionais obtidos e os caracteres produtivos em estudo (SAS[®] software; Khattree e Naik, 1999). Os dados foram considerados como medidas repetidas no mesmo sujeito (ovelha), sendo considerada no modelo estatístico a correlação entre as medidas na mesma ovelha. No modelo foram incluídos: o efeito fixo do ano de parto (1 a 7), do tipo de parto (simples ou múltiplo) e do padrão SSCP do exão em estudo, e o efeito linear e quadrático das covariáveis número de lactação e mês de parto. O modelo usado foi o seguinte:

$$Y_{ijkl} = \mu + Ano_i + TP_j + \beta_1(x_{ijkl} - \bar{x}) + \beta_1(x_{ijkl} - \bar{x})^2 + \beta_2(x_{ijkl} - \bar{x}) + \beta_2(x_{ijkl} - \bar{x})^2 + Animal_{ijkl} + Ex\tilde{a}o_k + \varepsilon_{ijkl}$$

Y_{ijkl} : observação (P150, Ptotal ou DurL) no animal l no ano i com o tipo de parto j e com o padrão conformacional k no exão considerado; μ : média geral; Ano_i : efeito fixo do ano; TP_j : efeito fixo do tipo de parto; $\beta_1(x_{ijkl} - \bar{x})$ e $\beta_1(x_{ijkl} - \bar{x})^2$: efeitos linear e quadrático da covariável número da lactação; $\beta_2(x_{ijkl} - \bar{x})$ e $\beta_2(x_{ijkl} - \bar{x})^2$ efeitos linear e quadrático da covariável mês de parto; $Animal_{ijkl}$: efeito aleatório do animal; $Ex\tilde{a}o_k$: efeito fixo do padrão SSCP do exão considerado; ε_{ijkl} : erro aleatório.

Foram testadas 3 estruturas para a matriz de correlações entre as observações no mesmo animal: “ante-dependent structure”; “compound symmetry structure” e “autoregressive order 1”. Os modelos foram comparados usando o critério da informação de Akaike e o critério bayesiano de Schwarz do modo a escolher o modelo que melhor se ajustou aos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados polimorfismos conformacionais (padrões SSCP) em todos os fragmentos nos rebanhos estudados. A cada padrão SSCP foi atribuída aleatoriamente uma letra identificativa, sendo as suas frequências apresentadas no quadro 1.

No rebanho Saloio foram encontrados 2 padrões SSCP no exão 1, 4 no exão 2, 8 no exão 3, 2 no exão 4 e 5 no exão 5. Os padrões SSCP com maior frequência de animais foram o A no exão 1, 2, 4 e 5 e o G no exão 3. Nos rebanhos Assaf foram encontrados 4 padrões SSCP no exão 1, 9 no exão 2, 9 no exão 3, 2 no exão 4 e 11 no exão 5. O padrão SSCP com maior frequência de animais foi o A nos cinco exões estudados.

Considerando os rebanhos genotipados, os Assaf revelaram um maior grau de polimorfismo, apresentando um maior número de padrões que o Saloio em todos os exões do gene *GH*, exceto no exão 4 em que apresentaram só dois padrões, tal com já se tinha verificado em rebanhos das raças Serra da Estrela (Marques *et al.*, 2003a) e Merino da Beira Baixa (Santos *et al.*, 2004). No exão 1, os padrões C e D do exão 1 do gene *GH* observados nas ovelhas Assaf não foram observados nas Saloias, nem em outras raças ovinas autóctones (Marques *et al.*, 2003a), contudo em ovelhas Sarda foram encontrados 5 padrões no exão 1 (Vacca *et al.*, 2013). No exão 2, principalmente no rebanho Saloio (4 padrões), mas também nos Assaf (9 padrões), o número de padrões SSCP observados foi menor que na raça Serra da Estrela (17 padrões). No exão 3 tanto o rebanho Saloio como os Assaf, apresentaram um padrão não descrito na raça Serra da Estrela (padrão SSCP I). Ainda no exão 3, os padrões A e B encontram-se presentes em 26% das ovelhas Saloias, em 47,5% das ovelhas Assaf, percentagens muito inferiores às anteriormente observadas em ovelhas Serra da Estrela (77%; Marques *et al.*, 2003a). No exão 5, só os padrões A e F encontrados nos rebanhos Saloio e Assaf têm correspondência com padrões anteriormente descritos na raça Serra da Estrela, todos os outros são padrões não descritos anteriormente nas raças Portuguesas. Salienta-se também o elevado grau de polimorfismo encontrado nos rebanhos Assaf.

No rebanho Saloio não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as ovelhas com os diferentes padrões SSCP em qualquer dos cinco exões do gene da *GH* e a P150 e a Ptotal (ver quadro 2 e 3). Em relação à DurL, as ovelhas com o padrão A no exão 4 do gene da *GH* estiveram em lactação mais 36 dias que as com o padrão B

($P < 0,05$), e as ovelhas com o padrão A no exão 5 mais 31 dias que as com o padrão C ($P < 0,05$).

A análise estatística permitiu estabelecer associações entre os padrões SSCP dos exões 1 e 5 no rebanho Assaf e as P150 e Ptotal. Considerando os polimorfismos encontrados no exão 1 (quadro 2), verificou-se que ovelhas Assaf com o padrão D produziram significativamente mais leite que as ovelhas com o A (+ 37 L de leite em 150 dias de lactação e + 123 L de leite considerando a lactação total; $P < 0,05$), estando em produção mais 21 dias ($P > 0,05$). No exão 5 (quadro 3), verificou-se que ovelhas Assaf com os padrões D e J foram as que apresentaram melhores produções com cerca de + 60 L de leite em 150 dias de lactação que as ovelhas com o padrão C. Considerando a Ptotal, as ovelhas com o padrão J produziram cerca de + 150 L de leite que as ovelhas com os padrões A, B e C e + 90 L de leite que as ovelhas com o padrão D, o segundo mais produtivo ($P < 0,05$). Em média as ovelhas com o padrão SSCP J no exão 5 do gene *GH* estiveram em lactação mais cerca de 20 dias que os animais com outros padrões ($P > 0,05$). Polimorfismos neste exão também foram associados com a produção de leite nas raças ovinas Serra da Estrela (Marques et al., 2003a e 2006) e Sarda (Vacca et al., 2013), bem como nas raças caprinas Serrana (Marques et al., 2003b) e Algarvia (Malveiro et al., 2001).

Todos os padrões identificados previamente na raça Serra da Estrela foram sequenciados e as mutações encontradas foram descritas por Marques et al. (2006). A caracterização dos novos padrões e a genotipagem de um maior número de animais Assaf está em curso no âmbito do projeto ALT20-03-0145-FEDER-000019.

CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível aferir da grande variabilidade genética do gene *GH* em rebanhos das raças Saloia e Assaf. As ovelhas Assaf apresentaram um maior número de padrões que as Saloias em todos os exões do gene *GH*, exceto no exão 4 em que as ovelhas de ambas as raças apresentaram só dois padrões. A variabilidade do gene *GH* observada está de acordo com a observada previamente nas raças ovinas Serra da Estrela e Merino da Beira Baixa, contudo, apontam para a existência de padrões SSCP específicos de cada raça.

Não foi encontrada associação significativa entre os padrões SSCP e a produção leiteira, mas verificou-se que o exão 5 da *GH* influenciou a DurL no rebanho Saloio. No rebanho

Assaf, as ovelhas que apresentaram o padrão D no exão 1 produziram em média mais 37 L de leite em 150 dias de lactação que as com o padrão A. As ovelhas que apresentaram o padrão D ou J no exão 5 do gene *GH* produziram em média mais 50 L de leite em 150 dias de lactação que as com os padrões A, B ou C.

Considerando os rebanhos genotipados, poder-se-á aumentar o progresso genético do rebanho Saloio pela seleção de borregas com o padrão A no exão 5 do gene da *GH* (aumentando a duração da lactação), e do rebanho Assaf pela seleção de borregas com os padrões D no exão 1 e D ou J no exão 5 (aumento da produção leiteira) A aplicação deste tipo de metodologia, uma vez caracterizados mais rebanhos, poderá ser uma ferramenta útil para a seleção precoce de animais de elevado potencial leiteiro dentro de cada raça.

BIBLIOGRAFIA

- Falaki, M, Gengler, N, Sneyers, M, Prandi, A, Massart, S, Formigoni, A., Burny, A, Portetelle, D, Renaville, R, 1996. *J Dairy Sci* 79: 1446-1453. Khattree, R, Naik, DN, 1999. *Applied multivariate statistics with SAS® software*. 2nd ed. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Lagziel, A, Lipkin, E, Soller, M, 1996. *Genetics* 142: 945-951. Malveiro, E, Pereira, M, Marques, PX, Santos, IC, Belo, CC, Renaville, R, Cravador, A, 2001. *Small Rumin Res* 41: 163-170. Marques, MR, Martins, APL, Belo, AT, Ribeiro, JM, Martins, MPV, Miranda, R, Duthoit, TM, Belo, CC, 2014. *Options méditerranéennes* 109(A): 345-348. Marques, MR, Santos, IC, Belo, CC, Cravador, A, 2003a. *XXVIII SEOC*: 425-427. Marques, MR, Santos, IC, Carolino, N, Belo, CC, Renaville, R, Cravador, A, 2006. *J Dairy Res* 73: 394-405. Marques, PX, Pereira, M, Marques, MR, Santos, IC, Belo, CC, Renaville, R, Cravador, A, 2003b. *Small Rumin Res* 50: 177-185. Mullen, MP, Lynch, CO, Waters, SM, Howard, DJ, O'Boyle, P, Kenny, DA, Buckley, F, Horan, B, Diskin, MG, 2011. *Genet Mol Res.* 10: 1819-30. Orita, M, Iwahana, H, Kanazawa, H, Hayashi, K, Sekiya, T, 1989a. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770. Orita, M, Suzuki, Y, Sekiya, T, Hayashi, K, 1989b. *Genomics* 5: 874-879. Santos, IC, Marques, MR, Belo, CC, Cravador, A, 2004. *BASE* 8: 40-41. Vacca, GM, Dettori, ML, Balia, F, Luridiana, S, Mura, MC, Carcangiu, V, Pazzola, M, 2013. *Mol Biol Rep* 40: 5285-94. Waters, SM, Berry, DP, Mullen, MP, 2012. *J Anim Breed Genet* 129: 70-8.

Quadro 1 – Frequências dos padrões conformacionais (padrões SSCP) os exões 1, 2, 3, 4 e 5 do gene *GH* em ovelhas de raça Saloia e Assaf (%).

Padrões SSCP	Saloia					Assaf				
	Fragmento contendo o exão									
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
A	88,76	47,19	10,11	94,38	53,41	56,63	37,06	25,25	85,35	26,04
B	11,24	15,73	15,73	5,62	23,86	10,20	20,81	22,22	14,65	19,79
C		35,96			4,54	29,59	15,23	3,54		7,81
D		1,12	1,12			3,57	8,63	1,52		5,73
E			21,35				5,08	13,13		0,52
F			7,86		12,50		5,58	3,03		1,56
G			25,84				6,09	21,21		1,56
H			16,85				1,02	8,08		27,08
I			1,12					2,02		4,69
J							0,51			3,13
K					5,68					2,08
Nº ovelhas	89	89	89	89	88	196	197	198	198	192

Quadro 2 – Produção de leite normalizada para uma lactação de 150 dias (P150, L), produção total de leite (PTotal, L) e duração da lactação (DurL, dias) em ovelhas de raça Saloia e Assaf com diferentes padrões SSCP no exão 1 do gene *GH*.

Raça	Padrão SSCP	P150 (N)	P150		PTotal		DurL	
			LSmeans	± SE	LSmeans	± SE	LSmeans	± SE
Saloia	A	40	132,2	± 7,44 ^a	168,7	± 11,86 ^a	206,3	± 10,14 ^a
	B	3	117,3	± 16,92 ^a	155,6	± 27,38 ^a	192,7	± 23,39 ^a
Assaf	A	66	360,6	± 8,45 ^a	502,2	± 17,50 ^a	250,8	± 8,17 ^a
	B	10	385,4	± 18,49 ^{ab}	541,0	± 38,55 ^{ab}	254,1	± 17,96 ^{ab}
	C	50	370,3	± 8,86 ^{ab}	537,1	± 18,51 ^b	269,9	± 8,49 ^b
	D	7	397,8	± 16,33 ^b	625,7	± 26,06 ^c	271,9	± 14,67 ^{ab}

^{a, b, c} – letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (P<0,05).

Quadro 3 – Produção de leite normalizada para uma lactação de 150 dias (P150, L), produção total de leite (Ptotal, L) e duração da lactação (DurL, dias) em ovelhas de raça Saloia e Assaf com diferentes padrões SSCP no **exão 5** do gene GH.

Raça	Padrão SSCP	(N)	P150		PTotal		DurL	
			LSMeans	± SE	LSMeans	± SE	LSMeans	± SE
Saloia	A	23	130,6	± 8,83 ^a	172,9	± 13,56 ^a	212,3	± 10,20 ^b
	B	10	132,3	± 10,34 ^a	159,5	± 16,04 ^a	204,9	± 12,10 ^{ab}
	C	3	120,4	± 17,83 ^a	144,8	± 25,09 ^a	171,2	± 15,43 ^a
	F	6	130,1	± 12,73 ^a	168,1	± 19,46 ^a	206,7	± 14,43 ^{ab}
Assaf	A	18	362,0	± 13,18 ^{ab}	484,6	± 27,26 ^a	237,7	± 12,43 ^a
	B	31	362,4	± 10,35 ^{ab}	509,1	± 19,55 ^a	254,5	± 9,70 ^a
	C	13	340,0	± 17,67 ^a	492,0	± 36,85 ^a	250,4	± 16,54 ^a
	D	9	402,1	± 18,72 ^c	555,9	± 38,68 ^a	252,7	± 17,91 ^a
	H	43	369,2	± 9,37 ^{abc}	527,6	± 19,31 ^a	264,3	± 8,90 ^a
	I	8	362,1	± 16,41 ^{abc}	529,0	± 32,97 ^a	270,8	± 14,98 ^a
	J	6	400,9	± 17,21 ^{bc}	647,2	± 20,73 ^b	273,8	± 15,31 ^a

^{a, b, c} – letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (P<0,05).

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem à FCT (projeto PRAXIS XXI 3/3.2/CA/1991/95), e ao Alentejo 2020, Portugal 2020 e FEDER (projeto ALT20-03-0145-FEDER-000019) o financiado deste estudo.

EFFECT OF GH GENE POLYMORPHISMS ON MILK PRODUCTION IN SALOIA E ASSAF OVINE BREEDS.

Hormones from the somatotropic axis are key for the regulation of milk production in ruminants. Polymorphisms at the growth hormone (GH) gene has been associated with milk traits in several autochthonous breeds. The objective of this work is to evaluate genetic diversity of GH gene in Saloia and Assaf sheep reared in the Nisa PDO cheese region.

The five exons of the *GH* gene were analysed by PCR-SSCP and were found to be polymorphic in both breeds. Assaf ewes presented a higher number of polymorphisms than Saloia ewes, pointing to the existence of breed specific SSCP patterns. In Saloia ewes, *GH* gene polymorphisms were significantly associated with lactation length, but not with milk production. In Assaf ewes, exons 1 and 5 affected significantly milk traits. The ewes with the D pattern at exon 1 produced more 37 L and 123 L of milk, respectively in 150 lactation days and in total lactation, than the ones with pattern A. Ewes with exon 5 patterns D or J produced more 50 L of milk in 150 lactation days than ewes with patterns A, B or C. In conclusion, there is still great scope for the genetic progress of the studied flocks and that the application of this type of methodology could be a useful tool for the early selection of animals of high milk potential.

KEYWORDS: *GH* gene polymorphisms; ovine milk production; Saloia; Assaf.