



## UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA ANÁLISE DA SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS DE OVINOS RESISTENTES OU SENSÍVEIS À VERMINOSE

Evandro Neves Muniz<sup>1</sup>, Cassia Renata Pinheiro<sup>2</sup>, Ana Veruska Cruz da Silva<sup>1</sup>, Hymerson Costa Azevedo, Amaury Apolonio de Oliveira, Raimundo Nonato Braga Lobo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Tabuleiros Costeiros, evandro.muniz@embrapa.br

<sup>2</sup> Aluna de Doutorado, ESALQ-USP.

<sup>3</sup> Embrapa Caprinos e Ovinos

**Resumo:** A Santa Inês é a raça ovina que mais cresce no Brasil, motivada pela sua versatilidade em se adaptar aos diversos ecossistemas e pela preferência dos criadores, o que conduz a um elevado valor no mercado. A expansão desta raça para regiões mais úmidas e de alta incidência de verminose têm demandado a identificação e a seleção de indivíduos resistentes a esta enfermidade. A caracterização molecular dos genótipos, através de marcadores de DNA, pode auxiliar na identificação de indivíduos com estas características e no processo de melhoramento genético. O objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente ovinos da raça Santa Inês quanto aos aspectos relacionados à resistência à verminose. Foram analisados 10 indivíduos presentes no Núcleo de Conservação do Ovino Santa Inês da Embrapa Tabuleiros Costeiros que foram classificados fenotipicamente como resistentes e sensíveis à verminose através da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), hematócrito e pesagens mensais realizadas entre dezembro de 2005 e dezembro de 2006. Foram utilizados 12 primers RAPD. Os dados obtidos foram convertidos em uma matriz binária e analisados pelo software NTSYSpc 2.11. Os resultados mostraram uma alta similaridade genética entre os genótipos, o que corrobora com outros estudos, evidenciando a importância do monitoramento genético nessa raça com o intuito de maximizar a variabilidade do rebanho. Com a informação disponível, no momento, não foi possível diferenciar geneticamente os animais resistentes e sensíveis à verminose.

**Palavras-chave:** consangüinidade, diversidade genética, RAPD, variabilidade

### Introdução

A criação de ovinos Santa Inês tem se destacado no Brasil por serem animais que apresentam boa adaptação aos trópicos, ausência de cio estacional, além de serem considerados resistentes a diversos tipos de agentes patogênicos. Apesar de seu constante crescimento, a raça vem sendo fortemente ameaçada pela perda da diversidade genética através do manejo incorreto dos acasalamentos, o que pode levar a extinção de características de interesse econômico. O conhecimento da variabilidade genética de uma raça é de grande importância para conservação de rebanhos e



indispensável no estabelecimento de programas de melhoramento animal. Nesse sentido é importante que sejam feitos estudos que tenham por objetivo a manutenção do patrimônio genético desses animais. O uso de marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) para detecção de variabilidade é amplamente difundido, devido as suas características de arbitrariedade e baixo custo, tornando-se uma alternativa viável em programas que tenham por objetivo selecionar indivíduos, principalmente para direcionamento de acasalamentos entre genótipos conhecidos. Dessa forma, pode-se obter elevados ganhos, proporcionando a criação de indivíduos geneticamente superiores, tanto para características ligadas a produtividade quanto a resistência às doenças, como no caso dos nematódeos gastrointestinais, onde a criação dos resistentes e o manejo apropriado direcionado aos animais susceptíveis têm sido uma importante ferramenta de controle (Rocha et al., 2004). Com o uso de técnicas moleculares, será possível identificar os animais resistentes e susceptíveis em um menor período de tempo, antes mesmo da expressão dos sintomas, possibilitando a seleção precoce desses indivíduos, que poderão ser utilizados como reprodutores, introduzindo a característica de resistência e aumentando o desempenho de sua prole (Nunes et al., 2007). Essa pesquisa propõe-se a estudar a variabilidade genética de ovinos da raça Santa Inês, frente a parasitos nematódeos gastrintestinais, utilizando a técnica RAPD, com objetivo de direcionar acasalamentos que possam auxiliar na seleção de indivíduos geneticamente superiores, além de auxiliar futuros programas de conservação desses genótipos.

### **Material e Métodos**

Neste experimento, foi utilizado um total de 10 animais da raça Santa Inês, pertencentes ao Núcleo de Conservação do Ovino Santa Inês da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no Campo Experimental Pedro Arle, na cidade de Frei Paulo, SE. O DNA foi obtido a partir de sangue venoso e extraído através do método de Miller et al. (1988). Dentre os animais, cinco foram considerados resistentes e cinco foram considerados susceptíveis a infecção por parasitos internos, em metodologia descrita em Lobo et al. (2009). Foram utilizados 12 primers RAPD para amplificação do DNA. As reações de RAPD consistiram em um volume final de 25 µl, compostas por 0,5 µM de primer, 1 U de Taq polimerase (Promega), 0,2mM de cada dNTP, tampão de reação 1x, 2 µl de DNA e água ultra pura para completar o volume da reação. Em todas as reações foi incluído um controle negativo com água estéril. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 96°C por 5 min., seguida por 35 ciclos de 94°C por 45 s, 36°C por 45 s, 72°C por 45 s e um período de extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1%, corados em



Brometo de etídio (0,02 µl/ml) e visualizados através de luz ultravioleta. Os marcadores RAPD gerados foram utilizados na construção de uma matriz binária. A partir dos dados binários, foi calculada a matriz de similaridade para os 10 genótipos, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para os marcadores RAPD. Com este coeficiente e utilizando-se o método aglomerativo Unweighted Pair Group Method with an Arithmetic Mean (UPGMA) e pelo procedimento Sequencial Agglomerative Hierarquic Nonoverlapping (SAHN), foram realizadas as análises de agrupamento através do software Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYSpc versão 2.11; Rohlf, 1992).

### Resultados e Discussão

Os 14 iniciadores utilizados amplificaram um total de 55 fragmentos de DNA, sendo aproximadamente 56% polimórficos, variando de dois (iniciadores A03 - AGT CAG CCA C; A16 - AGC CAG CGA A; A20 - GTT GCG ATC C; W04 - CAG AAG CGG A e X03 - TGG CGC AGT G) a oito (iniciador A09 - GGG TAA CGC C).

Com os dados obtidos e transformados em uma tabela binária, obteve-se um dendograma (Figura 1), onde é possível observar o grau de similaridade entre os genótipos estudados.

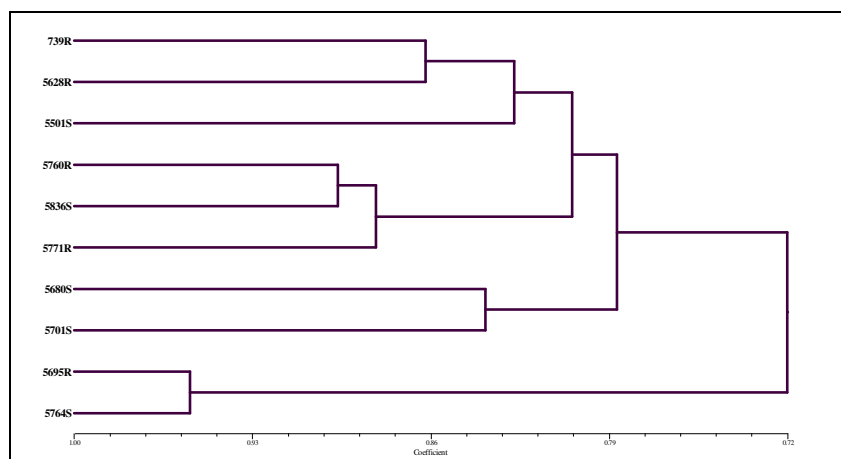


Figura 1. Agrupamento pelo método UPGMA com base no coeficiente de similaridade de Jaccard de dez genótipos de ovinos Santa Inês.

Nota-se que a similaridade entre os clones é maior que 72%, ou seja, os genótipos estudados apresentam uma alta similaridade genética (Figura 1) quando analisados com marcadores RAPD.



Outros estudos conduzidos em ovinos da raça Santa Inês, com marcadores microsatélites (Melo, 2009; Petrolí, 2007), corroboram com os resultados mencionados, demonstrando que a raça vem perdendo sua diversidade ao longo das gerações. À medida que se aumenta o número de iniciadores utilizados nas análises, observa-se maior distinção dos grupos genéticos resistentes e susceptíveis, devido ao aumento da exploração do genoma (Nunes et al., 2007). Seis primers utilizados no presente estudo apresentaram apenas bandas monomórficas (A16, A03, A04, A20, X03 e W04), que embora não contribuam na demonstração de variabilidade, são interessantes para serem utilizadas em estudos comparativos de determinação de variabilidade intra e inter específica.

### Conclusão

Para a característica de resistência a nematódeos gastrointestinais, um maior número de marcadores deve ser utilizado para que seja possível identificar grupos distintos de animais.

### Referências Bibliográficas

- LÔBO, R. N. B. et al. . Genetic parameters for fecal egg count, packed cell volume and body weight of Santa Inês lambs. **Genetics and Molecular Biology** , v. 32, p. 288-294, 2009.
- MELO, B.L.B. et al. Caracterização genética da raça ovina Santa Inês pertencente a rebanhos de Alagoas através de marcadores microsatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 55., 2009, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 2009. p.183.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple satting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.1215, 1998.
- NUNES, A.P. et al. Estudo da variabilidade genética de resistência a nematódeos gastrintestinais em ovinos da raça Corriedale com marcadores rapd. **Revista Brasileira Agrociência**, v.13, p.25-33, 2007.
- PETROLI, C.D. **Marcadores Microsatélites no MHC de ovinos: estudos de associação e diversidade genética da raça Santa Inês**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2007, 84 p. Dissertação de Mestrado.
- ROCHA, R.A.; AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A. Resistance of Santa Inês, Suffok and Ile de France ewes to nematode parasitism around parturition and during lactation. **Small Ruminant Research**, v.55, p.65-75, 2004.
- ROHLF F. **Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System-NTSYS-pc**. Versão 2.11T. New York, Exeter Software; 2004.

