

Genotipagem por PCR de deleção no éxon 11 do gene *mptl-1* associada à resistência ao monepantel em *Haemonchus contortus*

Alessandra da Silva Nucci^{1*}; Simone Cristina Méo Niciura²; Gustavo Felippelli³; Cintia Hiromi Okino²; Wilson Malagó Junior²

¹Aluna de graduação em Medicina Veterinária, Centro Universitário Central Paulista - UNICEP, São Carlos, SP. Bolsista PIBIC/CNPq, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP; *alenucci.medvet@gmail.com.

²Pesquisador/Analista da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

³Bolsista de pós-doutorado FAPESP, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

As infecções por nematoides gastrointestinais, principalmente as causadas por *Haemonchus contortus*, são responsáveis por grandes perdas econômicas na produção ovina devido ao parasitismo e à resistência anti-helmíntica. Em estudo anterior, por mapeamento genômico de X-QTL, foi detectada uma deleção de 6 bp (c.852_857delATTGTC | p.Leu285_Ser286del) localizada no éxon 11 em uma sequência que codifica o domínio transmembrana 2 da proteína MPTL-1 em *H. contortus*. Assim, formulamos a hipótese de que há associação entre a deleção identificada e a resistência ao monepantel. O objetivo do presente estudo foi delinear um protocolo para a genotipagem por PCR da 852_857del no gene *mptl-1* (HCON_00039360) em *H. contortus*. O DNA de larvas individuais de terceiro estágio (L3) foi extraído por solvente orgânico em volume final de 10 µL. Os primers de PCR (5'-CGAATGGAGCATCATTCTAGC-3' e 5'-GAAAGGTGCCTCGGAGTAAA-3') foram desenhados para amplificar a sequência contendo a deleção de 6 bp, levando à amplificação de fragmentos de 171 bp e 177 bp. A PCR foi otimizada com 1X de tampão, 0,2 µM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase e 0,2 µL de DNA, em 20 µL de volume final. As condições de termociclagem foram 94°C por 2 min, 40 ciclos a 94°C, 57°C e 72°C por 30 segundos cada, e 72°C por 10 min. Foi possível identificar a deleção de 6 bp e, assim, genotipar larvas individuais por padrão de bandas após eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 6% (PAGE) com 1X TBE a 60W por 2 h e coloração com nitrato de prata. Entretanto, os fragmentos de 171 bp e 177 bp não puderam ser diferenciados por eletroforese em gel de agarose 4% usando 1X TBE a 100 V por 2 h e coloração com brometo de etídeo. Alternativamente, os mesmos primers foram usados em amplificação por PCR em tempo-real (qPCR) com 1X de SYBR Green PCR Master Mix, 300 nM de cada primer e 0,2 µL de DNA, em volume final de 20 µL, no ABI 7500, que não é equipado com o módulo de *high resolution melting* (HRM). As diferenças detectadas nas temperaturas de *melting* após as análises da curva de dissociação não foram coincidentes com os genótipos após PAGE e, portanto, o uso das diferenças na temperatura de *melting* em qPCR sem HRM não permitiu a genotipagem da deleção de 6 bp no gene *mptl-1*. Concluímos que PCR seguida por PAGE pode ser usada para a genotipagem de populações de *H. contortus* para validação da deleção de 6 bp no gene *mptl-1* como marcador molecular de resistência ao monepantel. Entretanto, visto que a PAGE requer trabalho intensivo e é demorada, especialmente para genotipar grande número de amostras, adaptações adicionais à metodologia serão investigadas.

Apoio financeiro: PIBIC/CNPq (nº. 124515/2020-7); FAPESP (nº. 2019/02967-2)

Área: Ciências Agrárias

Palavras-chave: nematoides gastrointestinais; PAGE; qPCR; polimorfismo; resistência

Número Cadastro SisGen: A43C096