



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS PATERNAS EM RAÇAS OVINAS ATRAVÉS DE POLIMORFISMOS NO CROMOSSOMO “Y”

Yasmim Laíra Cavallaro **Restio**¹; Ana Carolina Januário de **Lima**², Weber Vilas Boas **Soares**³,
Maria Aparecida Cassiano **Lara**⁴.

Nº 15707

RESUMO - O cromossomo Y é uma ferramenta promissora para estudos de filogenia, caracterização e relação genética. O SNP oY1, localizado no gene SRY e microssatélite SRYM18 foram estudados visando a identificação de linhagens paternas de um rebanho Dorper e White Dorper. Um total de 15 cordeiros de uma propriedade particular, localizada no estado de São Paulo foi investigado pelas técnicas de PCR/RFLP e eletroforese capilar. Dos sete haplótipos descritos para *Ovis aries*, dois foram identificados: O haplotipo H6 foi caracterizado pela presença do alelo “A” (SNP oY1) e 141pb (SRYM18) e, o haplotipo H8, alelo “A” (SNP oY1) e 143pb (SRYM18). Esse trabalho faz parte de um estudo mais amplo e outros rebanhos serão investigados visando detectar outras linhagens.

Palavras-chaves: Dorper, gene SRY, microssatélite SRYM18, PCR/RFLP.

¹ Autor: Bolsista CNPq (PIBIC), aluna do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), Piracicaba – SP; Email: yasmim.cavallaro@gmail.com.

² Laboratório de Genética, Instituto de Zootecnia, APTA, Nova Odessa – SP.

³ Laboratório de Genética, Instituto de Zootecnia, APTA, Nova Odessa – SP.

⁴ Orientador: Pesquisadora do Instituto de Zootecnia, Laboratório de Genética, APTA, Nova Odessa – SP; Email: malara@iz.sp.gov.br.



**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

ABSTRACT- *The Y chromosome is a promising tool for studies of phylogeny, characterization and genetic relationship. The SNP oY1, located in the SRY gene, and microsatellite in SRYM18 have been studied aiming at the identification of paternal lineages of a herd Dorper and White Dorper. A total of 15 lambs from a particular property, located in the State of São Paulo was investigated by PCR/RFLP and capillary electrophoresis techniques. Of the seven haplotypes described for Ovis aries, two have been identified: haplotipo H6 was characterized by the presence of "A" allele (SNP oY1) and 141pb (SRYM18) and the haplotipo H8, "A" allele (SNP oY1) and 143pb (SRYM18). This work is part of a wider study and other herds will be investigated in order to detect other strains.*

Key-words: Dorper, PCR/RFLP, SRY gene, SRYM18 microsatellite.

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes, a ampla difusão da espécie se deve principalmente a seu poder de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações. O Brasil possui 15,5 milhões de cabeças ovinas distribuídas por todo o país, porém, concentradas em grande número no estado do Rio Grande do Sul e na região nordeste (Viana, 2008). Por ser uma prática que utiliza pequenas e médias propriedades para a criação de animais e geralmente não requer uma estrutura de manejo tão ampla comparada à bovinocultura, pois seu investimento inicial é baixo e potencialmente lucrativo, assim a ovinocultura vem crescendo no Brasil, adquirindo uma grande importância econômica e social, um exemplo claro é a utilização das raças Dorper e White Dorper em cruzamentos industriais e em programas de melhoramento genético, devido ao sucesso reprodutivo e ótimo rendimento de carcaça apresentados.

A raça ovina Dorper foi desenvolvida na África do Sul, através do cruzamento do *Dorset Horn* com o *Blackhead Persian* (conhecida no Brasil, como Somalis), para ser explorada em regiões áridas e semi-áridas (MILNE, 2000; BARROS et. al., 2005; LATEGAN, 2003). O *Blackhead Persian* é uma raça oriunda do deserto, que garantiu a rusticidade, frugalidade, adaptabilidade, pigmentação, cobertura de pêlos, alta fertilidade e generalidade, além de uma pele de excelente valor comercial, devido a essas características esta raça foi escolhida como a "raça mãe". O *Dorset*



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

Horn foi selecionado por apresentar uma estação de reprodução mais longa em comparação com as outras raças britânicas, crescimento rápido, boa cobertura muscular e excelente sabor da carne (MILNE, 2000; LATEGAN, 2003).

Durante a década de 1930 surgiram os primeiros produtos deste cruzamento, que se destacavam pelo rápido crescimento e pela qualidade e peso de suas carcaças. Alguns eram totalmente brancos e recebiam a denominação de Dorsian (DORset + perSIAN) atualmente conhecida como White Dorper, outros eram brancos com a cabeça e pescoço pretos, sendo conhecidos como Dorper (DORset + PERsian). A denominação de Dorper estendeu-se indiferentemente a todos os produtos dos referidos cruzamentos, independentemente de serem brancos na totalidade ou branco com cabeça e pescoço pretos. O Dorper é considerado o segundo maior rebanho da África do Sul, com mais de 10 milhões de cabeças, representando mais de 30% do total de ovinos do país (MILNE, 2000; LATEGAN, 2003).

No final dos anos 90, a raça Dorper foi introduzida no Nordeste do Brasil, pela Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba – Emepa, devido à adaptabilidade da raça em condições semiáridas, clima predominante daquela região (ROSANOVA et al, 2005). Segundo informações obtidas nos registros da Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos (ARCO), estima-se que haja no Brasil atualmente, cerca de 21.400 entre Dorper e White Dorper – Puros de Origem (PO), e, aproximadamente, 2.350 – Puros por Cruza (PC), um número ainda pequeno se comparados com outras raças, por exemplo, a Santa Inês 132.770 – PO e 502.120 – PC.

A caracterização genética tem demonstrado ser uma ferramenta eficaz para quantificar a diversidade genética de animais domésticos, servindo de base para políticas de melhoramento animal e desenvolvimento rural. Através da análise genética é possível estimar níveis de variabilidade de uma população, suas características diferenciais com outras, relativamente próximas, bem como analisar as relações filogenéticas entre as mesmas (Avisé et al., 1987).

O cromossomo Y (ChrY) por ser de herança exclusivamente paterna, também tem sido de muita utilidade em estudos evolutivos, permitindo completar os estudos de diversas espécies, além da variabilidade no ChrY ter uma grande aplicação na verificação de parentesco (MEADOWS et al., 2004). O ChrY é um dos menores cromossomos, com aproximadamente 60 Mb. Cerca de 24 Mb encontram-se na região na eucromatina e cerca de 30 Mb na região da heterocromatina, totalizando 95% de todo o cromossomo como região não recombinante ou sexo-específica, MYS (BUTLER, 2003). Pelo fato de apresentar regiões que não se recombinam, o cromossomo Y, está sujeito a acumular um maior número de mutações, porém isso o torna bastante informativo e,



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

consequentemente, uma ferramenta muito útil para a identificação de haplótipos (EDWARDS et al., 2000; HANOTTE et al., 2000; HURLES, 2001).

Na espécie ovina, o número de SNPs e microssatélites localizados no cromossomo Y é bem menor em relação a outras espécies, sendo necessários estudos adicionais para identificar outras regiões com mutações, uma vez que não se conhece a sequência completa do ChrY ovino (MEADOWS et al. 2004). Com base nos estudos realizados por Meadows et al. (2006) em várias raças do mundo, investigando o polimorfismo na região promotora do gene SRY (oY1) e o loco SRYM18 do cromossomo Y, tem sido sugerido a existência de sete haplótipos para a espécie ovina, que foram investigados no presente estudo para a caracterização das linhagens paternas.

Na Zootecnia a definição de raça é tida como uns grupos de indivíduos que apresentam características fenotípicas que diferem das demais populações, com o surgimento da biologia molecular novas tecnologias estão disponíveis para se conhecer a estrutura genética das populações, permitindo estabelecer um padrão racial das espécies existentes. A caracterização genética de ovinos embora esteja sendo bem explorado em muitos países, no Brasil este tipo de trabalho ainda é escasso, apesar de a ovinocultura ter aumentado nas últimas décadas.

O presente estudo teve como objetivo a identificação de linhagens paternas de um rebanho Dorper e White Dorper.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Cerca de 15 animais, da raça Dorper e White Dorper foram investigados, provenientes de uma única propriedade particular no Estado de São Paulo. O DNA foi obtido a partir de amostras pêlo, contendo o bulbo capilar, coletados de reprodutores com base em seus registros genealógicos. O DNA foi extraído empregando-se protocolos já padronizados no Laboratório e um kit comercial (Genomic DNA Purification Kit). As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria e a sua integridade avaliada pela análise de eletroforese em gel de agarose 1%. Para se realizar uma eletroforese, um gel de agarose é preparado juntamente com o corante Cyber Safe, o DNA é introduzido em pequenos poços de gel, e então uma corrente elétrica é aplicada através do gel para que as amostras de DNA migrem, o corante possui afinidade pelo DNA e o fluoresce vivamente em contato com a luz ultravioleta. Dessa forma podem-se localizar as bandas que correspondem ao DNA. Para a documentação dos resultados foi utilizado fotodocumentador.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

O DNA extraído foi diluído para a concentração de 50ng/μL e estocado -20°C, até o momento das análises.

Para acessar a variabilidade das linhagens paternas foi investigado o SNP *oY1* e o microssatélite *SRYM18*. O marcador genético *oY1* (Acesso AY604734.2: nt88: A>G) é um SNP localizado na região 5' do gene sexo-específico Y (*SRY*), descrita por Meadows et al (2004 e 2006). Este polimorfismo foi investigado pela técnica de PCR/RFLP segundo Lara et al. (2014). Um fragmento de 354 pb contendo o SNP foi amplificado com o uso de primers desenhados para o estudo (5' GTTCTTATCTTCCCAGTCCCTTC-3'e 5' GGTAGACAACAGGCCACATAC3'). A PCR foi realizada em 25 μL de volume total, contendo 100 ng de DNA genômico, 0,20 μM de cada primer, tampão 1X, 1,5 mM MgCl₂, 0, 0,2mM dNTP e 1 U *Taq polimerase*. Para a amplificação por PCR, as seguintes foram utilizadas: 95°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 57,8°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Uma alíquota de 7μL do DNA amplificado foi digerida com 5U da enzima de restrição *Ddel*. O RFLP foi analisado em gel de poliacrilamida 12%, mediante coloração com prata (Sanguinetti et al., 1994)

O microsatellite *SRYM18* (Acesso DQ272456) foi analisado no ABI3130 Genetic Analyser (Applied Biosystem, USA). A PCR foi realizada em um volume total de 10 μL contendo 25 ng DNA, tampão 1xPCR, 1,5 mM em MgCl₂, 0,2 mM em dNTP, 0,15 de cada primer (5'VIC-GGCATCACAACAGGATCAGCAAT-3' e 5'GTGATGGCAGTTCTCACAATCTCCT3') y 1 U de *Taq* polimerase. Para a PCR foi utilizada as mesmas condições de amplificação descritas anteriormente. Os genótipos foram observados utilizando-se o marcador interno *GeneScan* 400HD e software *GeneMapper*. Os haplótipos foram estabelecidos segundo a metodologia de Meadows & Kijas (2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os protocolos de extração de DNA utilizados geraram resultados satisfatórios onde a maior parte das amostras extraídas após serem aplicadas no gel de agarose e submetidas ao teste de eletroforese amplificam de forma a localizar as bandas correspondentes.

A metodologia utilizada para a análise do SNP *oY1* permitiu a identificação de dois alelos. O alelo “A” caracterizou-se pela presença do fragmento de 84pb e, o alelo G, pelo fragmento 76pb. No rebanho investigado apenas o alelo “A” foi detectado.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

Com relação ao microssatélite *SRYM18*, dois alelos foram detectados na população investigada. As frequências observadas para os alelos 141 e 143 foram 0,33 e 0,67, respectivamente. Dos sete haplótipos descritos para a espécie domesticada *Ovis aries* (Meadows et al., 2006); dois foram identificados. O haplótipo *H6* foi caracterizado pela presença dos alelos “A” e 141 e, o haplótipo *H8*, pelos alelos “A” e “143”.

Os resultados obtidos, até o momento, sugerem que o rebanho investigado é formado por apenas duas linhagens paternas. A variabilidade observada será comparada com outros rebanhos visando à verificação das diferenças entre as linhagens paternas de ovinos Dorper e White Dorper, considerados grupos genéticos distintos no Brasil. Além disso, este trabalho faz parte de um projeto mais amplo bem como é como iniciativa paralela ao Programa BIOVIS, coordenado pela RE CONBIAND. O presente estudo é de grande aplicação para a ovinocultura por possibilitar a identificação e a caracterização genética dos padrões fenotípicos do Dorper e White Dorper, uma vez que permitirá distinguir suas diferenças e semelhanças.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, até o momento, sugerem que o rebanho Dorper investigado é formado por apenas duas linhagens paternas.

5. AGRADECIMENTOS

Ao programa CNPq/PIBIC pela bolsa de Iniciação Científica e ao Instituto de Zootecnia por oferecer a oportunidade de crescimento profissional e aos membros do Laboratório de Genética Animal pelo apoio durante a execução do trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCO – Assistência aos Rebanhos de Criadores de Ovinos, Associação Brasileira de Criadores de Ovinos. Disponível em: < <http://www.arcoovinos.com.br/siteweb/index.asp>>. Acesso: Julho/2015

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.18, p.489-522, 1987.

BARROS, N.N.; VASCONCELOS, V.R.; WANDER, A.E.; ARAÚJO, M.R.A. Eficiência bioeconômica de cordeiros F1 Dorper x Santa Inês para produção de carne. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.825–831, 2005.

BUTLER, J.M. Recent developments in Y-short tandem repeat and Y-single nucleotide polymorphism analysis. **Analysis**, v.15, p.91, 2003.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

EDWARDS, C.J.; GAILLARD, C.; BRADLEY, D.G.; MAC HUGH, D.E. Y-specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species. **Animal Genetics**, v.31, p.127-130, 2000.

HANOTTE, O.; TAWAH, C.L.; BRADLEY, D.G.; OKOMO, M.; VERJEE, Y.; OCHIENG, J.; REGE, J.E. Geographic distribution and frequency of a taurine *Bos Taurus* and an indicine *Bos indicus* Y specific allele amongst sub-Saharan African cattle breeds. **Molecular Ecology**, v.9, p.387-396, 2000.

HURLES, M.E.; JOBLING, M.A. Haploid Chromosomes in Molecular Ecology: Lessons from the Human Y. **Molecular Ecology**, v.10, p.1599-613, 2001.

LARA, M.A.C.; GUTMANIS, G.; SOARES, W.V.B.; PRATE, J.N.S.; CAVALCANTE-NETO, A.; BUENO, M.S.; LANDI, V.; DELGADO, J.V. Análisis preliminares del cromossoma y em razas de ovelas explotadas em Brasil. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**, v.4, p.135-137, 2014.

LATEGAN, D. **Dorpers no novo século: padrões atualizados e informações gerais**. Dorpers Sheep Breeders' Society of South África. 69 p.2003.

MEADOWS, J.R.S.; HANOTTE, O.; DRÖGEMÜLLER, C.; CALVO, J.; GODFREY, R.; COLTMAN, D.; MADDOX, J.F.; MARZANOV, N.; KANTANEN, J.; KIJAS, J.W.. Globally dispersed Y chromosomal haplotypes in wild and domestic sheep. **Animal Genetics**, v.37, p.444 – 453, 2006.

MEADOWS, J.R.S.; HAWKEN, R.J.; KIJAS, J.W. Nucleotide diversity on the ovine Y chromosome. **Animal Genetics**, v.35, p.379-385, 2004.

MILNE, C. The history of the Dorper Sheep. **Small Ruminant Research**, v.36, p.99-102, 2000.

ROSANOVA, C.; SILVA, A.G.S.; GONZAGA-NETO, S. A raça Dorper e sua caracterização produtiva e reprodutiva. **Veterinária Notícias**, v.11, p.127-135, 2005.

VIANA, R.G.A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. *Revistas Ovinos*, v.4, n.12, 2008. Disponível em:
<<http://www.almanaquedocampo.com.br/images/files/panorama%20geral%20ovinocultura%20brasil.pdf>>. Acesso em: julho/2015.