

Análise da variabilidade genética em cervídeos através de ISSRs

Marlene Santos¹, Ana Cristina Matos², Luís Figueira², Ana Cláudia Coelho³, Manuela Matos⁴

¹Student of Biotechnology for Health Sciences University of Trás-os-Montes and Alto-Douro

²School of Agriculture, Polytechnic Institute of Castelo Branco

³CECAV- Center for Animal Science and Veterinary, University of Trás-os-Montes and Alto-Douro, Department of Veterinary Sciences

⁴IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Genomic and Biotechnology, University of Trás-os-Montes and Alto-Douro, Department of Genetics and Biotechnology



Introdução

Os veados (*Cervus elaphus*), os gamos (*Dama dama*) e os muflões (*Ovis ammon*) são mamíferos pertencentes à ordem Artiodactyla. Estes animais incluem-se no enorme grupo de animais selvagens existente em Portugal, com interesse cinegético, apresentando uma vasta distribuição geográfica e, como tal, elevada diversidade genética, que pode estar associada à etiopatogenia de diferentes doenças. Neste estudo utilizaram-se marcadores moleculares ISSRs para a análise da variabilidade genética em cervídeos.

Material e Métodos

✓ Extração de DNA com o “DNeasy® Blood & Tissue”, Qiagen® das espécies *Cervus elaphus*, *Dama dama* e *Ovis ammon* (como *outgroup*), da região da Beira Interior Sul, Centro de Portugal Continental.

✓ Reações de PCR (tabela 1) utilizando 10 *primers* de ISSRs (*UBC823*, *UBC825*, *UBC844*, *UBC845*, *UBC848*, *UBC855*, *UBC856*, *UBC873*, *UBC880* e *UBC881*).

✓ Separação dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5 %.



ISSRs				
Volume de reação		Condições de PCR		
		Ciclos	Tempo	Temperatura
Master mix	10 µl	45	5 min	94 °C
Primer (5 µM)	1,0 µl		30 s	94 °C
DNA	1,0 µl		45 s	52 °C
ddH ₂ O	8,0 µl		2 min	72 °C
		1	10 min	72 °C
Total	20 µl	---	∞	4 °C

Tabela 1: Volume de reação e condições de PCR para ISSRs.

Resultados e Análise

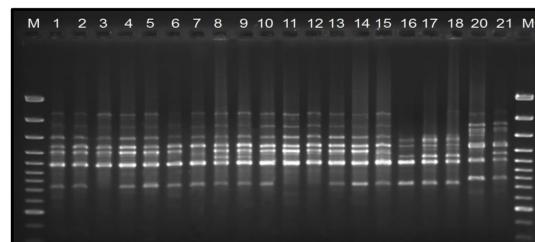
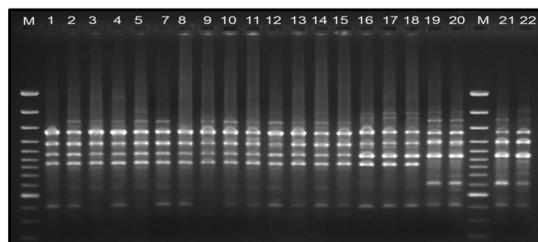


Figura 1: Resultados da amplificação utilizando o *primer* UBC848 em amostras de veado (1 a 15), gamo (16 a 18) e muflão (19 a 22). M: marcador de peso molecular.

Figura 2: Resultados da amplificação utilizando o *primer* UBC856 em amostras de veado (1 a 15), gamo (16 a 18) e muflão (19 a 22). M: marcador de peso molecular.

No conjunto dos *primers* observaram-se 192 bandas sendo 183 polimórficas, evidenciando uma taxa de polimorfismo de 95,31% (tabela 2).

O *primer* UBC845 foi o que permitiu obter um maior número de marcadores, ou seja, 28 marcadores; pelo contrário, o *primer* UBC856 foi o que registou menor número de marcadores, num total de 12 (tabela 2).

A taxa de polimorfismo mostrou ser máxima com os *primers* UBC823, UBC845, UBC880 e UBC881; apontando a taxa mais baixa para o *primer* UBC856 com um valor de 83,33% (tabela 2).

Primer	Nº de bandas	Nº de bandas monomórficas	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas únicas	% de polimorfismo	Variação de amplificação (pb)
UBC823	19	0	19	4	100	610 - 2800
UBC825	17	1	16	0	94,12	870 - 2800
UBC844	19	1	18	0	94,74	420 - 3000
UBC845	28	0	28	5	100	420 - 2800
UBC848	23	3	20	1	86,96	330 - 2900
UBC855	16	1	15	0	93,75	650 - 2900
UBC856	12	2	10	0	83,33	750 - 2250
UBC873	16	1	15	0	93,75	640 - 2900
UBC880	20	0	20	2	100	420 - 2750
UBC881	22	0	22	3	100	350 - 2500
Total	192	9	183	15	95,31	330 - 3000

Tabela 2: Resultados da amplificação e percentagem de polimorfismo de cada *primer* selecionado e do conjunto de *primers*, para as três espécies em estudo.

De acordo com o dendrograma (figura 3) verifica-se a formação de três grupos, correspondendo cada um deles a cada uma das espécies em estudo. Assim, o grupo I engloba as amostras correspondentes ao veado (*Cervus elaphus*); o grupo II refere-se às amostras de gamo (*Dama dama*) e por último, no grupo III encontram-se as amostras referentes ao muflão (*Ovis ammon*).

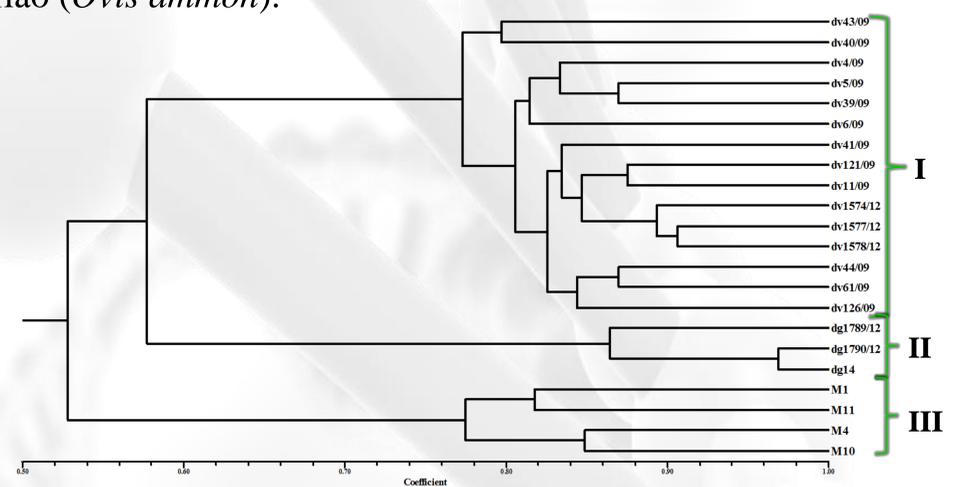


Figura 3: Dendrograma com as relações filogenéticas entre as 22 amostras das espécies em estudo, com base nos marcadores ISSRs, aplicando o método UPGMA e o coeficiente SM. A espécie *Ovis ammon* foi utilizada como “outgroup”.

A utilização de ISSRs permitiu-nos a obtenção de bons resultados, de acordo o número de indivíduos em estudo e limitados à zona Centro de Portugal Continental, comprovando a existência de variabilidade intra e interespecífica nos animais desta região.

Os resultados obtidos permitiram-nos verificar as relações filogenéticas entre as espécies/indivíduos em estudo, verificando-se uma maior similaridade entre as espécies *Cervus elaphus* e *Dama dama* que entre estas e a espécie *Ovis ammon*.

Os ISSRs são uma potencial ferramenta para análise de variabilidade genética em animais, nomeadamente em populações de animais selvagens.