

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

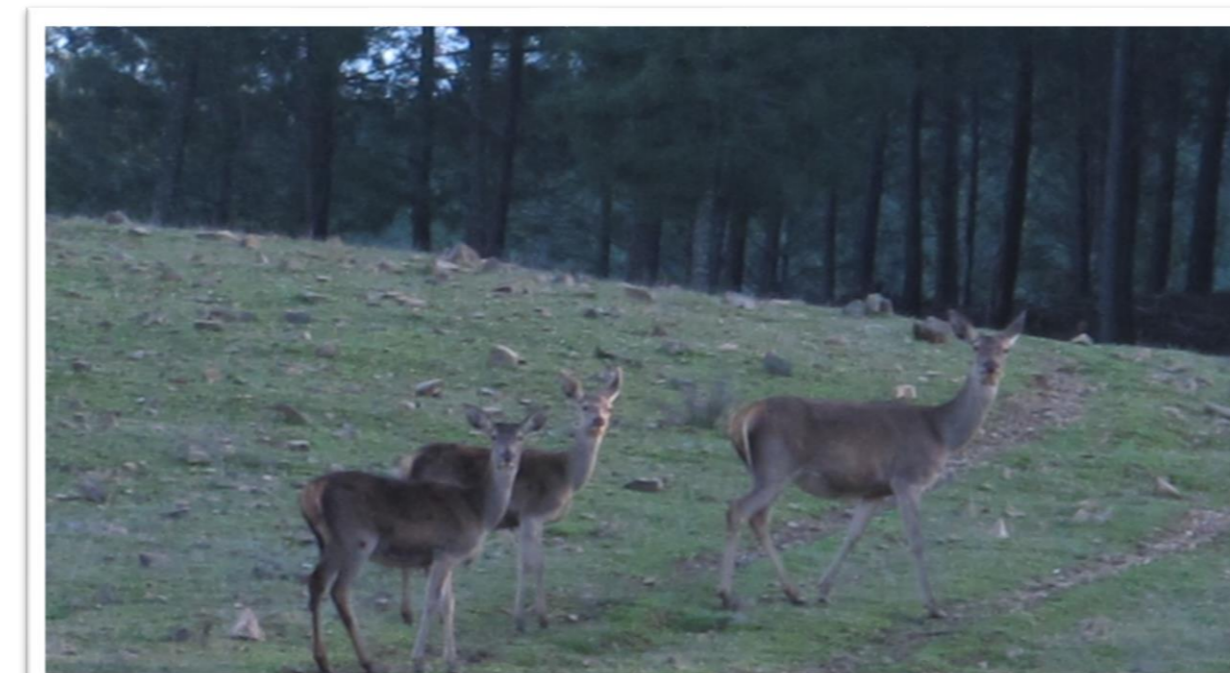
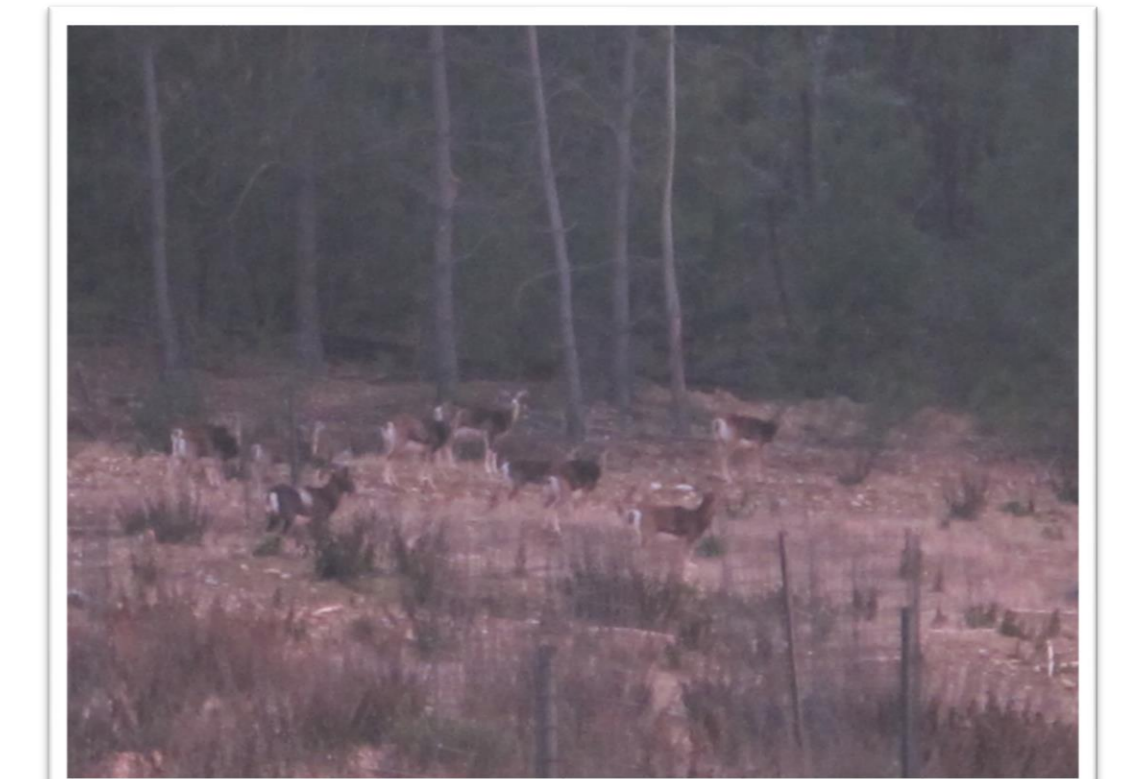
Os veados (*Cervus elaphus*), os gamos (*Dama dama*) e os muflões (*Ovis ammon*) são mamíferos pertencentes à ordem Artiodactyla. Estes animais incluem-se no enorme grupo de animais selvagens existente em Portugal, com interesse cinegético, apresentando uma vasta distribuição geográfica e, como tal, 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 | | |
| Master mix | 10 µl | Ciclos | Tempo | Temperatura |
| Primer (5 µM) | 1,0 µl | 1 | 5 min | 94 °C |
| DNA | 1,0 µl | 45 | 30 s | 94 °C |
| ddH ₂ O | 8,0 µl | | 45 s | 52 °C |
| | | | 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

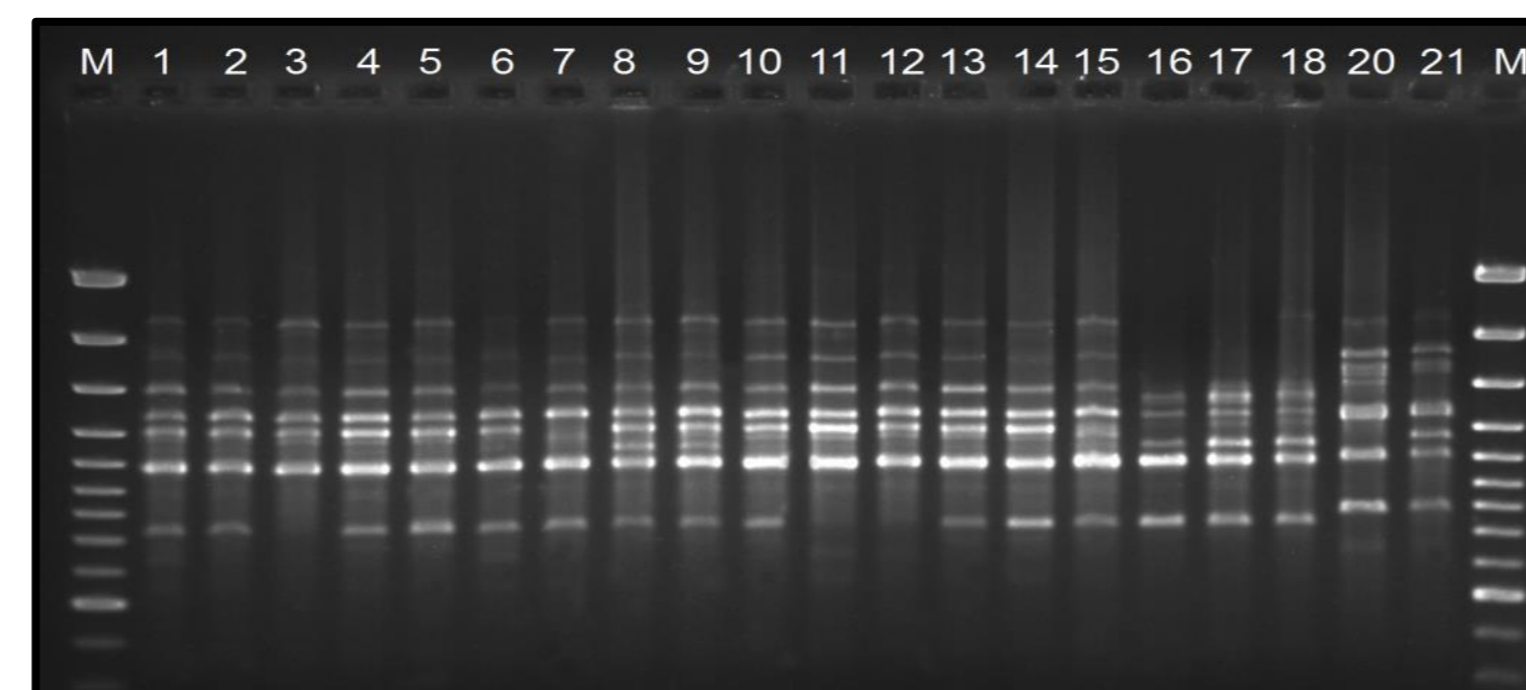
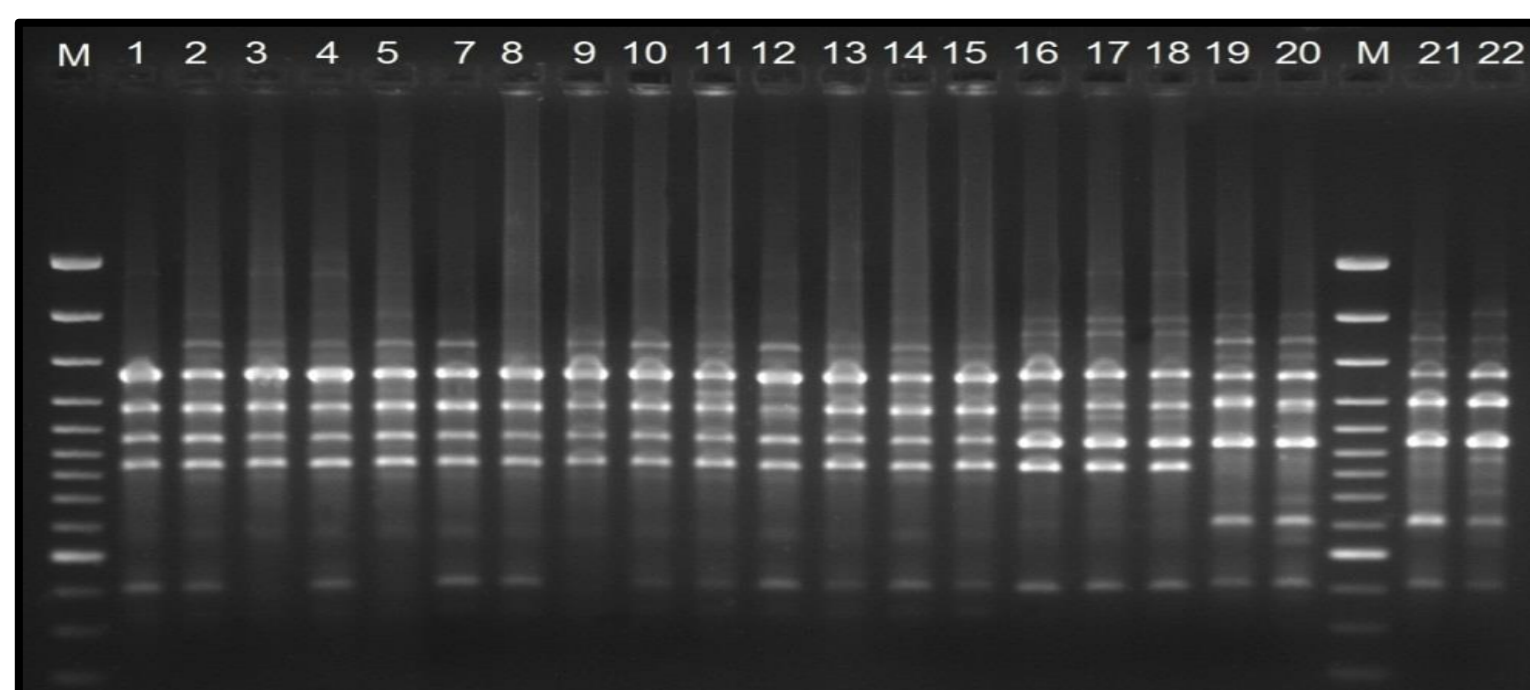


Figura 1: Resultados da amplificação utilizando o *primer* UBC848 em amostras de veado (1 a 15), gamo (16 a 18) e muflão (19 a 22). M: marcador de peso molecular.

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*).

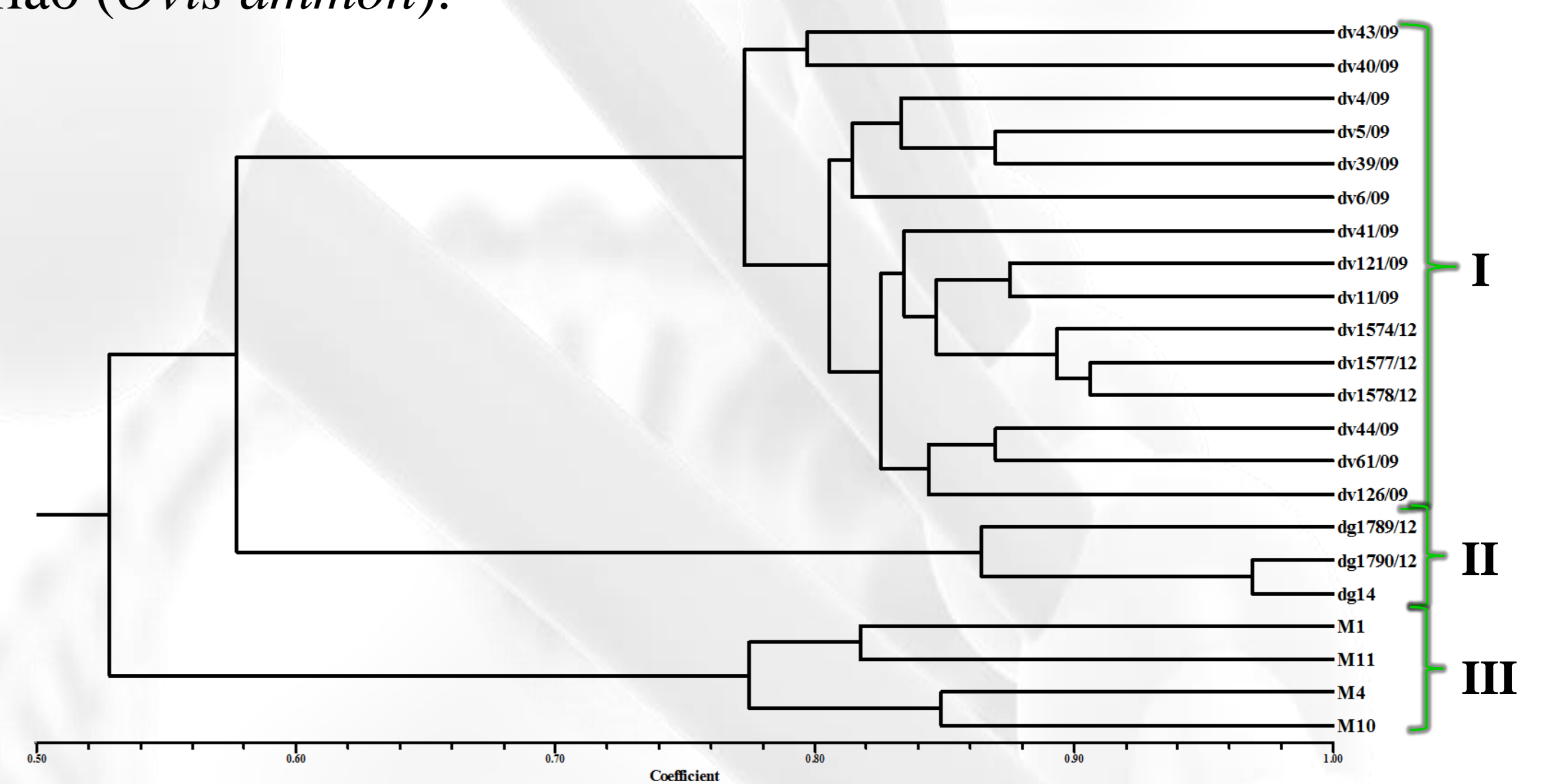


Figura 3: Dendrograma com as relações filogenéticas entre as 22 amostras das espécies em estudo, com base nos marcadores ISSRs, aplicando o método UPGMA e o coeficiente SM. A espécie *Ovis ammon* foi utilizada como “outgroup”.

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.