

MARCADORES MICROSSATÉLITES COMO AUXILIAR NA EXCLUSÃO DE PATERNIDADE EM BÚFALOS

MICROSATELLITE MARKERS AS A TOOL IN THE PATERNITY EXCLUSION IN BUFFALOES

Maria do Socorro Maués Albuquerque¹; Samuel Rezende Paiva¹, Andréa Alves do Egito¹, José Ribamar Felipe Marques², Arthur da Silva Mariante¹ e Eucleia Primo Betioli Contel³.

¹ Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório Genética Animal, 02372 Brasília- DF, Brasil

² Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental

³ Professora, Universidade de São Paulo-USP- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –

RESUMO: Utilizando um conjunto de 14 marcadores microssatélites foram analisados bubalinos dos seguintes grupos genéticos Murrah (N=94), Jafarabadi (N=85), Mediterrâneo (N=69), Carabao (N=77) e Baio (N=57). Para cada loco foram avaliados os seguintes indicadores: número de alelos, a heterozigosidade esperada e observada, conteúdo de informação polimórfica (PIC), probabilidade de exclusão por locos e probabilidade de exclusão combinada (PEC). O conjunto de marcadores detectou 141 alelos com poder de exclusão conjunta de paternidade (PEC) superior a 99,99%, supondo haver pelo menos um dos progenitores conhecido. Quando analisado por grupo genético o PEC foi de 99,94% (Baio), 99,98% (Carabao), 99,80% (Jafarabadi) e 99,97% (Mediterrâneo e Murrah). Adicionalmente foram analisados, com base nos maiores valores de PIC, conjuntos de 12, 10 e oito locos para os quais o PEC foi respectivamente, 99,99 %, 99,98 % e 99,96%. Tais resultados permitem concluir que o conjunto de doze locos mostrou-se eficiente como auxiliar na exclusão de paternidade em bubalinos. Este painel pode vir a ser utilizado para auxiliar no manejo de rebanhos de búfalos no Brasil.

Palavras- Chave: *Bubalus bubalis*, conservação, diversidade, SSR,

ABSTRACT: Using a set of 14 microsatellite markers buffalos of the genetic groups Murrah (N=94), Jaffarabadi (N=85), Mediterranean (N=69), Carabao (N=77) and Baio (N=57) have been analyzed. For each locus, the following parameters have been evaluated: number of alleles, expected and observed heterozygosity, polymorphic information content (PIC), probability of exclusion by loci and probability of exclusion combined (PEC). The set of markers detected 141 alleles that were jointly able to exclude paternity (PEC) to a level greater than 99.99%, assuming to have at least one known ancestor. When analyzed by genetic groups, the PEC was 99.94% (Baio), 99.98% (Carabao), 99.80% (Jaffarabadi) and 99.97% (Mediterranean and Murrah). Additionally, based on the highest values of PIC, sets of twelve, ten and eight loci have been analyzed, and the PEC was, respectively, 99.99 %, 99.98 % and 99.96%. Such results allow concluding that the set of twelve loci revealed to be efficient to assist in the exclusion of paternity in buffalos. This panel can be useful in the management of buffalo herds in Brazil.

Key- Words: *Bubalus bubalis*, conservation, diversity, SSR

INTRODUÇÃO

Atualmente as análises moleculares fornecem informações valiosas para estudos genéticos gerando dados que podem ser utilizados para implementar estratégias de conservação da biodiversidade, de melhoramento genético, estudos de filogenia e análise de paternidade, entre outros. Nesse sentido, a utilização de marcadores moleculares vem assumindo papel relevante na caracterização e conservação de raças e/ou populações de animais domésticos. Dentre eles, os microssatélites são considerados os marcadores mais polimórficos disponíveis atualmente, oferecendo uma discriminação de alta resolução entre populações relacionadas dentro de uma mesma espécie (Barker, 1994). Um grande número de locos microssatélites caracterizados em bovinos (Barendse et al., 1994; Kappes et al., 1997), vem sendo utilizado por diversos autores em trabalhos com búfalos. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um conjunto de microssatélites como ferramenta auxiliar na exclusão de paternidade e na caracterização genética de búfalos do Brasil.

Material e Métodos

Bubalinos de cinco grupos genéticos foram analisados a partir de um conjunto de catorze microssatélites (CSSM06, CSSM19, CSSM33, CSSM42, INRA05, INRA35, CSSM08, CSSM66,

ILSTS05, OARFCB20, INRA23, ETH152, CSSM09 e INRA172) agrupados em três multiplexes. O DNA foi extraído dos linfócitos segundo Miller et al. (1988). Os experimentos foram realizados em termocicladores PTC-100 (M J Research) e Primus 96 Plus (MWG-Biotech). Os iniciadores marcados com fluorescência (0,25 μ M) foram amplificados num volume de 20 μ l de reação contendo 2,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 50 -100 ng da amostra de DNA, e 0,5 U de Taq polimerase. Para comprovar a amplificação, os produtos do PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão de corrida (TBE1x), corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e documentados em aparelho de fotodocumentação *Eagle Eye*.

A genotipagem foi realizada em seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA, USA). Cada reação de genotipagem continha 1 μ l da reação de amplificação e 9 μ l de um mix contendo formamida e um marcador de tamanho molecular conhecido e marcado com o fluorocromo ROX (Brondani & Grattapaglia, 2001) na proporção de 8:8:1. As amostras foram submetidas a uma temperatura de 95 °C durante três minutos para desnaturação do DNA. Para as análises dos dados foram utilizados os softwares Genescan 672 v.2.0.2, Genotyper e para as análises estatísticas básicas foi utilizado o programa: Cervus (Marshall et al., 1998).

Resultados e Discussão

O conjunto de marcadores utilizados proporcionou um total de 141 alelos e um poder de exclusão de paternidade de 99,74% e 99,99%, considerando respectivamente, nenhum ou um dos progenitores conhecidos. A Tabela 1 mostra os principais indicadores: número de alelos detectados (A), conteúdo de informação do polimorfismo (PIC), Heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O), Exclusão de Paternidade (EP1 e EP2) e Poder de Exclusão Conjunta (PEC) para cada loco utilizado.

O grau de informação de um loco de microssatélite pode estar relacionado com o número de alelos observados e com o valor de PIC. O número de alelos por loco variou de 4 a 13 com média de 10,07 alelos/loco sendo que dez deles apresentaram mais de nove alelos (71%). Sete dos catorze locos estudados apresentaram valores de PIC superiores a 70%, quatro entre 55,5% e 67,9% e três apresentaram valores inferiores a 50%. Os valores mais elevados (PIC>80%) foram para os locos CSSM33, CSM66, CSSM19. A heterozigosidade esperada (H_E) depende do número de alelos e da frequência dos mesmos na população. Nas populações estudadas a H_E variou de 0,257 para o marcador INRA05 e 0,856 para o CSSM33, sendo que em oito dos catorze locos estudados o valor de H_E foi superior a 70%. O conjunto de marcadores detectou 141 alelos com poder de exclusão conjunta de paternidade (PEC) superior a 99,99%, supondo haver pelo menos um dos progenitores conhecidos. Quando analisado por grupo genético o PEC foi de 99,94% (Baio), 99,98 % (Carabao), 99,80% (Jafarabadi) e 99,97% (Mediterrâneo e Murrah). Adicionalmente foram analisados, com base nos maiores valores de PIC, conjuntos de 12, 10 e oito locos para os quais o PEC foi respectivamente, 99,99 %, 99,98 % e 99,96%. Tais resultados permitem concluir que o conjunto de doze locos mostrou-se eficiente como auxiliar na exclusão de paternidade em bubalinos. Este painel pode vir a ser utilizado para auxiliar no manejo de rebanhos de búfalos no Brasil.

Tabela 1. Análise da estrutura genética por locos: número de alelos detectados (A), conteúdo de informação do polimorfismo (PIC), Heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O), Exclusão de Paternidade (EP1 e EP2) e Poder de Exclusão Conjunta (PEC). Brasília, março/2007.

Locos	A	PIC	H_E	H_O	EP (1)	EP(2)
CSSM06	10	0,775	0,801	0,645	0,444	0,620
CSSM19	12	0,816	0,835	0,519	0,510	0,679
CSSM33	13**	0,839	0,856	0,556	0,552	0,713
CSSM42	10	0,795	0,817	0,435	0,474	0,648
INRA05	7	0,250	0,257	0,128	0,035	0,144
INRA23	10	0,436	0,462	0,320	0,117	0,275
INRA35	13	0,653	0,693	0,270	0,296	0,473
CSSM08	9	0,737	0,769	0,711	0,384	0,564
CSSM09	8	0,495	0,552	0,394	0,164	0,310
CSSM66	11	0,826	0,846	0,770	0,525	0,691
ETH152	12	0,719	0,748	0,647	0,365	0,549

ILSTS05	4*	0,573	0,645	0,347	0,213	0,361
OARFCB20	11	0,555	0,600	0,387	0,207	0,373
INRA172	11	0,679	0,718	0,599	0,318	0,497
MÉDIA	10,07	0,653	0,686	0.480	PEC=99,74	PEC=99,99

Tabela 2. Exclusão de paternidade em bubalinos por grupo genético: número de animais analisados (N), probabilidade de exclusão de paternidade quando nenhum dos pais é conhecido (EP1) e probabilidade de exclusão de paternidade quando pelo menos um dos pais é conhecido (EP2). Brasília, março/2007.

Grupo Genético	N	PE₁	PE₂
Baio	57	0,983753	0,999455
Carabao	77	0,992185	0,999809
Jafarabadi	85	0,964927	0,998002
Mediterrâneo	69	0,991089	0,999765
Murrah	94	0,990312	0,999792

Conclusão

O conjunto dos 14 locos microssatélites utilizados possuem probabilidades de exclusão combinada que os qualificam como adequados para auxiliar na exclusão de paternidade em populações de búfalos do Brasil.

A análise utilizando os doze locos mais informativos mostrou a mesma eficiência comprovando que pode ser reduzido o número de marcadores em função do polimorfismo dos mesmos.

Literatura Citada

BARENDSE, W. VAIMAN, D.; KEMP, S. J. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. **Mammalian Genome**, v. 8 p. 21-8. 1994.

BARKER, J. S. F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph. **Proceedings...** Guelph: International Committee for World Congresses on Genetics Applied to Livestock Production, 1994. v. 5, p. 501-508.

BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragments sizing. **BioTechniques**, 31. 793-800.2001.

KAPPES, S. M.; KEELE, J. W.; STONE, R.T. et al (1997). A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genome Research**. 7,235-49.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L AND PEMBERTON, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**,7 (5): 639-655.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, London, v. 16, p. 1215, 1988.