

## Análise de diversidade genética de búfalos utilizando marcadores do tipo SSRs

### Genetic diversity analysis of buffalo using SSRs type markers

#### RESUMO

O rebanho da bubalinocultura vem se difundindo no Brasil, por apresentarem produtos de alta qualidade nutricional. São poucos os estudos na área de melhoramento genético utilizando marcadores moleculares na espécie que poderiam contribuir positivamente na atividade. A variabilidade genética em um rebanho pode colaborar nas tomadas de decisões dos programas de acasalamento, desta forma, o objetivo do presente estudo foi realizar uma análise da diversidade genética de búfalos utilizando marcadores moleculares do tipo SSRs. Foram analisados 25 materiais genéticos provenientes de uma extração do bulbo folicular do pelo dos animais e submetidos a reações de PCR e genotipagem. Os dados obtidos através da genotipagem dos cinco marcadores moleculares (BM1224, ETH225, ETH152, TEXAN15 e CSFM50) foram analisados no programa Darwin e separados em dois grupos, demonstrando que os animais são geneticamente diferentes, todavia os animais de número 20 e 21, 18 e 23 e 1, 2 e 14 apresentaram alta semelhança genética.

**PALAVRAS-CHAVE:** Marcador molecular. Variabilidade genética. Bubalinocultura.

#### ABSTRACT

The herd of bubalinocultura has been spreading in Brazil, for presenting products of high nutritional quality. There are few studies in the field of genetic improvement using molecular markers in the species that could positively contribute to the activity. The genetic variability in a herd can collaborate in the decision making of the mating programs, thus, the objective of the present study was to perform an analysis of the genetic diversity of buffalos using molecular markers of type SSRs. Twenty-five genetic materials from an extraction of the follicular bulb from the animals were analyzed and subjected to PCR and genotyping reaction. The data obtained through the genotyping of the five molecular markers (bm1224, eth225, eth152, texan15 and csfm50) were analyzed in the Darwin program and separated into two groups, demonstrating that the animals are genetically different, however the animals of number 20 and 21, 18 and 23 and 1, 2 and 14 showed high genetic similarity.

**KEYWORDS:** Molecular marker. Genetic variability. Buffalo.

**Ariane Enara Pedro**

[ariane.enara@live.com](mailto:ariane.enara@live.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Juliana Morini Küpper Cardoso Persegui**

[julianam@utfpr.edu.br](mailto:julianam@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

A atividade de bubalinocultura vem se difundindo no Brasil, além de contribuir de forma direta na produção de alimentos (FIGUEIRO & SARAIVA, 2018). A criação de búfalos tem se destacado devido aos seus positivos índices zootécnicos, são animais que apresentam características de rusticidade, adaptabilidade e docilidade, permitindo assim uma maior facilidade em manejá-los, além de promoverem produtos que apresentaram alto valor agregado (WARMLING et al., 2018).

O leite de búfala é considerado um leite de alto valor nutricional, devido exibir em sua composição níveis de proteína, gordura, minerais, umidade, extrato seco que os tornam mais eficientes na produção de produtos derivados. Para que se alcance o sucesso na atividade é de extrema importância ter um controle rigoroso quanto ao manejo dos animais, a sanidade, a alimentação e não podendo se esquecer do controle dos indivíduos dentro da propriedade, bem como do controle do melhoramento genético (OLIVEIRA, 2018).

O melhoramento genético tem como principal objetivo incrementar indivíduos em uma determinada população (PEREIRA., 2012), buscando bons índices de produtividade, qualidade dos produtos, dentro do sistema a ser trabalhado (NASCIMENTO et al., 2013). Cada raça animal possui uma combinação de genes, bem como uma frequência alélica que tem a base da variação genética, sendo assim a diversidade genética reflete na variedade de tipos e raças existentes, como também em sua variação (EGITO., 2007). Para um melhor entendimento da variabilidade genética é indispensável o uso de marcador molecular, que tem como objetivo auxiliar no processo de mensuração de diferenças dentro de uma população (PIRES., 2009). Portanto o objetivo deste trabalho foi estudar a análise da diversidade genética de búfalos utilizando marcadores do tipo SSRs.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado através de uma parceria com a Fazenda Favim, localizado no município de Cruzeiro do Iguacu-PR, lá foram coletados todo o material e as análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus de Dois Vizinhos – PR. O material genético escolhido para se trabalhar foi a extração do DNA a partir de pelos contendo bulbo, permitindo assim uma maior facilidade em coletar o material, levando em consideração o número de animais escolhidos para o estudo.

Foram selecionados aleatoriamente 30 animais em uma idade reprodutiva, sendo eles mestiços da raça mediterrâneo com jafarabadi, porém as análises de diversidade genética foram feitas somente em 25 indivíduos, já que para 5 búfalos

não foi possível realizar a extração do DNA. Foram retirados manualmente de 30 a 40 pelos da parte dorsal de cada animal e de acordo com a numeração de cada um o material era adicionado em um envelope identificado com o número e seu sexo e trazidos para Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Dois Vizinhos - PR, e armazenado na geladeira. Após a realização da PCR foram realizados amplificação do produto para os cinco marcadores proposto a este trabalho. A PCR e genotipagem do prime CSFM50, BM1224, TEXAN15, ETH225 e ETH152. Foram realizadas a genotipagem dos 5 marcadores microssatélites.

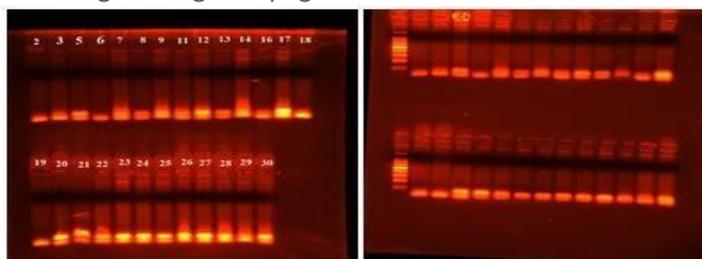
As análises de agrupamento foram realizadas através do método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages), utilizando o programa Darwin na versão 6.0.0 (PERRIER & JACQUEMOUD-COLLET, 2006). Com base na estatística bayesiana, o programa Structure (PRITCHARD et al., 2000) foi utilizado alternativamente para inferir o número de grupos (K).

Para esta análise foi utilizado um arquivo com dados de genotipagem, com valores de K=2 a K=5. Foram realizadas cinco repetições para cada valor de K, usando o modelo Noadmixture com 200.000 períodos de burn e 500.000 simulações de Monte Carlo de Cadeia de Markov (MCMC). Para verificar qual K foi o mais adequado para inferir os agrupamentos, foi calculada a razão de verossimilhança (LnPD) de acordo com os critérios propostos por EVANNO et al (2005).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

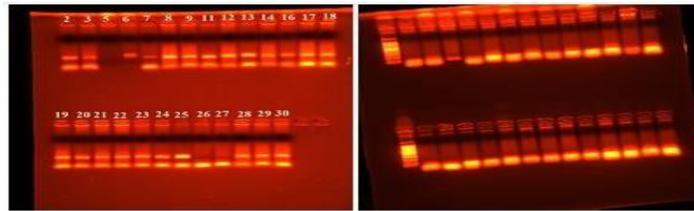
Os cinco marcadores microssatélites utilizados no estudo amplificaram possibilitando a leitura do material. Prime CSFM50 (Figura 1), BM1224 (Figura 2), TEXAN15 (Figura 3), ETH225 (Figura 4) e por último o prime ETH152.

Figura 1 – Amplificação do primer CSFM50 na imagem do lado esquerdo e a imagem da genotipagem do lado direito.



Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 2 – Amplificação do primer BM1224 na imagem do lado esquerdo e a imagem da genotipagem do lado direito.



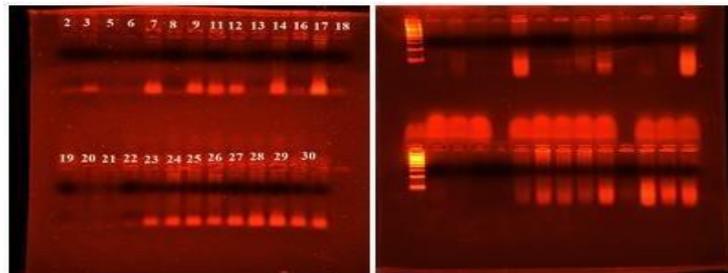
Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 3 - Amplificação do primer TEXAN15 na imagem do lado esquerdo e a imagem da genotipagem do lado direito.



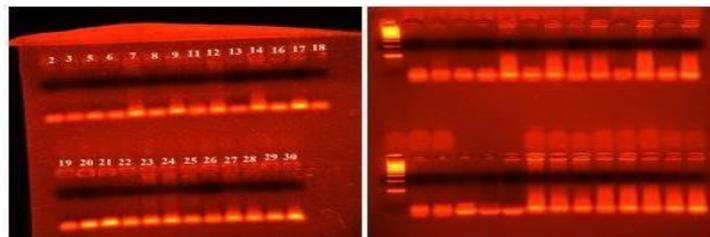
Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 4 ETH225 - Amplificação do primer ETH225 na imagem do lado esquerdo e a imagem da genotipagem do lado direito.



Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 5 – Amplificação do primer ETH152 na imagem do lado esquerdo e a imagem da genotipagem do lado direito.



Fonte: Autoria própria (2019).

De acordo com as figuras acima podemos observar o resultado da PCR e genotipagem seguindo as respectivas temperaturas: Desnaturação 94°C por 30

segundos, seguida de 35 ciclo, anelamento de 55°C por 45 segundos e extensão de 72°C por 30 segundos, seguido por uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Com um tempo total estimado de 01:53:16 segundos. Os primers ETH225 e ETH152 não apresentaram uma amplificação adequada, e por este motivo não foram utilizados nas análises de genotipagem.

Os genótipos foram divididos em dois grupos, além da semelhança entre eles. A maioria dos indivíduos apresentaram diversidade genética, porém os indivíduos 20 e 21, 18 e 23 e 1, 2 e 14 apresentaram alta semelhança genética entre si, indicando assim altos níveis de homozigose entre eles e ampliando o sistema endogâmico, porém expostos a ocorrência da depressão endogâmica que pode ocasionar problemas reprodutivos e produtivos. Todavia o principal objetivo do produtor é buscar um rebanho que apresente uma alta diversidade genética para que assim se tenha o fortalecimento da evolução das espécies, maximizações dos níveis de heterozigose e decrescimento dos problemas produtivos e reprodutivos na população. A opção de se trabalhar com um sistema de acasalamento endogâmico depende do objetivo do produtor, caso opte por manter no seu rebanho características de interesse, o acasalamento de animais aparentados pode ser uma boa alternativa se for bem conduzido.

Segundo Siqueira et al., (2009) os marcadores microssatélites utilizados no trabalho sobre diversidade genética em bovinos de corte se mostraram bem informativos e podendo ser utilizados na caracterização genética de populações taurinas. De acordo com Aytekin et al., (2011), ao utilizar os marcadores ISSR em seu estudo com búfalos o mesmo mostrou resultados promissores em relação a avaliação da diversidade genética do rebanho, isso confirma que ao se fazer uso desse tipo de marcador molecular o resultado apresentará uma alta precisão, porém são poucos estudos com o rebanho bubalino e os que tem é possível identificar uma transversalidade entre os bovinos e bubalinos e segundo Albuquerque (2006) através da análise do DNA é possível realizar estudos evolutivos bem como detectar a existência de marcadores genéticos polimórficos.

### CONCLUSÃO

De acordo com o que foi apresentado ao decorrer deste estudo é possível identificar que houve uma alta diversidade genética dentro das populações analisadas e que os marcadores utilizados apesar de serem desenvolvidos para estudos com bovinos se mostrou promissor no presente estudo com búfalos, sendo assim os marcadores podem ser utilizados em estudos evolutivos envolvem as duas espécies.

### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação Araucária por todo o auxílio financeiro recebido durante todo o tempo de pesquisa. Agradeço também a Profa. Dra, Juliana Morini por toda ajuda e paciência em ensinar.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. do S. et al. Variabilidade genética em búfalos estimada por marcadores RAPD. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2006.
- AYTEKIN, Ibrahim et al. Evaluation of ISSR markers for genetic diversity analysis in Anatolian water buffaloes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 11, p. 19571962, 2011.
- CORRÊA, Rua Augusto. Diversidade genética e eficiência de DNA microssatélites para o controle genealógico da raça Nelore. **Arq. Bras. Med**, v. 59, n. 5, p. 1257-1262, 2007.
- EGITO, Andréa Alves do. Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em Microssatélites e Haplótipos de DNA Mitocandrial: subsídios para a conservação. 2007. 246 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) -Universidade Brasília, Brasília, 2007.
- EVANNO, G et al. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, v.14, p.2611- 2620, 2005. DOI: 10.1111/j.1365294X.2005.02553. x.
- FIGUEIRO, M. R.; SARAIVA, N. Z. Principais estratégias de manejo sanitário na bubalinocultura. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2018.
- NASCIMENTO ,Rosa ; et al. (Org.). **Melhoramento Genético Aplicado em Gado de Corte - Programa Geneplus-Embrapa**. 1ed. Campo Grande: Embrapa, v. 1, 2013.
- PEREIRA, Jonas. C.C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**.6. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2012.
- PIRES, L. C. Diversidade genética entre populações caprinas com base em marcadores morfométricos. 2009. 120 f. Dissertação (Magister scientiae em zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.
- PRITCHARD JK.; STEPHENS M.; DONNELLY P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- SIQUEIRA, Fabiane et al. Diversidade genética de bovinos de corte por meio de marcadores microssatélites. In: **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46., 2009, Maringá. Anais. Maringá: SBZ: UEM, 2009., 2009.
- WARMLING, Leila Mara et al. Biotécnicas reprodutivas usadas em bubalinos no Brasil. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias. Curso de Zootecnia, 2018.