



Journal of the Selva Andina Research Society

ISSN: 2072-9294

infoselvandina@gmail.com

Selva Andina Research Society

Bolivia

do Amaral Crispim, Bruno; Beraldo dos Santo Silva, Danielly; Campos Banari, Alexandre; de Oliveira Seno, Leonardo; Barufatti Grisolia, Alexéia

Discriminação alélica em ovinos naturalizados do Pantanal Sul-Matogrossense por meio de marcadores microsatélites

Journal of the Selva Andina Research Society, vol. 3, núm. 1, 2012, pp. 3-13

Selva Andina Research Society

La Paz, Bolivia

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=361333625002>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto



Discriminação alélica em ovinos naturalizados do Pantanal Sul-Matogrossense por meio de marcadores microssatélites

Allelic discrimination in naturalized ovine from Pantanal Sul-Matogrossense by means of microsatellite markers

Crispim, Bruno do Amaral^{1*}; Silva, Danielly Beraldo dos Santo¹; Banari, Alexandre Campos¹; Seno, Leonardo de Oliveira¹; Grisolia, Alexéia Barufatti¹

Datos del Artículo

¹Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados – FCBA/UFGD, Mato Grosso do Sul – Brasil.

²Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados – FCA/UFGD, Mato Grosso do Sul - Brasil

*Endereço de contato: Bruno do Amaral Crispim.
E-mail: brunocrispim.bio@gmail.com

Palavras chave:

Marcadores moleculares, multiplexPCR, diversidade genética, ovelha, recursos genéticos.

Resumo

As técnicas de biologia molecular que são utilizadas na discriminação alélica para caracterização individual e de raças de ovinos são ferramentas importantes nos programas de melhoramento genético e de conservação de recursos genéticos. A utilização de marcadores moleculares microssatélites possibilita a diferenciação alélica, que por sua vez permite inferir a variabilidade genética de populações amostrais. O estudo teve como objetivo testar a sensibilidade e a eficiência da eletroforese capilar fluorescente, utilizando oligonucleotídeos iniciadores de microssatélites, para discriminação alélica da raça crioula do pantanal sul-matogrossense, bem como verificar a possibilidade de utilização dos produtos do sequenciamento em análises de variabilidade genética. Para o referido teste foram utilizadas amostras de sangue provenientes de ovinos da raça pantaneira. A discriminação alélica dos oito microssatélites foi determinada por meio de eletroforese capilar em sequenciador automático e as análises dos resultados foram realizadas nos programas CERVUS e Dendro-UPGMA. Os resultados indicaram a possibilidade da utilização da técnica para a genotipagem individual de todos os loci testados numa corrida eletroforética e a sua potencialidade para discriminação alélica mesmo em situações de diferença de dois pares de bases entre os alelos. O dendrograma resultante baseado na matriz de distância pelo método de agrupamento UPGMA, indicou coeficiente de similaridade médio de 0.72 no grupo de animais. Foi possível concluir que existe viabilidade e eficiência da técnica de marcadores moleculares microssatélites utilizando eletroforese capilar para discriminação alélica e a utilidade dos resultados para estudos de variabilidade genética, diagnóstico de paternidade e caracterização do rebanho de ovinos crioulos do Pantanal Sul-mato-grossense.

© 2012. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

The molecular biology techniques that are used in allelic discrimination for individual and sheep breeds characterization are important tools in breeding programs and conservation of genetic resources. The use of microsatellite markers allows allelic differentiation, which in turn allows us to infer the genetic variability of sample populations. The study aimed to test the sensitivity and efficiency of fluorescent capillary electrophoresis, using

J Selva Andina Res Soc. 2012; 3(1):3-13.

Historial del artículo

Recibido Abril, 2012.
Devuelto Junio 2012
Aceptado Julio, 2012.
Disponible en línea, Agosto, 2012.

Key words:

Molecular markers,
multiplex PCR,
genetic diversity,
sheep,
genetic resources.

Editado por:
**“Selva Andina
Research
Society”**

microsatellite primers, for allelic discrimination of the Crioulo breed from Pantanal sul-matogrossense, as well as verify the possibility of using the products of sequencing in genetic variability analysis. For this test, were used blood samples from Pantaneira breed sheep. The allelic discrimination of eight microsatellites was determined by capillary electrophoresis in automatic sequencer and the results analyses were performed on the programs CERVUS and Dendro-UPGMA. The results indicated the possibility of using this technique for the individual genotyping of all loci tested in electrophoretic analysis and its potential to allelic discrimination even in case of difference between two pairs of bases between the alleles. The resulting dendrogram based on the distance matrix by the UPGMA assembly method, indicated medium similarity coefficient of 0.72 in the group of animals. It was concluded that there is the viability and efficiency of the microsatellite molecular markers technique using capillary electrophoresis for allelic discrimination and the utility of results for studies of genetic variability, paternity diagnosis and characterization of the Crioulo sheep herd from Pantanal sul-matogrossense.

© 2012. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivian. All rights reserved.

Introdução

Os microssatélites são marcadores moleculares que apresentam alta sensibilidade, elevada capacidade de discriminação entre indivíduos, alto polimorfismo, heterozigose elevada e praticidade em rotinas laboratoriais. Estas características importantes tornaram este marcador útil para a realização de testes de parentesco, genética forense, caracterização e análise de diversidade genética (Gao et al 2007, Arranz et al 2001). A escolha correta dos microssatélites permite a elaboração de sistemas *multiplex* para a amplificação simultânea de diversos *loci* ao mesmo tempo, acelerando assim os procedimentos laboratoriais, facilitando a discriminação alélica e possibilitando a análise de amostras que possuem baixa concentração de DNA (Beaumont & Bruford 1999).

A visualização das sequências amplificadas dos microssatélites pode ser feita por meio de três matrizes sólidas: eletroforese em gel de agarose ou em gel de poliacrilamida desnaturante ou não desnaturante e sequenciamento automático (Ferreira & Grattapaglia 1998). A escolha do tipo

de gel está relacionada ao tamanho do fragmento e diferença de tamanho dos fragmentos de DNA.

Atualmente, têm-se realizado PCRs multiplex que utilizam *primers* marcados com corantes fluorescentes, tais como HEX, TET e FAM. Essas reações são aplicadas no interior de um capilar, e a migração do DNA acontece até passar pelo leitor do sequenciamento automático. Um feixe de laser rastreia o gel, excitando os marcadores, que emitem luzes em um comprimento de onda específico, de acordo com o corante utilizado. A luz é detectada e o padrão do espectro analisado com ajuda de programas específicos para cada sequenciador que permitem ler as sequências de DNA (Voet et al 2002). Os resultados da genotipagem automatizada baseada em fluorescência são mais informativos, pois permite a detecção de vários produtos amplificados de forma simultânea, o que diminui o custo das análises e o tempo de leitura por amostra (Kashyap et al 2004).

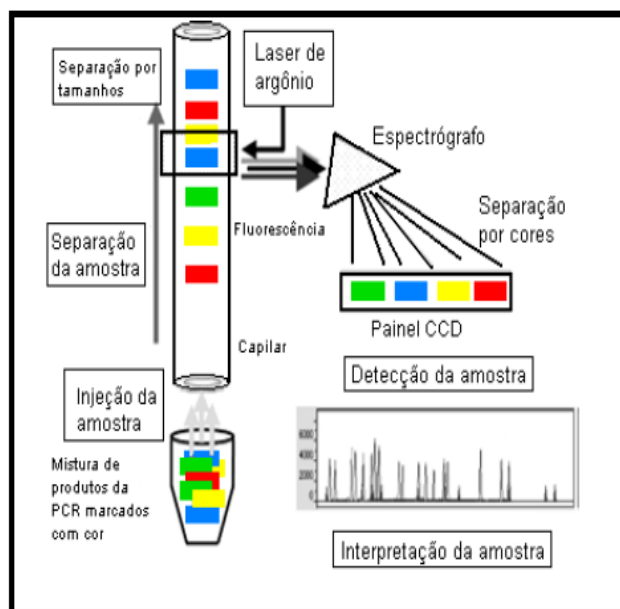
A corrida eletroforética dos produtos amplificados leva aproximadamente 30 minutos e os fragmentos são separados de acordo com o número de pares de bases e a cor do fluorocromo. A separação dos alelos por meio dessa tecnologia detecta a fluorescência induzida por laser e dispensa o uso de placas de géis (Tang & To 2006).

Para mover as moléculas da amostra através do polímero presente no capilar, necessita-se aplicar uma voltagem específica para cada reação por um determinado tempo. As moléculas de DNA que possuem peso molecular menor se deslocam mais rápido que as moléculas maiores. Quando os fragmentos de DNA alcançam a janela de detecção, as moléculas marcadas com fluoróforo são excitadas pelo laser, emitindo fluorescência no momento em que os fragmentos passam e uma câmera coleta as intensidades da emissão de quatro diferentes comprimentos de onda. As emissões são espectralmente separadas pelo espectrógrafo reflexivo. Um padrão interno, contendo fragmentos de DNA de tamanho conhecido e marcado com corante diferente também é processado junto sendo utilizado como controle (Fig 1). Os dados coletados são convertidos em eletroferogramas e que podem ser visualizados e analisados por meio de softwares específicos de acordo com o sequenciador utilizado (Tang & To 2006).

Além da possibilidade de automação e da utilização de PCR multiplex, a detecção dos marcadores microssatélites por eletroforese capilar em sequenciador automático permite distinguir com facilidade alelos que variam em uma única unidade repetitiva, o que aumenta a precisão dos

dados moleculares obtidos e a reprodutibilidade dos resultados. Nesse contexto, objetivou-se nesse estudo demonstrar a sensibilidade e eficiência da técnica de eletroforese capilar, e demonstrar a sua potencialidade em análise de variabilidade genética da raça crioula do Pantanal Sul-Matogrossense.

Fig 1 Esquema das etapas de funcionamento da Eletroforese Capilar em Sequenciador Automático



Adaptado de Pena (2010).

Materiales e métodos

No estudo, foram utilizadas amostras de dez ovinos crioulos do Pantanal (SRD, sem raça definida), que também é conhecida como “Pantaneira Sul-Matogrossense”. Os animais pertencem ao rebanho da Fazenda Experimental da Universidade Federal da Grande Dourados (FAECA/UFGD), localizada no município de Dourados, MS. As amostras de sangue foram

coletadas por punção da veia jugular em tubos para coleta de sangue (Vacutainer®) de 4.5mL, contendo anticoagulante K3 EDTA. As amostras foram mantidas sob-refrigeração até a realização da extração do DNA.

A extração de DNA foi realizada a partir de 300µL de sangue. As amostras de sangue foram colocadas em microtubos a esse material foi adicionado 2µL de Proteinase K (20mg/mL) e 500µL de SDS (Sodecil Sulfato de Sódio) a 20%. A homogeneização do material foi realizada em *vortex* e para incubação utilizou-se banho-maria a 60°C por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 800µL de clorofórmio e acrescentados 350µL de solução de precipitação (3M acetato de potássio, 6.6M ácido acético glacial). O material foi centrifugado a 18.000x g por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa foi alíquotada e transferida para outro microtubo.

Posteriormente, foi adicionado 1mL de etanol 100% gelado em cada microtubo e homogeneizado por inversão. O conteúdo foi centrifugado novamente a 18.000 x g por 5 minutos a 4°C e em seguida o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 1mL de etanol 70%. Novamente cada microtubo foi centrifugado e o sobrenadante desprezado e os microtubos foram invertidos para secagem. Ao final do procedimento o precipitado foi eluído em 100µL de TE (10 mM Tris HCl, 1mM EDTA) pH 8.7 com RNase (Promega) 1µg/mL.

A qualidade do DNA foi observada por meio de eletroforese em gel de agarose corada com brometo de etídeo, Além disso, dados referentes à

quantidade de DNA (ng/µL) e qualidade (razão de 260/280 nm) foram obtidos por meio de espectrofotometria (Nanodrop®). O DNA foi submetido à Reação em Cadeia pela Polimerase Multiplex (mPCR). Para tanto, foram utilizados oito pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos que flanqueiam regiões de microssatélites aleatórias.

A seleção dos *primers* foi baseada em listas de marcadores microssatélites para ovinos, que são disponibilizadas pela FAO 2011. As reações mPCR e sequenciamento foram realizadas em termociclador de temperatura programável (Termocicler VeriFlex 384, Applied Biosystems). As reações com volume final de 10µl foram preparadas contendo: 3.6µl de água ultra-pura q.s.p., 1.5µl de Tampão, mix de 1.5µl de *primers* (CSRD 0247, HSC, OarAE 129, MAF 214, OarFCB 304, OarCP 49, SPS 113, D5S2) descritos na Tabela 1, 0.4µl de Taq DNA Polimerase (2 unidades) e 10 a 50ng de DNA genômico. As reações multiplex foram conduzidas contendo os oito pares de oligonucleotídeos iniciadores sendo que estes se diferenciam pelo tamanho de alelos que cada par de oligonucleotídeo iniciador amplifica (Kevorkian et al 2009). As sequências *Foward* foram marcadas pelos corantes fluorescentes, HEX (6-carboxy-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína), FAM (6-carboxifluoresceína), ou TET (4,7,2',7'-tetracloro-6-carboxifluoresceína).

Os ciclos de temperatura e condições para a amplificação foram constituídas de um passo inicial de desnaturação a 95°C por 7 minutos, 40 ciclos com desnaturação de 95°C por 30 segundos,

anelamento a 63°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. Ao final dos 40 ciclos realizou-se uma extensão final a 72°C por 30 minutos. Ao término do processo de amplificação, as amostras foram resfriadas a 4°C. Em todos os experimentos foram realizados controles negativos contendo todos os reagentes exceto DNA, com o intuito de monitorar possíveis contaminações por DNA.

Na Tabela 1 foram representados os dados referentes ao tamanho dos fragmentos (pares de bases), oligonucleotídeos iniciadores (*Foward* e *Reverse*) e seus respectivos marcadores fluorescentes. Após a mPCR, as regiões amplificadas foram submetidas à corrida

eletroforéticas no equipamento MegaBACE™ 1000 DNA Analysis Systems (GE Healthcare, USA). Para tanto, foi preparada uma solução com TWEEN e marcador de peso molecular ET-400 (GE Healthcare). Em cada amostra foram colocados 0.3µl do marcador ROX, 7.7µl de TWEEN 0.02X e 2µl do produto de PCR. A placa contendo os reagentes foi desnaturada por 3 minutos a 94°C e colocada diretamente no gelo. A injeção das amostras foi feita a 3 KV por 80 segundos e a corrida a 8 KV por 80 minutos no MegaBACE™ 1000.

Tabela 1 Locus de microsatélite, localização no cromossomo (Crom), oligonucleotídeos iniciadores, marcadores fluorescentes e tamanhos dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) pela mPCR

<i>Locus</i>	Número de Acesso	Crom	Oligonucleotídeos		Tamanho dos fragmentos (pb)
			Foward (5'- 3') e marcadores fluorescentes	Oligonucleotídeos Reverse (5'- 3')	
CSRD247	EU009450	OAR 14	GGACTTGCCAGAACTCTGCAAT (HEX – amarelo)	CACTGTGGTTTGTATTAGTCAGG	208 - 250
HSC	M90759	OAR 20	CTGCCAATGCAGAGACACAAGA (FAM – azul)	GTCTGTCTCCTGTCTTGTTCATC	270 - 306
OarAE129	L11051	OAR 5	AATCCAGTGTGTGAAAGACTAATCCAG (TET – verde)	GATAGATCAAGATATAGAATATTTTCA ACACC	135 - 165
MAF214	M88160	OAR 16	AATGCAGGAGATCTGAGGCAGGGACG (TET – verde)	GGGTGATCTTAGGGAGGTTTTGGAGG	181 - 256
OarFCB 304	L01535	OAR 19	CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG (HEX – amarelo)	CGCTGTGTCAACTGGGTCAGGG	148 - 190
OarCP49	U15702	OAR 17	CAGACACGGCTTAGCAACTAAACGC (HEX – amarelo)	GTGGGGATGAATATTCCTTCATAAGG	77 - 103
SPS113	...	BTA 10	CCTCCACACAGGCTTCTCTGACTT (FAM – azul)	CCTAACTTGCTTGAGTTATTGCC	138 - 150
D5S2	Z14040	OAR 5	TACTCGTAGGGCAGGCTGCCTG (FAM – azul)	GAGACCTCAGGGTTGGTGATCAG	190 - 210

Os resultados gerados foram analisados no *software* Fragment Profiler version 1.2[®] (GE Healthcare). E, a sua possibilidade de aplicação em análises genéticas foi avaliada com o auxílio dos programas CERVUS[®] (Marshall et al 1998) e Dendro-UPGMA[®] (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) (Garcia-Vallvé & Puigbo 2009). O primeiro fornece dados referentes ao número de alelos, a heterozigosidade esperada (He) e heterozigosidade observada (Ho) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC). O segundo possibilita a construção de matriz de distância e fornece dados relativos a distância genética a partir da construção do dendrograma por meio do método da UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical averages).

Resultados

Os resultados obtidos pela eletroforese capilar realizada em sequenciador automático da mPCR dos ovinos foram visualizados no programa Fragment Profiler version 1.2[®] (GE Healthcare). Esse programa gerou gráficos que foram

demonstrados na Fig 2. O eixo X representa o tamanho dos fragmentos em pares de bases e o eixo Y indica a intensidade de fluorescência. Portanto, a partir de interpretação do gráfico foi possível determinar se o indivíduo genotipado foi homozigoto ou heterozigoto para determinado marcador. No exemplo da Fig 2, foram indicados os resultados da genotipagem para o marcadores OarAE129 em 3 indivíduos.

Os resultados obtidos pela eletroforese capilar realizada em sequenciador automático da mPCR dos ovinos foram visualizados no programa Fragment Profiler version 1.2 (GE Healthcare). Esse programa gerou gráficos que foram demonstrados na Figura 2. O eixo X representa o tamanho dos fragmentos em pares de bases e o eixo Y indica a intensidade de fluorescência. Portanto, a partir de interpretação do gráfico foi possível determinar se o indivíduo genotipado foi homozigoto ou heterozigoto para determinado marcador. No exemplo da Figura 2, foram indicados os resultados da genotipagem para o marcadores OarAE129 em 3 indivíduos.

Fig 2 Exemplo dos tamanhos dos alelos resultantes da PCR do microsatélite OarAE129 visualizados por electroforectrogramas no programa Fragment Profiler version 1.2 (GE Healthcare). (a) heterozigoto (148/150 pb); (b) heterozigoto (137/150 pb) e (c) homozigoto (148/148 pb) dos indivíduos 1, 3 e 9 respectivamente.



Os oito loci de microssatélites da mPCR foram discriminados e visualizados como demonstrados na Fig 3 para o animal número 4. Para os marcadores CSRD0247, D5S2, SPS113, MAF214, OarCP49, HSC, OarAE129, OarFCB304 foi possível identificar, respectivamente, os alelos 232/234, 192/192, 138/146, 192/233, 85/100, 276/290, 148/150 e 165/172.

Esses resultados demonstram que a eletroforese possibilitou genotipar individualmente todos os loci testados para um indivíduo numa única amostra.

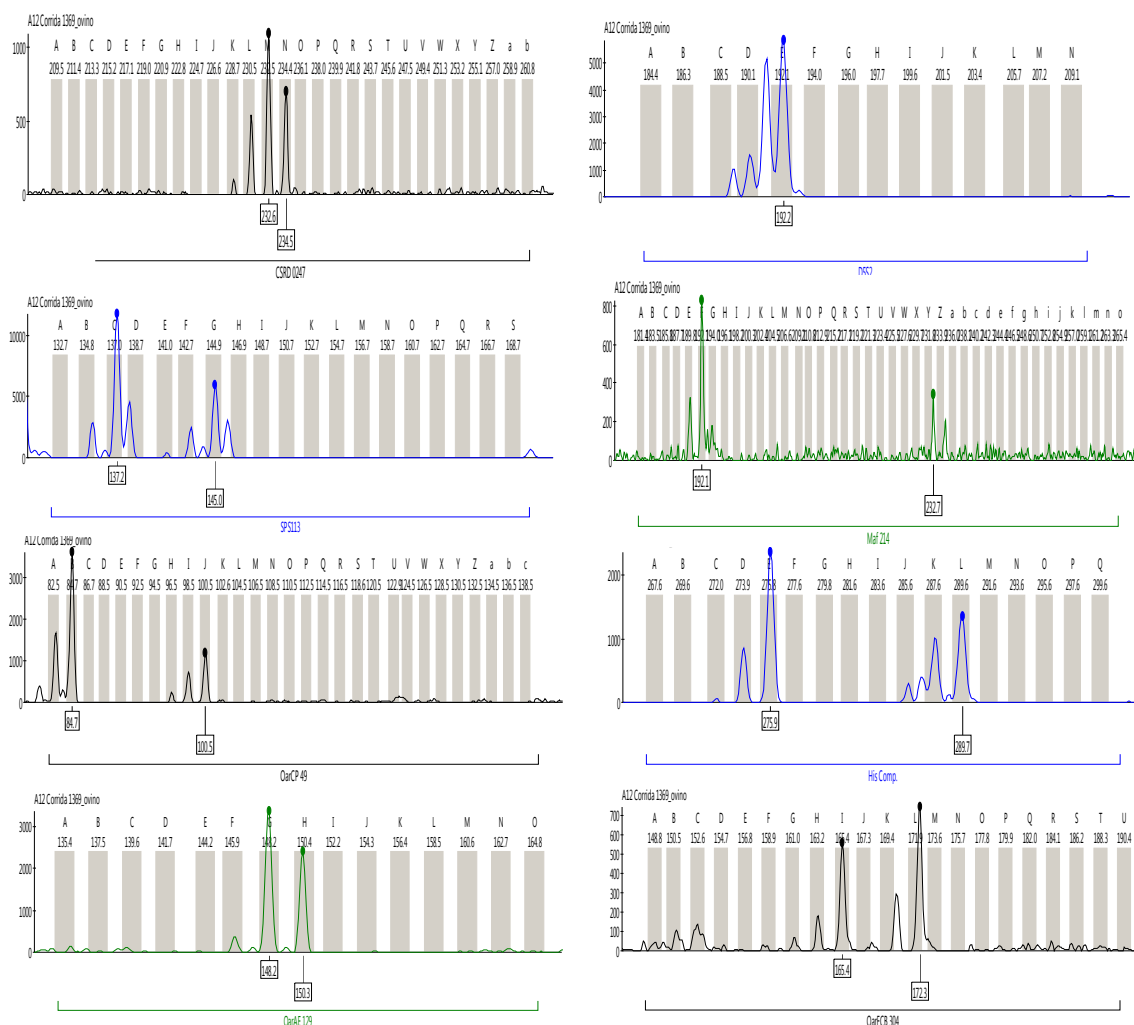


Fig 3 Electroforetograma dos resultados referentes aos oito loci marcadores microssatélites (CSRD0247, D5S2, SPS113, MAF214, OarCP49, HSC, OarAE129, OarFCB304) do animal número 4 gerados no programa Fragment Profiler version 1.2 (GE Healthcare).

A partir dos resultados gerados pelo eletroforeograma foi possível determinar os alelos para cada um desses oito *loci* de cada um dos indivíduos. As discriminações alélicas dos marcadores foram demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2 Resultados referentes à eletroforese capilar da mPCR dos oito *loci* de marcadores microsatélites quanto ao tamanho de alelos em pares de bases por animal

Animal	CRD 247	HSC	MAF 214	OarAE 129	OarFCB 304	OarCP 49	SPS 113	D5S2
1	229-229	280-280	192-209	148-150	165-172	86-94	145-147	190-190
2	230-232	272-278	194-231	148-148	165-178	92-94	147-147	190-193
3	219-229	272-272	194-229	137-150	165-172	85-94	138-138	192-192
4	232-234	276-290	192-233	148-150	165-172	85-100	138-146	192-192
5	232-232	276-280	183-227	148-150	149-172	96-103	138-146	192-194
6	228-228	285-285	192-194	137-144	165-172	85-100	141-141	190-192
7	229-244	272-274	192-227	138-151	165-165	87-104	147-147	192-192
8	230-243	272-276	186-192	148-150	178-188	96-119	138-142	192-194
9	241-243	278-278	192-203	148-148	165-177	86-94	145-147	192-196
10	229-236	276-276	192-229	148-150	161-163	85-85	138-142	190-193

No presente estudo foi possível observar a potencialidade da técnica em realizar a discriminação alélica para indivíduo que possui variação alélica com diferença de dois pares de bases, como exemplo o indivíduo 2, para os *loci* CRD247 e OarCP 49.

O número de alelos por *locus* variou de 5 a 10, com média de alelos de 7.75 entre os marcadores. Para o *locus* MAF 214, onde os valores de PIC foram altos (PIC 86%) foram determinados valores de 0.83 para heterozigosidade esperada e 1.00 de heterozigosidade observada. E, para o *locus* HSC os valores de PIC foram menores (PIC 59%), sendo obtidos valores de 0.83 para heterozigosidade esperada e 0.40 de heterozigosidade observada (Tabela 3).

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 86% para o marcador MAF214 a 59% para o marcador HSC, com média de 75.25% (Tabela 3).

Tabela 3 Número de Alelos por locus (N), Heterosidade esperada (He) e Heterozigosidade observada (Ho) e Conteúdo de informação Polimórfica (PIC) entre os 10 animais para 8 *loci* de microsatélites em ovinos sul-mato-grossenses

<i>Locus</i>	N	He	Ho	PIC (%)
CRD 247	10	0.90	0.70	84
HSC	6	0.83	0.40	59
MAF 214	10	0.86	1.00	86
OArAE 129	6	0.72	0.80	64
OarFCB	9	0.83	0.90	76
OarCP 49	10	0.90	0.90	84
SPS 113	6	0.82	0.60	75
D5S2	5	0.70	0.60	74

O método UPGMA é o mais simples método de construção de árvores filogenéticas. Ele foi desenvolvido para a construção de fenogramas que apresentem as similaridades fenotípicas entre OTUs (Operational Taxonomic Units, ou seja, as unidades taxonômicas que se deseja comparar), mas pode também ser utilizado para construir árvores filogenéticas se as taxas de evolução são

aproximadamente constantes entre diferentes linhagens. O dendrograma obtido a partir dos resultados das análises dos 8 loci marcadores microssatélites em 10 animais, baseado na matriz de distância pelo método de agrupamento UPGMA, indicou coeficiente de similaridade médio de 0.72.

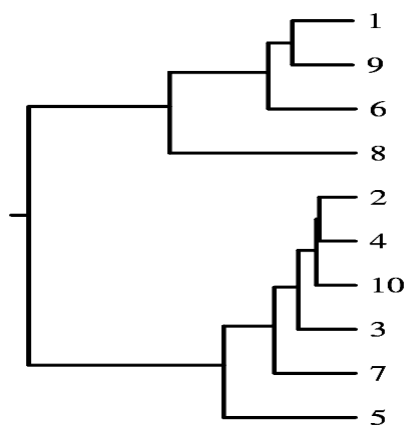


Fig 4 Dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA com base na matriz de similaridade determinada com coeficiente de Pearson para dados referentes aos 10 indivíduos genotipados da população de ovinos sul-mato-grossenses, analisadas para os alelos de 8 locos microssatélites, em função das distâncias genéticas, obtidas pelo coeficiente de Nei (1972).

Discussão

A técnica de eletroforese capilar é recomendada para análises de discriminação alélica de marcadores microssatélites pelo fato de que esta possibilita a visualização de alelos mesmo quando existe pequenas diferenças em pares de bases entre produtos amplificados. Diversos trabalhos obtiveram bons resultados aplicando a técnica de eletroforese capilar para discriminação alélica de microssatélites em ovinos, tais como Kevorkian et

al 2009, Arora & Bhatia 2005, Paiva et al 2011, Almeida 2007 que realizaram estudos de caracterização de variabilidade genética e conseguiram obterem resultados satisfatórios utilizando esta técnica.

Quando os resultados da amplificação são avaliados por meio de eletroforese convencional, agarose ou nitrato de prata em alguns casos, se houver sobreposição de alelos dos marcadores, não é possível realizar testes utilizando mPCR. Como por exemplo, os marcadores OarAE 129 e SPS113 possuem fragmentos com tamanhos aproximados de 137 a 150 pb, portanto há sobreposição de alelos, não sendo possível mPCR e posterior discriminação em eletroforese de gel de agarose ou poliacrilamida. Nesse caso, como a tecnologia de eletroforese capilar utilizou os marcadores com primers forward marcados com fluoróforos (TET e FAM, respectivamente) foi possível a mPCR desses marcadores, possibilitando a leitura de ambos, mesmo possuindo tamanhos similares de produtos amplificados (Beja-Pereira & Almeida 2005, Oliveira et al 2010). Demonstrando uma alta potencialidade no marcador para a realização estudos como variabilidade genética, caracterização de raças, estudo filogenéticos, pois mesmo com um pequeno número amostral utilizando desta tecnologia, foi possível identificar variação genética entre os mesmos para os diferentes marcadores.

Os dados relativos aos alelos identificados pela tecnologia de eletroforese capilar foram testados em programa de análise de diversidade genética, possibilitando observar que, mesmo com o pequeno número amostras testadas, observou-se

que o número de alelos teve uma variação de 5 a 10 alelos, indicando sua propriedade altamente mutialélica, altos valores de heterozigosidade e valores de PIC superiores a 50% para os loci estudados corroborando com resultados obtidos por Menezes et al (2006) e Kervorkian et al (2010), que em estudos com alguns destes marcadores analisados apresentaram resultados satisfatórios para estudo de diversidade genética. Tais valores reforçam a importância de se utilizar marcadores de microssatélites, visto que, estes apresentam alta qualidade de informação que pode ser extraída para estudos diversos, tais como estudos de caracterização e diversidade genética, bem como análises de paternidade.

O dendrograma obtido pelas análises inter-individuais mostraram a formação de dois clados distintos. Segundo Arranz et al (2001), esse tipo de análise é extremamente importante, pois mostra a variabilidade genética dos indivíduos sem impor a formação de grupos artificiais (ex., famílias, grupos, populações). Tais resultados poderão ser utilizados em sistemas de cruzamentos de forma a maximizar a variabilidade genética.

A utilidade e eficiência dessa técnica certamente seriam muito mais observadas se o número de animais fosse maior, onde existem perspectivas de estudos comparativos dos resultados da raça crioula pantaneira com outras raças de ovinos.

Contudo, pode-se concluir que existe viabilidade e eficiência da técnica de marcadores moleculares microssatélites utilizando eletroforese capilar para discriminação alélica e a utilidade dos resultados para estudos de variabilidade genética. É importante considerar ainda que esses resultados

possam servir como ferramenta para estudos de variabilidade, diagnóstico de paternidade, estudos de caracterização desse rebanho de ovinos criolos do Pantanal Sul-mato-grossense.

Conflito de interesse

Declaro que este trabalho não gera conflito de interesse de ordem: pessoal, comercial, acadêmico, político e financeiro.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e a Universidade Federal da Grande Dourados.

Literatura citada

- Almeida PAR. Diversidade genética e diferenciação das raças portuguesas de ovinos com base em marcadores de DNA – microssatélites: uma perspectiva de conservação. Doutorado em Ciência Animal. Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real. 2007; 333pp.
- Arora R, Bhatia S. Genetic diversity of Magra sheep from India using microsatellite analysis. Asian Australas. J. Anim. Sci. (in press). 2005.
- Arranz JJ, Bayón Y, San Primitivo F. Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. Genet Sel Evol. 2001; 33:529-42.
- Beaumont M, Bruford MW. Microsatellites in conservation genetics. In: Goldstein DB, Schlotterer C (eds) Microsatellites. New York

- (NY): Evolution and Applications Oxford University Press. 1999; 165-182.
- Beja-Pereira A, Almeida NF. Genética, Biotecnologia e Agricultura. 1ª ed. Porto (PT): Sociedade Portuguesa de Inovação. 2005; 96pp.
- FAO. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines. Rome. 2011; 9:72-73.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ed. Brasília(BR):Embrapa-Cenargen; 1998; 220pp.
- Gao LL, Anderson JP, Klingler JP, Nair RM, Edwards OR, Singh KB. Involvement of the octadecanoid pathway in bluegreen aphid resistance in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2007; 20:82-93.
- Garcia-Vallvé S, Puigbo P. DendroUPGMA: A dendrogram construction utility. Universitat Rovira i Virgili (URV). Tarragona. Spain. 2009.
- Kashyap VK, Sitalaximi T, Chattopadhyay P, Trivedi R. DNA Profiling Technologies in Forensic Analysis. *Int. J. Hum. Genet*. 2004; 4(1):11-30.
- Kevorkian SEM, Georgescu SE, Manea MA, Zaulet M, Hermenean AO, Costache M. Genetic diversity using microsatellite markers in four Romanian autochthonous sheep breeds. *Rom Biotech Lett*. 2010; 15(1):5059-65.
- Kevorkian SEM, Manea MA, Gavrila MG, Rebedea M, Georgescu SE, Costache M. Sequencing of exon three of α S1-casein sheep and goat gene. *Archiva Zootechnica*. 2009;12(3):87-92.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk L, Pemberton JM. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol*. 1998; 7:639-55.
- Menezes AC, Araujo HFP, Nascimento JLX, Rego ACG, Paiva AA, Serafim RN, et al. Monitoramento da população de *Anodorhynchus leari* (Bonaparte, 1856) (Psittacidae) na natureza. *Ornithologia*. 2006; 1:105-67.
- Nei M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 1972; 949:283-292.
- Oliveira TS, Hoffmann LV, Alves PF, Lucena VS, Filho JLS. Validação de métodos laboratoriais aplicadas a análises com marcadores microssatélites. *Revista Ciência Agronômica*. 2010; 41(2):279-84.
- Paiva SR, Facó O, Faria DA, Lacerda T, Barretto GB, Carneiro PL, Lobo RN, McManus C. Molecular and pedigree analysis applied to conservation of animal genetic resources: the case of Brazilian Somali hair sheep. *Trop. Anim. Health Prod*. 2011; 43:1449-57.
- Pena LS. Frequência Alélica de 14 locos do cromossomo X de indivíduos da região sul do Brasil. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências Médicas – UFGRS. 2010; 94pp.
- Tang WM, To KY. Four X-chromosomal STRs and their allele frequencies in a Chinese population. *Forensic Sci Int*. 2006; 162(1-3):64-5.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre: Artmed. 2002; 931p.