

XVIII

CIC

XI ENPOS  
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:  
por uma ciência do devir



## LOC/MICROSSATÉLITES POTENCIAIS PARA ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM DNA MITOCONDRIAL DE BOVINOS

**COSTA, Marco André Paldês da<sup>1</sup>; MAIA, Luciano Carlos da<sup>2</sup>; ALMEIDA, Diones Bender<sup>3</sup>; OLIVEIRA, Plínio Aguiar de<sup>4</sup>; BASSINI, Liane Ney<sup>5</sup>; COSTA DE OLIVEIRA, Antônio<sup>6</sup>; SIEWERDT, Frank<sup>7</sup>; MOREIRA, Heden Luiz Marques<sup>8</sup>.**

<sup>1</sup>Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil e-mail: [mapc.mv@gmail.com](mailto:mapc.mv@gmail.com); <sup>2</sup>Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil e-mail: [lucianoc.maia@gmail.com](mailto:lucianoc.maia@gmail.com); <sup>3</sup>Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil e-mail: [diones\\_almeida@yahoo.com.br](mailto:diones_almeida@yahoo.com.br); <sup>4</sup>Aluno de graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil e-mail: [plinio.lega@gmail.com](mailto:plinio.lega@gmail.com); <sup>5</sup>Aluna de graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil e-mail: [lianebassini@gmail.com](mailto:lianebassini@gmail.com); <sup>6</sup>Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil e-mail: [acosta@ufpel.edu.br](mailto:acosta@ufpel.edu.br); <sup>7</sup>Professor assistente do Animal Sciences Center, University of Maryland, College Park, EUA e-mail: [siewerdt@umd.edu](mailto:siewerdt@umd.edu); <sup>8</sup>Professor adjunto do Departamento de Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil e-mail: [heden.luiz@gmail.com](mailto:heden.luiz@gmail.com).

### 1. INTRODUÇÃO

Genes em DNA mitocondrial apresentam padrão de herança uniparental, em geral de origem materna. Mutações em seus cromossomos podem ser propagadas por deriva genética aleatória e segregação citoplasmática, causando alterações em fenótipos (Griffiths et al., 2008). Diferentes argumentos embasam sua contribuição sobre a variação fenotípica, dentre eles: função central no metabolismo energético, múltiplas cópias por células, pode codificar até 10% dos produtos gênicos expressados na mitocôndria, e maior taxa de mutação que o DNA nuclear (revisado por Gibson, Freeman & Boettcher, 1997).

Comumente, estudos sobre variações em DNA mitocondrial utilizam longas sequências que englobam a região de deslocamento da alça de replicação (D-loop), e os promotores de transcrição para cada fita (PL e PH1), ambos encontrados na região controle (Mannen et al., 1998; Mannen et al., 2003; Mannen et al., 2004). Até o momento, não estão disponíveis pesquisas empregando repetições microssatélites nessa mesma fonte de informação genética.

Marcadores microssatélites, também chamados SSR (*Simple sequence Repeat*) ou STR (*Short Tandem Repeat*), são reconhecidos pelo alto polimorfismo, especificidade (Tautz, 1993), suscetíveis a amplificação por PCR *multiplex*, e permitirem a genotipagem em gel de fluorescência semi-automatizado (Jakabová et al., 2002).

A relação entre a variação no DNA mitocondrial e características de produção e reprodução é largamente discutida (Gibson, Freeman & Boettcher, 1997; Mannen et al., 1998; Mannen et al., 2003; Mannen et al., 2004; Ribeiro et al., 2009).

O objetivo deste estudo foi identificar *loci* microssatélites passíveis de utilização em estudos de diversidade genética entre diferentes populações bovinas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A fim de permitir a identificação *in silico* de *loci* polimórficos, as sequências completas do DNA mitocondrial de duas subespécies do gênero *Bos* (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) e suas respectivas notações foram obtidas no *website* do *National Center for Biotechnology Information/NCBI* (Nº Acesso: NC\_006853 e AY126697, respectivamente), em agosto de 2009.

Os trechos repetitivos foram caracterizados pelo aplicativo SSRLocator (Maia et al., 2008), configurado para localizar sequências com ao menos 12 nucleotídeos (nt) de comprimento (monômeros com 12 repetições, dímeros com 6 repetições, trímeros com 4 repetições, tetrâmeros com 3 repetições, pentâmero com 3 repetições, e hexâmeros com 2 repetições). Fragmentos interrompidos por até 5 bases foram tratados como SSRs imperfeitos, e acima deste limiar como *loci* distintos (SSRs compostos). Já aqueles distantes acima 100nt são referenciados como SSRs perfeitos (Varshney et al., 2002). Os resultados foram exportados para arquivos em formato texto simples ASCII (.txt) e planilhas (.xls) para posterior comparação e interpretação.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os *loci* microssatélites identificados, com suas respectivas posições e notações no DNA mitocondrial de ambas as subespécies.

**Tabela 1** – Descrição de *loci* microssatélite (≥12nt) identificados no DNA mitocondrial de duas subespécies bovinas (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*).

Identid.	Motivo	Início	Fim	Notação	Identid.	Motivo	Início	Fim	Notação
Bta_mt01	(C)12	352	363	D-loop	Bin_mt01	(C)14	353	366	D-loop
Bta_mt02	(AAAATA)2	783	794	s-rRNA	Bin_mt02	(AAAATA)2	787	798	s-rRNA
Bta_mt03	(TAAGTC)2	2130	2141	l-rRNA	Bin_mt03	(TAAGTC)2	2133	2144	l-rRNA
Bta_mt04	(AAACTT)2	3054	3065	tRNA-Leu	Bin_mt04	(AAACTT)2	3057	3068	tRNA-Leu
Bta_mt05	(ATAAAA)2	5196	5207	ND2	Bin_mt06	(ATAAAA)2	5199	5210	ND2
Bta_mt06	(CCTC)3	5998	6009	COX1					
Bta_mt07	(TAC)4	6264	6275	COX1	Bin_mt07	(TAC)4	6267	6278	COX1
Bta_mt08	(ATTAAT)2	8496	8507	ATP8					
Bta_mt09	(TTATAC)2	10554	10565	ND4	Bin_mt08	(TTATAC)2	10557	10568	ND4
Bta_mt10	(CTAATA)2	10751	10762	ND4	Bin_mt09	(CTAATA)2	10754	10765	ND4
Bta_mt11	(CAAAC)2	11517	11528	ND4	Bin_mt10	(CAAAC)2	11520	11531	ND4
Bta_mt12	(CTCACT)2	12123	12134	ND5	Bin_mt11	(CTCACT)2	12126	12137	ND5
Bta_mt13	(ACTGAC)2	12302	12313	ND5	Bin_mt12	(ACTGAC)2	12305	12316	ND5
Bta_mt14	(TAACCC)2	14342	14353	ND6	Bin_mt13	(TAACCC)2	14345	14356	ND6
Bta_mt15	(CTAGCC)2	15387	15398	CYTB	Bin_mt14	(CTAGCC)2	15390	15401	CYTB
					Bin_mt05	(CCACTA)2	4936	4947	ND2

*Bta*: referência ao *Bos taurus taurus*; *Bin*: referência ao *Bos taurus indicus*; *mt*: referência ao DNA mitocondrial; D-loop: região da alça de deslocamento de replicação; s-rRNA: RNA ribossomal pequeno; l-rRNA: RNA ribossomal grande; tRNA-Leu: RNA transportador para leucina; ND2: NADH desidrogenase subunidade 2; ND4: NADH desidrogenase subunidade 4; ND5: NADH desidrogenase subunidade 5; ND6: NADH desidrogenase subunidade 6; COX1: citocromo c oxidase subunidade 1; ATP8: ATP sintase F0 subunidade 8; CYTB: citocromo B.

Um total de 15 *loci* microssatélites perfeitos foram identificados na subespécie *Bos taurus taurus*. Dois deste não foram encontrados dentre os 14 *loci* identificados em *Bos taurus indicus*, sendo um *locus* deste último grupo não localizado em taurinos. Somente um *loci*, (C)<sub>n</sub>, não apresentou o mesmo número de repetições em ambas as subespécies. Ao conferir a sequência de nucleotídeos dos *loci* não compartilhados, entre os grupos taurino e indiano, observou-se que os mesmos não haviam sido identificados devido a mutações em repetições flanqueantes que os descaracterizavam, como uma substituição de timina por citosina em *Bin\_mt05* (4037nt), e duas substituições de citosina por timina, uma em *Bta\_mt06* (6001nt) e outra em *Bta\_mt08* (8506nt). Considerando que o DNA mitocondrial não apresenta regiões intermediárias (*introns*), e que todas mutações identificadas estão em regiões expressas (*exons*), as quais são transcritas e codificadas, alterações em proteínas traduzidas podem ser esperadas (*a posteriori*).

Quanto a posição relativa a notação no DNA mitocondrial, todos os *loci* compartilhados estavam situados nos mesmos genes, embora existam diferenças quanto a referencia inicial e final.

A identificação prévia de variação em sequências de nucleotídeos, através de uma abordagem *in silico*, permite que diferenças entre trechos de DNA anotados em bancos de dados disponíveis sejam identificadas antes da aferição em populações sob estudo. Ao comparar sequências oriundas de grupos relacionados na evolução (por espécie, gênero, entre outros) maximizam-se as chances de encontrar marcadores informativos.

Diferentes trabalhos indicaram associações entre variações no DNA mitocondrial e características de qualidade de carcaça (Mannen et al., 1998; Mannen et al., 2003), reprodutivas (Ribeiro et al., 2009), e origem mitocondrial (Mannen et al., 2004; Ribeiro et al., 2009). Contudo, não são encontradas pesquisas utilizando marcadores microssatélites em DNA mitocondrial.

A capacidade de automação dos processos de genotipagem em seqüenciador automático (Jakabová et al., 2002), aliada a sua confiabilidade (Jamieson & Taylor, 1997; Delmotte, Leterme & Simon, 2001), possibilitariam a utilização de *loci* microssatélites em estudos de diversidade em DNA mitocondrial, agilizando resultados e possibilitando maior número de representantes genotipados.

#### 4. CONCLUSÕES

Através da abordagem *in silico*, *loci* microssatélites passíveis de utilização em estudos de variabilidade e diversidade genética de populações bovinas foram identificados. A observação prévia de polimorfismos entre duas subespécies do gênero *Bos* proporciona maiores expectativas de resultados reais em estudos posteriores.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Aos programas de Pós-Graduação em Zootecnia, Agronomia e Biotecnologia, todos da Universidade Federal de Pelotas, pelo apoio estrutural para execução deste trabalho. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de auxílio e financiamentos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DELMOTTE, F.; LETERME, N.; SIMON, J. C. Microsatellite allele sizing: difference between automated capillary electrophoresis and manual technique. **Biotechniques**, v.31, n.4, p.810, 814-6, 818, 2001.
- GIBSON, J. B.; FREEMAN, A. E.; BOETTCHER, P. J. Cytoplasmic and mitochondrial inheritance of economic traits in cattle. **Livestock Production Science**, v.47, n.1, p.115-124, 1997.
- GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. **Introduction to genetics analysis**. 9.ed. New York and Basingstoke: W.H. Freeman and Co., 2008. 712p.
- JAKABOVÁ, D.; TRANDZÍK, J.; CHRASTINA, J.; HUDECOVÁ, Ľ.; ZETOCHOVÁ, E.; BULLA, J.; BUGARSKÝ, A.; JAKAB, F.; KOZLÍK, P. Effectiveness of six highly polymorphic microsatellite markers in resolving paternity cases in Thoroughbred horses in Slovakia. **Czech Journal of Animal Science**, v.47, n.12, p.497-501, 2002.
- JAMIESON, A.; TAYLOR, S. C. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. **Animal Genetics**, v.28, n.6, p.397-400, 1997.
- MAIA, L. C.; PALMIERI, D. A.; DE SOUZA, V. Q.; KOPP, M. M.; DE CARVALHO, F. I.; COSTA DE OLIVEIRA, A. SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat Discovery Integrated with Primer Design and PCR Simulation. **International Journal of Plant Genomics**, v.2008, p.412696, 2008.
- MANNEN, H.; KOHNO, M.; NAGATA, Y.; TSUJI, S.; BRADLEY, D. G.; YEO, J. S.; NYAMSAMBA, D.; ZAGDSUREN, Y.; YOKOHAMA, M.; NOMURA, K.; AMANO, T. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.32, n.2, p.539-44, 2004.
- MANNEN, H.; KOJIMA, T.; OYAMA, K.; MUKAI, F.; ISHIDA, T.; TSUJI, S. Effect of mitochondrial DNA variation on carcass traits of Japanese Black cattle. **Journal of Animal Science**, v.76, n.1, p.36-41, 1998.
- MANNEN, H.; MORIMOTO, M. L.; OYAMAT, K.; MUKAI, F.; TSUJI, S. Identification of mitochondrial DNA substitutions related to meat quality in Japanese Black cattle. **Journal of Animal Science**, v.81, n.1, p.68-73, 2003.
- RIBEIRO, S. H. A.; PEREIRA, J. C. C.; VERNEQUE, R. S.; SILVA, M. A.; BERGAMANN, J. A. G.; LEDIC, I. L.; MORAIS, O. R. Efeitos da origem e da linhagem do DNA mitocondrial sobre características produtivas e reprodutivas de bovinos leiteiros da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.232-242, 2009.
- TAUTZ, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. **EXS**, v.67, p.21-8, 1993.
- VARSHNEY, R. K.; THIEL, T.; STEIN, N.; LANGRIDGE, P.; GRANER, A. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v.7, n.2A, p.537-46, 2002.