

ANÁLISIS PRELIMINARES DEL CROMOSOMA "Y" EN RAZAS DE OVEJAS EXPLOTADAS EN BRASIL

PRELIMINARY ANALYSES OF THE Y-CHROMOSOME IN SHEEP BREEDS EXPLOITED IN BRAZIL

Lara M.A.C.^{1*}, Gutmanis G.¹, Cavalcante-Neto A.¹, Bueno M.S.¹, Landi V.², Delgado J.V.²

¹Grupo de Investigación en Genética y Ciencias Animales. Instituto de Zootecnia. APTA/ Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Nova Odessa, São Paulo, Brasil. *malara@iz.sp.gov.br

²Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria - Universidad de Córdoba. España.

Keywords: Genetic characterization; Molecular marker; SNP *oYI*; SRYM18.

Palabras clave: Caracterización genética; Marcador molecular; SNP *oYI*; SRYM18.

Abstract

The chromosome *Y* is a promising tool for studies of phylogeny, characterization and genetic relationship. We studied the SNP *oYI*, located in the SRY gene, and microsatellite SRYM18, aiming at the identification of paternal lineages of sheep herds in Sao Paulo, Brazil. There were investigated 45 sheep from Instituto de Zootecnia (IZ) (Ile de France, Morada Nova, Poll Dorset, Santa Inês and Suffolk breed), and 15 lambs from private properties (Dorper, Santa Inês and Texel breed). The SNP *oYI* was investigated by PCR/RFLP technique and the SRYM18 was genotyped by the ABI3130, using the GeneMapper. From the seven haplotypes described for *Ovis aries*, four have been identified, as well as a new one, characterized as allele G (SNP *oYI*) and 141 (SRYM18). This haplotype was observed in nine lambs of IZ (1 Ile de France, 6 Poll Dorset and 2 Suffolk). The haplotypes H3 (A/139) and H5 (G/145) were observed only in the Suffolk and Texel flocks, and the H6 (A/143) in the herds Dorper and Morada Nova flocks. The H8 occurred in all herds, although it was fixed in Santa Inês. On the other hand, the frequency of this haplotype ranged between 14% (Poll Dorset and Texel) and 75% (Ile de France and Morada Nova) and in Suffolk, the frequency was 50%. The results showed that the Santa Inês flock descends from a single lineage. Other herds and increased sampling will be investigated later, once this work is part of a broader BIOVIS project of the Red CONBIAND.

Resumen

El cromosoma *Y* por ser exclusivamente herencia paterna, es una herramienta prometedora principalmente en estudios de filogenia, caracterización y relación genética. Se estudiaron el SNP *oYI*, situado en la región promotora del gen SRY y el microsatélite SRYM18, con el objetivo de la identificación de linajes paternos en rebaños de razas de ovejas explotables en São Paulo, Brasil. Se investigaron 45 corderos de los rebaños del Instituto Zootecnia (IZ) y 15 corderos de propiedades privadas. Las muestras del IZ, recogidos entre 1999 y el 2014, eran de la raza Ile de France (N = 4), Morada Nova (N = 4), Poll Dorset (N = 7), Santa Inês (N = 20) y Suffolk (N = 10) y de los particulares, Dorper (N = 3), Santa Inês (N = 5) y Texel (N = 7). El SNP *oYI* (AY 604734.2) fue investigado por la técnica de PCR/RFLP. El SRYM18 (DQ272456) fue genotipado en el ABI3130, utilizando el *GeneMapper*. De los siete haplotipos descritos para *Ovis aries*, cuatro han sido identificados, así como uno nuevo, caracterizado por los alelos G (SNP *oYI*) y 141 (SRYM18). Este haplotipo se observó en nueve corderos del IZ (1 Ile de France, 6 Poll Dorset y 2 Suffolk). Los haplotipos H3 (A/139) y H5 (G/145) fueron observados solamente en rebaños Suffolk y Texel y el H6 (A/143), en rebaños Dorper y Morada Nova. Por el contrario, el H8 ocurrió en todos los rebaños, aunque estaba fijado en Santa Inês. En el otro, la frecuencia de este haplotipo osciló entre el 14% (Poll Dorset y Texel) y el 75% (Ile de France y Morada Nova) y, en Suffolk, la frecuencia fue 50%. Los resultados obtenidos muestran que el rebaño Santa Inês analizado descende de un único linaje. Teniendo en cuenta los informes de la literatura sobre la variabilidad de esta raza, se pretende aumentar la toma de muestras en otros rebaños. Además, la variabilidad observada en los rebaños restantes será investigada en nuevos estudios, teniendo en cuenta que este trabajo forma parte de un proyecto más amplio, que es una iniciativa coordinada con el consorcio BIOVIS de la Red CONBIAND.

Introducción

El cromosoma *Y*, por ser exclusivamente herencia paternal, es una herramienta prometedora principalmente en estudios de filogenia, caracterización y relación genética entre poblaciones. Según la Asociación Brasileña de Criadores de Ovejas (ARCO), ha crecido la importación de ovejas mejoradas de razas comerciales, tales como: Dorper, Suffolk y Texel. Esta práctica ha contribuido para incrementar la variabilidad de los rebaños, que tuvieron alto grado de consanguinidad debido a la normalización de los patrones raciales y la fijación de ciertas características de mayor aceptación comercial. El objetivo del trabajo fue la identificación de linajes paternos en rebaños de razas de ovejas comerciales y nativas explotables en São Paulo, Brasil.

Material y métodos

Se investigaron un total de 60 animales no aparentados, siendo 45 corderos de los rebaños del Instituto Zootecnia, (IZ) y 15 corderos de propiedades privadas. Las muestras de los rebaños IZ, recogidos entre 1999 y el 2014, eran de la raza Ile de France (N = 4), Morada Nova (N = 4), Poll Dorset (N = 7), Santa Inês (N = 20) y Suffolk (N = 10) y de los particulares, Dorper (N = 3), Santa Inês (N = 5) y Texel (N = 7). O SNP *oY1* (AY604734.2: nt67: A>G) posicionado en la region 5' del promotor del gen ovino *sex determining region Y* (SRY) publicado y testado por Meadows et al. (2006), fue investigado por la técnica de PCR/RFLP. Un fragmento de 354pb que contiene este SNP fue amplificado con el empleo de los iniciadores, diseñados para el estudio (5'gttcttattctccagtccttc3' y 5'ggtagacaacaggccacatac3'). La PCR fue realizada en 25µL de volumen total conteniendo 100 ng de ADN genómico, 0,20 µM de cada iniciador, 1xPCR *buffer*, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP y 1 U *Taq*polimerase. Se utilizaron las siguientes condiciones para la amplificación: 95°C/5'seguido de 35 ciclos a 94°C/1', 57,8°C/30" y 72°C/1'y una extensión a 72°C/10'. Una alícuota de 7µl del ADN amplificado fue digerida con 5U de la enzima *DdeI*. El RFLP fue analizado en gel de poliacrilamida 12% mediante la tinción con sales de plata (Sanguinetti et al., 1994). El Microsatellite *SRYM18* fue analizado en el ABI3130 GeneticAnalyser (AppliedBioystem, USA). La PCR fue realizada en un volumen de 10 µl de volumen total conteniendo 25ng ADN, 1xPCR *buffer*, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 0,15 de cada iniciador (5'VIC-ggcatcacaacaggatcagcaat 3' y 5'gtgatggcagttctcacaatctct3') y 1U *Taq*polimerase. Para la PCR se utilizaron las mismas condiciones de amplificación descritas anteriormente. Los genótipos fueron observados utilizando el *GeneScan* 400HD y *GeneMapper*. Los haplotipos fueron establecidos según metodología de Meadows & Kijas (2009).

Resultados y discusión

La metodología utilizada para el análisis del SNP *oY1* permitió la identificación de dos alelos. El alelo A se caracterizó por la presencia del fragmento de 84pb y el alelo G, por el fragmento de 76pb. La variabilidad revelada por los dos marcadores en los rebaños investigados, puede verse en la tabla I.

Tabla I. Frecuencia alélica para el SNP *oY1* y SRYM18 en nueve razas de ovejas (*Allele frequency for Oyl SRYM18 SPN's in nine breeds of sheep*).

Rebaños	SNP <i>oY1</i>			SRYM18 (pb)		
	A	G	139	141	143	145
Dorper	1	0	0	0.33	0.67	0
Ile de France	0.75	0.25	0	1	0	0
Morada Nova	1	0	0	0.75	0.25	0
Poll Dorset	0.14	0.86	0	1	0	0
Santa Inês	1	0	0	1	0	0
Suffolk	0.7	0.3	0.2	0.7	0	0.1
Texel	0.29	0.71	0.14	0.14	0	0.72

No se observó SNP *oY1* (nt67: A>G) en corderos de la raza Dorper, Morada Nova y Santa Inês. En los otros, el alelo G fue más frecuente en rebaños Poll Dorset y Texel y, el alelo A, en Ile de France y Suffolk. De los siete haplotipos descritos para la especie domesticada *Ovis aries* (Meadows et al., 2006); cuatro han sido identificados, así como uno nuevo, caracterizado por los alelos G (SNP *oY1*) y 141 (SRYM18). Este haplotipo se observó en nueve corderos del IZ (1 Ile de France, 6 Poll Dorset y 2 Suffolk). Los haplotipos H3 (A/139) y

H5 (G/145) fueron observados solamente en rebaños Suffolk y Texel y el H6 (A/143) en rebaños Dorper y Morada Nova. Por el contrario, el H8 ocurrió en todos los rebaños, aunque estaba fijado en Santa Inês. En los otros, la frecuencia de este haplotipo osciló entre el 14% (Poll Dorset y Texel) y el 75% (Ile de France y Morada Nova) y, en Suffolk, la frecuencia fue 50%. Los resultados obtenidos muestran que el rebaño Santa Inês investigado desciende de un único linaje. Teniendo en cuenta los informes de la literatura sobre la variabilidad de esta raza (Paiva & Pimentel, 2009), se pretende aumentar la toma de muestras en otros rebaños. Además, la variabilidad observada en los rebaños restantes será analizada más adelante, considerando que este trabajo forma parte de un proyecto más amplio, que es una iniciativa coordinada con el consorcio BIOVIS de la Red CONBIAND.

Conclusiones

Los marcadores utilizados pueden ayudarnos en la identificación de los linajes paternos existentes en los rebaños comerciales, optimizando la selección de los animales para la cruces.

Considerando que la raza Dorper fue desarrollada en Sudáfrica y la Morada Nova, en Brasil durante el período colonial, por cruzamiento entre las ovejas portuguesas y africanas, los resultados observados son acordes a la historia de estas razas, lo que sugiere el haplotipo H6 como marcador de linaje africano.

Financiación

FAPESP – 2013/10973-6.

Bibliografía

- Meadows, J.R.S., Hanotte, C., Drogemuller, J. et al. (2006). Globally dispersed Y chromosomal haplotypes in wild domestic sheep. *Animal Genetics* 37(5): 444-453.
- Meadows, J.R.S. & Kijas, J.W. (2009). Haplogroup relationship between domestic and wild sheep reveals novel paternal haplotypes. *Animal Genetics* 40(1): 119-123.
- Paiva, S.R. & Pimentel, C.M. (2009). Uso de marcadores moleculares como ferramentas para conservação e melhoramento da raça Santa Inês. *Anais do Congresso Nordestino de Produção Animal*, 5. (CD-ROM)
- Sanguinetti, C., Dias Neto, E. & Simpson, A.J.G. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17(5): 209-214.