

## O USO DE MARCADORES MOLECULARES DE RAPD COMO POTENCIAL INFORMATIVO PARA A DISTINÇÃO ENTRE JAVALI *Sus scrofa scrofa*, O SUÍNO DOMÉSTICO *Sus scrofa domesticus* E SEUS HÍBRIDOS

Danilo Luciano GIMENEZ

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Concentração : Genética / Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP – Botucatu(SP)

Edmundo José LUCCA

Professor Titular da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça, FAMED –FAEF, UNITERRA, Garça (SP).

### RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar o potencial informativo quando do uso de marcadores moleculares de RAPD, na distinção entre javali, suíno doméstico e seus híbridos. Para tanto, foram analisados 16 javalis e 11 suínos domésticos. Os primers utilizados (em número de 11) geraram 17 bandas, sendo 75 polimórficas. A análise dos dados permitiu a reunião dos 27 animais em três grupos distintos, um dos quais formado pelos 11 suínos domésticos que apresentou homologia com outro grupo formado por javalis da França e do Canadá.

Os dados do presente trabalho permitem concluir que os marcadores moleculares RAPD possuem potencial informativo para distinção entre o javali e o suíno doméstico, abrindo um campo de estudo na diferenciação entre os javalis e os híbridos com o suíno doméstico.

**PALAVRAS CHAVE:** javalis; porcos domésticos; RAPD

### ABSTRACT

The main purpose of the present work was to evaluate the informative potential when RAPD molecular markers are used in the distinction among wild boar, pig and their hybrids. 16 wild boars and 11 pigs were analysed and the primers generates 107 bands, 75 of them were polymorphic. Data analysis make possible the establishment of three distinct groups, one of them with the 11 pigs only.

The data of the present work makes possible to conclude that RAPD molecular markers could be used as informative potential for the distinction between wild boars and pigs, opening a field of study in the differentiation between wild boars and their hybrids with domestic pigs.

**KEY WORDS:** wild boars; pigs; RAPD

### INTRODUÇÃO

Grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu na década de 1990., através da amplificação de fragmentos do DNA realizada com iniciadores de seqüência arbitrária de reduzido número de nucleotídeos (aproximadamente 10) e temperatura de anelamento abaixo do ideal, produzindo uma reação de baixa especificidade. Essas características permitem que o iniciador se anule em diversos locos, gerando múltiplas bandas (WILLIAMS *et al.*, 1990; WELSH E McCLELLAND, 1990). Essa técnica foi patenteada com o nome de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

O polimorfismo genético detectado por marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente. A técnica de RAPD permite gerar uma grande quantidade de polimorfismos de segmentos de DNA distribuídos por todo o genoma do organismo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995) e está sendo utilizada na análise de diferentes espécies de bovinos, suínos, caprinos, cães, camundongos e aves (LEE e CHANG, 1994).

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar o potencial informativo quando do uso de marcadores moleculares de RAPD na distinção entre javali, suíno doméstico e seus híbridos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 27 animais, 16 javalis e 11 suínos domésticos. Dos 16 javalis, 8 foram originários do Canadá e 8 da França. Os suínos domésticos foram originários do setor de suinocultura da fazenda Experimental Lageado, UNESP, campus de Botucatu (SP). Dos 11 suínos domésticos, 4 eram da raça Large White e 7 restantes, resultantes do cruzamento entre Landrace e Large White.

Amostras de 5 ml de sangue total foram colhidas da jugular, homogeneizadas em EDTA e mantidas a 4°C, até o momento da extração do DNA. A mesma foi feita utilizando o kit de extração, específico para sangue, da AMERSHAM PHARMACIA. Regiões aleatórias do DNA foram amplificadas pela técnica de PCR em termociclador M.J. Research, modelo PTC 200.

A reação de ampliação foi dirigida por 11 primers, únicos, em 11 reações independentes. As bandas foram obtidas a partir de primers comerciais, OPG2, OPG12, OPG13, OPG16, OPR4, OPR7, OPR8, OPR9, OPX1, OPX2 e OPX5 da OPERON. Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose de baixo ponto de fusão a 2%, em um sistema de eletroforese horizontal, diferença de potencial de cerca de 5,5 V/cm, por 2 horas. Os fragmentos de DNA amplificados foram corados por meio de brometo de etídio e o DNA foi visualizado por meio da fluorescência do brometo de etídio, quando exposto à luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD foram analisados utilizando o programa TREECON for Windows, pela presença ou ausência de bandas com polimorfismo no gel, por meio de coeficiente de King e o método de agrupamento UPMGA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primers utilizados nas amplificações individuais do DNA genômico dos 27 animais geraram 107 bandas, sendo 75 polimórficas (70,10%) e 32 monomórficas (29,90%). Não foi possível a obtenção de bandas utilizando-se o primer OPX5.

O polimorfismo obtido variou de 33,40 a 83,40%, sendo o primer OPX2 e o primer OPG16 os que geraram menor (33,40%) e maior (83,40%) polimorfismo, respectivamente. O número de banda geradas variou de 4 a 18 por primer, com média de 10,7 bandas.

A análise dos dados permitiu a reunião dos 27 animais em três grupos distintos identificados por G1, G2 e G3, com grande homologia entre os grupos G1 (formado pelos 11 suínos domésticos) e G2 (formado por 4 javalis da França e dois do Canadá). Os suínos do grupo G1, da raça Large White não foram separados daqueles resultantes dos cruzamentos Large White X Landrace. O grupo G3 incluiu 5 javalis do Canadá e 3 da França e se mostrou distinto dos anteriores.

O fato dos 27 animais serem provenientes de 3 regiões completamente diferentes, exclui a possibilidade de intercruzamento entre eles, concluindo-se que a variação observada é exclusivamente devida à variabilidade genética da espécie, revelada pelos marcadores utilizados.

## CONCLUSÃO

Devido ao padrão de bandas individuais geradas, foi possível detectar variabilidade entre os animais analisados, confirmando o potencial da técnica de RAPD em detectar variabilidade intraespecífica, especialmente no gênero *Sus* (CHANG, *et al.*, 1999).

Os marcadores RAPD possuem potencial informativo para distinção entre javali e o suíno doméstico, abrindo um campo de estudo na diferenciação entre os javalis e os híbridos com o suíno doméstico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHANG, Q., ZHOU, K.Y., ZHANG, Z.K., CAO, X. RAPD analysis of genetic diversity and phylogenetic relationship of the Taihu pigs. *Yi Chuan Xue Bao*, v.26, p. 480-8, 1999.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPALIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília : EMPRABACENARGEN, 220P, 1995.
- LEE, J.C., CHANG, J.G. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Sci.Int.*, v.4, p.103-97, 1994.

WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res., v.18, p. 7213-18, 1990.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., v.18, p.6531-e, 1990.