

CONSERVAÇÃO, USO E MELHORAMENTO DE GALINHAS CAIPIRAS



DÉBORA ARAÚJO DE CARVALHO
JOSÉ LINDENBERG ROCHA SARMENTO
MARCOS JACOB DE OLIVEIRA ALMEIDA
(ORGANIZADORES)

Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof. Me. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
C755	<p>Conservação, uso e melhoramento de galinhas caipiras / Organizadores Débora Araújo de Carvalho, José Lindenberg Rocha Sarmento, Marcos Jacob de Oliveira Almeida. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-5706-003-2 DOI 10.22533/at.ed.032202704</p> <p>1. Galinhas – Criação – Brasil. 2. Aves – Genética. I. Carvalho, Débora Araújo de. II. Sarmento, José Lindenberg Rocha. III. Almeida, Marcos Jacob de Oliveira.</p> <p style="text-align: right;">CDD 636.51</p>
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DESENHO E OTIMIZAÇÃO DE *PRIMERS* PARA ESTUDOS A PARTIR DO DNA MITOCONDRIAL DA ESPÉCIE *GALLUS GALLUS*

Data de aceite: 19/03/2020

Darllan Alves Evangelista Lima

Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/4563031138991290>

Artur Oliveira Rocha

Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/8991807731249154>

Débora Araújo de Carvalho

Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/5713516699845140>

José Lindenberg Rocha Sarmiento

Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/1991742176699922>

Marcos Jacob de Oliveira Almeida

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Meio-Norte (Embrapa MN) Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/2068380243699918>

Abigail Araújo de Carvalho

Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/2914794424016683>

Bruna Lima Barbosa

Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/1399649319998684>

Manoel Braz da Silva Júnior

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Maranhão, Campus São João dos
Patos
São João dos Patos, Maranhão
<http://lattes.cnpq.br/0090908144064939>

Maria Histelle Sousa do Nascimento

Universidade Estadual do Maranhão, Campus de
Caxias
Caxias, Maranhão
<http://lattes.cnpq.br/2651507116730705>

Luiz Antonio Silva Figueiredo Filho

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Maranhão, Campus Caxias
Caxias, Maranhão
<http://lattes.cnpq.br/3985156705338283>

RESUMO: Os marcadores moleculares do tipo DNA mitocondrial (mtDNA) vêm sendo utilizados em estudos filogenéticos, proporcionando conhecer a aproximação evolutiva das espécies. A região *D-loop* não codifica produtos gênicos. No entanto, apresenta uma grande quantidade de polimorfismos entre indivíduos, sendo a

região na qual se inicia o processo de duplicação do material genético, possibilitando uma maior suscetibilidade à ocorrência de mutações. Essa região do mtDNA é muito utilizada em estudos filogenéticos. Objetivou-se, com essa pesquisa, desenvolver *primers* a partir do genoma mitocondrial na região *D-loop* da espécie *Gallus gallus* e otimização dos mesmos, com intuito de disponibilizar essa ferramenta para acesso ao público científico e, assim, poder utilizar esse marcador com qualquer raça dentro da espécie.

PALAVRAS-CHAVE: *D-Loop*, Galinhas caipiras, Marcadores Moleculares, mtDNA.

PRIMER DESIGN AND OPTIMIZATION FOR STUDIES FROM THE MITOCHONDRIAL DNA OF THE *GALLUS GALLUS* SPECIES

ABSTRACT: Molecular markers of the type mitochondrial DNA (mtDNA) have been used in phylogenetic studies providing knowledge of the evolutionary proximity of species. The *D-loop* region does not encode gene products, however it presents a large amount of polymorphisms between individuals, being the region where the process of duplication of genetic material begins, providing a greater susceptibility to the occurrence of mutations. This region of mtDNA is widely used in phylogenetic studies. The objective of this research was to develop *primers* from the mitochondrial genome in the *D-loop* region of the *Gallus gallus* species and their optimization, in order to make this tool available to the scientific public and thus be able to use this marker with any breed within the species.

KEYWORDS: *D-Loop*, Free-range chickens, Molecular Markers, mtDNA.

1 | INTRODUÇÃO

A avicultura tradicional sempre existiu no Brasil, voltada à produção de ovos e carne para a subsistência. Como consequência da Segunda Guerra Mundial, houve a escassez de alimentos. Nesse período, deu-se início à avicultura industrial, na qual as aves passaram a ser criadas em galpões em grandes quantidades, com a finalidade de produção de carne e ovos. Em virtude dessa demanda, foram desenvolvidas tecnologias que contribuíram para o aumento da produção, da redução da conversão alimentar, da mortalidade e da diminuição da idade de abate. (DAMBRÓS JUNIOR, 2010; FONTEQUE et al. 2014; CARVALHO et al., 2018).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novas tecnologias na área da genética e biologia molecular foi primordial para o desenvolvimento de tecnologias do DNA recombinante, da reação em cadeia de polimerase (PCR) e do sequenciamento do DNA. Essas novas tecnologias foram úteis para a elaboração de marcadores utilizados nos estudos de recursos genéticos, cujo objetivo é facilitar a identificação e caracterização dos mesmos. Ainda há uma grande quantidade de questionamentos

sobre o uso adequado dessas tecnologias, principalmente na utilização de metodologias para a obtenção desses marcadores genéticos quanto às suas análises (FALEIRO,2007).

Os marcadores moleculares do tipo DNA mitocondrial (mtDNA) vêm sendo utilizados em estudos filogenéticos, proporcionando conhecer a aproximação evolutiva das espécies. A análise de marcadores mitocondriais é considerada ferramenta útil para a determinação da variabilidade genética. O estudo do DNA mitocondrial destaca-se como instrumento para a investigação molecular da variabilidade não nuclear, das variações genéticas dentro e entre espécies e das relações evolutivas, buscando o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos (NIU et al., 2002).

O mtDNA é um dos marcadores mais utilizados nos animais e tem sido usado amplamente por mais de três décadas. É altamente variável em populações naturais, é de fácil amplificação porque aparece nos mais variados tipos de células e é ainda mais abundante que o DNA nuclear. Bem conservado em animais, não possui íntrons e possui regiões intergênicas muito curtas. A região controle (*alça-D*) é normalmente flanqueada por regiões altamente conservadas, como as que codificam o rRNA, em que os *primers* utilizados na PCR são facilmente projetados (GALTIER et al., 2009).

Estudos filogenéticos permitem a identificação e entendimento das relações evolutivas entre as espécies, sendo utilizados para identificar características similares e definir relações históricas. A utilização dos métodos de estudos filogenéticos contribui para a formação de árvores filogenéticas nas quais é possível observar o grau de proximidade evolutiva entre as espécies e/ou raças, sendo relevantes em estudos de galinhas de raças nativas.

2 | GALINHAS CAIPIRAS

A origem dessa espécie de aves data de cerca de 150 milhões de anos atrás. A galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) surgiu a partir do processo de domesticação do *Gallus bankiva*, comumente conhecida como galinha vermelha do mato (*Red Jungle Fowl*), originárias do Sudeste da Ásia(CRAWFORD,1990).

As galinhas foram introduzidas no Brasil por Pedro Álvares Cabral quando chegou ao país, e levadas pelos colonizadores para várias regiões, a partir das quais passaram a ser criadas também pelos índios nativos. As galinhas caipiras são caracterizadas por ter alta variabilidade genética, serem rústicas e menos produtivas quando comparadas às galinhas industriais, que são melhoradas geneticamente (ALBINO et al.,2005; CARVALHO et al., 2016).

3 | CARACTERÍSTICAS DOS MARCADORES GENÉTICOS

Os marcadores moleculares têm a função de identificar regiões específicas com o objetivo de estudar, identificar e medir a variação existente entre os indivíduos de uma espécie. São utilizados para marcar alelos que sinalizam uma região de um cromossomo na qual serão localizados genes de interesse de difícil identificação (RAMALHO et al.,2008).

Os marcadores devem possuir boas características para maximizar sua utilidade. Dentre elas, as principais são ter alto grau de polimorfismo e uma boa distribuição ao longo do genoma. Para analisar o marcador, deve-se utilizar técnicas rápidas, práticas e reproduzíveis em outros laboratórios de forma confiável (MÉNDEZ et al.,2005). A técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) é a mais utilizada para identificar regiões de interesse do DNA. Esse método consiste na síntese *in vitro* de regiões específicas do DNA, simulando a replicação.

4 | DNA MITOCONDRIAL

O DNA mitocondrial é uma molécula de DNA extra cromossomal haploide, de herdabilidade uniparental materna. Constitui-se de uma dupla cadeia circular, que é dividida em cadeia pesada (H) e cadeia leve (L). Apresenta aproximadamente 16.569 pb (pares de base), sendo que somente 10% de sua totalidade é não codificante. A região codificante do mtDNA apresenta 37 genes, os quais correspondem a 13 polipeptídios, 2 moléculas de RNA ribossomal (rRNA) e 22 tipos de RNA transportador (tRNA). Já sua região não codificante corresponde à região denominada região controle ou *D-Loop*, a qual apresenta aproximadamente 1.122 pares de bases. Esta última é dividida em regiões hipervariáveis e é a responsável pela regulação da replicação e transcrição de todo o mtDNA (BLUTER,2010).

A região *D-loop* não codifica produtos gênicos e apresenta uma grande quantidade de polimorfismos entre indivíduos, sendo a região em que se inicia o processo de duplicação do material genético, proporcionando uma maior suscetibilidade à ocorrência de mutações. Essa variabilidade decorre da pobre atividade reparadora da polimerase do DNA mitocondrial, da ausência de histonas e da falta do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos, fatores que levam este genoma a apresentar uma taxa de mutação de 5 a 10 vezes maior que o DNA nuclear (YAKES; VAN OUTEN, 1997).

Objetivou-se, com essa pesquisa, desenvolver *primers* a partir do genoma mitocondrial na região *D-loop* da espécie *Gallus gallus*, otimizar os mesmos, com intuito de disponibilizar essa ferramenta para acesso ao público científico e, assim, poder utilizar esse marcador com qualquer raça dentro da espécie.

5 | MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostragem e coleta do material biológico

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no laboratório de Genética Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Piauí - UFPI. O projeto de pesquisa foi cadastrado no comitê de ética da (UFPI) sob o N° 399/17. Em seguida, foi realizada a coleta do material biológico (sangue) em um criatório de galinhas caipiras, no município de Teresina/PI. Foi coletado sangue da veia ulnar de 20 aves, sendo 10 galinhas Canela-Preta e 10 galinhas da linhagem comercial Pesadão.

Para a extração do DNA foi utilizado o Kit DNEASY Blood and Tissue da QIAGEN®. O procedimento para extração de DNA foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

A avaliação da qualidade da extração do DNA foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1%. A solução formada foi aquecida em forno micro-ondas até iniciar a ebulição (aproximadamente 1 minuto, em potência média, para gel de 60 ml). O frasco foi agitado e retornou ao forno micro-ondas por 30 segundos – ou até que os cristais de agarose dissolvessem totalmente. Após a solidificação da solução no suporte da cuba para o gel, o mesmo foi colocado na cuba de eletroforese e coberto com tampão tris-borato-EDTA 0,5X.

Em uma superfície plana coberta com parafilme, foi pipetada 10ul de DNA com 5ul de tampão de corrida. A voltagem da fonte foi ajustada para 110 volts por 30 minutos. Após a corrida, as bandas foram visualizadas em sistema de foto documentação.

5.2 Desenho dos *primers*

para amplificação das sequências, foi desenhado um par de *primer* a partir da posição nucleotídica 16,750 a 506 pb, localizada na região controladora *D-loop* do mtDNA, envolvendo uma parte hipervariável dessa região (Número de acesso no Genbank: NC007236.1; NISHIBORI et al., 2005). A escolha por essa região do mtDNA se deu com base em sua utilização em diferentes trabalhos envolvendo algumas raças de galinhas, o que permitiria a imediata comparação das sequências geradas neste trabalho.

Para desenho dos *primers* foi acessado o site *GenBank*, no qual se copiou o genoma mitocondrial da espécie *Gallus gallus*. Utilizando o software Gene Runner 5.1, selecionou-se a opção “*New DNA Sequence*” na aba de ferramenta e colou-se o genoma. Depois, foi selecionada a opção “*Analysis*”, seguida da opção “*Oligo*”. Nessa última inseriu-se os dados da região de interesse de estudo, alterando as

temperaturas e as porcentagens das bases. Com um *enter*, os *primers* desenhados sugeridos pelo programa apareceram. Foram sugeridos três pares de *primers*. Cada um deles gerou um fragmento de 522pb. Em seguida as sequencias geradas foram enviadas a laboratório especializado para sintetização.

5.3 Otimização dos *primers*

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi empregada para o procedimento de amplificação dos fragmentos. As reações de PCR seguiram o seguinte perfil: em um volume final de 16 µL, cada reação continha 30 ng de DNA; 1,0µL de tampão 10X (100 mMTrisHCl, pH 8,3, 500 mMKCl); 2,0 a 3,5µL (50 mM) de MgCl₂; 2 µL da mistura de dNTP (0,2 mMdedATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,6µM de cada iniciador; 1,0 unidade de Taq DNA polimerase; e água ultrapura para completar o volume das reações.

A PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos para desnaturação, 45 segundos com temperatura variando de 55 a 62°C para hibridização, 50 segundos a 72°C para extensão. Ao final,foi efetivada uma etapa de extensão de 7 minutos a 72°C. A amplificação dos fragmentos de DNA foi confirmada pela corrida em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídio, com posterior visualização em transluminador UV.

6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o auxílio do software Gene Runner5.1, foram desenhado três *primers* através do genoma da espécie *Gallus gallus* mitocondrial, com suas sequências *forward* e *reverse*, como se observa na Tabela 1.

Primer	Sequências
DVMT-F	TGTTGTTCTCAACTACGGG
DVMT-R	GAGGTATGCATGGGATGT
DEBMT-F	GCCATTGTTGTTCTCAACTACG
DEBMT-R	TACGGTGGAAGGCAAGTAGG
DEBMT2-F	CCATTGTTGTTCTCAACTACGG
DEBMT2-R	TACGGTGGAAGGCAAGTAGG

Tabela 1-Sequências de oligonucleotídeos (*primers*) desenhados

-F = *primer forward*; -R = *primer reverse*

Vários testes foram realizados para alcançar a otimização dos *primers*, utilizando inicialmente um protocolo padrão já usado na rotina do laboratório. Testes com variações nas temperaturas de anelamento de 55° a 62°C e variações

na concentração de $MgCl_2$ de 2,0 μ L a 3,5 μ L foram realizados nos três *primers*. Cada par de *primer* teve resultados específicos, como demonstrado na Tabela 2.

PRIMER	Galinha Canela- Preta		Galinha Pesadão	
	Ta (°C)	MgCl ₂ (μ L)	Ta (°C)	MgCl ₂ (μ L)
DVMT	61	3,0	61	3,0
DEBMT	60	2,5	61	3,0
DEBMT2	61	3,0	60	2,5

Tabela 2 – Concentrações de $MgCl_2$ e temperaturas de anelamento ideais para otimização da PCR para cada par de *primer*.

Ta (°C) = temperatura de anelamento do *primer*; $MgCl_2$ (μ L)= Cloreto de magnésio em microlitros.

As variações nas concentrações de $MgCl_2$ podem influenciar o resultado da PCR, pois ela afeta a eficiência da amplificação pela ação conjunta com a *Taq* polimerase. Esses índices podem dificultar, ainda, a visualização da intensidade dos fragmentos que aparecem no gel de agarose. As temperaturas de otimização variaram entre os *primers* e entre as raças. Essa variação pode ser justificada pelo fato dos *primers* terem sido desenhados em trechos hipervariáveis da região *D-loop*, que pode alternar entre raças. As temperaturas (principalmente de anelamento) e os tempos para amplificação também são afetados pela necessidade adequada da concentração de $MgCl_2$, que, por sua vez, também variou entre os grupos estudados.

7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Três pares de *primers* foram sugeridos a partir do genoma mitocondrial da espécie *Gallus gallus*. Eles amplificam a mesma região do genoma. Os *primers* propostos nessa pesquisa foram otimizados. Portanto, podem ser utilizados em futuros trabalhos para estudos filogenéticos da espécie *Gallus gallus*, sendo as sequências dos *primers* e os protocolos de otimização disponibilizados para o público científico, com o intuito de auxiliar pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS

ALBINO, L. F. T. et al. **Criação de Frango e Galinha Caipira**: 2ª ed. Revisada e ampliada. Viçosa: MG. Aprenda fácil Editora, 208p. 2005.

BUTLER, J.M. **Mitochondrial DNA analysis**. In: BUTLER, J. M. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers. 2.ed.Elsevier, p. 376-389. 2010.

CARVALHO, D. A. et al. **Caracterização genética e estrutura populacional de galinhas crioulas Canela-Preta**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, [s.l.], v. 51, n. 11, p.1899-1906, nov. 2016.

CARVALHO, D. A. et al. **Genetic variability of twelve microsatellite loci in native Canela-Preta chickens.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, [s.l.], v. 70, n. 4, p.1275-1281, ago. 2018.

CRAWFORD, R. D. **Poultry Breeding and Genetics.** Developments in Animal and Veterinary Sciences. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1122 p., 1990.

DAMBRÓS JUNIOR, D. **A avicultura no Brasil.** EMBRAPA, 2010. Disponível em:http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com_content&view=article&id=13&Itemid=15. Acesso em: 3 dez. 2019.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 102 p, 2007.

FONTEQUE, G. V. et al. **Genetic polymorphism of fifteen microsatellite loci in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens.** Pesquisa Veterinária Brasileira, [s.l.], v. 34, n. 1, p.98-102, jan. 2014.

GALTIER, N. et al. **Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal.** Molecular Ecology, [s.l.], v. 18, n. 22, p.4541-4550, nov. 2009.

NIU, D. et al. **The origin and genetic diversity of Chinese native chicken breeds.** Biochemical Genetics, [s.l.], v. 40, n. 5/6, p. 163-174. Springer Science and Business Media LLC. 2002.

MÉNDEZ, A. J. et al. **Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión.** Archivos Latinoamericanos de Producción Animal, v. 13, n. 1, p. 30-42, 2005.

NISHIBORI, M. et al. **Molecular evidence for hybridization of species in the genus Gallus except for Gallus varius.** Anim. Genet., [s.l.], v. 36, n. 5, p.367-375, 15 jun. 2005.

RAMALHO, M. A. P; SANTOS, J. B; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária.** 4. ed. Lavras: Editora UFLA, 464 p, 2008.

YAKES, F. M.; VAN HOUTEN, B. **Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress.** Proceedings Of The National Academy Of Sciences, [s.l.], v. 94, n. 2, p. 514-519, 21 jan. 1997.