



Caracterização molecular de quatro populações de galinhas (*Gallus gallus*) baseada em parte da região D-loop do DNA mitocondrial

Silvia Tereza Ribeiro Castro¹, Gleison Ricardo de Biazio², Maria do Socorro Maués Albuquerque³, Mônica Correa Ledur⁴, Samuel Rezende Paiva⁵

¹Pesquisadora responsável por atividade em projeto de pesquisa da Rede Animal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, email:silvia@cenargen.embrapa.br

²Assistente de pesquisa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. e-mail: gbiazio@cenargen.embrapa.br

³Pesquisadora líder da Rede Animal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. e-mail: maués@cenargen.embrapa.br

⁴Pesquisadora responsável por projeto de caracterização de suínos e aves, componente da Rede Animal, Embrapa Suínos e Aves. email:mledur@cnpas.embrapa.br

⁵Pesquisador responsável por projeto de caracterização de recursos genéticos animais, componente da Rede Animal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. e-mail: samuel@cenargen.embrapa.br

Resumo: As relações filogenéticas de quatro populações de galinhas (*Gallus gallus*) foram avaliadas usando informações do DNA mitocondrial. Sequências de DNA das amostras foram comparadas com a sequência D-loop de *Gallus gallus* depositada no GenBank. Um total de 455 pares de bases da região D-loop do mtDNA foram sequenciadas em 196 amostras de quatro populações. Onze haplótipos (H2-H12) foram observados a partir de 17 sítios variáveis ou SNPs. O grupo de maior variabilidade foi o Índio, com seis haplótipos provenientes de oito sítios polimórficos. Do total de indivíduos analisados, setenta e sete, ou seja, 39% apresentaram o haplótipo H4. A linhagem CC apresentou um único haplótipo em todos os indivíduos. Os dados encontrados sugerem que as linhagens comerciais apresentam menor variabilidade na região D-loop analisada do que o grupo Índio.

Palavras-chave: DNA mitocondrial, haplótipo, SNP, variabilidade genética.

Abstract: In this study, we evaluated the phylogenetic relationships of four populations of chicken (*Gallus gallus*) using mitochondrial DNA information. DNA sequences of samples were compared with the D-loop sequence of (*Gallus gallus*) deposited in GenBank. A total of 455 base pairs of the D-loop region of mtDNA have been sequenced in 196 samples of four populations. Eleven haplotypes (H2-H12) were observed from 17 variables sites or SNPs. The group of greater variability was the Indio, with six haplotypes from eight polymorphic sites. Of the total individuals analyzed, seventy-seven, i.e. 39%, presented the haplotype H4. The CC line presented only one haplotype in all individuals. The data suggest that commercial lines show less variability in the D-loop region analyzed than the group Indio.

Keywords: haplotype, genetic variability, mtDNA, SNP

Introdução

O Agronegócio avícola no Brasil responde por 1,5% do PIB, sendo responsável por quatro milhões de empregos diretos e indiretos. O país é o primeiro produtor e terceiro maior exportador de carne de frango do mundo. Este setor é altamente competitivo e não há dúvidas de que novas descobertas na área de biotecnologia, genética molecular e genômica serão decisivas para o país, em uma economia globalizada. Nesta pesquisa analisamos a primeira metade da região D-loop do DNA mitocondrial em indivíduos de duas linhas puras de galinhas desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves (Concórdia-SC) e uma marca comercial, cujo material genético foi coletado no norte do Paraná e oeste de Santa Catarina. O DNA mitocondrial vem sendo utilizado em análises filogenéticas e de evolução molecular em diferentes espécies. Em galinhas, variações na região mitocondrial D-loop foram descritas por Berthouly-Salazar e colaboradores (2010). Mais recentemente, pesquisas realizadas por Mwacharo e colaboradores (2011), com galinhas domésticas do oeste da África, indicaram a presença de diversidade genética na região D-loop que poderiam potencialmente apoiar programas de melhoramento. Nesta pesquisa, buscamos, a partir do mtDNA, estabelecer uma relação filogenética entre os quatro grupos de aves, parte de uma estratégia inicial para a implantação de programas de conservação de recursos genéticos, nessa espécie.

Material e Métodos

Foram analisadas, no Laboratório de Genética Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, duzentas e doze amostras de DNA de animais compreendendo quatro linhagens de galinha (*Gallus gallus*): CC (White Leghorn, produção de ovos); CCc (White Leghorn, produção de ovos, controle); Cobb 500 (frango corte comercial, duplo híbrido) e Índio (galinha doméstica), provenientes do Banco de DNA da Embrapa Suínos e Aves.



O DNA genômico foi extraído a partir do sangue total, quantificado em gel de agarose e em espectrofotômetro. Foram estudadas variações na sequência da *D-loop* compreendendo a região contida entre os primers forward 5'-CTATCACAGACGCTACCACCAACC-3' reverse 5'-GAGGTGGACGATCAATAAATCCATC-3'. As condições da PCR para a amplificação da região *D-loop* foram padronizadas usando o protocolo: desnaturação a 94°C – 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de amplificação a 94°C - 1 minuto, anelamento a 61°C - 1 minuto, 72°C - 1 minuto, com uma extensão final a 72°C - minutos. A visualização dos produtos da PCR, no gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, confirmou a amplificação de um fragmento de aproximadamente 500pb. Os produtos da PCR foram submetidos a uma purificação enzimática (ExoSAP-IT). Para o sequenciamento das amostras foi utilizado um sequenciador automático ABI 3100. Utilizando o programa SeqScape v2.5, as amostras foram alinhadas a uma sequência referência do GenBank, originada a partir da depositada por Desjardins & Morais (1990), com número de acesso NC 001323 e, posteriormente, editadas. Após edição, as sequências contendo 455bp foram analisadas no programa Mega 5.0 (Tamura e colaboradores, 2011). A rede haplotípica foi construída pelo programa Network versão 4.1.1.2, por meio do método Median-Joining (MJ) (Bandelt e colaboradores, 1999). Alguns índices de variação de sequência e a estrutura de haplótipos foram estimados por meio do programa DNAsp versão 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009).

Resultados e Discussão

Pela análise da sequência de 455pb da região *D-loop* do DNA mitocondrial foram identificados, nas 196 amostras utilizadas, 11 haplótipos diferentes sendo estes definidos por 17 polimorfismos de nucleotídeo único - SNPs (Tabela 1). Os resultados indicam que as amostras das linhagens CC; CCc e Cobb 500 apresentaram um menor número de substituições e, conseqüentemente, uma menor diversidade nucleotídica do que o Índio. Esta última apresentou seis haplótipos, cinco deles não ocorreram em CC, CCc e Cobb, o que é esperado por não ter sofrido seleção. Observamos (Tabela 2) que a linhagem CC apresentou um único haplótipo em todos os indivíduos amostrados, corroborando o longo período de seleção a que esta foi submetida, desde 1982. O haplótipo de maior frequência foi o H4, que está presente em 39% dos indivíduos amostrados. Foram encontradas mais transições do que transversões, além de uma inserção de três citosinas (CCC), considerando todas as amostras. Nenhum haplótipo foi compartilhado entre os quatro grupos. Na rede network foram observados três vetores medianos, indicando haplótipos extintos ou não amostrados (Bandelt e colaboradores, 1999). Foi gerada uma alça (*loop*) entre os haplótipos mais frequentes resultando em conexões alternativas entre eles.

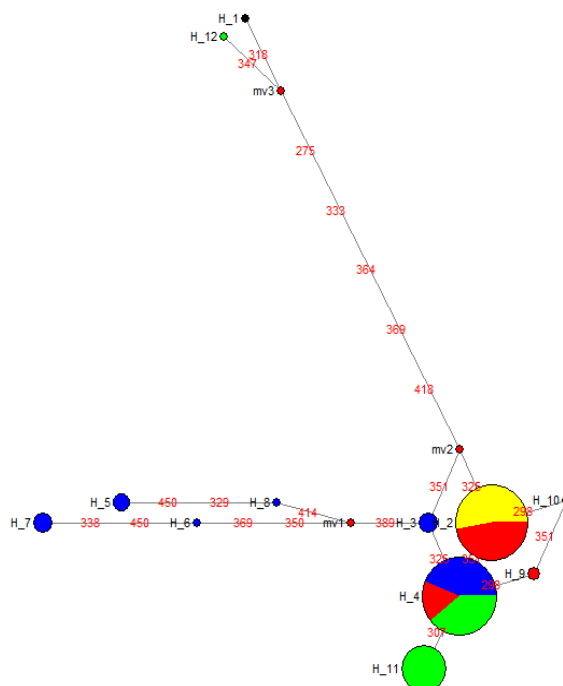


Figura 1. Análise de Network a partir de sequências de DNA de galinhas, parte da região controle do mtDNA. Cada círculo representa um haplótipo. O tamanho de cada círculo é diretamente proporcional à frequência do haplótipo correspondente. Os números em vermelho referem-se à posição da mutação.

● Linhagem CC; ● Linhagem CCc; ● Linhagem Cobb; ● Índio; ● Referência



Tabela 1. Diversidade haplotípica, diversidade nucleotídica e número de SNPs estimados a partir da região *D-loop* do mtDNA, para cada uma das populações analisadas.

Linagem	Número de indivíduos	Número de Haplótipos	Diversidade Haplotípica	Diversidade Nucleotídica	SNPs
CC	38	1	0,000+/-0,000	0.00000+/-0.00000	0
CCc	50	4	0,478+/- 0,064	0.00119+/- 0.00019	2
Cobb	58	3	0,525+/- 0,021	0.00172+/-0.00058	9
Índio	50	6	0,521+/- 0,079	0.00449+/- 0.00087	8
Todas as populações	196	11	0,696+/- 0,019	0.00328+/- 0.00579	17

Tabela 2. Frequência e distribuição dos haplótipos identificados na região controle *D-loop* do mtDNA em cinco populações de galinhas, incluindo o haplótipo referência (H1).

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
CC		38										
CCc		34		13					2	1		
Cobb				30							27	1
Índio			5	34	4	1	5	1				
Referência	1											

Conclusões

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que a análise da região D-loop mostrou-se eficiente em detectar, através dos índices de diversidade molecular utilizados, uma menor variabilidade, nessa região, para as linhagens que sofreram processo de seleção CC e Cobb, bem como para CCc, mantida sem seleção, porém com provável perda de variabilidade pois é mantida fechada, em relação à que não sofreu, Índio.

Agradecimentos

Agradecemos à Embrapa Suínos e Aves pelo envio de amostras de DNA dos animais, aos funcionários e colaboradores dos Laboratórios No.10 PBI e LGA, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que direta ou indiretamente colaboraram tornando possível este trabalho. À líder da Rede Animal e responsáveis por projeto componente e plano de ação pela contribuição, revisão e logística para a realização desta pesquisa.

Literatura citada

- C Berthouly-Salazar, X Rognon, T Nhu Van, M Gély, C Vu Chi, M Tixier-Boichard, B Bed'Hom, N Bruneau, E Verrier, JC Maillard and JR Michaux. Vietnamese chickens: a gate towards Asian genetic diversity. *BMC Genetics* 11:53-63, 2010.
- Hans-Jurgen Bandelt, Peter Forster, Arne Rohl. **Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies.** Mathematisches Seminar, Universität Hamburg, Hamburg, Germany, 1999.
- J M Mwacharo, G Bjornstad, V Mobegi, K Nomura, H Hanada, T Amano, H Jianlin, O Hanotte. Mitochondrial DNA reveals multiple introductions of domestic chicken in East Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 58:374-382, 2011.
- J Rozas, P Librado, J C Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer and R. Rozas. DnaSP v5. Universitat de Barcelona. **Current Released Version: 5.10.01** March 04, 2010.
- Koichiro Tamura, Daniel Peterson, Nicholas Peterson, Glen Stecher, Masatoshi Nei and Sudhir Kumar. **MEGA 5 for Windows**, 2011.
- P Desjardins & R Morais. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *Journal of Molecular Biology* 212(4):599--634, 1990.