



VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal *São Carlos, SP, 10 e 11 de julho de 2008*

Caracterização genética de caprinos Moxotó e Canindé por meio de microssatélites de DNA¹

Adriana Mello de Araújo², Francisco Luiz Ribeiro da Silva³, Luciana Cristine Vasques Villela³, Shara Emanuella Freire Lima⁴, Daniel Brito⁴, Katiuscia Furtado⁴, Márcio da Silva Costa⁵, Joubert de Borges Moraes⁵, Rodrigo Maranguape Silva da Cunha⁶

¹Trabalho financiado pelo Banco do Nordeste

²Pesquisadora da Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI. e-mail: adriana@cpamn.embrapa.br

³Pesquisadores da Embrapa Caprinos, Sobral-CE

⁴Bolsistas da Embrapa/NUBIS e Estudante em Biologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA, Sobral,CE

⁵Bolsistas do CNPq Embrapa e Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – UFPI

⁶Professor da Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE

Resumo – O Nordeste do Brasil possui o maior plantel caprino do País, quase sempre associado à agricultura familiar e a sistemas de produção pouco tecnificados. O ambiente natural onde o caprino do nordeste está inserido é o semi-árido, áreas geralmente impróprias para a produção pecuária intensiva. Este trabalho teve o objetivo de caracterizar as raças caprinas naturalizadas Moxotó e Canindé por meio de marcadores de microssatélite. Os animais avaliados pertencem ao Núcleo de Conservação da Embrapa Caprinos. O DNA extraído foi amplificado mediante a reação em cadeia polimerase (PCR), em multiplex e genotipados através do programa *Fragment Profile* (Amersham Biosciences). A heterosigozidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (HE) foi calculada através do programa TFPGA (Miller, 1997). Todos os *loci* analisados foram considerados polimórficos ($H > 0,5$). O número de alelos observado demonstra haver diversidade dentro da população. O valor de F_{ST} atribui 7% da variação existente a diversidade entre população e heterogeneidade dentro das populações ($F_{IS} = 0,26$) dentro do rebanho de conservação. A distância genética (Nei, 1978) entre as raças Moxotó e Canindé foi de 0,377.

Palavras-chave: polimorfismo, heterozigosidade, recursos genéticos

Genetic characterization of Moxotó and Canindé goat breeds in the Northeast of Brazil using DNA microsatellites

Abstract – The Northeast region possesses the largest goat herd of Brazil, almost always associated to family agriculture and to production systems with little technological inputs. The Semi-arid is a natural environment where live goats of the Northeast, generally inappropriate for the animal production. This work had the objective of characterizing the naturalized goat breeds Moxotó and Canindé by means of microsatellites DNA markers. The sampled animals belong to the Nucleus of Conservation of Embrapa Caprinos. The extracted DNA was amplified by means of the polymerase chain reaction (PCR), in multiplex and genotyped through the program

Fragment Profile (Amersham Biosciences). The expected heterozygosity under Hardy-Weinberg equilibrium (HE) were calculated using the program TFPGA (Miller, 1997). All the loci were considered polymorphic ($H > 0,5$). The number of observed alleles demonstrates diversity within the population; The F_{ST} value gives 7% of total variation to diversity between conservation flocks and show heterogeneity inside populations ($F_{IS} = .26$). The distance genetic (Nei, 1978) among breeds Moxotó and Canindé were of 0,377.

Keywords: polymorphism, heterozygosity, genetic resources

Introdução

Os recursos genéticos dos animais domésticos são um componente da agrobiodiversidade e importantes para a segurança alimentar e sustentabilidade do homem na Terra (FAO, 1998). Os caprinos são importantes para a sustentabilidade socioeconômica do Nordeste, por representar alternativa de emprego e renda para as famílias de áreas rurais do semi-árido. Os grupos naturalizados possuem como característica comum a adaptação ao ambiente hostil e alta fertilidade quando comparada a outras raças exóticas especializadas (Araújo et al, 2006). Entretanto, apresentam baixos níveis de produtividade, mesmo porque estão submetidas somente a ambientes restritivos. Dentre estes grupos conservados, talvez o mais tradicional seja a raça Moxotó, originária de Pernambuco, homologada em Livro de Registro como raça desde 1977 e a Canindé, homologada como raça desde 1981.

As análises de marcadores de microssatélites de DNA possibilitam caracterização das raças ameaçadas de desaparecimento e o estado de sua conservação.

Material e Métodos

Foram utilizadas 22 amostras individuais de DNA extraído de caprinos adultos da raça Moxotó e 21 amostras da raça Canindé do núcleo de conservação da Embrapa Caprinos, localizado em Sobral-CE. As amostras de sangue para extração de material genético foram colhidas na veia jugular pelo sistema a vácuo contendo EDTA. Depois de colhido, o sangue foi armazenado a -4°C até a extração de DNA, usando o protocolo com fenol, adaptado de Araújo et al. (2006).

Foram selecionados sete *loci* de microssatélite anteriormente descritos na literatura e depositados no ISAG (2008): ILSTS011 (6-fam), CSR0247 (6-fam), INRA063 (6-fam), INRA006 (6-fam), SRCRSC023 (Ned), Oarfcb 48 (Hex) e HSC (6-fam).

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Perkin-Elmer, modelo PE2400. A reação de cada *primer* foi constituída de 25ng de DNA genômico, em solução de PCR (20 mM de Tris-HCL, pH 8,3; 50 mM de KCl; 0,2 mM de dNTP; e 1,0 unidade de *Taq* DNA Polimerase) as concentrações de Cloreto de Magnésio variaram entre 1,25 mM a 2,5 mM, dependendo da exigência de cada locus, totalizando um volume no final da reação de 20 μL . O ciclo para realização da PCR foi de $95^{\circ}\text{C}/5$ min. seguido de 28 ciclos de $95^{\circ}\text{C}/1$ min, $56^{\circ}\text{C}/1$ min, $72^{\circ}\text{C}/1$ min, e uma fase extensão final de $72^{\circ}\text{C}/20$ min. A eletroforese capilar foi realizada com base na desnaturação por $94^{\circ}\text{C}/5$ min e genotipadas pelo Megabace (Amersham Biosciences), com base no software *Fragmente Profile*. Os genótipos obtidos foram analisados pelo programa TFPGA (Miller, 1997), obtendo-se as frequências gênicas de cada alelo, a heterozigosidade esperada e a distância de Nei (1978). Para acessar a diferenciação genética das populações, os índices de fixação de Wright F_{IS} (consangüinidade ou perda de heterozigosidade dentro da população), F_{ST} (medida de diferenciação entre populações) e F_{IT} (perda global de heterozigosidade) foram computados, utilizando um

bootstrapping com intervalo de confiança de 95% (1000 repetições) (Weir e Cockerham, 1984).

Resultados e Discussão

Nos sete *loci* de microssatélites analisados na população de caprinos, foi detectado um número médio de sete alelos por locus, sendo que o número de alelos por locus variou de onze (ILSTS011) a quatro alelos (oarfc48). De acordo com dados da FAO (1998), um locus deverá conter mais de quatro alelos para ser útil na caracterização de recurso genético animal.

A heterozigosidade esperada para todos os *loci* foi de 0,78 na raça Moxotó e 0,75 na Canindé, variando entre locus de 0,62 a 0,89. De uma maneira geral, a heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E) não foi maior do que a observada (contagem direta), indicando não haver acentuado perda global de heterozigosidade. Observou-se também um aumento da heterozigosidade esperada em relação aquela estimada para a raça Moxotó por Araújo (2006), onde a H_E foi de 0,49. Tais indicativos podem sinalizar uma reversão do quadro endogâmico da população.

Os marcadores estudados apresentaram elevado grau de polimorfismo, com exceções do SRCRSP023, ($H < 0,70$) em ambas as raças estudadas. Um locus é considerado altamente polimórfico se sua heterozigosidade é maior do que 0,70, o que implica frequência menor do que 0,55 no mais freqüente alelo. Isso é observado de acordo com a Tabela 1.

Para conservação de recursos genéticos a informação do polimorfismo de DNA é fundamental, visto que a presença de vários alelos dentro de um locus é indicação de variação genética, mantendo a população representativa. Variação esta que pode ser fonte para futuros programa de melhoramento destas espécies.

A distancia genética entre a população Moxotó e Canindé foi de 0,377. O valor de distância entre estas raças foi maior do que observado por Menezes (2005). Tal fato pode ser devido à localização geográfica distinta entre os rebanhos estudados nestes estudos. O coeficiente de diferenciação genética (F_{ST}) foi 0,07, indicando que apenas 7% da variabilidade genética total foi representada pela diferença entre as populações estudadas das raças Moxotó e Canindé. Através de *bootstrapping*, com intervalo de confiança de 95%, o valor de F_{ST} difere de zero, indicando haver diferença significativa entre as populações estudadas. Os coeficientes F_{IT} e F_{IS} foram, respectivamente, 0,32 e 0,26. O valor elevado para F_{IS} é indicativo de populações heterogêneas, podendo ser decorrente de consangüinidade, presença de alelos nulos não identificados, população subdividida ou seleção contra heterozigoto (Menezes, 2005).

Tabela 1- Locus (Dye), alelos observados (pb), número de alelos encontrados na raça Moxotó e Canindé (N_1/N_2) e heterozigosidade esperada (H_{E1}/H_{E2}) para cada locus analisado.

Locus	pb	N_1	N_2	H_{E1}	H_{E2}
ILSTS011 (Hex)	261-281	11	11	0,86	0,88
CSRD0247 (6-Fam)	221-249	13	8	0,89	0,79
INRA063 (Ned)	167-209	10	7	0,80	0,66
INRA006 (6-Fam)	105-129	8	8	0,83	0,78
Oarfb 048 (Ned)	153-167	5	4	0,68	0,73
HSC (6-Fam)	274-290	6	7	0,75	0,80
SRCRSP023 (Ned)	87-105	4	6	0,62	0,65
Todos os loci	-			0,78	0,76

Conclusões

Os *loci* de microssatélites estudados apresentaram polimorfismo, podendo ser usado para estudos de diversidade genética e variabilidade em caprinos, sendo o locus SRCRSP023 o menos polimórfico. Mais marcadores deverão ser incluídos em estudos futuros para melhor caracterizar as populações e permitir estimativas de distância genética em relação a outros grupos genéticos.

O número de alelos observado e bem como a heterozigosidade demonstram haver diversidade dentro da população Moxotó e Canindé. O coeficiente F_{ST} atribui 7% desta diversidade genética a variação entre população. A distância genética indica haver diferença entre as populações Moxotó e Canindé.

Literatura Citada

- ARAÚJO, A.M.; GUIMARÃES, S.E.F.; MACHADO, T.M.M.; LOPES, P.S.; PEREIRA, C.S.; SILVA, F.L.R. et al. Microsatellites in the study of genetic diversity among herds of the Saanen and Alpine dairy goat breeds and the naturalized Moxotó breed in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.1, p.67-74, 2006.
- FAO. **Secondary Guidelines for development national farm animal genetic resources management plans: management of small populations at site**. FAO, Rome, 1998. 215p.
- ISAG. Liliana Di Stasio – **ISAG Standing Committee on “Applied Genetics in Sheep and Goats”**, 2008. Disponível em: <http://www.isag.org.uk/pdf/2005_PanelsMarkersSheepGoats.pdf>. Acesso em: 10/03/08.
- MENEZES, M.P.C. **Variabilidade e relações genéticas entre raças caprinas nativas brasileiras, ibéricas e canárias**. Tese de doutorado da Universidade Federal da Paraíba/ Doutorado Integrado em Zootecnia, Areia, 2005.
- MILLER, M.P. **TTPGA – Tools for populations genetics analyses**. V 1.3 A Window program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, 1997.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C. Estimating F-statistics for analysis of population structure. **Evolution**, v.36, p.1358-1370, 1984.