

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

Distância genética em caprinos naturalizados por meio de microssatélites de DNA¹

Adriana Mello de Araújo², Luanna Chácara Pires³, Francisco Luiz Ribeiro da Silva⁴,
Samuel Rezende Paiva⁵, Márcio da Silva Costa⁶, Joubert de Borges Moraes⁶, Théa
Mírian Medeiros Machado⁷, Glícia Maria de Almeida⁶, Rodrigo Maranguape S. Cunha⁸,
Mario Beffa²

¹Trabalho financiado pelo Banco do Nordeste e CNPq

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

³Mestranda em Zootecnia – UFV. Bolsista da CAPES. e-mail: lualu66@yahoo.com.br

⁴Embrapa Caprinos, Sobral, CE

⁵Embrapa Recursos Genéticos, Brasília, DF

⁶Pós graduandos em Ciência Animal – UFPI/ Bolsista

⁷ Professor do Departamento de Zootecnia – UFV

⁸ Professor da UVA, Sobral, CE

Resumo: Há uma necessidade de adotar estratégias de conservação para as populações naturalizadas de animais domésticos para assegurar a manutenção destas para o futuro. Este estudo visa contribuir para o conhecimento da variabilidade genética por meio de marcadores de microssatélites em caprinos naturalizados Moxotó, Canindé e Marota. Foram amostrados 124 animais adultos dos grupos Moxotó, Canindé e Marota dos núcleos de conservação da Embrapa. O DNA extraído foi amplificado mediante a reação em cadeia polimerase (PCR) e genotipado através do programa *Fragment Profile* (Amersham Bioscience). O método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*) foi utilizado para construção do dendograma com *bootstrap* (1000 repetições) pelo programa TFPGA (Miller, 1997). O dendograma agrupou no primeiro nóculo as populações Moxotó e Canindé e o *bootstrap* apresentou 75% de similaridade neste nóculo. No segundo nóculo houve a inclusão das três populações e obteve *bootstrap* de 100%. O número de *loci* suportando cada nóculo foram quatro e cinco, respectivamente. O método UPGMA, utilizando as distâncias de Nei (1978), permitiu o discernimento das populações caprinas com base em dados moleculares.

Palavras-chave: dendograma, diversidade genética, grupamento, marcadores, recursos genéticos

Genetic distance in naturalized goats using DNA microsatellites

Abstract: There is a need to adopt conservation strategies for naturalized populations of domestic animals to ensure their maintenance for the future. The objective of this study was to determine the genetic variability in naturalized Brazilian goat populations using microsatellite markers. Samples of 124 Moxotó, Canindé and Marota adult animals were obtained from conservation flocks maintained by Embrapa. The extracted DNA was amplified by chain polimerase reaction (PCR) and genotyped using the *Fragment Profile* program (Amersham Bioscience). The *Unweighted Pair Group Method With*

Arithmetic Mean method (UPGMA) was used for construction of the dendrogram with bootstrap (1000 repetitions) of the TFPGA program (Miller, 1997). The Moxotó and Canindé groups were included in the first nodule of the dendrogram with a bootstrap value of 75%. All three groups were included in the second nodule with a bootstrap value of 100%. The loci number supporting each nodule was four and five, respectively. The method UPGMA with molecular data, using Nei's distances (1978), allowed for the discernment of these goat populations.

Keywords: dendrogram, genetic diversity, groupment, marks, genetic resources

Introdução

A população caprina no Brasil é de aproximadamente 10.050.888 de animais, com 94% concentrada na Região Nordeste (IBGE, 2006). É preciso realizar estudos e definir estratégias de conservação para as raças naturalizadas de caprinos, pois a diversidade é importante tanto na conservação quanto na produção animal. Segundo Rodero e Herrera (2000), esses estudos devem visar à caracterização, identificação e a diferenciação das populações revelando a origem e a história das raças, seu senso e distribuição geográfica, qualidades e aptidões, caracteres etnológicos, descrição fenotípica, estudos morfo-estruturais e o uso de polimorfismos entre as raças.

Existem várias ferramentas que auxiliam na conservação, com destaque a análise de DNA, que é utilizado em programas de conservação e melhoramento genético. Neste aspecto, a biologia molecular, através de técnicas de análise de DNA, vem auxiliando o desenvolvimento de novas tecnologias, permitindo conhecer a variabilidade ao nível de DNA (Barker, 1994).

Segundo Notter (1998), assegurar a sobrevivência de raças, seja nas instituições públicas ou pelos criadores, permitirá que, no futuro, as mesmas possam constituir fonte de material genético capaz de melhorar a resistência de outras raças ou a condições desfavoráveis do ambiente de criação.

O método UPGMA se baseia no agrupamento sucessivo de pares de táxons de acordo com o nível de similaridade. O método de “ligação média” ou UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*) define a distância entre agrupamentos como a distância média entre os pares. Esse método gera árvores com simetria dos ramos ao redor de um nó e a condição biológica que gera tal simetria é a ocorrência de taxas evolutivas constantes. Porém, em estudos de diversidade dos animais domésticos, o interesse maior está no valor de conservação, mais do que na filogenia exata (Araújo, 2004).

Com este estudo objetivou-se contribuir para o conhecimento da variabilidade genética através do uso de marcadores microssatélites dos caprinos naturalizados Moxotó, Canindé e Marota.

Material e Métodos

Utilizou-se neste estudo 23 animais adultos da raça Moxotó, 22 animais Canindé e 79 Marota dos núcleos de conservação da Embrapa, localizados em Sobral, CE (Moxotó e Canindé) e em Castelo do Piauí, PI (Marota). 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 do fenol, adaptado de Araújo (2004).

Foram selecionados para estudo das raças Moxotó e Canindé e do ecótipo Marota, cinco *loci* de microssatélites anteriormente descritos na literatura e depositados no ISAG (2008): ILSTS011 (6-fam), CSRD0247 (6-fam), INRA006 (6-fam), HSC (6-fam) e SCRRSP23 (Ned).

As amostras amplificadas por meio do PCR foram conduzidas em aparelho 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 μ L. O ciclo para realização da PCR foi de 95°C/5 min. seguido de 28 ciclos de 95°C/1 min, 56°C/1 min, 72°C/1 min, e uma fase extensão final de 72°C/20 min. A eletroforese capilar foi realizada com base na desnaturação por 94°C/5 min e genotipadas pelo Megabace (Amersham Bioscience), com base no software *Fragmente Profile*. Os genótipos obtidos foram analisados pelo programa TFGA (Miller, 1997), obtendo-se as frequências gênicas de cada alelo e a heterozigosidade observada.

A distância genética (D_A) foi estimada segundo Nei (1978), corrigida para amostras de tamanho pequeno. O método de agrupamento com média aritmética não ponderada (*UPGMA-Uniweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*), foi utilizado para construção do dendograma. Para dar um intervalo de confiança à árvore construída, o *bootstrap* (1000 repetições) foi realizado pelo programa TFGA v 1.3, fornecendo a porcentagem de replicatas similares aos dados originais.

Resultados e Discussão

A matriz das distâncias genéticas calculada (Nei, 1978) é dada na Tabela 1 e pode ser tomada como medida da diversidade entre populações. A similaridade entre as populações Moxotó e Canindé foi maior do que entre Canindé e Marota, e entre Moxotó e Marota.

Tabela 1- Distâncias genéticas de Nei (1978) D_A entre as populações caprinas estudadas.

Populações	Canindé	Marota
Moxotó	0,5180	1,0045
Canindé		0,6593

A população Marota demonstrou maiores distâncias em relação às raças Moxotó ($D_A = 1,0045$) e Canindé ($D_A = 0,6593$).

Na Figura 1, o dendograma gerado agrupou no primeiro nóculo as populações Moxotó e Canindé e o *bootstrap* apresentou 0,7470 de similaridade neste nóculo. No segundo nóculo houve a inclusão das três populações à distância de 0,8319 e obteve *bootstrap* de 100%. O número de *loci* suportando cada nóculo foi quatro e cinco, respectivamente.

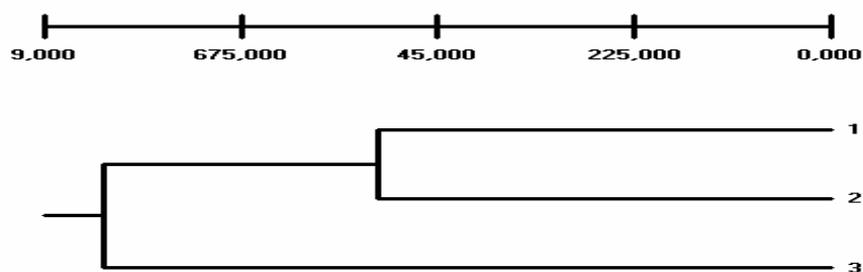


Figura 1. Dendrograma UPGMA (*unrotated*) construído usando a distância genética (D_A).

Conforme dados obtidos neste estudo, existe diversidade genética entre as populações estudadas. O método UPGMA através da D_A (Nei, 1978) mostrou topologia correta na construção de árvores filogenéticas, pois D_A é a medida de distância mais eficiente para obter topologia da árvore evolutiva. As distâncias de Nei e o dendograma obtido condizem com o histórico das populações e de suas distribuições geográficas originais, mostrando-se consistentes.

Conclusões

Em estudo com marcadores de microssatélites da variabilidade das populações caprinas naturalizadas, foi demonstrado que as raças Moxotó e Caniné possuem distância genética, sendo ambas mais distantes da população Marota. O método UPGMA, utilizando as distâncias de Nei (1978), permitiu o discernimento das populações caprinas com base em dados moleculares. Preconiza mais estudos sobre a variabilidade dos caprinos naturalizados do nordeste brasileiro com objetivo de monitorar a conservação.

Literatura Citada

- ARAUJO, A.M. **Paternidade e diversidade genética em caprinos no Brasil por meio de microssatélites de DNA**. Tese de doutorado. UFV. Viçosa, 2004. 172p.
- BARKER, J.S.F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: WORD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph. **Proceedings...**Guelph, 1994. v.21, p.501-508.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. Disponível em: <www.ibge.gov.br/ibge/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/default.sht>. Acesso em: 24/04/2008.
- 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.
- 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, 2000.
- NOTTER, D.R. Development of sheep composite breeds for lamb production in the tropics and subtropics. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 1., 2000, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Emepa-PB, 2000. p.141-150.