

Marcadores moleculares no estudo de distância genética entre grupos de caprinos autóctones do Nordeste: I-amostras de DNA.

Raquel Silveira¹, Adriana Mello de Araújo², Francisco Luiz Ribeiro da Silva³, Samuel Rezende Paiva⁴, Elizabeth Saraiva Peixoto Pinheiro⁵, Márcio Costa¹
1 Bolsistas de Iniciação Científica Embrapa; 2 Pesquisadora da Embrapa Meio-Norte; 3 Pesquisador da Embrapa Caprinos; 4 Embrapa Recursos Genéticos; 5 Aluna do Curso de Medicina Veterinária UECE

RESUMO- Os caprinos autóctones do Nordeste são originários de exemplares trazidos na época da colonização que se diferenciaram genotipicamente devido ao isolamento geográfico. Os grupos genéticos Moxotó e Canindé foram homologados como raças distintas, embora alguns autores sustentem, sob o ponto de vista histórico, que os caprinos autóctones possuem a mesma origem genética. Para investigar a diversidade e distância genética entre os grupos fenotipicamente semelhantes de caprinos autóctones, este trabalho colheu amostras dos principais rebanhos destinados à conservação de recursos genéticos de institutos de pesquisa no Ceará, Piauí e Bahia. As amostras de sangue estão armazenadas nos laboratórios da Embrapa Caprinos e Meio-Norte. Até o momento, foram colhidas 100 amostras da raça Moxotó, 32 da Canindé, 152 da Marota, 45 da Azul e 37 da Repartida. As amostras de sangue de 25 caprinos Moxotó, 25 Marota e 10 Azul foram extraídas pelo protocolo do fenol. Os marcadores investigados até o momento são o INRA006, INRA172, CSRC 0247 e ILSTS011. Os dados obtidos ainda não foram analisados.

Palavras Chave: Extração de DNA, diversidade genética, recursos genéticos

ABSTRACT

Molecular marks in the study of genetic distance between local goats groups of northwest: I. DNA samples

The groups of Brazilians goat of northeast are originally of units brought at the time of settling and had differentiated geotipically due to the geographic isolation. The genetic groups Moxotó and Canindé had been homologated as distinct breed. Even so some authors support, under the historical point of view, that goat presented only diverse color coat pattern, but with a same genetic origin. To investigate the diversity and genetic distance of similar coat color pattern, this work harvested samples of the main destined flocks the conservation of genetic resources of Researchs Institutes in the Ceará, Piauí and Bahia. The samples of blood are stored in the Embrapa Caprinos and Embrapa Meio-Norte laboratories. Until the moment, 100 samples of the Moxotó breed had been sampled, 32 of the Canindé breed, 152 of the Marota breed, 45 of Azul breed and the 37 of the Repartida one. The samples of blood of 25 Moxotó, 25 Marota breed and 10 Azul breed has been extracted by the protocol of phenol. The markers investigated until the moment are the INRA006, INRA172, CSRC 0247 and ILSTS011. The data observed had been not yet analyzed.

Key Words: isolation of DNA , genetic diversity, genetic resources

INTRODUÇÃO

Os caprinos autóctones do Nordeste são grupamentos genéticos originários de animais trazidos para o Brasil na época da colonização e que passaram por um longo período de seleção natural para adaptação no semi-árido. Na atualidade, estes grupamentos sofrem risco de desaparecimento em consequência da introdução e cruzamento com as raças exóticas mais produtivas. O desenvolvimento histórico de tipos locais de animais domésticos deu-se mais através do isolamento genético e da seleção natural, do que pela intervenção do homem. Cinco ecótipos caprinos são citados: Moxotó, Marota, Canindé, Gurguéia e Repartida (Machado et al., 2000). Obtiveram homologação de Livro de Registro e são reconhecidas como raça apenas a Moxotó (1977) e a Canindé (1999). Estudos de diversidade genética dos ecótipos são urgentes para melhor direcionar os recursos existentes para sua conservação (Mariante et al., 2000). Segundo Kumar (2000), os marcadores de microssatélites apresentam um alto grau de polimorfismo, são bem documentados em algumas espécies (bovinos, suínos, ovinos, eqüinos, aves e peixes), podendo ser usados para a caracterização de rebanhos, além de estabelecer as relações filogenéticas entre as diversas raças. A variabilidade entre populações pode ser acessada através de ferramentas matemáticas, que traduzem as diferenças em medidas de distância entre um par de populações.

MATERIAL E MÉTODOS

Os rebanhos de conservação genética amostrados encontram-se distribuídos em centros de pesquisa do Nordeste, sendo assim organizados: Moxotó e Canindé na Embrapa Caprinos, Sobral-CE, Marota e Azul na Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI e Repartida, Empresa Baiana de Desenvolvimento, Caraíbas-BA. As amostras de sangue foram coletadas de animais de ambos os sexos, com idade superior a seis meses. Os tubos contendo as amostras foram congelados até a fase de extração. O total de amostras colhidas correspondem a: 100 para a raça Moxotó, 32 Canindé, 152 Marota, 45 Azul e 37 amostras de Repartida. Até o momento, as amostras de sangue de 25 Moxotó, 25 Marota e 10 Azul foram extraídas pelo protocolo do fenol descrito a seguir. As amostras de sangue (4ml) contidas nos tubos vancouver foram levadas ao banho-maria a 37 °C por aproximadamente 30 minutos, até descongelar. Logo após, os conteúdos foram transferidos para tubos de 14 ml, diluindo com um volume de ± 5 mL de PBS 1X, centrifugando a 4000 rpm por 15 minutos, verificando, assim, se ocorreu a formação de um precipitado, descartando o sobrenadante. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em 5 ml de Tampão de Extração (0,5% SDS, 10 mM Tris, 0,1 M EDTA), e cada tubo sofreu a ação do vortex para a homogeneização. A proteinase K foi adicionada em uma concentração de 100 μ g mL, levados ao banho-maria por 4 horas, a uma temperatura de 55 °C. Logo após, foi adicionado 5 mL de etanol e levado ao

agitador por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados a 4.000 rpm por 15 minutos e transferidos os sobrenadantes aquosos para um novo tubo de 14 mL, repetindo assim por três vezes até que o sobrenadante aquoso apresentasse limpo. Para cada tubo foi adicionado 5 mL de acetato de amônio 5M e 10 mL de álcool absoluto gelado. Após esse passo, o DNA já se encontra precipitado, sendo conservado no álcool por 24 horas. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 4.000 rpm por 5 minutos, depois o álcool foi descartado. Todas as amostras de DNA foram re-hidratadas com 2 mL de álcool 70%, centrifugado a 4.000 rpm por 5 minutos, e descartado o álcool. Esse processo foi repetido por mais duas vezes até que o DNA tornasse transparente. Em seguida, os tubos foram levados à estufa até a evaporação do álcool. Decorrido o tempo de secagem, o DNA foi ressuscitado em Tampão Tris-EDTA (TE). Finalmente, algumas amostras foram escolhidas aleatoriamente para constatar a presença de DNA em eletroforese em gel de agarose.

RESULTADOS PRELIMINARES

O protocolo de extração de DNA de sangue total através do método do fenol foi executado nos dois laboratórios da Embrapa. O método, apesar de utilizar o solvente orgânico fenol, apresenta um bom desempenho para amostras de sangue total congelado. Os kits de extração possuem um custo elevado para os projetos de pesquisa e outros métodos, como o CTAB, não apresentaram resultados satisfatórios para extração de DNA de sangue total.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A.M., GUIMARÃES, S.E.F et al. Genetic diversity between herds of Alpine and Saanen dairy goats and the naturalized Brazilian Moxotó breed. *Genetic and Molecular Biology*, vol.29, nº .1, p.67-74, 2006.

DEVENDRA, C. Potential productivity from small ruminants and contribution to improved livelihoods and rural growth in developing countries. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*,34. Anais... Recife, 2002. p.246-269.

FAO. Secondary Guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans: Management of small populations at site. FAO, Rome. 215p, 1998.

KUMAR, D. DNA markers for the differentiation of farm animal breeds. In. *Domestic Animal Diversity: Conservation and sustainable development*. Ed. Sahai, R. & Vijh, R.K. Karnal: SI Publications. 2000. P.305-312.

MACHADO, T. M. M, MACHADO, M.M.M The geografic localization of local goat populations, Brazil In: *Global Conference on Conservation of domestic animal*

genetic resources, 5., 2000, Brasília. Proceedings. Ed. Mariente, A S, McManus, C., Salomão, A.N. Brasília:Embrapa. CD-Rom.

MARIANTE, A S., CASTRO, S.T.R., WETZEL, M.M.V.S. Conservation of animal genetic resources: structure of the Brazilian Network. In: Global Conference on Conservation of domestic animal genetic resources, 5., 2000, Brasília. Proceedings. Ed. Mariente, A S, McManus, C., Salomão, A.N. Brasília:Embrapa. CD-Rom.

Parecer: Aprovado