

Teresina, PI
Novembro, 2008

Autores

Cíntia de Souza Clementino
Departamento de Biologia,
CCN-UFPI

Denise Mendes Martins
Departamento de Biologia,
CCN-UFPI

Pedro Rodrigues de Araújo Neto
Departamento de Biologia,
CCN-UFPI

Fábio Barros Britto
Departamento de Biologia,
CCN-UFPI

Firmino José Vieira Barbosa
Zootecnista, Professor da
UESPI, Teresina, PI.

Paulo Sarmanho da Costa Lima
Engenheiro agrônomo,
Pesquisador da Embrapa
Meio-Norte, Teresina, PI.

Fábio Mendonça Diniz
Engenheiro de pesca,
Pesquisador da Embrapa
Meio-Norte, Teresina, PI.

Variabilidade Fenotípica e Genotípica em Galinhas Caipiras (*Gallus gallus domesticus*): Resultados Preliminares

Introdução

A galinha doméstica teve origem e se desenvolveu em um habitat de florestas de bambu no Sudeste Asiático a partir do gênero *Gallus gallus* (*G. g. domesticus*), evidência monofilética confirmada por análise molecular do DNA mitocondrial (FUMIHITO et al., 1994, 1996). Em pouco tempo, elas se difundiram pelo mundo, sendo introduzidas no Brasil na época do descobrimento. Em razão de sua fácil domesticação e de programas de melhoramento genético, tornaram-se uma das mais importantes fontes econômicas na agropecuária (HELLMEISTER FILHO et al., 2003).

Se, por um lado, os avanços tecnológicos no campo da nutrição, genética, reprodução, sanidade e ambiência de linhagens modernas de galinhas promoveram o alcance de altos índices de produtividade no sistema de produção industrial, por outro, a ausência de práticas de manejo apropriadas às galinhas naturalizadas, que são predominantes na agricultura familiar (RAMOS et al., 2001), prejudica a viabilidade econômica de sua exploração.

Nesses 500 anos, surgiram nas aves caipiras, a partir de vários ramos genealógicos, diferentes fenótipos em termo de plumagem, porte, hábitos, aptidão e coloração dos ovos. Porém, não se tem ainda a certeza de evidências que confirmem a correlação das variações morfológicas às características de interesse econômico. Essas aves se adaptaram ao clima, ficaram mais resistentes a algumas doenças e se alimentam principalmente de produtos fibrosos, conferindo-lhes características peculiares à carne e aos ovos. O estudo dos caracteres fenotípicos e genotípicos permitiria a obtenção de dados precisos sobre a variabilidade presente nesses indivíduos (NISHIBORI et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivos a avaliação preliminar da variabilidade fenotípica presente nessas aves e a seleção de marcadores moleculares, microsatélites ancorados (ISSR), para análise da variabilidade genética. Esse marcador vem sendo empregado em diversos estudos filogenéticos de populações naturais (HANG; BURTON; BOCKELMAN, 2006; LUQUE et al., 2002; PANARARI, 2006; PHARMAWATI; YAN; FINNEGAN, 2005), destacando-se pelo seu elevado grau de polimorfismo, alta reprodutibilidade e baixo custo, o que poderá corroborar este estudo.

Metodologia

Análise fenotípica

Analísaram-se 300 aves quanto a sua plumagem e 620 ovos, ambos provenientes de indivíduos reproduzidos no aviário-modelo da Embrapa Meio-Norte, durante o período de agosto de 2007 a janeiro de 2008. Os ovos, inicialmente, foram submetidos à assepsia e identificados numericamente, observando-se a data de coleta. A classificação foi realizada por meio da pesagem, da mensuração dos parâmetros morfométricos e da coloração da casca. Os ovos viáveis foram selecionados pelo processo de ovoscopia e, em seguida, incubados artificialmente à temperatura de 37,7 °C e umidade de 65 % durante 21 dias.

Coleta e Extração de DNA

Na análise molecular, as amostras de DNA foram coletadas a partir de penas e pele de galinha caipira reproduzidas no campo experimental da Embrapa Meio-Norte, em Teresina, Piauí. Em seguida, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos e acondicionadas em recipientes de 1,5 mL contendo etanol 100 %, a -20 °C, para conservação do material. A extração foi realizada utilizando-se o protocolo de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico e precipitação em etanol (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A amplificação do DNA, utilizando-se a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), foi visualizada por eletroforese em gel de agarose a 2 %.

Análise de ISSR

Foram analisados 63 primers de ISSR, sintetizados pela University of British Columbia, no Canadá, num volume final de reação de PCR de 20 µL, com os seguintes parâmetros: tampão 1,0 µL [20 mM Tris HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50 % (v/v) glicerol], 2,0 mM MgCl₂, 800 mM dNTP, 0,4 pMol de primer, 1 U de Taq DNA polimerase e 1 µL da amostra de DNA (~100 ng). Os programas específicos das PCRs foram estabelecidos de acordo com as respectivas temperaturas de anelamento dos primers. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Techne Genius ou GeneAmp 2400

Thermal Cycler PCR (Perkin-Elmer), com uma fase inicial de desnaturação a 94 °C por 1,5 minutos, seguida de 42 ciclos nas seguintes condições: 40 segundos para desnaturação a 94 °C; 1 minuto para anelamento (Ta), com a temperatura ajustada de acordo com cada primer; 2 minutos para extensão a 72 °C. A extensão final foi realizada a 72 °C por 5 minutos. Após as reações, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2 %, a 100 V. As bandas produzidas foram fotografadas e posteriormente analisadas para verificação de polimorfismo e tamanho do amplicon (fragmento de DNA gerado por PCR).

Resultados e Discussão

Nas análises fenotípicas, foram obtidos ovos em tons de marrom, branco e azul, e uma variação no peso (Fig. 1 e 2). Quanto à plumagem, a ocorrência de muitos indivíduos híbridos, decorrente de um cruzamento aleatório, apresentando duas ou mais cores, demonstrou a grande variação quanto a esse caráter. Assim, não foi possível realizar a classificação por cores individuais.

No estudo molecular, houve amplificação de dez dos primers testados (UBC-822, UBC-840, UBC-845, UBC-849, UBC-854, UBC-856, UBC-881, UBC-886, UBC-895, UBC-899), sendo obtido um padrão de bandas multialélicas e polimórficas (Fig. 3). O comprimento dos fragmentos obtidos variou de 350 a 2.036 pares de bases. Os resultados mostraram uma média de aproximadamente sete bandas amplificadas por primer, sendo encontradas bandas polimórficas nos diferentes genótipos, como mostra a Tabela 1. Esse polimorfismo, detectado pelo ISSR no DNA de galinhas caipiras, pode inferir a variabilidade genética presente nesses indivíduos (BORNET; BRANCHARD, 2001). Os resultados aqui encontrados mostram-se dentro de um limite satisfatório para o estudo sobre a variabilidade genética, quando comparados com outros trabalhos em animais (ABBOT, 2001; BORBA et al., 2005; MALTAGLIATI et al., 2006) e em algumas plantas (AJIBADE; WEEDEN; CHITE, 2000; HAO et al., 2006; NARAYANAN ET AL., 2006; PHARMAWATI; PATRICK, 2005;), que mostram um padrão de amplificação e polimorfismo semelhante.

É importante mencionar que o estudo fenotípico aliado às análises moleculares permite uma seleção mais

adequada de caracteres desejados, como tolerância a altas temperaturas e resistência a doenças (DEKKERS; HOSPITAL, 2002; RIEGER; CAMPOS; SANTOS, 2006), características presentes nas galinhas caipiras, que provavelmente são decorrentes do cruzamento entre várias raças e da adaptabilidade às condições impostas pelo meio ambiente, e que ainda podem servir de matéria-prima para um futuro trabalho de

melhoramento genético. Entretanto, a seleção de caracteres de interesse pode diminuir essa riqueza em diversidade genética, sendo prejudicial em alguns casos, como a adaptação a determinado meio e a fuga ao predador (RODRIGUES; QUEIROZ; DUARTE, 2006). Assim, é importante melhorar geneticamente as galinhas caipiras, porém, preservando as características peculiares que originaram essa denominação.

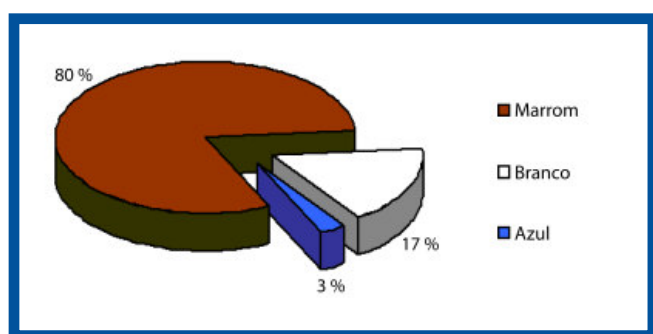


Fig. 1. Distribuição dos ovos de galinhas caipiras por coloração da casca.

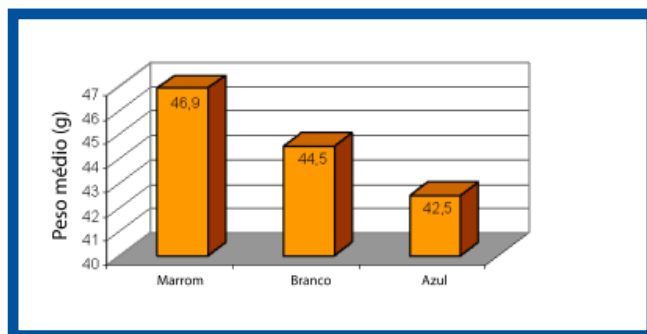
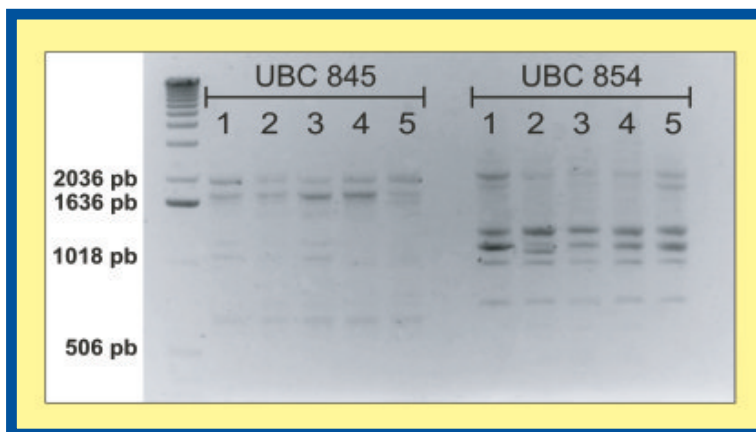


Fig. 2. Peso médio dos ovos de galinhas caipiras reproduzidas na Embrapa Meio-Norte.

Fig. 3. Padrão de amplificação de bandas mostrado pela técnica de ISSR, utilizando-se dois primers.



Primer	Varição no comprimento dos fragmentos (em pb)	Número de bandas	Banda polimórfica
UBC 822	2036 - 800	8	5
UBC 840	1300 - 900	7	4
UBC 845	2036 - 1100	5	1
UBC 849	800 - 506	8	2
UBC 854	2036 - 1200	6	2
UBC 856	2036 - 800	8	4
UBC 881	2036 - 900	4	3
UBC 886	1636 - 700	8	1
UBC 895	2036 - 1018	4	1
UBC 899	1636 - 350	7	4
Total		65	27
Média		6,5	2,7

Tabela 1. Padrão dos fragmentos amplificados pelos dez marcadores ISSR testados.

Conclusão

Tanto os dados fenotípicos quanto o polimorfismo encontrado entre os marcadores moleculares ISSR selecionados indicaram o alto nível de variabilidade genética. A seleção dessas características por meio de análises moleculares poderá auxiliar no isolamento de características de interesse.

Referências

- ABBOT, P. Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). **Journal of Insect Science**, Madison, v. 1, n. 8, p. 1-3, 2001.
- AJIBADE, S. R.; WEEDEN, N. F.; CHITE, S. M. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. **Euphytica**, Wageningen, Holanda, v. 111, n. 1, p. 47-55, Jan. 2000.
- BORBA, R. da S.; GARCIA, M. S.; KOVALESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; CASTELO BRANCO, J. S.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 565-569, July/Aug. 2005.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, n. 3, p. 209-215, Sep. 2001.
- DEKKERS, J. C. M.; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 3, n. 1, p. 22-32, Jan. 2002.
- FUMIHITO, A.; MYIAKE, T.; SUMI, S. I.; TAKADA, M.; OHNO, S.; KONDO, N. One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 91, n. 26, p. 12505-12509, Dec. 1994.
- FUMIHITO, A.; MYIAKE, T.; TAKADA, M.; SHINGU, R.; ENDO, T.; GOJOROBI, T.; KONDO, N.; OHNO, S. Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 93, n. 13, p. 6792-6795, June 1996.
- HANG, A.; BURTON, C. S.; BOCKELMAN, H. Characterization of wild wheat (*Aegilops* L.) and wild barley (*Hordeum* L.) germplasm using intersimple sequence repeat (ISSR) and general DNA primers. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Roma, v. 147, p. 25-28, 2006.
- HAO, B.; LI, W.; LINCHUN, M.; LI, Y.; RUI, Z.; MINGXIA, T.; WEIKAI, B. A study of conservation genetics in *Cupressus chengiana*, an endangered endemic of China, using ISSR markers. **Biochemical Genetics**, New York, NY, v. 44, n. 1/2, p. 29-43, Feb. 2006.
- HELLMEISTER FILHO, P.; MENTEN, J. F. M.; SILVA, M. A. N.; COELHO, A. A. D.; SAVINO, V. J. M. Efeito de genótipo e do sistema de criação sobre o desempenho de frangos tipo caipira. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, supl. 2, p. 1883-1889, 2003.
- LUQUE, C.; LEGAL, L.; STAUDTER, H.; GERS, C.; WINK, M. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). **Hereditas**, Lund, Suécia, v. 136, n. 3, p. 251-253, Sep. 2002.
- MALTAGLIATI, F.; LAI, T.; CASU, M.; VALDESALICI, S.; CASTELLI, A. Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, Inglaterra, v. 34, n. 8, p. 626-634, Aug. 2006.
- NARAYANAN, C.; DUBEY, S.; WALI, S.A.; SHUKLA, N.; KUMAR, R.; MANDAL, A.K.; ANSARI, S.A. Optimization of DNA extraction for ISSR studies in *Tectona grandis* L.f.: an important forest tree species. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 13, p. 1220-1223, July 2006.
- NISHIBORI, M.; SHIMOGIRI, T.; HAYASHI, T.; YASUE, H. Molecular evidence for hybridization of species in the genus *Gallus* except for *Gallus varius*. **Animal Genetics**, Oxford, Inglaterra, v. 36, n. 5, p. 367-375, Oct. 2005.
- PANARARI, R. de S. Variabilidade genética, evidenciada por marcadores nucleares e do genoma mitocondrial, de espécies do gênero *Brycon* (Characiformes: Characidae) de três bacias hidrográficas. 2006. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- PHARMAWATI, M.; YAN, G.; FINNEGAN, P. M. Molecular variation and fingerprinting of *Leucadendron* cultivars (Proteaceae) by ISSR markers. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 7, p. 1163-1170, June 2005.
- RAMOS, G. M.; GIRÃO, E. S.; AZEVEDO, J. N. de; BARBOSA, F. J. V.; MEDEIROS, L. P.; LEAL, T. M.; SAGRILO, E.; ARAÚJO NETO, R. B. de. Modelo de desenvolvimento sustentável para o Meio-Norte do Brasil: sistema Regeneração de agricultura familiar. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2001. 73 p. (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 31).
- RIEGER, T. T.; CAMPOS, S. R. da C.; SANTOS, J. F. dos. A biologia molecular como ferramenta no estudo da biodiversidade. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 11-24, 2006.
- RODRIGUES, F. P.; QUEIROZ, S. A.; DUARTE, J. M. B. Genetic relatedness among wild, domestic and Brazilian fighting roosters. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 83-87, abr./jun. 2006.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v. 1.

Circular Técnica, 46

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Meio-Norte
Endereço: Av. Duque de Caxias, 5.650, Bairro
Buenos Aires, Caixa Postal 01, CEP 64006-220,
Teresina, PI.
Fone: (86) 3089-9100
Fax: (86) 3089-9130
E-mail: sac@cpamn.embrapa.br
1ª edição
1ª impressão (2008): 120 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: Flávio Flavaro Blanco,
Secretária Executiva: Luísa Maria Resende Gonçalves
Membros: Paulo Sarmanho da Costa Lima, Fábio
Mendonça Diniz, Cristina Arzabe, Eugênio Celso Emérito
Araújo, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevêdo, Carlos
Antônio Ferreira de Sousa, José Almeida Pereira e Maria
Teresa do Rêgo Lopes

Expediente

Supervisão editorial: Lígia Maria Rolim Bandeira
Revisão de texto: Francisco de Assis David da Silva
Editoração eletrônica: Jorimá Marques Ferreira