

CONSTRUÇÃO DE UM BANCO DE DNA DE GIR LEITEIRO PARA A VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES APLICADOS AO MELHORAMENTO GENÉTICO

CELESTINO, C.S.¹; COSTA, T. G. da.²; SOUSA, N. F. M.³; LACORTE, G. A.⁴; BASTOS, R. T.⁵; STEINBERG, R.S.⁶; SORIANO-ARAUJO, A.⁷

1 Carina dos Santos Celestino, Bolsista (IFMG) Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMG Campus Bambuí, Bambuí – MG; carinasantos7571@gmail.com

2 Talita Gomes da Costa, Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMG Campus Bambuí, Bambuí - MG

3 Nathan Felipe Morais de Sousa, Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMG Campus Bambuí, Bambuí - MG

4 Gustavo Augusto Lacorte: Pesquisador do IFMG, Campus Bambuí - MG

5 Rafael Teixeira Bastos: Pesquisador do IFMG, Campus Bambuí – MG

6 Raphael Steinberg da Silva: Pesquisador do IFMG, Campus Bambuí - MG

7 Amanda Soriano Araújo Barezani: Pesquisadora do IFMG, Campus Bambuí – MG; amanda.barezani@ifmg.edu.br

Palavras chaves: (Melhoramento genético; DNA; Gir leiteiro; Marcadores Moleculares).

Campus: Bambuí

Área do conhecimento: Biologia Molecular

RESUMO

O presente trabalho tem como principal objetivo a criação de um banco de DNA destinado a pesquisa de bovinos Gir leiteiro aplicadas ao melhoramento genético. O material biológico coletado, é registrado e armazenado para a realização da genotipagem e a utilização dos marcadores moleculares. A aplicação dos marcadores moleculares é de suma importância para a avaliação genética de um animal, contribuindo com a união de melhores características extraídas de cada animal escolhido. A raça de zebuínos Gir leiteiro, são caracterizadas pela alta produção de leite no mundo do agronegócio. Os valores nutricionais contidos no leite contribuem para uma boa saúde, no Brasil o leite é um dos produtos de maior destaque e desempenha importantes funções na sociedade como na geração de empregos e avanço na economia. Diante disso o banco de DNA se tornou uma ferramenta indispensável quando se trata do melhoramento genético. O alto índice de evolução da variabilidade genética verificada nas raças de zebuínos se dá por meio de programas de melhoramento animal, promovendo então características de qualidade na produção, como leite, gordura, proteínas. A genética molecular tem sido uma importante ferramenta que atinge tanto a produtividade quanto o lucro alcançado através do melhoramento. A metodologia para a criação dos dados passa por diferentes etapas até a obtenção do material genético bruto, o protocolo utilizado para o processo é o Salting-out, ao final do procedimento o material biológico deve ser identificado e estocado, as amostras obtidas podem ser armazenadas a longo prazo. Os principais passos do protocolo utilizado, é a obtenção dos leucócitos, adquirindo primeiramente um pellet branco e leitoso. Nos próximos passos é realizado então a obtenção do ácido nucleico (DNA), e para isso é necessário a formação de um pellet de proteína que logo será descartado, e com a ação do etanol obtemos então o material genético que

será diluído em T.E. As análises de genotipagem com a utilização dos marcadores moleculares, realizadas através das amostras obteve um resultado significativo.

INTRODUÇÃO

A criação de um banco de DNA de bovinos da raça Gir leiteiro tem como principal objetivo a análise do material genético dos animais para a verificação de genótipos associados a uma qualidade superior do leite produzido pelo animal. O uso do material genético nesta área, são amplos e importantes para o avanço da ciência. A criação de um banco de DNA, propõem a implementação da montagem do estoque de material da espécie em estudo. Através de marcadores moleculares é possível obter características de um potencial genético de cada indivíduo ou até mesmo de todo o rebanho (EMBRAPA, 2016).

A utilização dos marcadores moleculares permite uma maior segurança e eficácia nos processos de seleção, já que eles podem revelar maior quantidade de características genéticas. Independente dos distintos níveis da expressão gênica, o uso de marcadores moleculares é de grande importância, colaborando com uma análise ampla do genoma (PANDEY *et al.*, 2006).

As distintas raças de bovinos com características genéticas específicas e individuais, tem tido grande importância na produção animal, realizando sistemas de cruzamentos que contém uma grande variabilidade genética, complementando e agrupando as melhores características através do cruzamento, garantindo assim o melhor desempenho do indivíduo e privilegiando os avanços econômicos (MARSON *et al.*, 2005). A produção leiteira no Brasil atingiu uma alta lucratividade, visto que o leite é um importante alimento enriquecido de diversos grupos proteicos, lipídeos, vitaminas e carboidratos, compondo assim uma boa dieta nutricional humana (HAUGE *et al.*, 2007).

A raça zebuína Gir leiteiro apresenta um perfil diferenciado em comparação com outras raças, tanto anatômicas quanto fisiológicas. Chama atenção pela rusticidade e facilidade de se adaptar em diferentes áreas, já que tal raça se originou da Índia. Essa raça vem ganhando espaço no bom temperamento leiteiro, seja em ordenha manual ou mecanizada. Os custos para manter o rebanho em aspectos de alimentação e mão de obra para os devidos cuidados são baixos (ABCGIL, 2015).

O Gir leiteiro vem ganhando destaque pela reprodutividade e produtividade de leite no Brasil. Boa parte da porcentagem da produção de leite no país são de vacas mestiças de gado europeu com gado zebuino, sendo a raça Gir Leiteiro opção favorita dos produtores (ALVIM, *et al.*, 2005; ANDREAZZA, 2006; IBGE, 2007). A importância da produção leiteira aborda aspectos

nutritivos até questões sociais na geração de empregos superando diversos outros setores da economia (ALVIN *et al.*, 2005).

A atividade leiteira no país vem crescendo em larga escala e tomando importantes concepções estruturais. A alimentação do rebanho, quanto a qualidade do leite são aspectos ligados a diversidade nos sistemas de produção (CORRÊA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2009). A produção do leite firmou-se como a principal atividade de renda dos pequenos empresários gerando um grande impacto no desenvolvimento regional (BERRA *et al.*, 2014).

O leite é considerada uma bebida com uma quantidade gratificante de valores nutricionais, uma alta concentração de cálcio, proteínas e vitaminas que tem um importante papel no desenvolvimento e manutenção de uma vida saudável (EMBRAPA, 2002). Quanto a qualidade do leite produzida, pode-se observar diferenças por vários fatores externos como nutricionais, o manejo durante a lactação, a genética dos bovinos, raça (BOWDEN, 1981). Para uma produção de leite adequada e qualitativa no campo é necessário que o bem-estar do animal seja mantido.

O principal objetivo do melhoramento é a união de características do interesse para a obtenção de melhores qualidades. O melhoramento genético tradicional, é realizado através de cruzamentos combinados entre indivíduos, já o melhoramento assistido por marcadores moleculares, são combinações específicas direcionadas, de alelos delimitados por um polimorfismo (BERED *et al.*, 1997).

Portanto, a criação do banco de DNA da raça Gir Leiteiro é de extrema importância para realização de pesquisas e avanços sociais, atingindo a economia e beneficiando tanto os pequenos quanto os grandes produtores rurais. Ofertando para os produtores ferramentas e tecnologia através do uso de marcadores moleculares com a genotipagem do material.

METODOLOGIA

A metodologia utilizada no presente trabalho, para a obtenção das amostras de DNA, para a criação do banco de DNA é de acordo com o protocolo de extração *Salting-out*. A coleta do material biológico (sangue periférico) é realizada manualmente em diferentes fazendas de Gir Leiteiro Puro de Origem participantes do PNMGL do estado de Minas Gerais, armazenadas em tubo Vacutainer com anticoagulante EDTA e o sangue é encaminhado até o Laboratório de Biologia Molecular do IFMG - campus Bambuí onde a extração e análises das mesmas são feitas.

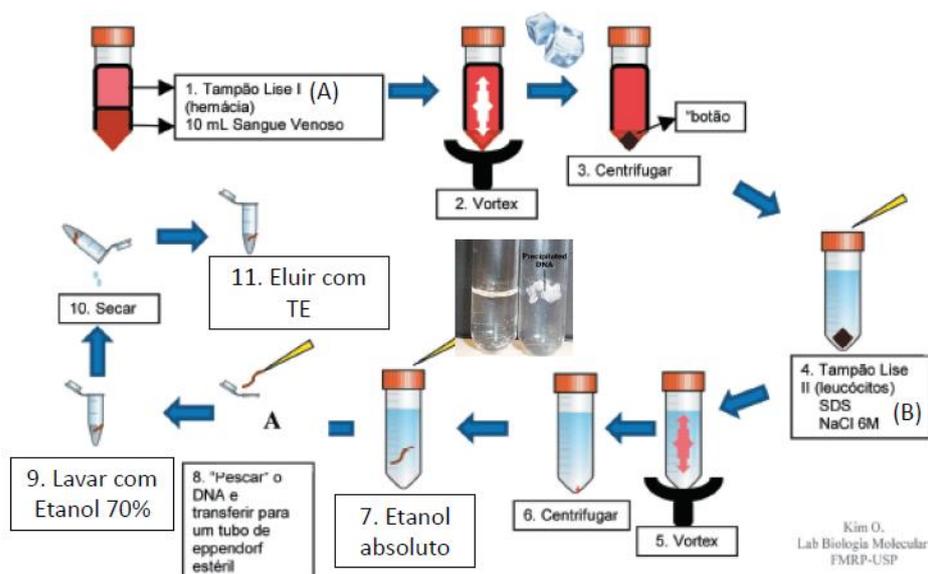
No momento em que o material genético chega ao laboratório, o primeiro passo a ser realizado é o Processo de cadastramento das amostras. O cadastramento do animal é de grande importância tanto para o fazendeiro, que sede o material para pesquisa quanto para o

pesquisador, que irá fazer a genotipagem. O animal é cadastrado com duas identificações; a primeira com a identificação de origem e a segunda com a identificação que ele recebe do laboratório. É importante que seja cadastrado a raça, zebuíno Gir leiteiro e a fazenda a qual pertence.

O processo de extração segue o protocolo de *Salting-out* (OLIVEIRA *et.al.*, 2007), que é um protocolo de extração com precipitação salina, com alta concentração de sais, processo muito importante para separação de matérias biológicas presente no sangue. (Passos importantes do protocolo pode ser analisado na Figura 01).

A extração do DNA é processada em dois dias, o primeiro dia envolve a obtenção dos leucócitos. O material coletado é transferido para tubos de polipropileno de 15 mL identificados, onde será realizado diversas lavagens com uma solução de tampão de hemólise, até obter somente células brancas, ou seja, um *pellet* branco e leitoso. No segundo dia temos a obtenção do DNA, onde o *pellet* é suspenso por uma solução tampão de digestão contendo o detergente SDS e proteinase K, que após algumas horas no banho maria a 65°C e uma centrifugação forma um *pellet* de proteína, o sobrenadante portanto é transferido para novos microtubos identificados, e o *pellet* de proteína é descartado. O etanol gelado atua nas moléculas de DNA unindo-as formando uma massa esbranquiçada, precipitando o DNA. O pellet de DNA formado pela centrifugação da amostra precipitada é secado na estufa a 65°C e em seguida é adicionado o tampão TE para a eluição do DNA. Ao finalizar a extração a amostra é armazenada a 4°C.

Figura 01: Esquema do protocolo de precipitação salina. Para extração de DNA genômico

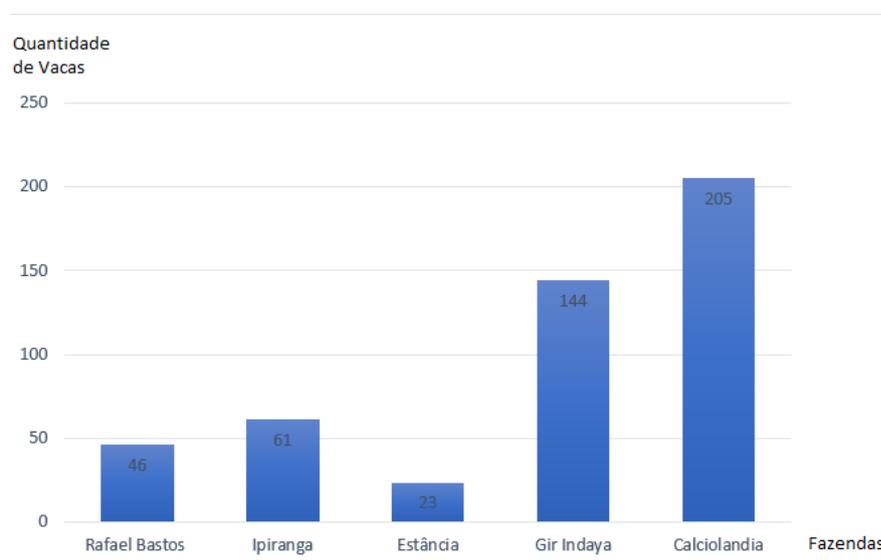


A figura 01 detalha os passos que são seguidos pelo protocolo. 1 Lisar os glóbulos vermelhos acrescentando a solução Tampão de Hemólise; 2 Homogeneizar, e colocar em banho de gelo para aumentar a lise; 3 Centrifugar, obtendo assim as células brancas (Pellet); 4 Ressuspender o pellet com a solução Tampão de Digestão, acrescentando a proteinase k; 5 Homogeneizar novamente; 6 Centrifugar, obtendo assim um pellet de proteína que será descartado; 7 Adicionar etanol absoluto para a precipitação do DNA; 8 Transferir o DNA para um microtubo devidamente identificado; 9 Lavagem com etanol 70%; 10. Colocar os tubos para secar na estufa; 11 Eluir o material genético com TE.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

No desenvolvimento deste trabalho, o banco de DNA bovino das raças Gir leiteiro do Laboratório de Biologia Molecular do IFMG campus - Bambuí conta com atualmente 479 amostras extraídas. Cada amostra contém em média um volume de 200 microlitros em uma concentração geral de 400 ng de DNA por μL de amostra. A coleta foi realizada em 5 distintas fazendas do estado de Minas Gerais até o momento (Gráfico 01), com o intuito de diversificar as amostras e obter resultados de genotipagem comparativos.

Gráfico 01: Relação da quantidade de amostras coletadas de zebuínos Gir leiteiro por fazenda.



Com a criação deste banco de DNA diversas genotipagens das amostras começaram a ser realizadas por nosso grupo de pesquisa. As primeiras análises produzidas estão sendo a genotipagem de polimorfismos em genes codificadores de proteínas do leite, como a Beta-Caseína e em genes codificadores de hormônios como o polimorfismo no gene da Tiroglobulina, obtendo resultados de larga aplicabilidade.

CONCLUSÃO

A partir dos procedimentos realizados e o objeto de análise adquirido concluímos que a criação do banco de DNA é um instrumento de grande funcionabilidade que obtemos na atualidade. Através da estocagem de amostras que podem ser armazenadas a longo prazo, pode-se obter de forma precisa, importantes resultados de genotipagem da área de estudo em questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VERNEQUE, Rui da Silva et al. **Melhoramento Genético de Gado de Leite no Brasil**. Disponível em: <<http://sbmaonline.org.br/anais/viii/palestras/pdfs/7.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2019.

CRUZ, Izinara Rosse da. **Aplicação marcadores moleculares para análise de diversidade genética no cromossoma Y de bovinos da raça Guzerá**. 2011. Disponível em: <<http://www.pggenetica.icb.ufmg.br/defesas/158M.PDF>>. Acesso em: 05 jul. 2019.

CAMPOS, Miguel Angello da Silva Fernandes. **Caracterização genética de vacas leiteiras por meio de marcadores moleculares e suas implicações na composição e qualidade do leite**. 2011. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/17175/1/MiguelASFC_DISSERT.pdf>. Acesso em: 05 jul. 2019.

DINIZ, Fernando. **Novas ferramentas genômicas mudam a cara do melhoramento genético**. 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/21255873/novas-ferramentas-genomicas-mudam-a-cara-do-melhoramento-genetico>>. Acesso em: 05 jul. 2019.

SANTOS, Fabrício R. et al. **Bancos de DNA: coleções estratégicas para estudos da biodiversidade**. 2002. Disponível em: <<http://labs.icb.ufmg.br/lbem/pdf/bancodedna.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2019.

MATTE, Ursula; GOLDIM, Jose Roberto. **Banco de DNA**. 1999. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/bioetica/bancodn.htm>>. Acesso em: 05 jul. 2019.

VILELA, Duarte. **A importância econômica, social e nutricional do leite**. 2002. Disponível em: <<http://www.nupel.uem.br/importancia.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2019.

CARVALHO, Limirio de Almeida et al. **Importância econômica**. 2002. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html>>. Acesso em: 05 jul. 2019.

HAUG, A.; HOSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids Health Dis.**, v. 6, p.25, 2007.

OLIVEIRA, Márcia Cristina de Sena et al. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de dna por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase.** 2007. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2019.

BERED, Fernanda et al. **MARCADORES MOLECULARES E SUA APLICAÇÃO NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS.** 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781997000300026>. Acesso em: 05 jul. 2019.