

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL

**DESENVOLVIMENTO E UTILIZAÇÃO DE MARCADORES  
MICROSSATÉLITES EM PERDIZES (*Rhynchotus  
rufescens*) E OUTROS TINAMÍDEOS**

Dimas Oliveira Santos  
Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL

**DESENVOLVIMENTO E UTILIZAÇÃO DE MARCADORES  
MICROSSATÉLITES EM PERDIZES (*Rhynchotus  
rufescens*) E OUTROS TINAMÍDEOS**

Dimas Oliveira Santos

Orientador: Prof. Dr. Humberto Tonhati

Co-orientador: Prof Dr. Renato Caparroz

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

JABOTICABAL – SP

Fevereiro de 2011

S237d Santos, Dimas Oliveira  
Desenvolvimento e utilização de marcadores microsatélites em  
perdizes (*Rhynchotus rufescens*) e outros Tinamídeos / Dimas Oliveira  
Santos. -- Jaboticabal, 2011  
xvi, 72 f. : il. ; 28 cm

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Humberto Tonhati

Co-orientador: Renato Caparroz

Banca examinadora: José Maurício Barbanti Duarte, Sandra Aidar de  
Queiroz, Leonardo de Oliveira Seno, Marcelo Cervini

Bibliografia

1. Clonagem. 2. Polimorfismos genéticos. 3. Transferabilidade. 4.  
Inferência bayesiana. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.124:636.082

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**DIMAS OLIVEIRA SANTOS** – filho de Florisvaldo Jose dos Santos e Valdelice Oliveira Santos, nasceu no dia 08 de fevereiro de 1963, na cidade de São Paulo, estado de São Paulo. Formado em Zootecnia em 1986 pela Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais. Obteve o título de mestre no ano de 2002, junto ao Programa de pós-graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, na Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilheus-Ba, trabalhando com nutrição de caititus (*Tayassu tajacu*) sob orientação da Prof<sup>o</sup>. Dr Sergio Luis Gama Nogueira Filho. No ano de 2007 iniciou o doutorado no Programa de pós-graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof<sup>o</sup>. Dr. Humberto Tonhati e co-orientação do Professor Renato Caparroz. Atualmente é professor Assistente na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, onde ministra as disciplinas de Melhoramento Animal Aplicado e criação de animais silvestres e de biotérios no Campus de Itapetinga – BA, instituição em que leciona desde 1989. No dia 22 de fevereiro de 2011, submeteu-se ao exame de defesa da tese de doutorado intitulada “Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélites em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) e outros tinamídeos”, para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

“O ser humano quando guiado pelo sentido da beleza, transpõe o acontecimento fortuito para fazer dele um tema que em seguida fará parte da partitura da vida. voltará ao tema repetindo-o, modificando-o, desenvolvendo-o, transformando-o como faz o compositor com os temas de uma sonata”

Milan Kundera

## **Ofereço**

À minha esposa Maria Helena e minha filha Clara, e aos meus pais, Florisvaldo e Valdelice, pelo amor, confiança e apoio dispensados em todos esses anos de vida e estudos. Por terem sempre me acompanhado, sofrendo e sonhando junto comigo, muitas vezes deixando de lado seus compromissos e não medindo esforços para contribuírem nas realizações de meus sonhos, da mesma forma, sempre acreditando nos meus objetivos e nunca duvidando da minha capacidade e dedicação.

Aos meus irmãos Ari, Carlos, Cida, Gal, Con e Rogério por sempre terem me incentivado a buscar meus sonhos e, por vocês serem sempre tão especiais para mim.

Obrigado por tudo e lembrem-se que Amo muito vocês!

## **Dedico**

À Dona Lili

Não poderia deixar de expressar o amor e a gratidão que tenho pela mulher guerreira, mãe e esposa dedicada, que mesmo diante das adversidades enfrentadas, não poupou esforços para criar de forma exemplar os sete filhos e netos, e que nos dias de hoje, demonstra a força e a garra de continuar viva enfrentando a doença que lhe acomete.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pai todo poderoso, criador do céu e da terra

Ao meu guia e protetor, sempre presente em minha vida

À minha esposa e minha filha pela compreensão e apoio diante das dificuldades impostas pela distância e pelo tempo de afastamento

Aos meus pais que enxergaram a educação, como base para o crescimento pessoal e para a conquista da liberdade, pautando sempre na dignidade e na honestidade.

Aos meus irmãos e cunhados presentes em todos os momentos da minha vida.

À minha sogra Dona Nice, a quem tenho muita estima e consideração

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia -UESB e ao Departamento de Tecnologia Rural e Animal-DTRA, pela liberação e apoio para cursar o doutorado.

À Universidade Estadual Paulista Campus de Jaboticabal a ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao meu orientador Prof Humberto Tonhati pela confiança, apoio, ensinamentos, aconselhamentos e principalmente pela amizade.

Ao meu co-orientador Prof Renato Caparroz e família, pelos ensinamentos, pela amizade, atenção e ajuda que prestou durante a execução deste trabalho.

À Embrapa Sudeste, na pessoa da Dra Luciana Regitano, onde galguei os primeiros passos na Biologia Molecular

Ao CBMEG/UNICAMP, na pessoa da professora Anete Pereira, que contribuiu de forma significativa na obtenção dos resultados alcançados

Ao ICB/UFG onde tive a oportunidade de dar seqüência às minhas análises e também de conhecer pessoas

Ao Professores Maurício Barbanti, Sandra Queiroz, Leonardo Seno, Marcelo Cervini e Fabio Pablos pelas sugestões e correções da tese apresentada.

Aos funcionários João, Paulo Tosta, Iris, Beterraba e Turquinho

Ao amigo Severino Cavalcanti (Cabeção) pelos conselhos, amizade e atenção dispensada sempre que solicitada.



Aos amigos Henry Cadavid, Francisco, Raul Auspilcueta, Herymá, Sandro, Leonardo, Luis Henrique, Naudin, Daniele, Luiz Gabriel, Daniel, Diogo, Juana, Fernanda Monsalves, Marcelo Cervini, Gregório, Patrícia, Enrique, Milene e Diercles pelos agradáveis momentos de convívio.

Á todos os colegas do “Departamento de Zootecnia e Melhoramento Animal” pelo companheirismo e pela agradável convivência.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	1
Objetivos .....	5
Objetivo geral:.....	5
Objetivos específicos.....	5
Síntese bibliográfica .....	6
Descrição das espécies estudadas .....	6
Perdiz ( <i>Rhynchotus rufescens</i> – TEMMINCK, 1815).....	7
Macuco ( <i>Tinamus solitarius</i> - VIEILLOT, 1819) .....	8
Azulona ( <i>Tinamus tao</i> - TEMMINCK, 1815).....	8
Jaó ( <i>Crypturellus undulatus</i> - TEMMINCK, 1815).....	9
Inhambu-xororó ( <i>Crypturellus parvirostris</i> - WAGLER, 1827).....	9
Inhambu-xintã ( <i>Crypturellus tataupa</i> - TEMMINCK, 1815) .....	10
Inhambu-guaçu ( <i>Crypturellus obsoletus</i> -TEMMINCK, 1815).....	10
Inhambu-chororão ( <i>Crypturellus variegatus</i> - GMELIN, 1789).....	10
Zabelê ( <i>Crypturellus noctivagus</i> - WIED-NEUWIED, 1820).....	11
Marcadores moleculares na conservação de espécies .....	12
Marcadores microssatélites (STRS).....	14
Referências.....	17
CAPÍTULO 2 UTILIZAÇÃO DE PRIMERS HETERÓLOGOS NA DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PERDIZES ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ) E OUTROS TINAMÍDEOS.....	27
Introdução .....	28
Materiais e método .....	30
Resultados e discussão.....	35
Conclusões .....	37

Referências.....	37
CAPÍTULO 3 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE <i>PRIMERS</i> DE MICROSSATÉLITES PARA AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PERDIZES ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ) E OUTROS TINAMÍDEOS.....	41
Introdução.....	42
Materiais e métodos.....	44
Resultados e discussão.....	49
Conclusão.....	55
Referências.....	55
CAPITULO 4 ESTUDO GENETICO-QUANTITATIVO DE CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS, PONDERAIS E COMPORTAMENTAIS EM PERDIZES, UTILIZANDO DE INFERÊNCIA BAYESIANA.....	61
Introdução.....	62
Materiais e métodos.....	63
Resultados e discussão.....	65
Conclusões.....	70
Referências.....	71

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Figura 1 Classificação taxonômica da família tinamidae (Myers et al., 2008)... 6

Figura 2 Espécies de tinamídeos: a) *Rhynchotus rufescens*; b) *Tinamus solitarius*; c) *Tinamus tao*; d) *Crypturellus undulatus*; e) *Crypturellus parvirostris* ; f) *Crypturellus tataupa* g) *Crypturellus obsoletus*; h) *Crypturellus variegatus* e; j) *Crypturellus noctivagus*..... 12

### CAPÍTULO 2 UTILIZAÇÃO DE PRIMERS HETERÓLOGOS NA DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PERDIZES (*Rhynchotus rufescens*) E OUTROS TINAMÍDEOS

Figura 1 Resultados de PCR *primers* CAU14 e o CAU17 Corrida em gel de agarose 2 % - Tm = 56° C. As amostras seguem a seguinte ordem: L - corresponde ao ladder de 1kb; 1 e 2 - amostras de DNA de perdizes utilizando-se o *primer* CAU 14; 3 e 4 - amostras com o *primer* CAU 17; 5 a 7 - amostras de DNA de avestruz utilizando-se o *primer* CAU 14; 8 e 9 amostras com o *primer* CAU 17 utilizando-se DNA de avestruzes..... 35

Figura 2 Resultados de PCR em amostras de perdizes amplificadas com o *primer*, Tm 54°C. Corrida em gel de agarose 2 %. As amostras seguem a seguinte ordem: 1 a 11 - amostras de DNA de perdizes utilizando-se o *primer* E101; C – controle negativo; L – Ladder de 1kb. 36

CAPÍTULO 3 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *PRIMERS* DE MICROSSATÉLITES PARA AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PERDIZES (*Rhynchotus rufescens*) E OUTROS TINAMÍDEOS

- Figura 1 Corrida em gel de agarose 1,5 %, corado com Brometo de Etídeo - Resultados de PCR primers de microssatélites para Perdizes 60° C. A distribuição das amostras segue a seguinte ordem: L - *ladder* de 1kb; 1 e 2 - *primer* 8A; 3 e 4 - *primer* 12A ; 5 e 6 - *primer* 12B; 7 e 8 - *primer* 09D; 9 e 10 - *primer* 10D; 11 e 12 - *primer* 09C; 13 e 14 - *primer* 03D; 15 e 16 - *primer* 11D; 17 18 - *primer* 04F; 19 e 20 - *primer* 10F, 21 e 22 -*primer* 12F; 23 e 24 - *primer* 03G; 25 e 26 - *primer* 06G; 27 e 28 - *primer* 11G; 29 e 30 - *primer* 12G e 31 e 32 - *primer* 05H..... 50
- Figura 2 Frequência dos alelos para cada primer de microssatélite: a) RruGT12A; b) RruGT06G;c) RruGT12B e;d) RruGT10D..... 53

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2 UTILIZAÇÃO DE *PRIMERS* HETERÓLOGOS NA DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PERDIZES (*Rhynchotus rufescens*) E OUTROS TINAMÍDEOS

Tabela 1	Relação dos tinamídeos e locais de coleta das amostras analisadas nesse estudo .....	31
Tabela 2	Relação dos <i>locos</i> selecionados de avestruzes ( <i>Struthio camelus</i> ) para análise de transferabilidade em perdiz e outros tinamídeos .....	33
Tabela 3	Relação dos <i>locos</i> selecionados de inhambu da cabeça vermelha ( <i>Tinamus major</i> ) para análise de transferabilidade em perdiz e outros tinamídeos .....	34
Tabela 4	Amplificação em amostras de DNA de diferentes espécies de tinamídeos utilizando pares de primers desenhados para <i>Tinamus major</i> .....	36

### CAPÍTULO 3 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *PRIMERS* DE MICROSSATÉLITES PARA AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PERDIZES (*Rhynchotus rufescens*) E OUTROS TINAMÍDEOS

Tabela 1	Relação dos tinamídeos e locais de coleta das amostras .....	45
Tabela 2	Descrição dos <i>primers</i> , variabilidade alélica de 8 <i>locos</i> de microsatélites desenvolvidos para perdizes ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ), incluindo nome do <i>locos</i> , número de acesso, sequências do <i>primer</i> , motivo de repetição, temperatura de hibridização (T), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho), tamanho do fragmento, equilíbrio Hardy–Weinberg (EHW) <i>P</i> value, Conteúdo de polimorfismo informativo (PIC) e	

	probabilidade de não exclusão de paternidade – primeiro pai (NE-1P).....	51
Tabela 3	Transferabilidade em amostras de DNA de diferentes espécies utilizando <i>primers</i> desenhados para <i>Rhynchotus rufescens</i> e respectivas temperaturas de hibridização.....	53
Tabela 4	Genotipagem dos animais pertencentes a uma família de perdizes utilizando <i>primers</i> de microssatélites .....	54
<p style="text-align: center;">CAPITULO 4 ESTUDO GENETICO QUANTITATIVO DE            CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS, PONDERAIS E            COMPORTAMENTAIS EM PERDIZES, UTILIZANDO DE            INFERÊNCIA BAYESIANA</p>		
Tabela 1	Descrição do banco de dados utilizados nas análises de estimação de parâmetros genéticos.....	64
Tabela 2	Estatísticas descritivas das distribuições posteriores das estimativas de variância genética, residual e herdabilidade das características estudadas .....	67
Tabela 3	Estatísticas descritivas das distribuições posteriores das estimativas de correlação genética entre as características estudadas.....	69
Tabela 4	Estatísticas descritivas das distribuições posteriores das estimativas de correlação residual entre as características estudadas.....	70

**TÍTULO: DESENVOLVIMENTO E UTILIZAÇÃO DE MARCADORES  
MICROSSATÉLITES EM PERDIZES (*Rhynchotus rufescens*) E OUTROS  
TINAMÍDEOS**

**RESUMO-** A Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Jaboticabal desenvolve há vários anos pesquisas na área de animais silvestres, contribuindo dessa forma na conservação e produção de espécies ameaçadas de extinção. Uma dessas espécies estudadas para fins científicos, a perdiz (*Rhynchotus rufescens*), apresenta potencialidades para a produção comercial em cativeiro. Com o objetivo de determinar polimorfismos genéticos nessa espécie e em outras espécies de tinamídeos, foram desenvolvidos 16 pares de *primers* de microssatélite para a perdiz a partir de biblioteca genômica enriquecida com microssatélites. A fim de se verificar a amplificação cruzada em perdiz e em outros tinamídeos foram utilizados 10 pares de *primers* desenvolvidos para avestruzes (*Struthio camelus*) e outros 10 pares desenvolvidos para o inhambú-da-cabeça-vermelha (*Tinamus major*). Dos 16 locos desenvolvidos para perdiz, 8 apresentaram sucesso na amplificação nessa espécie e apenas cinco amplificaram em outros tinamídeos. Foi realizada a genotipagem em 26 amostras de perdizes e obtidas estimativas relacionadas ao percentual de locos polimórficos (50%), número médio de alelos por loco (5,75), conteúdo polimórfico informativo médio (0,62) e diversidade genética esperada (0,69). Quanto ao teste de transferabilidade, dos pares de *primers* desenvolvidos para *T. major*, somente um apresentou amplificação específica em perdizes, sendo observadas taxas de amplificação cruzada de 100 e 70% para macuco (*Tinamus solitarius*) e para a azulona (*Tinamus tao*), respectivamente. As amplificações nos demais tinamídeos ficaram restritas a cinco locos de microssatélites. Com o uso de programas computacionais e de análises estatísticas, foram estimados parâmetros genéticos e fenotípicos de características morfométricas em perdizes, visando conhecer



melhor a estrutura dessas aves, assim como obter possíveis correlações com características de produção.

**Palavras-chave** – Clonagem, herdabilidade, heterozigosidade, polimorfismo genético, transferabilidade, inferência bayesiana

**TITLE: DEVELOPMENT AND USE OF MICROSATELLITE MARKERS IN THE RED-WINGED TINAMOU (*Rhynchotus rufescens*) AND OTHER TINAMOUS**

**ABSTRACT** - The São Paulo State University UNESP, Jaboticabal campus has for several years research with wild animals, contributing for the preservation and production of the species threatened by extinction. One of these species is the red-winged-tinamou (*Rhynchotus rufescens*), that has potential for production in captivity. The aim of the study was to determine genetic microsatellite polymorphisms in this species and other tinamous species. Sixteen microsatellite primer pairs were developed for the red-winged-tinamou from a genomic library enriched with microsatellites. In order to verify the cross amplification for the tinamous species we used 10 pairs of primers designed for ostriches (*Struthio camelus*) and 10 pairs developed for *Tinamus major*. From the 16 loci developed for red-winged-tinamou, 8 amplified in this species and only five amplified in other Tinamous. Genotyping was performed on 26 samples and estimates related to the percentage of polymorphic loci (50%), average number of alleles per locus (5.75), polymorphic information content (average 0.62) and expected genetic diversity (0.69). In order to test the transferability of the primer pairs developed for *T. major*, only one had a specific amplification in partridges, with observed rates of cross-amplification of 100 and 70% for macuco (*Tinamus solitarius*) and the azulona (*Tinamus tao*), respectively. The amplifications in other tinamous were restricted to five microsatellite loci. With the use of computer programs and statistical analysis, we estimated genetic and phenotypic parameters of morphometric characteristics in red-winged-tinamou, in order to better understand the structure of these birds, as well as for possible correlations with production traits.

**Keywords** – Bayesian inference, cloning, genetic polymorphisms, heterozygosity, heritability and transferability

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

A fauna silvestre como recurso natural sempre esteve presente em todo processo de desenvolvimento da humanidade, sendo uma das principais razões da condição nômade do homem primitivo, que na busca por alimentos e vestimentas, acompanhava o movimento dos rebanhos.

Ainda hoje, a carne de animais silvestres pode ser considerada a principal fonte de proteína animal para subsistência em regiões carentes da África, Ásia e América Latina. No Brasil, principalmente nas zonas rurais, é muito utilizada por populações carentes, tanto para a subsistência quanto para geração de renda através da sua comercialização. REDFORD & ROBINSON (1987) estimaram um total de 57 milhões de animais caçados e mortos na Amazônia brasileira, considerando a caça de subsistência e comercial.

Além da caça predatória, outras atividades como a agricultura e a pecuária, o desmatamento e a poluição de ambientes aquáticos e terrestres têm ocasionado sérios impactos aos animais.

A fragmentação dos ecossistemas, promovendo o isolamento de populações naturais, tem como principal consequência, a diminuição da variabilidade genética devido ao aumento dos acasalamentos endogâmicos. Estudos realizados por FRANKHAM (1998) relacionam o aumento do risco de extinção como consequência do aumento da endogamia. Este processo é mais pronunciado em populações isoladas em ilhas e que apresentam menores taxas reprodutivas do que as populações continentais, além disso, a baixa variabilidade genética de populações isoladas as torna mais susceptíveis ao processo de deriva genética, ou seja, as variações ambientais e demográficas de natureza estocástica (FRANKHAM, 1997). A depressão endogâmica pode influenciar diretamente o tamanho efetivo da população, que a depender da estrutura populacional pode levar à extinção local ou completa da espécie (HEDRICK, 2001).

Com o uso de técnicas apropriadas é possível elaborar estratégias de preservação e recuperação ambiental, visando retardar o processo de depressão endogâmica ou reduzir as consequências catastróficas do mesmo (SANTOS et al., 2004).

Neste sentido, o uso de produtos provenientes de espécies silvestres de forma responsável e atentando aos aspectos da sustentabilidade, poderá agregar valor à biodiversidade. Assim a criação de animais silvestres para fins comerciais tem se constituído numa boa alternativa de conservação de espécies silvestres, concorrendo com a caça ilegal, além de proporcionar a geração de emprego e renda. A carne de espécies silvestres é considerada especiaria em muitos restaurantes e supermercados, sendo muito valorizada, principalmente em grandes centros consumidores (NOGUEIRA-FILHO & NOGUEIRA, 2000).

Não existem dados precisos sobre o total de carne de animais silvestres comercializada no Brasil, nem do total de criatórios destinados à produção comercial. Estimativas apontam a capivara como a espécie mais comercializada, seguida da ema, jacaré, caititu, queixada, cutia e paca (GIANNONI, 2001).

SANTOS et al. (2009), trabalhando com criatórios de caititus (*Pecari tajacu*), demonstraram ser viável economicamente a criação comercial destes animais, desde que sejam atendidas condições básicas de legislação, criação e comercialização.

Em estudos realizados no Canadá com uma espécie de Tinamídeo (*Nothoprocta perdicaria*) nativo do Chile, AGGREY et al. (1992) constataram que apesar do maior tempo para o abate em relação às aves comerciais, aquelas aves apresentaram bom peso e excelente rendimento de carcaça. Esforços semelhantes foram conduzidos por GARITANO-ZAVALA (2004) no sentido de viabilizar a criação em cativeiro de outro tinamídeo encontrado na Bolívia, denominado localmente de pisacca (*Nothoprocta ornata*).

Dentre as várias espécies que podem ser utilizadas em criatórios comerciais, encontra-se a perdiz (*Rhynchotus rufescens*). Características

relacionadas à produção e à reprodução vêm sendo pesquisadas desde 1989 no Setor de Animais silvestres da FCAV/UNESP.

Em pesquisa realizada por MORO et al. (2006), comprovou-se que a carne de peito da perdiz apresenta excelente valor nutritivo, com baixos níveis de colesterol, rendimentos de carcaça de 74,37 % e de peito da ordem de 36,65%, o que atende as exigências do mercado consumidor. Em trabalhos realizados com perdiz (*Rhynchotus rufescens*), BRUNELI et al. (2005) estudaram fatores relacionados ao ciclo reprodutivo destas aves, determinado época e horário de maior postura de ovos. Da mesma forma, CROMBERG et al. (2007), com o objetivo de conhecer aspectos reprodutivos de perdizes, estudaram a relação macho:fêmea, a estrutura sócio-hierárquica e outras características comportamentais, com vistas à adaptação em cativeiro.

Apesar da grande potencialidade da criação comercial de perdizes, por se tratar de uma espécie em processo de domesticação, algumas características necessitam ser trabalhadas do ponto de vista zootécnico. Um estudo realizado por HATA (2009) demonstrou a relação existente entre a adaptação das perdizes ao cativeiro e o tempo de imobilidade tônica desses animais, característica esta associada ao estresse.

Como podemos observar, diversas pesquisas foram realizadas nas áreas de produção, nutrição, comportamento e bem estar pela Instituição, com o intuito de levantar estas potencialidades. Neste sentido as pesquisas na área de genética e melhoramento são necessárias para caracterização da espécie e determinação da diversidade genética de populações naturais e cativas.

O capítulo dois do presente estudo aborda a utilização de marcadores microssatélites em perdizes e outros tinamídeos, através do uso de *primers* heterológos desenhados para avestruz (*Struthio camelus*) e para o inhambu de cabeça vermelha (*Tinamus major*). No capítulo três foram desenvolvidos e caracterizados *primers* de microssatélites especificamente para perdiz. Também verificamos a transferabilidade destes marcadores em outros tinamídeos, como o Macuco (*Tinamus solitarius*), o Zabelê (*Crypturellus notivagus*), a azulona

(*Tinamus tao*), o inhambu-chitã (*Crypturellus tataupa*), o inhambu-xororó (*Crypturellus parvirostris*), o inhambu-xororão (*Crypturellus variegatus*), o inhambu-guaçu (*Crypturellus obsoletus*) e o Jaó do interior (*Crypturellus undulatus*).

Com o uso de programas computacionais e de análises estatísticas, no capítulo quatro, estimamos parâmetros genéticos e fenotípicos das características comprimento da asa, do bico e do tarso, assim como da largura e da altura do bico e da cabeça em perdizes, visando conhecer melhor a estrutura morfométrica dessas aves, assim como obter possíveis correlações com características de interesse zootécnico.

## **Objetivos**

### **Objetivo geral:**

- Selecionar conjunto de locos de microssatélites para realização de estudos genéticos populacionais em perdiz e outros tinamídeos

### **Objetivos específicos**

- Analisar a tranferabilidade de pares de *primers* heterólogos para amplificação de locos microssatélite em perdiz e outras espécies de tinamídeos;
- Identificar locos de microssatélite no genoma de perdiz
- Desenhar pares de primers específicos para amplificação de locos microssatélite em perdiz;
- Verificar a transferabilidade desses pares de primers de perdiz na amplificação cruzada em diferentes espécies de Tinamidae e
- Estimar componentes de (co)variância e parâmetros genéticos em características morfométricas de perdiz

## Síntese bibliográfica

### Descrição das espécies estudadas

Os tinamídeos, juntamente com as ratitas, são considerados as aves mais antigas do continente sul americano, com registros fósseis de 10 milhões de anos na Patagônia, e em registros encontrados em cavernas no Brasil, que datam 20 mil anos. São classificados taxonomicamente como pertencentes à classe Aves, ordem Tinamiformes composta por uma única família Tinamidae, dividida em duas subfamílias, a Tinaminae e a Rhynchotinae (SILVEIRA et al., 2001).

A subfamília Tinaminae compreende os gêneros *Tinamus*, *Tinamotis*, *Nothocercus* e *Crypturellus*, tendo como habitat natural o chão de florestas tropicais e subtropicais. A subfamília Rhynchotinae compreende espécies dos gêneros *Nothoprocta*, *Rhynchotus*, *Nothura*, *Eudromia* e *Taoniscus*, habitando principalmente as regiões campestres (DISLICH, 2007). A classificação taxonômica da família Tinamidae está representada na figura 1.

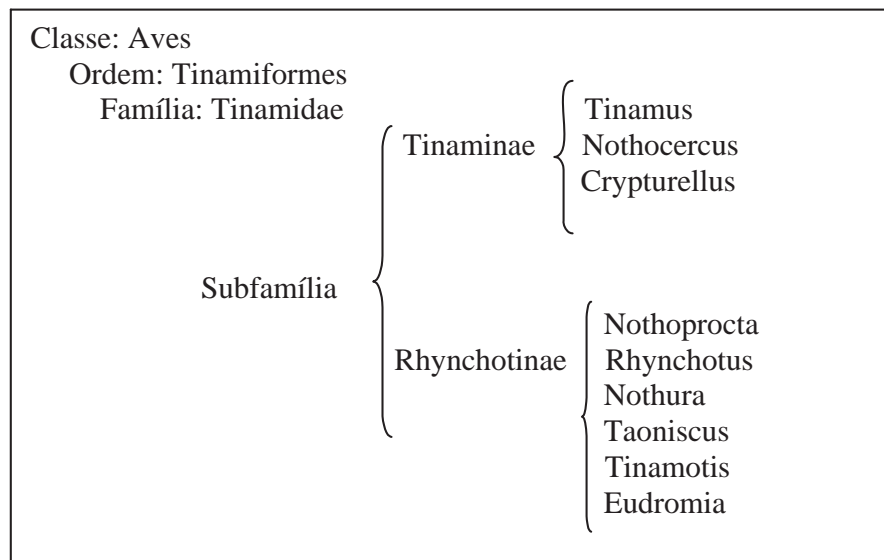


Figura 1 - Classificação taxonômica da família tinamidae (Myers et al., 2008).



Em decorrência da grande variação inter-específica que ocorre, principalmente em gêneros como *Tinamus*, *Crypturellus* e *Nothura*, a taxonomia da família é bastante complexa, levando muitas vezes a erros no estabelecimento dos táxons (AMARAL & SILVEIRA, 2004).

Estudos realizados por BERTELLI & PORZECANSKI (2004), utilizando análises morfológicas e marcadores moleculares, classificaram filogeneticamente 47 espécies distribuídas em nove gêneros. Apresentam como característica principal a dificuldade de vôo. A sua distribuição geográfica abrangem o noroeste do México ao sul da Argentina (SICK, 1997), ocupando os mais diferentes ambientes terrestres, como as elevadas altitudes dos desertos andinos, até a Mata Atlântica com baixas altitudes. Embora represente uma importante ordem nos mais variados ecossistemas brasileiros, poucas pesquisas foram realizadas para se conhecer melhor os tinamídeos brasileiros. A seguir são descritos os tinamídeos utilizados no presente estudo de acordo com informações disponíveis em SICK (1997), SIGRIST (2006) e IUCN (2010).

### **Perdiz (*Rhynchotus rufescens* – TEMMINCK, 1815)**

Considerado o maior tinamídeo campestre nacional com ampla distribuição geográfica no continente americano, é também conhecida no Brasil como perdigão (sul do Brasil) ou inhambupé (NE do Brasil). São aves de aparência galinácea com plumagem de coloração castanho claro, salpicado de preto e branco com forte mimetismo defensivo.

Os adultos medem entre 35 e 37 cm, com peso médio de 750 gramas, podendo alguns indivíduos atingir 1000 gramas (WEEKS, 1973), sendo as fêmeas mais pesadas do que os machos.

Possui hábito terrícola, habitando os campos sujos, cerrados e caatinga, sendo que sua alimentação consiste de sementes, frutos e invertebrados do solo, podendo utilizar-se do bico para alcançar raízes e tubérculos. Os machos são

responsáveis pela incubação dos ovos e criação dos filhotes, que podem ser provenientes de várias fêmeas (SICK, 1997).

A perda de habitat, a contaminação por agrotóxicos e a caça intensiva, constiuem sérias ameaças á sua sobrevivência, sendo considerada espécie vulnerável nos estados de São Paulo e Paraná e espécie em perigo no Rio de Janeiro e em Minas Gerais (BRESSAN et al., 2009).

Apresenta grandes potencialidades para a criação em cativeiro com resultados muito favoráveis em termos de reprodução, resistência a doenças e facilidade no manejo, possibilitando inclusive a sua criação como ave de corte.

### **Macuco (*Tinamus solitarius* - VIEILLOT, 1819)**

É considerado o maior tinamídeo da mata atlântica, medindo até 48 cm de comprimento, apresenta o dorso pardo-azeitonado e ventre cinza-claro. Atualmente, a subespécie *Tinamus solitarius pernambucensis*, do Nordeste brasileiro, foi considerada oficialmente inválida (AMARAL & SILVEIRA, 2004). O desmatamento constitui a principal ameaça para a espécie, pois a ave não consegue se adaptar à mata secundária, vivendo preferencialmente na mata primitiva.

De acordo com a International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2010) apresenta status de conservação “quase ameaçada”. É uma ave muito apreciada, pois possui carne branca e saborosa, considerada pelos especialistas franceses, como o grupo de aves cuja carne se adequa ao preparo de qualquer tipo de prato.

### **Azulona (*Tinamus tao* - TEMMINCK, 1815)**

Ave muito apreciada para caça, é encontrada na Amazônia brasileira e na bacia do alto Paraguai, habitando exclusivamente áreas de mata-de-terra-firme.

Apresenta coloração de tom cinza-ardósia, podendo atingir cerca de 1,9 kg e medindo 52 cm.

Acredita-se que o macuco e a azulona venham de um mesmo ancestral comum, com diferenças relacionadas ao peso maior da Azulona e ao fato dos ovos, apesar de serem da mesma cor verde azulada, serem perfeitamente esféricos na azulona, diferenciados da forma oblonga apresentada em *Tinamus solitarius*.

### **Jaó (*Crypturellus undulatus* - TEMMINCK, 1815)**

Ave cinegética típica do Brasil central, habita matas abertas e cerrados, principalmente na beira de rios, também conhecida na Amazônia como Macucauá e Sururina. Representante da avifauna primitiva apresenta registros fósseis encontrados no continente que datam 10 milhões de anos. Possui plumagem cinza amarronzada no dorso, finamente estriada, medindo cerca de 31 cm de comprimento.

No sudeste e sul do Brasil, ocorre o Jaó-do-litoral (*Crypturellus noctivagus noctivagus*), também chamado de Jaó-do-sul ou zabelê, encontrado na mata atlântica primitiva, desde o nível do mar, até cerca de 400 m de altitude.

### **Inhambu-xororó (*Crypturellus parvirostris*- WAGLER, 1827)**

É a menor espécie do seu gênero, medindo cerca de 19 cm, com vasta distribuição geográfica no Brasil, habitando campos sujos, capoeiras, plantações e pastos. Também conhecida popularmente no Brasil por inhambuzinho, inhambumirim, espanta-boiada, bico-de-lacre e xororó. Por ser uma ave cinegética apresenta status de conservação de espécie em perigo. Ocorre ao sul do Amazonas, Pará ao nordeste, sudeste e sul do Brasil, assim como no Peru, Bolívia, Paraguai e Argentina. Adapta-se bem ao cativeiro, tendo ótima capacidade de reprodução, o que favorece o repovoamento em áreas naturais.

**Inhambu-xintã (*Crypturellus tataupa* - TEMMINCK, 1815)**

Apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil e em países da América do Sul, habitando capoeirões, espigões de mata secundária, plantações degradadas em áreas de mata nativa primitiva, plantações (milho, café, algodão, entre outras). Também conhecida no Brasil como pé-roxo, bico-de-lacre, chitão, com dimensões de aproximadamente 23 cm. É uma ave cinegética, que pouco se afeta às variações em seu habitat, reproduzindo-se com relativa facilidade em condições de cativeiro.

**Inhambu-guaçu (*Crypturellus obsoletus* - TEMMINCK, 1815)**

É um tinamídeo florestal, encontrado na mata primária, em trechos de vegetação densa e de sub-bosque, e em matas secundárias, habitando a floresta atlântica no Brasil em praticamente todos os níveis de altitude, sendo sua presença mais marcante, acima dos 400 m. Apesar de ser ave de interesse cinegético, apresenta status de conservação “pouco preocupante”.

Mede entre 28 e 32 cm, possuindo uma camuflagem bastante eficiente, com plumagem em tons de marrom-acinzentado nos machos e uma tonalidade mais avermelhada nas fêmeas. Em regiões onde ocorreram a implantação de florestas de Eucalipto e de Pinho, o inhambu-guaçu apresentou grande crescimento populacional.

**Inhambu-chororão (*Crypturellus variegatus* - GMELIN, 1789)**

Também conhecido como inhambu-anhangá, chorão ou inhambu-codorna, inhambu-relógio e inhambu-onça, é encontrado no sudeste e nordeste do Brasil, sendo também de ocorrência amazônica. É uma ave cinegética, sendo atraída e

caçada com o uso de pio de madeira apropriado, no período entre setembro e novembro.

Possui uma peculiaridade reprodutiva na relação de três a quatro machos para cada fêmea, que bota um só ovo de coloração rosada, para que o macho possa incubá-lo. A fêmea atrai um segundo macho, acasala, copula, seguido de nova postura, que será chocado por esse segundo macho, sendo tal procedimento repetido com três ou quatro machos.

### **Zabelê (*Crypturellus noctivagus* - WIED-NEUWIED, 1820)**

Espécie cinegética muito ameaçada pelo desmatamento e a ocupação imobiliária em suas áreas de ocorrência natural, ocorrendo inclusive extinções locais. É uma espécie de ampla distribuição geográfica, ocorrendo na caatinga e na mata atlântica. Mede entre 32 a 34 cm, com linhas horizontais vermelho-acobreado no dorso inferior, o tom alaranjado do ventre e garganta, e a tonalidade corporal cinza-azulado.

As fêmeas apresentam mínimas diferenças no colorido da plumagem, sendo esse em geral um pouco mais claro. De acordo com a International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2010) apresenta status de conservação “quase ameaçada”.



Figura 2 – Espécies de tinamídeos: a) *Rhynchotus rufescens* ; b) *Tinamus solitarius*; c) *Tinamus tao* d) *Crypturellus undulatus*; e) *Crypturellus parvirostris* ; f) *Crypturellus tataupa* g) *Crypturellus obsoletus*; h) *Crypturellus variegatus* e; j) *Crypturellus noctivagus*

### Marcadores Moleculares na conservação de espécies

Marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer genótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA & GRATTTAPAGLIA, 1995).

O desenvolvimento tecnológico na área de marcadores moleculares tem aumentado bastante nos últimos anos, principalmente após a padronização da

técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), que consiste na síntese enzimática “in vitro” de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA-Polimerase, e de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (*Primers*) que delimitam a sequência de DNA para amplificação. Trata-se de uma técnica rápida e versátil, que envolve ciclos sequenciais completos compreendendo as etapas de desnaturação, hibridização e extensão de DNA.

Os marcadores moleculares têm sido muito utilizados na construção de mapas de ligação, teste de parentesco, genética evolutiva, ecologia, estudos filogenéticos e genética de populações. A caracterização genética de animais é importante para quantificar a diversidade genética, constituindo-se uma importante metodologia para os programas de melhoramento genético e de conservação (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Características de interesse zootécnico como reprodução, produção, resistência à doenças e comportamentais resultam da interação da constituição gênica e do meio ambiente. Animais criados sob as mesmas condições ambientais podem apresentar diferenças fenotípicas em razão de pequenas mudanças nas sequências de nucleotídeos, que constituem a informação genética de cada indivíduo (COUTINHO & REGITANO, 2001).

Diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas para detectar a variabilidade genética nas sequências de DNA, mediante marcadores moleculares, como RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SNP (Single Nucleotide Polymorphism), mt DNA (DNA mitocondrial) e microssatélites ou STR (Short Tandem Repeats).

VIALA et al. (2001) utilizaram *primers* de RAPD para determinação da variabilidade genética de tucanos (*Ramphastos toco*) observando principalmente a nitidez de padrão de amplificação e do resultado positivo de reprodutibilidade. Em estudos de variabilidade genética de papagaios da espécie *Amazona vinacea*, OLIVEIRA (2003) observou índices de diferenciação (Simple Matching), que variaram de 6,3 a 40,8%. O autor encontrou variação genética de 10 a 40%, ao



analisar vinte indivíduos da espécie *Triclara malchiatacea*, criados em cativeiro, utilizando nove *primers* de RAPD.

A variabilidade genética de duas espécies de araras silvestres *Ara araruna* e *Ara chloroptera*, foi determinada por CAPARROZ et al. (2001), através da técnica DNA *fingerprint*, utilizando sondas de minissatélites humanos. Os autores encontraram índices de variabilidade genética maior na população de *A. chloroptera* do que na população de *A. araruna*.

Espécies que apresentam menor diversidade genética são mais vulneráveis a extinção. FARIAS & MYIAKI (2006) verificaram alta correlação entre variabilidade genética e ameaça de extinção de três espécies de araras, *Anodorhynchus hyacinthinus*, *Ara araruna* e *A. chloroptera*. A espécie *A. hyacinthinus*, ameaçada de extinção, apresentou os mais baixos valores de variabilidade genética (heterozigosidade e diversidade alélica), quando comparados aos observados para as outras duas espécies, que não estão ameaçadas de extinção.

A manutenção da diversidade genética é um dos principais objetivos na conservação de pequenas populações, nas quais, o declínio da variabilidade genética provoca a diminuição da capacidade de resposta à seleção natural e aos efeitos da deriva genética na frequência de alelos (STOFER, 1996).

### **Marcadores Microssatélites (STRs)**

No genoma dos organismos eucariotos, existe uma grande quantidade de DNA repetitivo, sendo descritos pela primeira vez em leveduras e vertebrados por HAMADA et al. (1982). Microssatélites são caracterizados por repetições em tandem de mono, di, tri ou tetra nucleotídeo, localizadas dentro de regiões de sequência única. Cada bloco de repetições é normalmente menor que 100 pares de nucleotídeos (TAUTZ, 1989).

Apresentam a vantagem de serem marcadores co-dominantes e se encontram distribuídos por todo o genoma eucariota (TAUTZ, 1989). São menos



comuns e mais curtos em organismos invertebrados do que nos vertebrados, sendo que os organismos que apresentam “sangue frio”, como peixes e tartarugas, possuem sequências repetidas mais longas (CHAMBERS et al., 2000). Estudos realizados por LI et al. (2004) analisando frequência e densidade de microsatélites em regiões codificantes, constataram uma maior abundância de hexanucleotídeos (64,5% - 76,6%), seguidos de proporções decrescentes de tri, dí, e mono-nucleotídeos. Estes mesmos autores observaram predominância de repetições ricas em adenina e mais raramente repetições ricas em guanina.

Os STRs mais estudados são as sequências (CA) $n$  e (GT) $n$  por aparecerem com maior frequência na maioria dos genótipos eucariotos. De acordo com Weber (1990), estas repetições se apresentam no genoma humano a cada 100 kb.

Estes marcadores podem ser amplificados pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando iniciadores (*primers*) que contém parte da sequência flanqueadora à região repetida, resultando em produtos de diferentes tamanhos, em função do número de cópias da sequência delimitada pelos *primers*. A visualização dos amplificados pode ser feita através de técnicas de eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida.

Estas características têm possibilitado a utilização dos marcadores microsatélites em diferentes estudos, como a construção de mapas de ligação, teste de parentesco, genética de populações, genética evolutiva, ecologia e estudos filogenéticos (PRIMMER et al., 1997).

Análises de polimorfismos de STRs têm sido utilizadas em diversos estudos de variabilidade genética, tanto intra como inter populacional, sendo empregadas também para se determinar a distância genética de populações.

Segundo OLIVEIRA et al. (2006), um elevado número de alelos privados ou exclusivos podem ser encontrados com o uso de STRs, em estudos envolvendo sub-populações dentro de meta-populações. Estes alelos privados permitem inferir sobre o grau de isolamento das sub-populações. Entretanto, a taxa de mutação dos microsatélites pode induzir a super-estimativas sobre fluxo gênico ou de introgressão genética, ocasionada pela homoplasia de alelos, onde dois alelos

podem ser considerados idênticos devido à condição de estado e não por descendência (BALLOUX et al. , 2000).

A determinação do grau de parentesco entre indivíduos através destes marcadores possibilita a diferenciação de animais que são produzidos legalmente em criatórios comerciais daqueles coletados de forma ilegal na natureza. Com este objetivo, PILLAY et al. (2009) caracterizaram 22 locos de microssatélites polimórficos para uma espécie de papagaio Sul-Africano (*Poicephalus robustus* ). Estimativas de exclusão de paternidade também podem ser obtidas com o uso destes marcadores, conforme estudos realizados por ZOU et al. (2010) com uma espécie de grou japonês (*Grus japonensis*).

A construção de bibliotecas de microssatélites pode ser realizada através da técnica *shotgun*, que consiste na clivagem da molécula de DNA em milhares de fragmentos, sendo estes então clonados em vetores e sequenciados (FLEISCHMANN et al. 1995). Embora esta técnica permita a obtenção de um grande número de microssatélites, é necessário o sequenciamento de inúmeros fragmentos, o que implica em maiores custos.

Outra técnica, como a adotada no presente estudo, consiste na construção dos *primers* de microssatélites através do enriquecimento de bibliotecas, com o uso de sondas biotiniladas que seleciona os fragmentos por motivos de repetição (CT e GT), para então proceder a clonagem nos vetores e sequenciamento, conforme protocolo adaptado de BILLOTE et al. (1999).

Outro atributo interessante dos marcadores STRs é a transferabilidade, ou seja a possibilidade de se utilizar pares de *primers* desenhados para uma determinada espécie, na determinação de polimorfismos em outras espécies do mesmo gênero (CIPRIANI et al., 1999) ou dentro da mesma família (ZUCHI et al., 2002; Roa et al. ,2000).

Diversos estudos demonstraram que esta transferabilidade depende não somente da proximidade filogenética entre as espécies, mas também de fatores como o tamanho e a complexidade do genoma. LILLANDT et al. (2002), trabalhando com aves e WILLIAMSON et al. (2002), com felinos, obtiveram

melhores resultados com o uso de *primers* heterólogos do que GARNER et al. (2003) e PRIMMER & MERILLÃ (2000) em pesquisas com anfíbios, possivelmente devido ao tamanho dos genomas destes serem o dobro do genoma dos mamíferos e quatro vezes o das aves.

Uma metodologia desenvolvida por DAWSON et al. (2009) selecionando loci de microssatélites com elevado grau de homologia entre uma espécie de pássaro nativo da Austrália (*Taeniopygia guttata*) e a galinha doméstica (*Gallus gallus*), permitiu melhorar consideravelmente a taxa de transferibilidade em outras espécies de pássaros

Neste sentido, o conhecimento da variabilidade genética em populações de perdizes permitirá desenvolver programas de reprodução e melhoramento genético, visando a conservação e a criação comercial da espécie, assim como, servirá de subsídio para estudos de conservação de outros tinamiformes, como macucos, inhambus, jaós e zabelês.

## Referências

AGGREY, S.E.; NICHOLS, C.R.; CHENG, K.M. The partridge tinamou for commercial meat production: preliminary evaluation. In: WORLD'S POULTRY CONGRESS, 1992 **Anais...** Amsterdam: WPSA, 1992. p360.

AMARAL, F.S.R. do; SILVEIRA, L.F. Tinamus solitarius pernambucensis, Berla, 1946 é sinônimo de Tinamus solitarius (Vieillot, 1819). **Ararajuba**, v.12, n.1, p.33-41, 2004.

AVISE, J.C.; HAIG, S.M.; RYDER, O.A.; LYNCH, M.; GEYER, C.J. Descriptive genetic studies; applications in population management and conservation biology. In: Ballou, J.D. e FOSE, T.J. (Ed) **Population management for survival and recovery**. Columbia University Press, New York, 1995. p 183-244.

ARGOLO, G.R. de. **Análise do consumo e de preferências da carne de animais silvestres na Região Cacaueira da Bahia**. Ilhéus, BA: UESC, 2002. 104p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Universidade Estadual de Santa Cruz, 2002.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N.; HAUSER, J. Estimating gene flow across hybrid zones: How reliable are microsatellites?. **Acta Theriologica**, v.45 : 93-101, 2000.

BELL, G.I.; SELBY, M.J.; RUTTER, W.J. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating units. **Nature**, v.295, p. 31-35, 1982.

BERTELLI, S.; PORZECANSKI, A.L. Tinamou (Tinamidae) systematics: a preliminary combined analysis of morphology and molecules. **Ornitol. Neotrop.**, v.15 (Suppl.), p.1–8, 2004.

BILLOTE, N.; LAGODA, P.J.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, F.C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v.54, p.277–288, 1999.

BRESSAN, P.M.; KIERULFF, M.C.M.; SUGIEDA, A.M. **Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo/ Secretaria do Meio Ambiente, 645 p., 2009.

BRUNELI, F. A. T.; THOLON, P.; ISAAC, F. L.; DAMASCENO, P. R.; TONHATI H.; QUEIROZ, S. A. de. Caracterização da Reprodução de Perdizes (*Rhynchotus Rufescens*) em cativeiro. **ARS Veterinária**, v.21, n.2, p.272-280, 2005.

CAPARROZ, R.; GUEDES, N.M.R.; BIANCHI, C.A.; WAJNTAL, A. Analysis of the genetic variability and breeding behaviour of wild populations of Macaw species (Psittaciformes, Aves) by DNA fingerprinting. **Ararajuba**, v.9, n.1, p. 43-49, 2001.

CHAMBERS, G.K.; MacAVOY, E.S.; Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, v.126, p. 455-476, 2000.

CIPRIANI, G.; LOT, G.; HUANG, W.G.; MATARAZZO, M.T.; PETERLUNGER, E. e TESTOLIN, R.. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus pérsica* (L) Batsch]: Isolation, characterization and cross species amplification in prunus. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.65-72, 1999.

COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C. de A. Uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: REGITANO, L.C.A; COUTINHO, L.L. (Ed.). **Biologia Molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, 215 p.

CROMBERG, V.U.; STEIN, M.S.; BOLELI, I.C.; TONHATI, H.; QUEIROZ, A.S. Reproductive and Behavioral Aspects of Redwinged Tinamous (*Rhynchotus rufescens*) in Groups with Different Sex Ratios. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.9, n.3 p. 161–166, 2007.

DAWSON, D. A.; HORSBURGH, G. J.; KUPPER, C. STEWART, I. R. K. ;BALL, A. D. ; DURRANT, K. L.; HANSSON, B.; BACON, I.; BIRD, S. ;A ´ KLEIN, K.; KRUPA, A.P.; LEE, J.; MARTIN-GALVEZ, D. ; SIMEONI, M.; SMITH, G.; SPURGIN L. G. e BURKE, T. New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. **Molecular Ecology Resources**, v.10, p.475-494, 2010.

DEL HOYO, J.; ELLIOT, A.S.; SARGATAL, J. **Handbook of the birds of the world**. Barcelona: Lynx Edicions, 696p.,1992.

DISLICH, M. Tinamiformes (macuco, inhambu, perdiz). In: CUBAS, Z.S.; SILVA,R.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens: Medicina veterinária**. Ed. Roca. 1º ed. 1354p.,2007.

FAO. **Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources mangement palms: management of small populations at risk**. Roma, 1998. 215p.

FARIA, P. J.; MIYAKI, C. Y. Molecular markers for population genetic analyses in the family Psittacidae (Psittaciformes, Aves). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 231-240, 2006.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1995. 220p.

FLEISCHMANN, R. D., ADAMS, M. D., WHITE, O.; CLAYTON,R. A.; KIRKNESS,E. F. ; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; J TOMB;; DOUGHERTY,B. A. ; MERRICK, J.M.; MCKENNEY, K.; SUTTON,G.; FITZHUGH, W.; FIELDS,C.; GOCAYNE,J. D.;SCOTT,J. ; SHIRLEY,R.;LIU,L.; GLODEK,A. ; KELLEY,J. M.; WEIDMAN,J. F.; PHILLIPS,C. A.;SPRIGGS,T.; HEDBLOM, E. ; COTTON,M. D. ; UTTERBACK,T. R. ; HANNA, M. C.; NGUYEN, D.T. ; SAUDEK,D. M.; BRANDON,R. C.;FINE, L. D.; FRITCHMAN, J. L.; FUHRMANN;; GEOGHAGEN,J. L. N. S. M.;GNEHM, C. L.; MCDONALD, L. A.; SMALL, K. V.; FRASER,C. M.; SMITH,H. O. ; VENTER, J. C. Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v.269, p.496-512,1995.

FRANKHAM, R. Inbreeding and Extinction: Island Populations. **Conservation Biology**, v.12, n.3, p.665-675, 1998.

FRANKHAM, R. Do island populations have lower genetic variation than mainland populations? **Heredity**, v.78, p.311- 327, 1997.

GARITANO-ZAVALA, A.; LOZANO, J.C.; GISMONDI,P.; MOLINA, M.; FLORES, C.; CONDORI, G.; VARGAS, P.; CONDORI, C.; HUALLPARA, S. e ALANOCA, G. Los primeiros resultados de la crianza experimental em cautiverio de la pisaca (*Nothoprocta ornata*) em dos comunidades rurales del altiplano Boliviano. **Ornitologia Tropical**, v.15(suppl.), p.339-341, 2004.

GARNERO, A. del V., LEDESMA, M.A., GUNSKI, R.J. Alta homeologia cariotípica na família Tinamidae (Aves: Tinamiformes). **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.14, n.1, p.53-58, 2006.

GIANNONI, M.L. Animais Silvestres: uma nova pecuária. In: ZOOTEC, 2001. **Anais...** ZOOTEC:Goiania-GO, 2001. p350-356.

HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. **Proc. Natl.Acad.Sci.**, v.79, p.6465-6469, 1982.

HATA, M.E. **Efeitos genéticos e ambientais sobre o tempo de permanência em imobilidade tônica em perdizes *Rhynchotus rufensis***. Jaboticabal, 2009. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2009.

HENDRICK, P.W. Conservation genetics: Where are we now? **Trends in ecology and Evolution**, v.16, p.629-636, 2001.

IUCN. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2010.3. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em 27 de setembro de 2010.

LI, B.; XIA, Q.; LU, C. ZHOU, Z.; XIANG, Z. Analysis on frequency and density of microsatellites in coding sequences of several eukaryotic genomes. **Geno. Prot. Bioinfo.**, v.2, n.1, p. 24-31, 2004.

LILLANDT, B.; BENSCH, S.; HANSSON, B.; WENNERBERG, L.; Von SCHANTZ, T. Isolation and cross-species amplification of microsatellite loci in the Siberian Jay (*Perisoreus infaustus*). **Hereditas**, v.137, p.157-160, 2002.

MORO, M.E.G.; JOJI, P.A.de S.; SOUZA, H.B.A. de; MORAES, V.M.B.de.; VARGAS, F.C.V. Rendimento de carcaça e composição química da carne da perdiz nativa (*Rhynchotus rufescens*). **Ciência Rural**, v.36, n.1, p 258-262, 2006.

MYERS, P.; ESPINOSA, R; PARR, C.S.; JONES, T.; HAMMOND, G.S.; DEWEY, T.A. **The Animal Diversity Web (online)**. Disponível em: <<http://animaldiversity.org>>. Acesso em: 18 de Abril, 2011.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.70, p.3321-3323, 1973.

NOGUEIRA-FILHO, S.L.G.; NOGUEIRA, S.S.da C. Criação comercial de animais silvestres: Produção e comercialização da carne e subprodutos na região sudeste do Brasil. **Revista Econômica do Nordeste**, v.31, n.2, p.188-195, 2000.

O'BRIEN, S.J.; A role for molecular genetics in biological conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.91, p.5748-5755, 1994.



OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.2, p.294-307, 2006.

OLIVEIRA, F.P. , *Amazona rhodocorytha*, *Triclaria malachitacea* e *Droptus accipitrinus* (**Pscittaciformes-Aves**) mediante o uso de RAPD como marcador molecular. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/ Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

PEIXOTO, J.E. **Aspectos comportamentais de perdiz (*Rhynchotus rufescens*) em cativeiro durante a fase reprodutiva**: um estudo de caso. Pirassununga, 2002. Dissertação (Mestrado em Zootecnia na área de concentração; Qualidade e produtividade animal) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2002.

PILLAY, K.; DAWSON, D.A.; HORSBURGH, G.J.; PERRIN, M.R.; BURKE, T.; TAYLOR, T.D. Twenty-two polymorphic microsatellite loci aimed at detecting illegal trade in the Cape parrot, *Poicephalus robustus* (Psittacidae, Aves). **Molecular Ecology resources**, v.10, p.142-149, 2010.

PRIMMER, C.R.; MERILÄ, J. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. **Conservation Genetics**, v.3, p.445-449, 2000.

PRIMMER, C.R.; RAUDSEPP, T.; CHOWDHARY, B.P.; MOLLER, A.P.; ELLEGREN, H. Low frequency of microsatellites in the avian, genome. **Genome Res.** 7: 471–482, 1997.

REDFORD, K.H.; ROBINSON, J.G. The game of choice patterns of Indian and colonist hunting in the neotropics. **American Anthropology**, v.89, p.650-667, 1987.

ROA, A.C.; CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; DUQUE, M.C.; MAYA, M.M.; BONIERBALE, M.W.; IGLESIAS, C.; TOHME, J. Cross species amplification of cassava (*Maniot sculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, v.87, p.1647-1655, 2000.

SANTOS, D.O.; MENDES, A.; NOGUEIRA, S. S. da C.; NOGUEIRA FILHO, S. L. G. Criação comercial de caititus (*Pecari tajacu*): uma alternativa para o agronegócio. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.1, p. 1-10, 2009

SANTOS, F.R.; LACERDA, D.R.; REDONDO, R.A.R. Tecnologias genômicas na conservação da biodiversidade. **Bio sci. J.**, v. especial, p. 79-92, 2004.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Uma introdução. Editora nova fronteira, Rio de Janeiro, 792 p, 1997.

SIGRIST, T. **Aves do Brasil**: Uma visão artística. Traduzido por Maria Tereza Quirino. 2ed. São Paulo: Editora Avis Brasilis, 2006.

SILVEIRA, L.F.; HÖFLING, E. MORO, M.E.G.; NASCIMENTO, A.A.; AANTES, I.G. Order Tinamiformes (Tinamous) In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**. Ames: Iowa State University, p.72-80, 2001.

SOUSA, R.L.M.; CARDOSO, T.C.; PAULILLO, A.C.; MONTASSIER, H.J.; PINTO, A.A. Antibody response to new castle disease vaccination in a flock of young partridges (*Rhynchotus rufensis*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.30, n.3, p.459-641, 1999.

STOFER, A. Quantitative genetics: a promising approach for the assessment of genetic variation in endangered species. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.11, p.343-348, 1996.

TAUTZ, D. Hipervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.6463-6471, 1989.

THOLON, P. **Avaliação da adaptação de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) ao cativeiro**. Jaboticabal, 2002. Dissertação (Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Genética e Melhoramento Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

VIALA, V.L.; SOUZA, E.B. de; TAROSSO, L.F. da S.; OLIVEIRA, F.P. Caracterização da variabilidade genética em indivíduos cativos de *Ramphastos toco* (Piciformes: Ramphastidae) mediante o uso de RAPD como marcador molecular. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.14, n.1, p. 29-34, 2006.

WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for a simple extraction of DNA for PCR-based typins from forensic material. **Biotechnique**, v.10, p.506-513, 1991.

WEBER. J.L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. **Genomics**, v.44, p.388-396, 1990.

WEEKS, S.E. The behavior of the Red-winged Tinamou, *Rhynchotus rufescens*. **Zoologica**, v58, n1, p.13-40, 1973.

WILLIAMSON, J.E.; HUEBINGER, R.M.; SOMMER, J.A.; LOUIS, E.E.; BARBER, R.C. Development and cross species amplification of 18 microsatellites in dipteran. **Molecular Ecology Notes**, 2:110-112, 2002.

ZOU, H.; DONG, H.; KONG, W.; MA, J.; LIU, J. Characterization of 18 polymorphic microsatellite loci in the red-crowned crane (*Grus japonensis*), an endangered bird. **Animal Science Journal**, v.81, p.519-522, 2010.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.V.; PINHEIRO, JB.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, v.2, p.512-514, 2002.

## CAPÍTULO 2 – UTILIZAÇÃO DE *PRIMERS* HETERÓLOGOS NA DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PERDIZES (*Rhynchotus rufescens*) E OUTROS TINAMÍDEOS

**RESUMO** - Considerada o maior tinamídeo campestre da fauna brasileira e com ampla distribuição geográfica no continente americano, a perdiz (*Rhynchotus rufescens*), juntamente com outros representantes desta ordem, encontram-se atualmente com populações em declínio, principalmente pela destruição de habitats e pela caça predatória. A conservação destas espécies se justifica não somente por sua história evolutiva, como principalmente pela importância ecológica que estas aves apresentam, contribuindo para a dispersão de sementes, controle de insetos e predação, além da criação em cativeiro para fins comerciais. Para tanto se torna necessário conhecer a estrutura genética destes animais a fim de subsidiar estratégias conservacionistas. Neste sentido o presente estudo teve como objetivo caracterizar o grau de polimorfismo genético em perdizes, utilizando dez pares de *primers* de microssatélites, desenhados para avestruzes (*Struthio camelus*) e dez pares de *primers* específicos para o inhambu-cabeça-vermelha (*Tinamus major*). Nenhuma amplificação foi obtida em perdizes com a utilização dos *primers* para avestruz. Dos *primers* desenvolvidos para *T. major* somente um (E101) apresentou amplificação específica em perdizes, observando-se ampliações inespecíficas para os *primers* A104, E118 e E119. Foram observadas taxas de amplificação cruzada de 100 e 70% para macuco (*Tinamus solitarius*) e para a azulona (*Tinamus tao*), respectivamente. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, é possível a utilização desses marcadores em pesquisas destinadas a conservação dessas duas espécies, sendo necessário o desenvolvimento de *primers* específicos para a perdiz e os demais tinamídeos estudados.

Palavras-chave: Conservação, PCR, variabilidade genética e transferabilidade

## Introdução

A perdiz (*Rhynchotus rufescens*), maior tinamídeo campestre nacional, juntamente com outros representantes desta ordem, encontra-se em algumas regiões ameaçada de extinção, principalmente pela destruição de habitats e pela caça predatória (BRESSAN et al., 2009). Sua distribuição geográfica abrange todo o continente americano (SICK, 1985).

Segundo SICK (1985) são animais que pertencem a avifauna mais antiga deste continente, com registros fósseis de 10 milhões de anos na Patagônia, e em cavernas no Brasil, que datam de aproximadamente 20 mil anos.

O desenvolvimento de estratégias que visem à conservação destas espécies se justifica não somente por sua história evolutiva, como também pela importância ecológica que estas aves apresentam, contribuindo para a dispersão de sementes, controle de insetos e predação.

Vale ressaltar ainda, que estes animais podem ser criados em cativeiro, assumindo uma importância econômica na geração de emprego e renda em comunidades carentes, desde que atendidas condições básicas de legislação, criação e comercialização. Neste sentido torna-se importante a determinação da estrutura genética das populações tanto em vida livre como em cativeiro, principalmente no que se refere à variabilidade entre indivíduos e entre populações, o que determina as estratégias de conservação e manejo de espécies.

Com o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) na década de 80, marcadores STRs tem sido muito utilizada em pesquisas às questões de evolução e de biologia da conservação.

Os STRs estão amplamente distribuídos no genoma dos diversos organismos, de forma casual. Em animais, verifica-se a ocorrência da conservação de sítios de STRs em espécies relacionadas, o que permite em alguns casos, a amplificação de locos de microssatélites de espécies do mesmo gênero com o uso de *primers* heterólogos (MOORE et al., 1991).

Trabalhos realizados por MENOTTIRAYMOND & OBRIEN (1995) com espécies estreitamente relacionadas, tais como gado bovino e ovino, demonstraram ser possível a utilização de *primers* desenhados para uma espécie, na análise de polimorfismos de microssatélites de outra espécie. ZUCOLOTO et al. (2006), utilizando *primers* desenvolvidos para o crocodilo americano (*Alligator mississippiensis*) e para o jacaré do papo amarelo (*Caiman latirostris*), conseguiram a amplificação de produtos de PCR com relativo polimorfismo em outras três espécies de crocodilianos sul americanos. Para a determinação do número populacional de onças pardas (*Puma concolor*) em duas unidades de conservação do estado de São Paulo, MIOTTO (2006) utilizou-se de *primers* desenvolvidos para o gato doméstico (*Felis catus*). Da mesma forma, DALTOÉ-INGLÊZ et al. (2005) para a avaliação da variabilidade genética de bugios (*Alouatta caraya*), utilizaram *primers* de espécies relacionadas.

A transferabilidade em aves também é descrita em diversos trabalhos, apesar da frequência relativamente baixa de locos de microssatélites comparada com outras espécies (LONGMIRE et al.1999; PRIMMER et al. 1997b). PANG et al (1999) obtiveram taxa de 22,9 % de amplificação específica em codornas, utilizando STRs desenhados para galinhas.

Em trabalho realizado por LILLANDT et al. (2002) com microssatélites desenvolvidos para Siberian Jay (*Perisoreus infaustus*), foi observada transferabilidade destes *primers* em outras quatro espécies de pássaros, embora os melhores resultados foram obtidos para a espécie do mesmo gênero. Resultados semelhantes tiveram HUANG et al. (2005), que verificaram maior transferabilidade em gansos do que em galinhas e pavões, quando utilizaram primers para microssatélites desenhados para patos-de-pequim, ressaltando que patos e gansos pertence a ordem Anseriforme, enquanto galinhas e pavões são galiformes.

Diferentes estudos bioquímicos obtidos por hibridização de DNA colocam os tinamiformes como parentes próximos de ratitas, como a ema (*Rhea americana*) e o avestruz (*Struthio camelus*) (SIBLEY & AHLQUIST, 1981).

GARNERO et al. (2006) estudando a homeologia cromossômica de várias espécies da família tinamidae, também constataram a proximidade do grupo *Rhynchotus* e *Nothura* com as ratitas, porém com um grau de diferenciação entre os cromossomos sexuais.

Por esta razão, para a verificação de transferabilidade em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) e outros tinamídeos, o presente estudo avaliou a utilização de *primers* heterólogos de microssatélites, desenvolvidos para avestruzes (*Struthio camelus*) e para o Inhambu-de-cabeça-vermelha (*Tinamus major*).

## **Materiais e método**

### **Coleta das amostras**

Os estudos foram realizados utilizando amostras de sangue de perdizes e de outros tinamídeos, coletadas a partir da veia na asa, e, em algumas aves com o corte da unha.

O número de indivíduos amostrados de cada espécie, e os locais de coleta estão discriminados conforme Tabela 1.



Tabela 1 - Relação dos tinamídeos e locais de coleta das amostras analisadas nesse estudo

Espécie/amostra	Nome Científico	Nº	Criador	Localidade
Perdiz	<i>Rhynchotus rufescens</i>	02	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
		04	Setor de Aves-UESB	Itapetinga-BA
		02	Criador Recanto das Aves	Itatiba-SP
		18	Criatório científico da FCAV/Unesp	Jaboticabal-SP
Inhambu chororó	<i>Crypturellus parvirostris</i>	04	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
		02	Criador Recanto das Aves	Itatiba-SP
Inhambu-guaçú	<i>Crypturellus obsoletus</i>	02	Criador Recanto das Aves	Itatiba-SP
		02	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
Macuco	<i>Tinamus solitarius</i>	07	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
		03	Criador Recanto das Aves	Itatiba-SP
Zabelê	<i>Crypturellus noctivagus</i>	03	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
Jaó	<i>Crypturellus undulatus</i>	03	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
Inhambu-chintã	<i>Crypturellus tataupa</i>	03	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
Inhambu-chororão	<i>Crypturellus variegatus</i>	03	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
Azulona	<i>Tinamus tao</i>	03	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG

### Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído de tecidos e sangue utilizando-se do método do fenol-cloroformio (AUSEBEL et al., 1995). Para se obter a digestão das proteínas foi adicionada proteinase K (20mg /ml). Depois transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo adicionando-se a este 300 µl de clorofórmio:álcool-isoamilico (24:1) removendo-se novamente o sobrenadante para um tubo novo.

Adicionou-se 700µl de etanol absoluto gelado, levando-se a mistura para o freezer a uma temperatura de -20°C por 1 hora, para em seguida descartar o sobrenadante por decantação. Nova precipitação realizada adicionando-se 150µl de etanol 70%. Prosseguiu-se a uma centrifugação a 4°C por 25 minutos e 12000 rpm e ao finalizar, desprezou-se o sobrenadante, para resuspensão posterior do pellet seco totalmente, com 150µl de TE (10mM Tris HCl pH=7,6 e 1mM EDTA pH=8,0), sendo finalmente armazenado a 4°C.

A visualização da integridade e concentração do DNA foi feita através de luz ultravioleta (UV) em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad). A quantificação e verificação de qualidade das amostras de DNA foi realizada em aparelho NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Na quantificação foram utilizados 2,0µl do DNA extraído, sendo a qualidade das amostras verificada mediante a relação 260/280 nm e 260/230 nm, as quais medem respectivamente a pureza do DNA e a presença de proteínas, fenol e outros contaminantes que são absorvidos a 280 nm.

### **Desenho e características dos *primers* utilizados**

Inicialmente para a determinação de polimorfismos em perdizes, foram selecionados dez *locos* identificados em avestruzes (TANG et al., 2003; KINWELE et al., 1998). Outros dez *locos* foram selecionados a partir do trabalho publicado por BRENNAN et al. (2008), que desenvolveu *primers* de STRs específicos para Inhambu-de-cabeça-vermelha (*Tinamus major*). A seleção dos *primers* foi feita considerando-se o número de alelos e o comprimento dos produtos. Com o objetivo de diminuição de gastos na etapa de genotipagem foi adicionada aos *primers forward* uma cauda M13 (CACGACGTTGTAAAACGAC), de acordo com protocolo descrito por SCHUELKE (2000) e BOUTIN-GANACHE et al. (2001).

As sequências dos *primers forward e reverse*, unidades de repetição, número de alelos (NA) e comprimento dos produtos obtidos pelos *primers* para avestruzes e Inhambu-de-cabeça-vermelha selecionados estão apresentados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 – Relação dos *locos* selecionados de avestruzes (*Struthio camelus*) para análise de transferabilidade em perdiz e outros tinamídeos

Locos Acesso GenBank Nº	Seqüência (5' - 3')	Repetição	NA	Tamanho
CAU1 AF533368	F: TTACAAGCAAGGTAGAACCCA R: GCAAGCAACCCAATCCCTG	(AC)8AT(GC)3(AC)7	10	86–104
CAU7 AF533371	F: CACTCCTGTCCCCTACTTG R: CTGTAGTGTATTTAGAGACTGA	(AC)18	12	185–211
CAU14 AF533375	F: ATTTAACTTCTCTAAGGCACTC R: GAGGAGCAATTCAGACAGAC	(CA)16	14	142–178
CAU17 AF533378	F: CGTAAACCCAGATAATCACAA R: AGTGGCATTGTAGCTCTTCA	(CA)22	11	160–180
CAU40 AF533395	F: ACGGGGAGACTCAAGGATG R: GCTTGCGTGTGCATGAGTAT	(CA)9	9	138–156
CAU83 AF533422	F: AAACAAGCCGCTAGTGAGGA R: TGCAGACTCAGACCAGCATC	(AC)16	8	198–218
CAU85 AF533424	F: GAGGTGCCTGTCTTGTTTAC R: AAAAGCACCTTCCCACATTG	(AC)26	16	204–276
OSM4 <sup>#</sup>	F: ATCACTTTGCTGAAGTCAAAGG R: CTAACAGAGATCTGGGCGGA	(TA)16	5	134
OSM5 <sup>#</sup>	F: GTGGATCAGTTCAATCCTTGC R: GCCCAAGAAAATGATGGAGA	(CA)20	6	232
OSM6 <sup>#</sup>	F: TTTGACCATTGAGCATGCAT R: AGAACTGCTGCCTTTCCTCA	(CA)15	5	108

Marcadores microsatélites com código CAU (China Agricultural University)

Modificado de TANG et al.(2003)

Marcadores microsatélites com código OSM

Modificado de KIMWELE et al.(1998)

Tabela 3 - Relação dos locos selecionados de inhambu da cabeça vermelha (*Tinamus major*) para análise de transferabilidade em perdiz e outros tinamídeos

Locos Acesso Nº	Sequencia (5' - 3')	Repetição	NA(Indivíduos)	Tamanho (Pb)
A1 EU259625	F - AGCACATGAGCTTTTTAGAGC R - GCACTTGACTTGACACAGTATG	GT (14)	9 (19)	244-268
A11 EU259615	F - AATTGGAAACGATGGTGTTAC R - GCTCAAATAATGAATGGACAG	CA (16)	10 (18)	202-238
A104 EU259616	F - AAGGAAGCTGCGACAAGTC R - TAGCGGCCTAGCAGGTTAC	CA (18)	13 (19)	299-333
A106 EU259617	F - GAATTAGCCAGCATCTTTACAC R - CCAAGTATTGTTTCAGTCAACC	CA (20)	13 (19)	156-186
A108 EU259618	F - CTCACGCCTTCATACAGAATAC R - GTAATAGGTCGCTGGTCAAGTA	CA (21)	8 (19)	183-203
E101 EU259623	F - CCCAGGGTTACCAACAAGC R - GCCCATACTCTCTTTCCC	GA (15)	11 (19)	194-226
E105 EU259624	F - TGCTGCCTGTCCACTTACTC R - TCACGCTTCAGTTATGACCC	GA (22)	14 (19)	202-236
E111 EU259626	F - GCTTTCAGGATGCTGCTC R - CCCTTTAGTGTGCTGTAGGC	CT (14)	8 (19)	166-184
E118 EU259627	F - TGGCATTGTAGAGTTGAATC R - AAGTCCCCGTGGTGTTAC	CT (19)	9 (19)	234-282
E119 EU259628	F - TTGCCATACTCTCTTTCC R - TGATTGCCAGGTTACCAC	CT (14)	12 (20)	201-233

Modificado de BRENNAN et al. (2008)

### Otimização da PCR

A reação de amplificação foi realizada de acordo com a programação para cada *primer* após ter conseguido as temperaturas ótimas para cada um deles fazendo gradiente de temperaturas, ajuste de ciclos, variando as Taq polimerases e mudando as concentrações dos diferentes reagentes utilizados na PCR. A concentração dos reagentes utilizados na PCR, os parâmetros utilizados assim como as condições utilizadas para a padronização das reações em PCR no termociclador são apresentadas nas tabelas 1 e 2 em anexo (página 63).

## Resultados e discussão

### Gel utilizando *primers* de avestruzes

Dos dez pares de *primers* testados em perdiz, somente os *primers* CAU14 e o CAU17 apresentaram amplificons em amostras (Figura 1). No entanto estas bandas se mostraram inespecíficas. Resultados semelhantes foram descritos por BRENNAM et al. (2008), onde os autores também obtiveram inespecificidade de ampliações com o uso de *primers* de avestruz para analisar polimorfismo em *Tinamus major*.

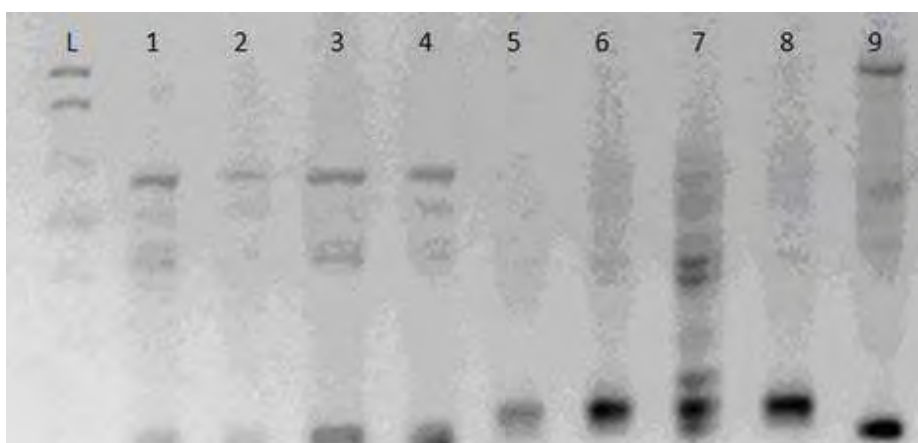


Figura 1 – Resultados de PCR *primers* CAU14 e o CAU17 Corrida em gel de agarose 2 % - Tm = 56° C. As amostras seguem a seguinte ordem: L - corresponde ao ladder de 1kb; 1 e 2 - amostras de DNA de perdizes utilizando-se o *primer* CAU 14; 3 e 4 - amostras com o *primer* CAU 17; 5 a 7 - amostras de DNA de avestruz utilizando-se o *primer* CAU 14; 8 e 9 amostras com o *primer* CAU 17 utilizando-se DNA de avestruzes.

### Amplificação com os locos de inhambu da cabeça vermelha

Dos dez pares de *primer* testados, quatro apresentaram ampliações inespecíficas e somente o *primer* E101 apresentou boa amplificação em perdizes, conforme observado na figura 2.



Figura 2 – Resultados de PCR em amostras de perdizes amplificadas com o *primer*, Tm 54°C. Corrida em gel de agarose 2%. As amostras seguem a seguinte ordem: 1 a 11 - amostras de DNA de perdizes utilizando-se o *primer* E101; C – controle negativo; L – Ladder de 1kb

O resumo das ampliações preliminares obtidas usando-se *primers* do inhambu de cabeça vermelha (*Tinamus major*) em amostras de perdizes e outros tinamídeos é apresentado na tabela 4.

Tabela 4 - Amplificação em amostras de DNA de diferentes espécies de tinamídeos utilizando pares de primers desenhados para *Tinamus major*

<i>Primer</i> Espécie	A1	A11	A104	A106	A108	E101	E105	E111	E118	E119
Perdiz			#			+			#	#
Macuco	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Azulona			+	+		+	+	+	+	+
Inhambú-guaçu			+				+			
Inhambú-xororó			+						+	+
Inhambú-chintã			+	+						
Inhambú-xororão							+			
Jaó do interior										
Zabelê							+			

+ Amplificações específicas  
# Amplificações inespecíficas

Conforme os resultados apresentados na tabela 4, verifica-se que a taxa de transferabilidade dos *primers* utilizados foi maior em espécies do mesmo gênero *Tinamus*, como o macuco(100%) e a azulona (70%) do que em espécies de outros gêneros. Resultados semelhantes foram obtidos por LILLANDT et al. (2002) trabalhando com aves do gênero *Perisoreus* e HUANG et al. (2005) trabalhando com patos e galinhas.

Os testes de amplificação realizados em perdizes não produziram bons resultados, com exceção do *primer* “E101” que apresentou amplificação específica e os *primers* A104, E118 e E119 com amplificações inespecíficas, os demais locos não produziram *amplificons*. Quanto aos demais tinamídeos analisados, os estudos são preliminares, sendo necessário realizar novas reações de PCR, testando concentração de reagentes e principalmente a determinação da temperatura de hibridização ideal para cada espécie, uma vez que não foi realizado testes em gradiente de temperatura visando otimização das reações de PCR.

### **Conclusões**

A utilização de *primers* heterólogos pode constituir uma boa metodologia na avaliação de polimorfismos genéticos em populações, entretanto nem sempre a transferabilidade ocorre em espécies pertencentes à mesma família. Conforme observamos neste estudo a eficiência foi maior entre espécies do mesmo gênero.

### **Referências**

AUSEBEL, F; BRENT, R; KINGSTON, R; MOORE D; SERDMAN J.G; SMITH, J.A.; STRUN, K. **Current protocols in molecular biology**. 20 ed., 900p.,1995.

BOUTIN-GANACHE, I.; RAPOSO, M.; RAYMOND, M. M13-tailed *primers* improve readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele sizing methods. **Biotechniques**, v.31, p.1-3, 2001.

BRENNAN, P. L. R.; HYSENI, C. Development of microsatellite markers for parentage analysis in the great tinamou (*Tinamus major*). **Molecular Ecology Resources**, v.8, n.4, p. 933-935, 2008.

BRESSAN, P.M., KIERULFF, M.C.M., SUGIEDA, A.M. Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados/ Coordenação geral Paulo Magalhães Bressan. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 645 p.,2009

DALTOÉ-INGLÊZ, A. P.; SCHNEIDER, M.P.C.; GONÇALVES, E. C.; SARAIVA, P.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. N.; SILVA, A. L.C.; OLIVEIRA, S. F. Variable Microsatellite Markers For the Black Howler Monkey *Alouatta Caraya*: a Test of four Heterologous *Loci* developed for *Alouatta belzebu*. 19th Annual Meeting of the Society for Conservation Biology, Book of abstracts, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Julho de 2005.

HUANG, Y.; TU, J.; CHENG, X.; TANG, B. ; HU, X. ; LIU, Z. ; FENG, J. ; LOU, Y. ; LIN, L. ; XU, K. ; ZHAO, N. ; Characterization of 35 novel microsatellite DNA markes from the duck (*Anas platyrhynchos*) genome and cross-amplification in other birds. **Genet.Sel. Evol.**, v.37, p.455-472, 2005.

KIMWELE, C.N.; GRAVES, J.A.; BURKE, T.; HANOTTE, O. Development of microsatellite markers for parentage typing of chicks in the ostrich *Struthio camelus*. **Molecular Ecology**, v.7, p.247-255, 1998.

LILLANDT, B.; BENSCH, S.; HANSSON, B.; WENNERBERG, L.; Von SCHANTZ, T. Isolation and cross-species amplification of microsatellite loci in the Siberian Jay (*Perisoreus infaustus*). **Hereditas**, v.137, p.157-160, 2002.

LONGMIRE, J.L.; HAHN, D.C.;ROACH, J.L. Low abundance of microsatellite repeats in the genome of the brown-headed cowbird (*Molothrus ater*). **J. Heredity**, v.90, p.574–578, 1999.



MENOTTIRAYMOND, M.A.; OBRIEN, S.J. Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of felidae. **J. Heredity**, v.86, p.319-322, 1995.

MIOTTO, R.A. **Análise do DNA fecal para determinação da presença e do número populacional mínimo de onças-pardas (Puma concolor, Felidae) em duas unidades de Conservação do estado de São Paulo, o Parque Estadual do Vasununga e a Estação Ecológica de Jataí, São Carlos**, 2006. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, 68p., 2006.

MOORE, S.S.; SARGEANT, L.L.; KING, T.J.; MATTICK, J.S.; GEORGES, M.; HETZEL, D.J.S. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR *primer* pairs in closely related species. **Genomics**, v.10, p.654-660, 1991.

PANG, S.W.Y.; RITLAND, C.; CARLSON, K.M. Japanese quail microsatellite loci amplified with chicken-specific *primers*. **Animal Genetics**, v.30, n.3, p.195-199, 1999.

PRIMMER, C.R.; RAUDSEPP, T.; CHOWDHARY, B.P.; MOLLER, A.P.; ELLEGREN, H. Low frequency of microsatellites in the avian genome. **Genome Res**, v.7, p.471-482, 1997.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, P.233-234,2000.

SIBLEY, C.G., AHLQUIST, J. The phylogeny and relationships of the ratites birds as indicated by DNA-DNA hybridization. Proc.End.Int.Congr.Sys.and Evol.Biol., 301-335, 1981.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**: uma introdução. Editora nova fronteira, Rio de Janeiro, 792 p,1997.

TANG, B.; HUANG, Y.H.; LIN,L.; HU, X.X.; FENG, J.D.; YAO, P.; ZHANG, L.; LI, N. Isolation and characterization of 70 novel microsatellite markers from ostrich (*Struthio camelus*). **Genome**, v.46, p.833-840, 2003.

ZUCOLOTO, R.B.; VILLELA, P.M.S.; VERDADE, L.M.; COUTINHO, L.L. Cross-species microsatellite amplification in South American Caimans (Caiman spp and *Paleosuchus palpebrosus*). **Genetics and Molecular Biology**, v.29,n.1, p.75-78, 2006.

### **CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *PRIMERS* DE MICROSSATÉLITES PARA AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PERDIZES (*Rhynchotus rufescens*) E OUTROS TINAMÍDEOS**

**Resumo** - A perdiz (*Rhynchotus rufescens*), considerada o maior tinamídeo campestre nacional e com ampla distribuição geográfica no continente americano, juntamente com outros representantes desta ordem, encontra-se atualmente ameaçada, principalmente pela destruição de habitats e pela caça predatória. A conservação destas espécies se justifica não somente por sua história evolutiva, como principalmente pela importância ecológica que estas aves apresentam, contribuindo para a dispersão de sementes, controle de insetos e predação, além da criação em cativeiro para fins comerciais. Para tanto é importante conhecer a estrutura genética destes animais a fim de subsidiar estratégias conservacionistas. Neste sentido o presente estudo teve como objetivo desenvolver *primers* de microssatélites específicos para perdizes, a partir de biblioteca genômica enriquecida com microssatélites. De 16 pares de *primers* desenhados, somente oito foram otimizados para determinação de polimorfismos genéticos em perdizes, sendo que quatro destes mostraram-se monofórficos. Foi realizada a genotipagem em 26 amostras de perdizes de diferentes origens utilizando-se de quatro *primers* e obtidas estimativas relacionadas ao percentual de locos polimórficos (50%), número médio de alelos por loco (5,75), conteúdo de informação polimórfica médio (0,62) e diversidade genética esperada (0,69). Quanto ao teste de transferabilidade em outros tinamídeos, tivemos resultados positivos em poucos pares de *primers*. A utilização dos locos polimórficos desenvolvidos possibilitará o estabelecimento de estratégias voltadas para os programas de melhoramento genético de populações destinadas à produção zootécnica em cativeiro, assim como, conhecer a estrutura genética de populações naturais.

Palavras-chave: Clonagem, conservação, heterozigidade, transferabilidade e variabilidade genética

## **Introdução**

Considerada o maior tinamídeo campestre nacional e com ampla distribuição geográfica no continente americano, a perdiz (*Rhynchotus rufescens*) juntamente com outros representantes desta ordem, encontra-se em algumas regiões, ameaçada de extinção, principalmente pela destruição de habitats e pela caça predatória (BRESSAN et al., 2009).

São animais que pertencem a avifauna mais antiga deste continente, com registros fósseis de 10 milhões de anos na Patagônia, e em cavernas no Brasil, que datam de aproximadamente 20 mil anos (SICK, 1985).

A conservação destas espécies se justifica não somente por sua história evolutiva, como também pela importância ecológica que estas aves apresentam, contribuindo para a dispersão de sementes, controle de insetos e predação.

Outro aspecto importante é que alguns destes animais podem ser criados em cativeiro, assumindo importância econômica na geração de emprego e renda, desde que sejam atendidas condições básicas de legislação, criação e comercialização. SANTOS et al. (2009), trabalhando com criatórios de caititus (*Pecari tajacu*), demonstraram ser viável economicamente a criação comercial destes animais, desde que sejam atendidas condições básicas de legislação, criação e comercialização.

Em trabalhos realizados com perdiz (*Rhynchotus rufescens*), BRUNELI et al. (2005) estudaram fatores relacionados ao ciclo reprodutivo destas aves, determinado época e horário de maior postura de ovos. Da mesma forma, CROMBERG et al. (2007), com o objetivo de conhecer aspectos reprodutivos de perdizes, estudaram a razão sexual, a estrutura sócio-hierárquica e outras características comportamentais, com vistas à adaptação em cativeiro.

Através de pesquisas desenvolvidas no Canadá com outra espécie de tinamídeo nativo do Chile (*Nothoprocta perdicaria*), AGGREY et al. (1992) constataram que apesar do maior tempo para o abate em relação às aves comerciais, aquelas aves apresentaram bom peso e excelente rendimento de carcaça. Esforços semelhantes foram conduzidos por GARITANO-ZAVALA (2004) no sentido de viabilizar a criação em cativeiro de outro tinamídeo encontrado na Bolívia, denominado localmente de pisacca (*Nothoprocta ornata*).

Determinar a estrutura genética das populações tanto em vida livre como em cativeiro, principalmente no que se refere à variabilidade entre indivíduos e entre populações, constitui um aspecto importante no estabelecimento de estratégias de conservação e manejo de espécies. Com o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) na década de 80, marcadores STRs tem sido muito utilizado em pesquisas direcionadas à produção animal, assim como, a questões relacionadas à evolução e à biologia da conservação.

Vários trabalhos de pesquisa reportam a utilização de marcadores microssatélites em espécies de interesse zootécnico, dentre outros citamos os desenvolvidos para aves domésticas, como frango de corte (GROENEN et al. 1998; 2000), perus (REED et al. 2000), codornas (KAYANG et al. 2000) e avestruzes (KIMWELE et al. 1998; TANG et al. 2003).

Empregando-se a tecnologia genômica é possível quantificar o risco de extinção das várias espécies ameaçadas (O'BRIEN, 1994; AVISE et al. 1995). A utilização de marcadores microssatélites para a estimativa de variabilidade genética de populações com objetivos conservacionistas é reportada em diversos estudos. SANDERLIN et al. (2009) trabalhando com STRs-tetranucleotídeos, constataram baixa diversidade genética em duas populações do urso negro americano (*Ursus americanus*).

Estudos realizados por FANTIM et al. (2007) permitiram conhecer o sistema de reprodução e estabelecer estratégias de manejo em cativeiro e de conservação em três espécies de tartarugas do gênero *Podocnemis*. BISHOP et al. (2009) constataram a diminuição do tamanho efetivo em populações do crocodilo do nilo,

ocasionada pela caça excessiva. Da mesma forma, para estudos populacionais em ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*), KOLOMYJEC et al. (2008) desenvolveram dez locos de marcadores microsatélites.

Em pesquisa realizada por CORREA et al. (2009), foram desenvolvidos 16 locos de microsatélites para estudos de genética populacional, determinação de parentesco e comportamento reprodutivo na espécie cigarra do campo (*Neothraupis fasciata*, Passeriforme).

Os microsatélites estão distribuídos no genoma dos diversos organismos, de forma casual, sendo verificado em animais, a conservação de diversos sítios em espécies relacionadas, o que permite em alguns casos, a transferência de marcadores entre espécies ou mesmo gêneros com o uso de *primers* heterólogos (MOORE et al., 1991).

MANTELLATTO et al. (2010) testaram a transferabilidade de *primers* desenvolvidos para cervídeos dos gêneros *Rangifer tarandus*, *Cervus elaphus*, *C. axis* e *Moschus berezovskii* e obtiveram resultados de amplificação em espécies nativos do gênero *Mazama* (*M. americana*, *M. bororo*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, and *M. nemorivaga*). Trabalhos semelhantes foram realizados por LEITE et al. (2007) com o cervo do pantanal (*Blastocerus dichotomus*).

Neste sentido o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e a caracterização de locos microsatélite para perdizes (*Rhynchotus rufescens*), visando com isso obter marcadores moleculares para futura aplicação em estudos genéticos populacionais nessa espécie e em outros tinamídeos.

## **Materiais e métodos**

### **Coleta das amostras**

Os estudos foram realizados utilizando amostras de sangue e de tecidos de 26 perdizes amostradas em diferentes regiões do Brasil, e também amostras de outros tinamídeos.

As espécies amostradas, quantidades e locais de coleta estão discriminadas na tabela 1. Entre as 18 perdizes provenientes do criatório científico da FCAV/UNESP foram selecionadas, com base em informações de registros genealógicos daquele criatório, uma família constituída de pai, mãe e dois filhos, com o propósito de se avaliar a utilização dos *primers* desenvolvidos em testes de parentesco.

Tabela 1 - Relação dos tinamídeos e locais de coleta das amostras

Espécie/amostra	Nome Científico	Nº	Criador	Localidade
Perdiz	<i>Rhynchotus rufescens</i>	02	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
		04	Setor de Aves-UESB	Itapetinga-BA
		02	Criador Recanto das Aves	Itatiba-SP
		18	Criatório científico da FCAV/Unesp	Jaboticabal-SP
Inhambu chororó	<i>Crypturellus parvirostris</i>	04	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
		02	Criador Recanto das Aves	Itatiba-SP
Inhambu-guaçú	<i>Crypturellus obsoletus</i>	02	Criador Recanto das Aves	Itatiba-SP
		02	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
Macuco	<i>Tinamus solitarius</i>	07	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
		03	Criador Recanto das Aves	Itatiba-SP
Zabelê	<i>Crypturellus noctivagus</i>	03	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
Jaó	<i>Crypturellus undulatus</i>	03	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
Inhambu-chintã	<i>Crypturellus tataupa</i>	03	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
Inhambu-chororão	<i>Crypturellus variegatus</i>	03	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG
Azulona	<i>Tinamus tao</i>	03	Criatório Poços de Caldas	Poços de Caldas-MG

### Extração e integridade do DNA

O DNA genômico foi extraído de tecidos e sangue utilizando-se do método do fenol-cloroformio (AUSEBEL et al. 1995). Para se obter a digestão das proteínas foi adicionada proteinase K (20mg/ml).

Depois transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo adicionando-se a este 300 µl de clorofórmio:álcool-isoamilico (24:1) removendo-se novamente o sobrenadante para um tubo novo. Adicionou-se 700µl de etanol absoluto gelado, levando-se a mistura para o freezer a uma temperatura de -20°C por 1 hora, para

em seguida descartar o sobrenadante por decantação. Nova precipitação realizada adicionando-se 150 $\mu$ l de etanol 70%. Prosseguiu-se a uma centrifugação a 4°C por 25 minutos e 12000 rpm e ao finalizar, desprezou-se o sobrenadante, para resuspensão posterior do pellet seco totalmente, com 150 $\mu$ l de TE (10mM Tris HCl pH=7,6 e 1mM EDTA pH=8,0), sendo finalmente guardado a 4°C.

A visualização da integridade e concentração do DNA foi feita através de luz ultravioleta (UV) em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad).

Para a quantificação e verificação de qualidade das amostras de DNA foi utilizado o aparelho NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Na quantificação foram utilizados 1,0 $\mu$ l do DNA extraído, sendo a qualidade das amostras verificada mediante a relação 260/280 nm e 260/230 nm, as quais medem respectivamente a pureza do DNA e a presença de proteínas, fenol e outros contaminantes que são absorvidos a 280 nm.

### **Construção da biblioteca enriquecida de microssatélites**

A construção da biblioteca enriquecida de STRs foi realizada inicialmente no laboratório de análise Genética e molecular – CBMEG – UNICAMP, para tanto foi utilizada amostra de DNA proveniente de uma perdiz, com concentração aproximada de 250ng/ $\mu$ l.

Para a geração de fragmentos de tamanhos adequados, o DNA genômico foi inicialmente digerido com a enzima RsaI (10 u/  $\mu$ l). Após a digestão foi feita a ligação dos adaptadores Rsa21 e Rsa25, permitindo que todos os fragmentos apresentassem uma terminação comum e conhecida. Importante nesta etapa foi a utilização da T4 DNA ligase. Com objetivo de aumentar a quantidade de fragmentos e garantir a ligação foi realizada uma pré-amplificação.

Procedeu-se uma purificação dos produtos amplificados utilizando o kit “Quiaquick PCR purification kit” (QIAGEN Cat. # 28104). Após esta etapa, foi feita a seleção dos fragmentos contendo microssatélites, utilizando-se de beads contendo bolinhas magnéticas (PROMEGA) e oligos de STRs biotinolados (50  $\mu$ M)



Biotina - IIIII(CT)8 e Biotina - IIIII(GT)8. Nova amplificação foi realizada para geração de fragmentos de fita dupla em maior quantidade.

Os fragmentos amplificados foram clonados em um vetor pGEM -T e posteriormente transformados em XL1-BLUE, através de eletroporação utilizando-se do equipamento E. coli Pulser™ Transformation Apparatus da BioRAD.

O plaqueamento das colônias foi realizado em solução contendo meioLB + ampicilina (preparada a 50 mg/ml), 30 µl de IPTG + 30 µl de X-Gal. Para a manutenção dos clones foram utilizadas placas ELISA com fundo em U, contendo 200 µl de meio 2YT-HMFM + ampicilina (100 µg/ml) por poço. As colônias foram deixadas para crescer overnight a 37°C, armazenadas em freezer -20°C por 30 min e finalmente armazenadas em freezer -80°C.

Antes de enviar as amostras para seqüenciamento, foi realizado um mini-prep com o objetivo de isolar o DNA plasmidial das colônias recombinantes.

### **Preparo das reações de seqüenciamento**

Para o preparo das reações de seqüenciamento foi realizada uma amplificação dos fragmentos, utilizando-se 1 µl do *primer* T7(5 pmol/µl), 1,5 µl do mix Dinamics e 1,5 µl do DNA plasmidial, completando-se o volume final de 10 µl de água MilQ.

A purificação das amostras foi feita através de uma lavagem com isopropanol 65%, vortex 30 segundos e centrifugação a 3700 rpm por 45 minutos, descartando-se o sobrenadante. Em seguida foram feitas duas lavagens com Etanol 60%, sendo centrifugadas a 3700 rpm por 10 minutos, com descarte do sobrenadante. Foi feita uma centrifugação com a placa invertida em papel absorvente, por um minuto a 500 rpm. Finalmente a placa foi seca em termociclador a 95 °C por um minuto e guardada em freezer a -20°C. Estas etapas foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás – UFG.

Para o seqüenciamento, adicionou-se 10 µl de formamida Hi-di por poço, deixando em temperatura ambiente por 5 minutos e vortexando 1 minuto, utilizando seqüenciador ABI 3100 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems), etapa realizada no laboratório do CNPAF/Embrapa arroz feijão de Goiânia.

### **Desenho e características dos *primers* utilizados**

O desenho dos *primers* foi feito a partir das seqüências obtidas utilizando o programa *Primer 3* levando-se em consideração o comprimento dos produtos, a temperatura de hibridização e evitando-se a formação de *mispriming* ou de *hairpins*. Com o objetivo de diminuição de gastos na etapa de genotipagem, foi adicionada aos *primers forward* uma cauda M13 (TGTAACGACGGCCAGT), de acordo com protocolo estabelecido por SCHUELKE (2000) e BOUTIN-GANACHE et al. (2001).

### **Otimização da PCR**

A reação de amplificação foi realizada de acordo com a programação para cada *primer* após ter conseguido as temperaturas ótimas para cada um deles fazendo gradiente de temperaturas, ajuste de ciclos, variando as Taq polimerases e mudando as concentrações dos diferentes reagentes utilizados na PCR. A concentração dos reagentes utilizados na PCR, os parâmetros utilizados assim como as condições utilizadas para a padronização das reações em PCR no termociclador são apresentadas nas tabelas 1 e 2 em anexo (pagina 66).

### **Genotipagem das amostras e caracterização dos *primers***

Os produtos da amplificação de 26 perdizes foram submetidos à eletroforese vertical em gel desnaturante de acrilamida 6% e corados com nitrato

de prata de acordo com CRESTE et al. (2001), com a finalidade de se caracterizar a variabilidade presente nestes locos.

### **Análises estatísticas**

Os parâmetros estatísticos com frequências alélicas, heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), conteúdo polimórfico informativo (PIC) e Probabilidade de não exclusão de paternidade (NE-1P) foram estimados com o uso do software Cervus 3.0 (MARSHAL et al., 1998). As estimativas dos desvios de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram realizadas utilizando-se do programa GENEPOP 3.3 (RAYMOND e ROUSSET, 1995 )

### **Resultados e discussão**

#### **Desenho dos *primers* sintetizados**

De um total de 96 colônias contendo fragmentos de DNA enriquecidos com microssatélites foi possível identificar 34 locos de microssatélites (35,4%), sendo que destes, foram selecionados 16 (47%) para desenho de pares de *primers* para amplificação via PCR.

#### **Resultados das amplificações dos géis em agarose**

A figura 1 demonstra os resultados obtidos da corrida em gel de agarose dos de 16 *primers* de microssatélites desenvolvidos para perdizes após amplificação em PCR, com temperatura de hibridização de 60° C.



Figura 1 – Corrida em gel de agarose 1,5 %, corado com Brometo de Etídeo - Resultados de PCR primers de microsatélites para Perdizes 60° C. A distribuição das amostras segue a seguinte ordem: L - *ladder* de 1kb; 1 e 2 - *primer* 8A; 3 e 4 - *primer* 12A ; 5 e 6 - *primer* 12B; 7 e 8 - *primer* 09D; 9 e 10 - *primer* 10D; 11 e 12 - *primer* 09C; 13 e 14 - *primer* 03D; 15 e 16 - *primer* 11D; 17 18 - *primer* 04F; 19 e 20 - *primer* 10F, 21 e 22 - *primer* 12F; 23 e 24 - *primer* 03G; 25 e 26 - *primer* 06G; 27 e 28 - *primer* 11G; 29 e 30 - *primer* 12G e 31 e 32 - *primer* 05H.

A caracterização dos locos de microsatélites desenvolvidos para perdizes é apresentada na tabela 2. De um total de 16 *primers* sintetizados, foram genotipados oito locos de microsatélites, sendo quatro destes polimórficos. Um total de 23 alelos foi detectado, sendo que uma média de 5,75 alelos por loco foi observada nestes quatro locos selecionados para este estudo, variando de dois (RruGT06G) a 11(RruGT10D) alelos. A tabela 3 mostra a freqüências alélicas de cada loco. Para confirmação da presença do microsatélite no produto de amplificação foi realizado o sequenciamento de, pelo menos, um indivíduo em cada locos desenvolvido.

As análises multilocos revelaram estimativas de Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) de 0,6932, variando de 0,496 (RruGT06G) a 0,846 (RruGT10D). A Heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) foi de 0,557, com variação de 0,250(RruGT06G) a 0,682(RruGT12B). O loco RruGT12B apresentou uma valores de  $H_o$  ligeiramente maior que  $H_e$ , indicando um excesso de heterozigotos para este loco, embora apresenta resultados significativos de  $P$  value, indicando que este loco está em EHW.

Tabela 2 - Descrição dos *primers*, variabilidade alélica de 8 locos de microssatélites desenvolvidos para perdzizes (*Rhynchotus rufescens*), incluindo nome do locos, número de acesso, sequências do *primer*, motivo de repetição, temperatura de hibridização (T), heterozigidade esperada (He), heterozigidade observada (Ho), tamanho do fragmento, equilíbrio Hardy-Weinberg (EHW) P value, Conteúdo de polimorfismo informativo (PIC) e probabilidade de não exclusão de paternidade – primeiro pai (NE-1P).

Locos	Sequências (5'-3')	Repetição	T	NA (Ind)	HE	HO	Tam.	EHW P value	PIC	NE-1P
RruGT12A	F GGTTCCTTCTGAGGTTCTCTG R TTTTCCTTCCCCAGTT	(GT)7	58	5 (21)	0,805	0,619	190-200	0,0905	0,752	0,605
RruGT12B	F ACTGCACTTTTGACGTTAGC R GCTGCAGATACAAGGCTACA	(GT)8	50	5 (22)	0,626	0,682	196-204	0,1655	0,546	0,801
RruGT10D	F GTGACACATTCCAGATTTGC R CATGCTCAGGATGAAGACAC	(GT)24	60	11 (25)	0,846	0,680	222-250	0,0002	0,813	0,489
RruGT06G	F CCTGTGCCCTCTGCGGGTC R GGCAGCTTTCAGGAGCTTAG	(AT)5(GT)7(AT)4	54	2 (24)	0,496	0,250	282-288	0,0310	0,368	0,882
RruGT08A	F GGGTAGCTGTGACCCCTTGC R GATGCAAGATGATGGTGAG	(GT)6	54	1 (24)	-	-	192	-	-	-
RruGT09C	F AAGATGACAGTGGGACTGAA R AGAGGGAGCTGTATCCTTTG	(GT)7+(GT)9+(GT)6	58	1 (26)	-	-	204	-	-	-
RruGT09D	F CCACCTCCCTTCATCTCAAT R TGCCCTATTCCACCTCTTCT	(GT)7	56	1 (23)	-	-	258	-	-	-
RruGT11G	F GTGTGCCTGTGATTTTCTGC R CACACACGCATGTATGTAGC	(GT)4GC(GT)2GC(GT)8	54	1 (26)	-	-	258	-	-	-
Medias <sup>1</sup>				5,75 <sup>1</sup>	0,6932 <sup>1</sup>	0,557 <sup>1</sup>			0,619 <sup>1</sup>	0,2088 <sup>2</sup>
Probabilidade de não exclusão combinada										

Observa-se ainda que os locos RruGT10D e RruGT06G encontram-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ). Estes valores podem ter ocorrido provavelmente porque a maioria das amostras de perdizes utilizadas, neste estudo, é proveniente do plantel da FCAV/UNESP que estão submetidas a um processo de seleção e de controle de acasalamentos, inerentes à condição de cativeiro.

Os valores de conteúdo polimórfico informativos, para os quatro marcadores polimórficos estão de acordo com o esperado, sendo que o marcador com maior número de alelos (RruGT10D) apresentou maior valor de PIC.

A probabilidade de não exclusão indica o poder de um loco em não excluir um indivíduo erroneamente determinado para paternidade. Neste estudo, o poder de não exclusão variou de 0,489 (RruGT10D) a 0,882 (RruGT06G). Apesar de cada loco isoladamente apresentar alta probabilidade de não exclusão, a análise combinada resultou em probabilidade de não exclusão de 0,2088 para um candidato parental, ou seja o conjunto de quatro locos analisados apresentou um poder de discriminação para análises de paternidade de 79%. Para melhorar este poder de discriminação, seria interessante o desenvolvimento de mais marcadores polimórficos.

Estudos realizados por HE et al. (2009), utilizando 14 pares de microssatélites polimórficos para o faisão dourado, obtiveram valores de exclusão de paternidade de 99%, o mesmo valor verificado por ZOU et al. (2010), utilizando 18 marcadores microssatélites também polimórficos, para uma população do grou japonês em semi-cativeiro.

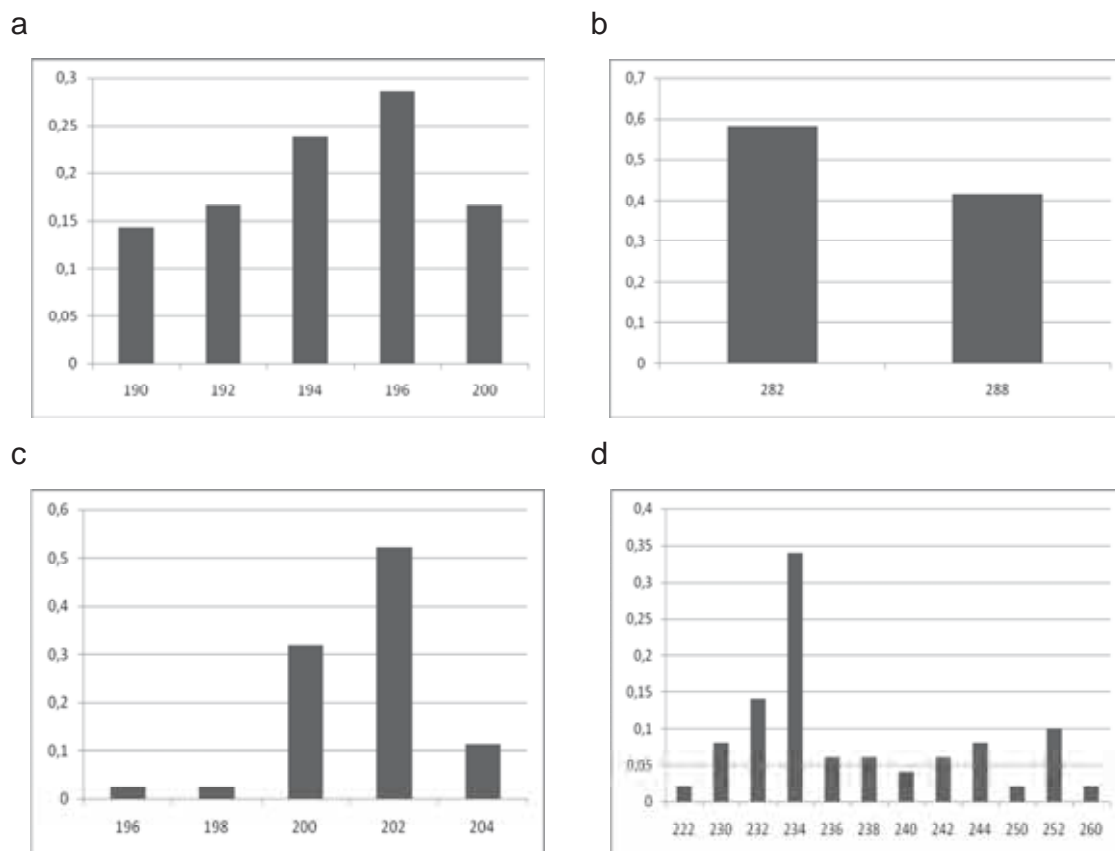


Figura 2 - Frequência dos alelos para cada primer de microssatélite: a) RruGT12A; b) RruGT06G;c) RruGT12B e;d) RruGT10D.

Neste estudo também foi testada a transferabilidade dos *primers* desenvolvidos para perdizes (*Rhynchotus rufescens*) na amplificação de amostras de DNA de outros tinamídeos, cujo os resultados são apresentados nas tabela 3.

Tabela 3 - Transferabilidade em amostras de DNA de diferentes espécies utilizando *primers* desenhados para *Rhynchotus rufescens* e respectivas temperaturas de hibridização

Primer Espécie	RruGT08A	RruGT12A	RruGT12B	RruGT09D	RruGT04F	RruGT11G	RruGT05HF
Macuco	-	-	50	56	-	-	#
Azulona	-	-	50	56	-	-	-
Inhambu-guaçu	-	58	50	56	52	56	#
Inhambu-xororó	-	-	50	56	-	56	-
Inhambu-chintã	-	-	50	56	-	-	-
Inhambu-xororão	-	-	50	56	#	-	-
Jaó do interior	#	-	50	56	-	-	-
Zabelê	#	-	50	56	-	-	-

# Bandas inespecíficas - Sem amplificações

Os resultados apresentados na tabela 4 demonstram a baixa transferabilidade dos *primers* desenvolvidos para perdizes, utilizados em outros tinamídeos. Dos que apresentaram ampliações para todas as espécies, somente o *primer* RruGT12B poderá ser utilizado em estudos de polimorfismos genéticos, haja vista o caráter monomórfico do *primer* RruGT09D.

### Resultados das amostras da família genotipada

De acordo com os resultados apresentados na tabela 5, verifica-se a compatibilidade da distribuição dos alelos entre pais e filhos, o que demonstra a aplicabilidade dos marcadores microssatélites em testes de paternidade e de parentesco, muito importantes em programas de conservação e de produção animal.

Tabela 4 – Genotipagem dos animais pertencentes a uma família de perdizes utilizando *primers* de microssatélites

	RruGT12A		RruGT12B		RruGT10D		RruGT06G	
Pai	196	200	200	202	232	234	282	288
Mãe	194	200	200	202	234	244	282	288
Filho1	196	194	200	202	232	234	282	282
Filho2	196	200	198	200	234	234	282	282

### Sequências do genoma de perdizes depositadas no GenBank

As seqüência foram obtidas de 96 colônias clonadas em plasmídeo pGEM-T, sendo que ainda existem outras 54 colônias, que também serão seqüenciadas, para então serem enviadas ao GenBank.



## Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho têm importantes implicações para o conhecimento e conservação da diversidade genética em perdizes. A utilização dos locos polimórficos desenvolvidos possibilitará o estabelecimento de estratégias voltadas para os programas de melhoramento genético de populações destinadas à produção zootécnica em cativeiro, assim como, conhecer a estrutura genética de populações naturais.

## Referências

AGGREY, S.E.; C.R. NICHOLS; K.M. CHENG. The partridge tinamou for commercial meat production: preliminary evaluation. In: WORLD'S POULTRY CONGRESS ,1992. **Anais...** Amsterdam: WPSA, p.360, 1992.

AUSEBEL, F; BRENT, R; KINGSTON, R; MOORE D; SERDMAN J.G; SMITH, J.A. and STRUN, K. **Current protocols in molecular biology**. 20 Ed., 1995.

AVISE, J.C.; HAIG, S.M.; RYDER, O.A.; LYNCH, M.; GEYER, C.J. Descriptive genetic studies; applications in population management and conservation biology. In. Ballou, J.D. e Fose, T.J. (Ed) **Population management for survival and recovery**. Columbia University Press, New York, Pp 183-244, 1995.

BISHOP, J.M.; LESLIE, A.J.; BOURQUIM, S.L; O'RYAN, C. Reduced effective population size in an overexploited population of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). **Biological Conservation**, v.142, p. 2335–2341, 2009.

BOUTIN-GANACHE, I., RAPOSO, M., RAYMOND, M., M13-tailed *primers* improve readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele sizing methods. **Biotechniques**, v.31, p.1-3, 2001.

BRESSAN, P.M., KIERULFF, M.C.M., SUGIEDA, A.M.. **Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados/** Coordenação geral Paulo Magalhães Bressan. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 645 p., 2009.

BRUNELI, F. A. T.; THOLON, P.; ISAAC, F. L.; DAMASCENO, P. R.; TONHATI H.; QUEIROZ, S. A. de. Caracterização da Reprodução de Perdizes (*Rhynchotus Rufescens*) em cativeiro. **Ars veterinária**, v. 21, n.2, p.272-280, 2005.

CORREA, C.L.; COLLEVATTI, R.G.; CAPARROZ, R. Isolation and Characterization of Microsatellite Loci for *Neothraupis fasciata*, (Emberizidae, Passeriformes) with Widely Cross Amplification in Neotropical Passerines. **Jornal of Heredity**, V.101, p.1-5, 2009.

CRESTE, C.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p. 299-306, 2001.

CROMBERG, V.U.; STEIN, M.S.; BOLELI, I.C.; TONHATI, H.; QUEIROZ, A.S. Reproductive and Behavioral Aspects of Redwinged Tinamous (*Rhynchotus rufescens*) in Groups with Different Sex Ratios. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.9, n.3 p. 161–166, 2007.

FANTIM, C.; CARVALHO, C.F. ; HRBEK, T.; SITES JR, J.W.; MONJELÓ, L.A.S.; ASTOLFI-FILHO, S.; FARIAS, I.P. Microsatellite DNA Markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered yellow spotted Amazon River turtle. **Molecular ecology notes**, v.7, p.1235-1238, 2007.

GARITANO-ZAVALA, A.; LOZANO, J.C.; GISMONDI, P.; MOLINA, M.; FLORES, C.; CONDORI, G.; VARGAS, P.; CONDORI, C.; HUALLPARA, S. e ALANOCA, G. Los primeiros resultados de La crianza experimental em cautiverio de La pisaca (*Nothoprocta ornata*) em dos comunidades rurales del altiplano Boliviano. **Ornitologia Tropical**, v.15(suppl.), p.339-341, 2004.

GROENEN, M.A.; CROOIJMANS, R.P.; VEENENDAAL, A.; CHENG, H.H.; SIWEK, M.; VAN DER POEL, J.J. A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome. **Genomics**, v.49, p.265–274, 1998.

GROENEN, M.A.; CHENG, H.H.; BUMSTEAD, N.; BENKEL, B.F.; BRILES, W.E.; BURKE, T.; BURT, D.W.; CRITTENDEN, L.B.; DODGSON, J.; HILLEL, J.; LAMONT, S.; DE LEON, A.P.; SOLLER, M.; TAKAHASHI, H.; VIGNAL, A. A consensus linkage map of the chicken genome. **Genome Res.**, v.10, p.137–147, 2000.

HE, K.; ZHANG, P.; FANG, S. Development and characterization of 14 novel microsatellite markers from the golden pheasant (*Chrysolophus pictus*). *Conserv. Genet.*, v.10, p.511-513, 2009.

KAYANG, B.B.; INOUE-MURAYAMA, M.; NOMURA, A.; KIMURA, K.; TAKAHASHI, H.; MIZUTANI, M.; ITO, S. Fifty microsatellite markers for Japanese quail. **J. Hered.**, v.91, p.502–505, 2000.

KIMWELE, C.N., GRAVES, J.A., BURKE, T. and HANOTTE, O. Development of microsatellite markers for parentage typing of chicks in the ostrich *Struthio camelus*. **Molecular Ecology**, v.7, p.247-255, 1998.

KOLOMYJEC, S.H.; GRANT, T.R.; BLAIR, D. Ten polymorphic microsatellite DNA markers for the platypus, *Ornithorhynchus anatinus*. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.1133–1135, 2008.

LEITE, K.C.E.; COLLEVATTI, R.G.; MENEGASSO, T.R.; TOMAS, W.M. e DUARTE, J.M.B. Transferability of microsatellite loci from Cervidae species to the endangered Brazilian marsh deer, *Blastocerus dichotomus*. **Genetics and Molecular Research**, v.6, n.2, p.325-330, 2007.

MANTELLATTO, A.M.B.; CARNELOSSI, E.A.G. e DUARTE, J.M.B. Transferability of microsatellite loci from exotic Cervidae to Brazilian brocket deer (*Mazama* spp, Mammalia: Cervidae). **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.1, p.277-282, 2010.

MARSHAL, T.C. SLATE, J., KRUUK, L..E.B., PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v,7, p 639-655, 1998.

MOORE, S.S.; SARGEANT, L.L.; KING, T.J.; MATTICK, J.S.; GEORGES, M.; HETZEL, D.J.S. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR *primer* pairs in closely related species. **Genomics**, v.10, p.654-660, 1991.

O`BRIEN, S.J.; A role for molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 5748-5755. 1994.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, 86, p.248–249, 1995.

REED, K.M., ROBERTS, M.C., MURTAUGH, J., BEATTIE, C.W., AND ALEXANDER, L.J.. Eight new dinucleotide microsatellite loci in turkey (*Meleagris gallopavo*). **Anim. Genet.**, v.31(2):140p., 2000.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v.230, p.1350-1354, 1985.

SANDERLIN, J.S.; FAIRCLOTH, B.C.; SHAMBLIN, B.; CONROY, M.J. Tetranucleotide loci from the black bear (*Ursus americanus*). **Molecular Ecology resources**, v.9, p.288-291, 2009.

SANTOS, D.O.; MENDES, A.; NOGUEIRA, S. S. da C.; NOGUEIRA FILHO, S. L. G. Criação comercial de caititus (*Pecari tajacu*): uma alternativa para o agronegócio. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.1, p.1-10, 2009.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v.18, p233-234, 2000.

SICK, H. **Ornitologia brasileira: uma introdução**. Editora nova fronteira, Rio de Janeiro, 792 p, 1997.

TANG, B.; HUANG, Y.H.; LIN, L.; HU, X.X.; FENG, J.D.; YAO, P.; ZHANG, L.; LI, N. Isolation and characterization of 70 novel microsatellite markers from ostrich (*Struthio camelus*). **Genome**, v.46, p.833-840, 2003.

ZOU, H.; DONG, H.; KONG, W.; MA, J.; LIU, J. Characterization of 18 polymorphic microsatellite loci in the red-crowned crane (*Grus japonensis*), an endangered bird. **Animal Science Journal**, v.81, p.519-522, 2010.

## Anexo

Anexo 1 - Concentração dos reagentes necessários na PCR e parâmetros utilizados para sua padronização.

<b>Taq Pol 5U/μl</b>	<b>Concentração Final Recomendada</b>
Água mQ	H <sub>2</sub> O
Buffer 10x	1X
MgCl <sub>2</sub> a 25mM	1-4mM
Mix dNTPs a 2mM	0,2 mM de cada
<i>Primer</i> FW 10μM	0,1 - 1 μM
<i>Primer</i> RV 10μM	0,1 - 1 μM
Taq 5U/μl	1,25U/50μl a 0,625U/25μl
DNA 25ng/μl	10pg-1μg/50ul (0,01ng - 1000ng)

Anexo 2 – Condições utilizadas para a padronização das reações em PCR no termociclador

<b>Termociclador</b>	<b>Desnat.</b>	<b>Desnat.</b>	<b>Hibridização</b>	<b>Extensão</b>	<b>Ext. final</b>	<b>Manutenção</b>
Nº de ciclos	1	Nº de ciclos (25-35)			1	1
Temp. °C	94°C	94°C	50-60 °C	72°C	72°C	15°C
Tempo (min.)	4 min.	45seg	45seg	45seg	7 min.	infinito

#### **CAPITULO 4 - ESTUDO GENETICO-QUANTITATIVO DE CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS, PONDERAIS E COMPORTAMENTAIS EM PERDIZES, UTILIZANDO DE INFERÊNCIA BAYESIANA**

**Resumo** - Foram utilizados registros de características morfométricas, ponderais e de comportamento de 690 perdizes pertencentes a quatro gerações, nascidas nas estações reprodutivas de 2006-2007, 2007-2008, 2008-2009 e 2009-2010, com o objetivo de se estimar componentes de (co)variância e parâmetros populacionais. Um modelo multi-características foi proposto, em que se consideram os efeitos fixos de classe de época de nascimento/geração e sexo, e como aleatórios aditivo direto e residual. Para a obtenção das estimativas foi utilizado o programa GIBBS2F90, que utiliza para a estimação dos componentes de variância o método bayesiano. As estimativas de herdabilidade para as características morfométricas apresentaram magnitudes que variaram de 0.177 a 0.690. As correlação genéticas apresentaram valores diversos, inclusive indicativos de antagonismo entre algumas características. Os resultados apresentados indicam que a realização de um processo de seleção utilizando como critérios de seleção medidas morfométricas, pode incorrer em ganho genético rápido, dado os valores de herdabilidade.

Palavras-chave: Amostrador de Gibbs, critérios de seleção, parâmetros genéticos

## Introdução

As novas tendências do mercado consumidor têm possibilitado o oferecimento de produtos diferenciados como, por exemplo, a produção de carne de aves silvestres, dentre as quais a perdiz (*Rhynchotus rufescens*), possui grande potencial para atender a esta demanda. Representante da fauna brasileira, esta espécie apresenta características de grande interesse para a produção animal, tais como excelente valor nutritivo da carne de peito, baixos níveis de colesterol e altos rendimentos de carcaça e de peito, 74.37 % e 36.65%, respectivamente (MORO et al. 2006).

Com o objetivo de se expressar o potencial latente desta ave em um sistema de produção animal, assim como em outras espécies, a utilização da seleção como metodologia é indispensável. Dentro do estabelecimento de um programa de melhoramento genético, primeiramente deve-se estabelecer os objetivos e critérios de seleção a serem adotados, sendo necessário a realização de estudos a fim de se conhecer os mecanismos genéticos envolvidos. Dentro deste contexto se insere a importância de se estimar os componentes que compõem a variância sobre determinada característica. As estimativas de (co)variância tem sido aplicadas na construção de índices de seleção, em modelos mistos, estimação de herdabilidade e correlações, planejamento de programas de melhoramento e interpretação de mecanismo genético de características quantitativas (HENDERSON, 1986).

Em vista de um sistema de produção de carne, a primeira característica a ser considerada como critério é o peso corporal, em virtude da facilidade de obtenção. Entretanto, segundo NORTH CUTT et al. (1992), as mensurações corporais lineares, como altura e comprimento, são mais precisas na determinação do tamanho do animal do que o peso, sendo que a utilização de mensurações corporais, em conjunto com medidas tradicionais, possibilitam maior precisão para determinar a relativa maturidade do animal, validando-se desta forma estudos de características morfométricas.



Neste sentido, o objetivo deste trabalho é a estimação de componentes de (co)variância e parâmetros populacionais (herdabilidade e correlações genética e residual) em características morfométricas em perdiz, a fim de auxiliar a tomada de decisão quanto a determinação de critérios de seleção em programas de melhoramento desta espécie.

### **Materiais e Métodos**

Para o presente estudo, foram utilizadas informações de 690 perdizes pertencentes a quatro gerações, nascidas nas estações reprodutivas de 2006-2007, 2007-2008, 2008-2009 e 2009-2010, criadas no Setor de Animais Silvestres da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV. Foram consideradas para o estudo as seguintes características: comprimento do tarso (CT), comprimento do bico (CB), comprimento da asa (CA), largura da cabeça (LC), largura do bico (LB), peso adulto (PA), peso aos 90 dias (P90) e imobilidade tônica (IT), sendo as características morfológicas mensuradas com a utilização de paquímetro digital e as pesagens e a característica de imobilidade tônica obtidas com o uso de balança de precisão e cronômetro digital, respectivamente.

A montagem do arquivo de dados e formação dos grupos de aves de acordo com a época de nascimento e geração e, a eliminação de informações incompletas e outliers, foram realizadas utilizando-se do programa SAS® (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA-2009).

Tabela 1 – Descrição do banco de dados utilizados nas análises de estimação de parâmetros genéticos

<b>Caract.</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>D.P.</b>	<b>Minimo</b>	<b>Maximo</b>
CT	544	49,849	5,517	34,370	63,500
CB	539	38,671	2,972	29,200	48,330
CA	437	148,640	7,291	125,890	172,000
PA	439	723,011	99,681	496,000	1046,000
LB	542	10,297	0,792	8,180	12,470
LC	541	26,062	1,368	22,180	30,340
IT	651	306,551	301,523	13,000	1625,00
P90	662	537,660	132,734	196,000	878,000

Um modelo multi-características foi proposto, em que se consideram os efeitos fixos de classe de época de nascimento/geração e sexo, e como aleatórios, os aditivo direto e residual. Para a obtenção das estimativas foi utilizado o programa GIBBS2F90 (MISZTAL, 2010), que utiliza para a estimação dos componentes de variância o método bayesiano, através da implementação do amostrador de Gibbs. Em notação matricial, o modelo completo utilizado para análise pode ser representado por:

$$y = X\beta + Za + \varepsilon$$

em que,  $y$ ,  $\beta$ ,  $a$  e  $\varepsilon$  são os vetores de observações, dos efeitos fixos, valores genéticos aditivos diretos e efeitos residuais, respectivamente;  $X$  e  $Z$  as matrizes de incidência que associam  $\beta$  e  $a$  às observações. Assumiu-se para os efeitos fixos e aleatórios, respectivamente, “priors” uniformes e normais:

$$\beta \sim \text{uniforme}$$

$$a | G \sim \text{MVN}[0, (A \otimes G)]$$

$$\varepsilon | R \sim \text{MVN}[0, (I \otimes R)]$$

onde  $A$ ,  $G$ ,  $R$  e  $I$  são respectivamente, as matrizes de parentesco, (co)variâncias de efeitos genéticos diretos, (co)variâncias dos resíduos e identidade ;  $\otimes$  é o operador do produto Kronecker. Para os componentes de variância utilizou-se prioris advindo de distribuições Wishart Invertida, correspondente em casos univariados a chi-quadrado invertida (VAN TASSEL & VAN VLECK, 1996). Assim:

$$G | S_a, v_a \sim IW[S_a v_a, v_a]$$

$$R | S_r, v_r \sim IW[S_r v_r, v_r]$$

em que,  $S_a$  e  $v_a$ ;  $S_r$  e  $v_r$  são os valores "a priori" e graus de liberdade para as (co)variâncias aditivas diretas e residual, nesta ordem.

Foi determinado um comprimento de cadeia de 1000000 de ciclos, após um período de burn-in de 30000 ciclos. Os valores eram coletados a cada 20 ciclos. Tanto o período de aquecimento, quanto o intervalo de coleta, foram estabelecidos empiricamente, entretanto, posteriormente, foi realizada uma inspeção pós-gibbs através do programa Gibanal (VAN KAAM, 1997), para verificar a convergência e obtenção de amostras. Os parâmetros populacionais foram calculados a partir das amostras vetor a vetor, sendo estimados a média e desvio-padrão das distribuições "a posteriori".

## Resultados e Discussão

### Análise pós-gibbs

Através da análise utilizando do programa Gibanal em conjunto com inspeção gráfica (resultados não apresentados), verificou-se que o aquecimento utilizado foi suficiente para garantir a convergência em todos os parâmetros estimados. Mas uma grande dependência entre as amostras foi verificada, o que ocasionou considerável redução no número de amostras efetivas, principalmente

para as estimativas de correlações genéticas. A similaridade entre média, mediana e moda em grande parte das distribuições posteriores dos parâmetros são indicativos de distribuições normais, entretanto em alguns parâmetros (tais como em algumas correlações genéticas) desvios de normalidades são verificados.

No que concerne a confiabilidade das estimativas, verifica-se que em virtude do pequeno número de informações, algumas das estimativas apresentam intervalos de alta densidade amplos. Assim, deve-se ter cuidado em estabelecer conclusões baseadas em alguns parâmetros (especialmente correlações) em virtude do intervalo em que se encontra a estimativa.

#### Herdabilidades

As estimativas de herdabilidade (Tabela 1) para as características estudadas apresentaram magnitude de baixa a alta, variando entre 0,177 (comprimento de asa) e 0,510 (comprimento de bico) . Constata-se que ganhos genéticos podem ser obtidos através da seleção, uma vez que se verifica contribuição do efeito genético sobre a variação das características.

No que se refere as características morfológicas, não foram possíveis comparações com resultados da literatura, uma vez que estudos com perdizes ou outros tinamídeos serem escassos. Entretanto, trabalhos envolvendo outras espécies, corroboram com os resultados encontrados para características morfológicas.

Estimativas de herdabilidade de características de conformação como comprimento de coxa e canela medidas na quarta e sexta semanas e ângulo do peito na sexta semana de idade em três linhagens de codornas foram relatadas por MANDAL et al. (1995). Estas estimativas variaram de 0,10 a 0,52, sendo mais altas na quarta semana. Para ângulo de peito as estimativas variaram de 0,32 a 0,50. Estimativas de herdabilidade de 0,51 a 0,63 para as características peso corporal, peso muscular e características de esqueleto (peso, comprimento,

largura e altura) de codornas japonesas com oito semanas de idade foram relatadas por SATO et al. (1989).

Tabela 2 – Estatísticas descritivas das distribuições posteriores das estimativas de variância genética, residual e herdabilidade das características estudadas

Caract.	Param. <sup>1</sup>	A.E. <sup>2</sup>	Média	Mediana	Moda	IAD-LI	IAD-LS
CT	$\sigma_a^2$	2110	4,971	4,590	4,847	2,552	7,516
	$\sigma_r^2$	3167	19,218	19,060	19,150	16,06	22,28
	$h^2$	1583	0,206	0,186	0,203	0,113	0,306
CB	$\sigma_a^2$	2109	4,244	4,117	4,215	2,561	5,971
	$\sigma_r^2$	3163	4,019	4,113	4,011	2,821	5,262
	$h^2$	2109	0,510	0,522	0,515	0,341	0,667
CA	$\sigma_a^2$	94	9,454	8,663	8,871	4,449	16,58
	$\sigma_r^2$	3166	44,298	43,199	44,220	36,64	52,06
	$h^2$	147	0,177	0,163	0,168	0,084	0,29
PA	$\sigma_a^2$	3167	3743,780	3572,646	3696,000	2092	5476
	$\sigma_r^2$	3167	3882,053	3755,123	3858,500	2670	5161
	$h^2$	3167	0,489	0,510	0,492	0,308	0,661
LC	$\sigma_a^2$	2111	0,161	0,142	0,154	0,058	0,262
	$\sigma_r^2$	2375	0,429	0,436	0,430	0,335	0,517
	$h^2$	1583	0,267	0,252	0,261	0,111	0,425
LB	$\sigma_a^2$	1582	0,690	0,654	0,671	0,32	1,075
	$\sigma_r^2$	1583	1,241	1,238	1,240	0,949	1,546
	$h^2$	1266	0,356	0,331	0,350	0,195	0,53
IT	$\sigma_a^2$	4750	35234,180	32422,970	34500,000	19420	52020
	$\sigma_r^2$	3167	63232,270	63197,100	63295,000	49220	77160
	$h^2$	4750	0,356	0,342	0,350	0,208	0,501
P90	$\sigma_a^2$	3167	3176,345	3086,135	3131,000	1788	4604
	$\sigma_r^2$	3166	4293,625	4049,070	4278,000	3198	5433
	$h^2$	3167	0,425	0,404	0,422	0,258	0,581

<sup>1</sup>  $\sigma_a^2$  = variância genética aditiva;  $\sigma_r^2$  = variância residual;  $h^2$  = herdabilidade

<sup>2</sup> amostras efetivas

<sup>3</sup> desvio-padrão

As características de desenvolvimento ponderal (peso adulto e peso aos 90 dias) apresentaram valores altos de herdabilidade, indicando que ganhos genéticos significativos podem ser obtidos utilizando-as como critérios de seleção. Valores de magnitude semelhante foram apresentados por THOLON et al. (2008), trabalhando com pesos em diversas idades em perdizes. Para imobilidade tônica, estimativa de menor valor foi reportada por HATA (2009) nesta espécie.

#### Correlações genéticas e residuais

As correlações genéticas entre as características estudadas (Tabela 2) apresentaram valores entre -0,332 (CT/IT) e 0,806 (CA/LB). Tais valores indicam que cuidados devam ser dados a programas de seleção para esta espécie, uma vez que a escolha de determinado critério pode induzir em resultados não desejáveis em outras características.

Como, verificado em outros estudos, nas mais diversas espécies, os pesos apresentam-se altamente correlacionados, indicando que a seleção para peso aos 90 dias promoverá aumento no peso adulto dos animais. No que se refere a associação genética das demais características com PA e P90, a exceção das estimativas com CB e IT, apresentaram valores próximos. Em vista das correlações estimadas, adotando-se PA ou P90 como critério de seleção ganho genéticos são esperados nas demais características, com exceção da relação do CB com o P90.

Tabela 3 - Estatísticas descritivas das distribuições posteriores das estimativas de correlação genética entre as características estudadas

Caract.	A.E.	Média	Mediana	Moda	IAD-LI	IAD-LS
CT/CB	679	-0,270	-0,346	-0,279	-0,606	0,076
CT/CA	103	-0,146	-0,217	-0,158	-0,552	0,313
CT/PA	1583	0,613	0,609	0,621	0,379	0,814
CT/LC	110	0,219	0,267	0,231	-0,270	0,662
CT/LB	224	-0,151	-0,255	-0,172	-0,569	0,282
CT/IT	594	-0,332	-0,361	-0,348	-0,634	0,010
CT/P90	297	0,592	0,643	0,610	0,292	0,856
CB/CA	173	0,626	0,670	0,640	0,357	0,836
CB/PA	3166	0,182	0,197	0,190	-0,138	0,492
CB/LC	1583	0,064	0,066	0,070	-0,367	0,469
CB/LB	2366	0,158	0,184	0,169	-0,215	0,509
CB/IT	2375	-0,065	-0,090	-0,068	-0,419	0,288
CB/P90	1583	-0,046	-0,044	-0,042	-0,423	0,316
CA/PA	488	0,491	0,551	0,503	0,185	0,756
CA/LC	1583	0,407	0,487	0,425	0,034	0,759
CA/LB	45	0,806	0,840	0,816	0,601	0,950
CA/IT	2375	0,179	0,189	0,182	-0,191	0,542
CA/P90	1584	0,404	0,439	0,423	0,084	0,716
PA/LC	2375	0,276	0,226	0,278	-0,117	0,647
PA/LB	2375	0,318	0,325	0,326	-0,036	0,640
PA/IT	2375	0,246	0,274	0,252	-0,102	0,580
PA/P90	1583	0,745	0,771	0,757	0,549	0,914
LC/LB	1187	0,230	0,321	0,245	-0,186	0,649
LC/IT	2375	0,038	0,002	0,039	-0,386	0,444
LC/P90	1583	0,304	0,318	0,317	-0,119	0,688
LB/IT	1584	0,160	0,188	0,168	-0,215	0,546
LB/P90	1584	0,395	0,429	0,407	0,043	0,717
IT/P90	3167	0,082	0,072	0,082	-0,262	0,408

<sup>1</sup> número de amostras efetivas

<sup>2</sup> desvio-padrão

Com relação às estimativas de correlações residuais, estas apresentaram valores de menor magnitude quando comparadas as estimativas genéticas, variando entre -0,114 (CA/LB) e 0,491 (PA/P90). Assim, em vistas dos valores encontrados, podemos inferir que alterações no ambiente para uma determinada características, ocasiona poucas mudanças sobre as demais características.

Tabela 4 - Estatísticas descritivas das distribuições posteriores das estimativas de correlação residual entre as características estudadas

Caract.	A.E. <sup>1</sup>	Média	Mediana	Moda	IAD-LI	IAD-LS
CT/CB	594	0,305	0,280	0,302	0,135	0,475
CT/CA	1267	0,392	0,400	0,394	0,272	0,507
CT/PA	3167	0,162	0,193	0,166	-0,003	0,321
CT/LC	475	0,017	0,043	0,020	-0,131	0,153
CT/LB	487	-0,023	-0,023	-0,025	-0,168	0,132
CT/IT	3166	0,136	0,152	0,135	-0,014	0,282
CT/P90	3166	0,047	0,087	0,052	-0,111	0,210
CB/CA	1583	0,092	0,085	0,094	-0,078	0,252
CB/PA	3166	0,115	0,135	0,120	-0,131	0,344
CB/LC	2110	-0,005	0,004	-0,003	-0,200	0,201
CB/LB	2104	-0,058	-0,060	-0,055	-0,284	0,141
CB/IT	3166	0,144	0,164	0,144	-0,075	0,351
CB/P90	2375	0,146	0,129	0,146	-0,086	0,369
CA/PA	3166	0,306	0,320	0,308	0,160	0,441
CA/LC	3167	0,028	0,021	0,030	-0,107	0,163
CA/LB	3166	-0,114	-0,103	-0,112	-0,278	0,043
CA/IT	3166	-0,026	-0,045	-0,027	-0,171	0,112
CA/P90	3166	0,205	0,222	0,207	0,059	0,350
PA/LC	3167	0,173	0,167	0,175	-0,013	0,365
PA/LB	3166	0,156	0,163	0,159	-0,049	0,351
PA/IT	3166	0,013	0,034	0,015	-0,188	0,216
PA/P90	3166	0,491	0,528	0,497	0,326	0,636
LC/LB	2372	0,062	0,081	0,065	-0,115	0,218
LC/IT	2111	-0,039	-0,027	-0,039	-0,207	0,122
LC/P90	2111	0,010	0,042	0,014	-0,174	0,191
LB/IT	3166	-0,060	-0,057	-0,059	-0,243	0,115
LB/P90	1584	0,033	0,049	0,037	-0,163	0,218
IT/P90	3165	0,008	0,019	0,008	-0,173	0,181

<sup>1</sup> número de amostras efetivas<sup>2</sup> desvio-padrão

## Conclusões

Os resultados apresentados indicam que a realização de um processo de seleção utilizando como critérios de seleção medidas morfométricas, pode incorrer em ganho genético rápido, dado os valores de herdabilidade, inclusive com ganhos positivos sobre os pesos dos animais.



## Referências

HATA, M.E. **Efeitos genéticos e ambientais sobre o tempo de permanência em imobilidade tônica de perdizes (*Rhynchotus rufescens*)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal, 2009.

HENDERSON, C.R. Recent developments in variance and covariance estimation. **Journal Animal Science**, v.63, p. 208-216. 1986.

MANDAL, K. G. et al. Genetic parameters of slaughter traits in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Indian Veterinary Journal**, v. 72, n. 1, p. 43-46, 1995.

MISZTAL, I. [2007]. **BLUPF90 family of programs**. Disponível em <<http://nce.ads.uga.edu/~ignancy/newprograms.html>>. Acesso em: 12/12/2007.

NORTHCUTT, S.L.; WILSON, D.E.; WILLHAM, R.L. Adjusting weight for body condition score in Angus cows. **Journal Animal Science**, v.70, n.5, p.1342-5, 1992.

OLESEN, I. ; GROENT, A.F. ; GJERDE, A.F. Definition of animal breeding goals for sustainable production systems. **Journal of Animal Science**,v.78, p.570-582. 2000.

SATO, K. et al. Genetic parameters of body weight, muscle weight and skeletal characteristics in Japanese quail. **Jikken Dobutsu**, v. 38, n. 1, p. 47-54, 1989.

THOLON, P.; FREITAS, E.C.; QUEIROZ, S.A. Estimativas de parâmetros genéticos para pesos corporais em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro. **Revista Caatinga**, v.21,n.2,p.48-61. 2008.

Van KAAM, J.B.C.H.M. **GIBANAL** – Analyzing program for Markov Chain Monte Carlo sequences. Version 2.4, Netherlands: 1997.

Van TASSEL, C.P.; Van VLECK, L.D. Multiple-trait Gibbs sampler for animal models; flexible programs for Bayesian and likelihood-based (co)variance components inference. **Journal Animal Science**, v.74, n.11, p.2586-2597, 1996.