



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



**SEXAGEM MOLECULAR EM PERDIZ *Rhynchotus rufescens* (Aves: Tinamiformes): AÇÕES
PARA SUPORTE À CRIAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE**

Marielly de Campos Bordignon

Botucatu, SP

2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

SEXAGEM MOLECULAR EM PERDIZ *Rhynchotus rufescens* (Aves: Tinamiformes): AÇÕES
PARA SUPORTE À CRIAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE

NOME DO ALUNO: Marielly de Campos Bordignon

ORIENTADOR: Prof^a Dr^a Adriane Pinto Wasko

CO-ORIENTADOR: Prof Dr Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética), junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética), do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu.

BOTUCATU – SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bordignon, Marielly de Campos.

Sexagem molecular em perdiz rhynchotus rufescens (Aves: Tinamiformes) : ações para suporte à criação e conservação da espécie / Marielly de Campos Bordignon. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Adriane Pinto Wasko

Coorientador: Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva

Capes: 20200005

1. Perdiz (Ave). 2. Aves - Criação. 3. Conservação.
4. Reprodução. 5. Marcadores genéticos.

Palavras-chave: Cativoiro; Conservação; Criação; Marcadores moleculares; Reprodução.

Dedico este trabalho à minha família, em especial a minha filha Isabella, que participou (ainda na barriga) no processo de desenvolvimento da pesquisa e escrita. Te amo e amarei eternamente.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir a chegar aqui, por me auxiliar e me dar força para continuar.

Agradeço aos meus pais Ana Claudia e Edson por sonharem junto comigo, por me incentivarem e apoiarem em todos os meus planos. Sem vocês eu nada seria.

Agradeço a minha irmã Mirella, por sempre estar ao meu lado, por me dar conselhos e me dar forças.

Agradeço ao meu marido Victor, por ser meu companheiro, por sempre dar o seu melhor por nossa família e principalmente por sempre me ajudar nos momentos mais difíceis. Sei que sempre poderei contar com você.

Agradeço a minha filha, Isabella, que foi a melhor surpresa da minha vida. Me trouxe muito amor, paz, luz e alegria. A cada dia tento ser melhor por você.

Agradeço aos meus avós Joaquim e Argemira (*in memoriam*) por terem acreditado em mim e por sempre me ajudarem física e espiritualmente.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a Dra Adriane P. Wasko, que em todos esses anos foi muito mais que uma orientadora, sempre pude contar com seu apoio e carinho. Se eu nunca tivesse te conhecido, tenho certeza de que hoje eu não estaria aqui. Obrigada por mudar o meu mundo, por me trazer conhecimento, por me mostrar que era possível eu estudar em uma universidade pública. Muito obrigada por tudo.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, principalmente a Val, Mariana e Bruna, por sempre estarem comigo, por me ajudarem e por dividirem momentos de alegria e tristeza.

Agradeço ao meu coorientador Prof Dr. Augusto e todo o laboratório, principalmente o Luiz Eduardo, que sempre se dispôs a me ajudar.

Agradeço aos meus colegas de trabalho, tenho aprendido diariamente a ser uma pessoa melhor e a como posso transformar a vida dos meus alunos. Esses anos todos na pós-graduação e trabalhando no ensino público, me trouxe a certeza de que quero continuar na área da educação, espero um dia pode mudar a vida de alguém como a minha foi mudada em 2011 no curso de férias “Experimentando Genética”.

Agradeço a todos os professores do Ensino Fundamental, Médio, Graduação e Pós-Graduação. Sem o conhecimento de vocês eu jamais teria chegado até aqui.

Agradeço a todos os pesquisadores, que mesmo em tempos difíceis, não desistiram. Foram momentos difíceis que passamos, muitas incertezas, medos e tristezas. Mas, estamos conseguindo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Características gerais de <i>Rhynchotus rufescens</i>	1
1.2 Sexagem molecular em aves	7
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivos Gerais	11
2.2 Objetivos Específicos	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Amostragem biológica	12
3.2 Extração de DNA	14
3.3 Análise da qualidade e quantidade das amostras de DNA	16
3.4 Sexagem molecular	16
3.5 Produção de material de divulgação científica	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Amostragem biológica e isolamento de DNA	18
4.2 Padronização da técnica de PCR e implementação de teste de sexagem molecular	21
4.3 Cartilha de divulgação científica	31
5 DISCUSSÃO	33
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES E TABELA

- Figura 1. Exemplar adulto da subespécie *Rhynchotus rufescens rufescens* (The Internet IBC Bird Collection, 2021)_____3
- Figura 2. Exemplares adultos das subespécies (A) *Rhynchotus rufescens catingae* (Wikiaves, fotografia de Rodrigo Conte) e (B) *Rhynchotus rufescens pallescens* (Wikiaves, fotografia de Jefferson Bob)_____3
- Figura 3. (A) Mapa da América do Sul evidenciando a área de distribuição geográfica de *Rhynchotus rufescens* no Brasil (BirdLife, 2021) e (B) Mapa do Brasil indicando, de forma mais detalhada, registros de ocorrência da espécie (Táxeus, 2022)_____4
- Figura 4. Diversidade de sistemas de determinação sexual em vertebrados (Adaptado de BACHTROG et al., 2014)._____8
- Figura 5. Área do Setor de Melhoramento Genético de Perdizes da Fazenda Experimental Lageado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu (Fotografia de Luiz Eduardo Cruz dos Santos Correia)._____13
- Figura 6. Coleta de amostra de sangue da veia braquial de exemplar de *Rhynchotus rufescens rufescens* (Fotografia de arquivo pessoal)_____14
- Figura 7. Resultado de eletroforese em gel de agarose de amostras de DNA total isoladas a partir de sangue de exemplares de *Rhynchotus rufescens rufescens* (1 a 10) utilizando o kit DNA DNeasy - Qiagen. L, marcador de peso molecular (1Kb Plus); pb, pares de bases____20
- Figura 8. Resultado de eletroforese em gel de agarose de sexagem molecular em exemplares de *Rhynchotus rufescens rufescens*. (1 a 3) amostras de DNA de fêmeas e (4 a 6) amostras de DNA de machos. C- (controle negativo); L, marcador de peso molecular (1Kb Plus); pb, pares de bases_____24
- Tabela 1. Dados das amostras de DNA de *Rhynchotus rufescens rufescens* utilizadas na sexagem molecular e respectivos diagnósticos._____25

RESUMO

A perdiz (*Rhynchotus rufescens*), espécie da família Tinamidae, compõe a avifauna brasileira e representa atualmente uma das aves com grande potencial no mercado de corte avícola não convencional como fonte proteica alternativa. Adicionalmente, embora não seja considerada uma espécie em risco de extinção, suas populações naturais têm apresentado declínio no número de indivíduos devido, especialmente, à destruição de habitats e à caça predatória. Desta forma, sua criação em cativeiro pode beneficiar não somente o mercado consumidor e ampliar as opções da avicultura brasileira como também minimizar a pressão da caça de exemplares silvestres. Para melhor subsidiar programas de criação, são ainda necessários estudos genéticos, ainda extremamente escassos para a espécie. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo gerar dados associados à correta identificação de machos e fêmeas de *Rhynchotus rufescens*, por meio de análises moleculares. Adicionalmente, visou-se também gerar um material de divulgação científica sobre a espécie. Amostragens não-destrutivas, associadas à coleta de sangue de exemplares mantidos no Setor de Melhoramento Genético de Perdizes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Campus de Botucatu), mostraram-se eficientes para obtenção de DNA de qualidade e seu posterior uso em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A amplificação de um segmento do gene *chSPIN* (*spindlin*) permitiu a identificação, por meio de eletroforese em gel de agarose, de fragmentos de cerca de 850 e 1.400 pares de bases em fêmeas, referente ao gene presente nos cromossomos sexuais W e Z, respectivamente. Em machos, foi observado um fragmento de aproximadamente 1.400 pares de bases, associado ao gene encontrado nos dois cromossomos Z. Das 202 amostras de DNA obtidas, foi possível determinar o sexo de 188 animais, o que corresponde a 93,06% de efetividade. Desta forma, estabeleceu-se, pela primeira vez na literatura, um protocolo de sexagem molecular para *R. rufescens* que poderá ser amplamente utilizado para geração de perfis sexo-específicos em exemplares da espécie. O material de divulgação científica gerado corresponde a uma cartilha, voltada especialmente a estudantes do ensino médio, e será utilizada para subsidiar ações de interface com a educação básica, associadas à inserção social, que já vêm sendo desenvolvidas junto a um programa de pós-graduação.

Palavras-chave: criação, reprodução, cativeiro, conservação, marcadores moleculares.

ABSTRACT

The red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*), a species of the Tinamidae family, composes the Brazilian avifauna and currently represents one of the birds with great potential in the non-conventional poultry market as an alternative protein source. Additionally, although it is not considered an endangered species, its natural populations have shown a decline in the number of individuals, mainly due to habitat destruction and predatory hunting. In this way, its breeding in captivity can benefit not only the consumer market and expand the options of Brazilian poultry farming, but also minimize the hunting pressure of wild specimens. In order to give support to breeding programs, genetic analyses have to be performed, although these data are still extremely scarce for the species. Therefore, the present study aimed to generate data associated with the correct identification of males and females of *Rhynchotus rufescens*, throughout molecular analyses. Additionally, it was also generated a scientific divulgation material about the species. Non-destructive sampling strategies, associated to blood withdrawal from specimens kept in the Partridge Genetic Improvement Sector of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science at UNESP (Botucatu Campus), proved to be efficient for obtaining DNA of good quality and its subsequent use in PCR (Polymerase Chain Reaction). The amplification of a segment of the *chSPIN* gene (*spindling*) led to the identification, throughout agarose gel electrophoresis, of fragments of approximately 850 and 1,400 base pairs in females, referring to the gene present in the sex chromosomes W and Z, respectively. In males, a fragment of around 1,400 base pairs was observed associated to the gene found in the two Z chromosomes. Among the 202 obtained DNA samples, it was possible to determine the sex of 188 animals, which corresponds to a 93.06% of effectiveness. Thus, it was established, for the first time in the literature, a molecular sexing protocol for *R. rufescens* that could be widely used to generate sex-specific profiles in individuals of the species. The generated science divulgation material corresponds to a booklet, which is especially focused on high school students, and will be used to support interface actions with basic education that are associated with social insertion and that have been already developed in a graduate program.

Keywords: poultry, reproduction, captivity, conservation, molecular markers.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>CHD</i>	<i>chromo-helicase-DNA-binding</i>
<i>chSPIN</i>	<i>gene spindlin</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ESD	Environmental Sex Determination
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GSD	Genetic Sex Determination
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IUCN	International Union for Conservation of Nature
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPG	Programa de pós graduação
<i>R. rufescens</i>	<i>Rhynchotus rufescens</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais de *Rhynchotus rufescens*

O Brasil se encontra entre os países de maior riqueza faunística do mundo, apresentando mais de 20% do número total mundial de espécies (IBGE, 2017). Em relação às aves, possui 1.971 espécies distribuídas em seus diferentes biomas, sendo assim o terceiro país com maior diversidade neste grupo animal (CBRO, 2021). Portanto, pode ser considerado uma das regiões mais importantes em relação a investimentos em conservação da biodiversidade (SICK, 1997). Além disso, é também um dos destaques no *ranking* mundial de produção avícola (TREMEA & SILVA, 2020).

Dentre as aves, a família Tinamidae, única constituinte da ordem Tinamiformes, compreende espécies terrestres endêmicas da região Neotropical, popularmente conhecidas como macucos, inhambus, codornas e perdizes. Estas compõem a avifauna mais antiga do continente Americano, onde foram encontrados registros fósseis de 4 milhões de anos (Plioceno). No Brasil, especificamente no estado de Minas Gerais, há registros pleistocênicos de fósseis desse grupo de aves com cerca de 15 a 20 mil anos (SICK, 1997).

Composta por duas subfamílias (Tinaminae e Rhynchotinae), a família Tinamidae apresenta 9 gêneros e 47 espécies atualmente distribuídas geograficamente do noroeste do México até o sul da América do Sul, ocupando inclusive altitudes consideráveis (até 5.300 metros acima do nível do mar) (BERTELLI & PORZECANSKI, 2004). As espécies da subfamília Tinaminae, pertencentes a três gêneros (*Tinamus*, *Nothocercus* e *Crypturellus*), têm como habitat natural florestas tropicais e subtropicais. Outros seis gêneros (*Nothoprocta*, *Rhynchotus*, *Nothura*, *Tinamotis*, *Eudromia* e *Taoniscus*), pertencentes à subfamília Rhynchotinae, são encontrados em praticamente todos os biomas (MYERS et al. 2008; DISLICH, 2007).

As aves da família Tinamidae caracterizam-se pelos dedos livres - três anteriores e um posterior, pernas de comprimento médio e ausência de cauda. Possuem pequeno, médio

ou grande porte, podendo apresentar cores miméticas no colorido da plumagem em adaptação a seus hábitos terrestres e geralmente conseguem voar apenas curtas distâncias (SIGRIST, 2009). Diversas espécies de tinamídeos são atualmente apreciadas para consumo humano no Brasil, como por exemplo *Rhynchotus rufescens* (perdiz) e *Nothoprocta perdicaria* (inhambu-chileno) devido às propriedades e ao sabor da carne (KERMODE et al., 1995; MORO et al., 2006; QUEIROZ et al., 2013). Entretanto, a caça excessiva, somada à destruição de seus habitats, têm levado a um declínio no número de exemplares de algumas espécies, como *Crypturellus noctivagus* (jaó-do-sul), *Nothura minor* (codorna-mineira), *Taoniscus nanus* (inhambu-carapé) e *Tinamus tao* (azalona) (IUCN, 2022). Embora mais de 90% das espécies de Tinamidae sejam encontradas no Brasil, especialmente na região da Bacia Amazônica (SICK, 1997), cerca de 6% são consideradas quase ameaçadas de extinção (NT, *Near Threatened*) e 11% vulneráveis (VU, *Vulnerable*) (IUCN, 2022).

Incluído na subfamília Rhynchotinae, o gênero *Rhynchotus* possui uma única espécie - *R. rufescens* - e compreende as aves popularmente conhecidas como perdizes, embora também sejam chamadas de perdigão, napopé e inhambupé. Atualmente são reconhecidas três subespécies (DEL HOYO et al., 2013; ITS, 2021), sendo duas encontradas no Brasil, sobretudo em regiões campestres, cerrados, buritizais e planaltos descampados (SICK, 1997). *Rhynchotus rufescens rufescens* Temminck, 1815 é encontrada no sudeste do Peru até a Bolívia, Paraguai, Uruguai, Argentina e Brasil. Possui coloração menos acinzentada e mais marrom na porção superior de seu corpo e apresenta um barrado pardo (BLAKE, 1977) (Figura 1A). Dados de sua ocorrência no Brasil indicam registros de populações naturais mais concentradas nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do país (Táxeus, 2022). *Rhynchotus rufescens catingae* Reiser, 1905 ocorre na região central e nordeste do Brasil. Embora apresente coloração acastanhada na porção superior, as partes posteriores do corpo são mais acinzentadas e tem barras dorsais mais claras e pardas. Seu pescoço é ocre escuro (BLAKE, 1977) (Figura 2A). A terceira subespécie - *Rhynchotus rufescens pallescens* Kothe, 1907 - é encontrada no norte da Argentina. Embora mais acinzentada que as demais subespécies,

seu pescoço apresenta coloração ocre e pálida e os exemplares apresentam barrado mais sutil (BLAKE, 1977) (Figura 2B). Juvenis das subespécies são mais difíceis de serem identificados por possuírem penas com uma mistura de cor marrom acinzentado, porém de cor mais apagada que a dos indivíduos adultos (PEIXOTO, 2002). A Figura 3 evidencia as áreas de distribuição de *R. rufescens* no Brasil.



Figura 1. Exemplar adulto da subespécie *R. rufescens rufescens* (The Internet IBC Bird Collection, 2021).



(A)



(B)

Figura 2. Exemplares adultos das subespécies (A) *R. rufescens catingae* (Wikiaves, fotografia de Rodrigo Conte) e (B) *R. rufescens pallescens* (Wikiaves, fotografia de Jefferson Bob).

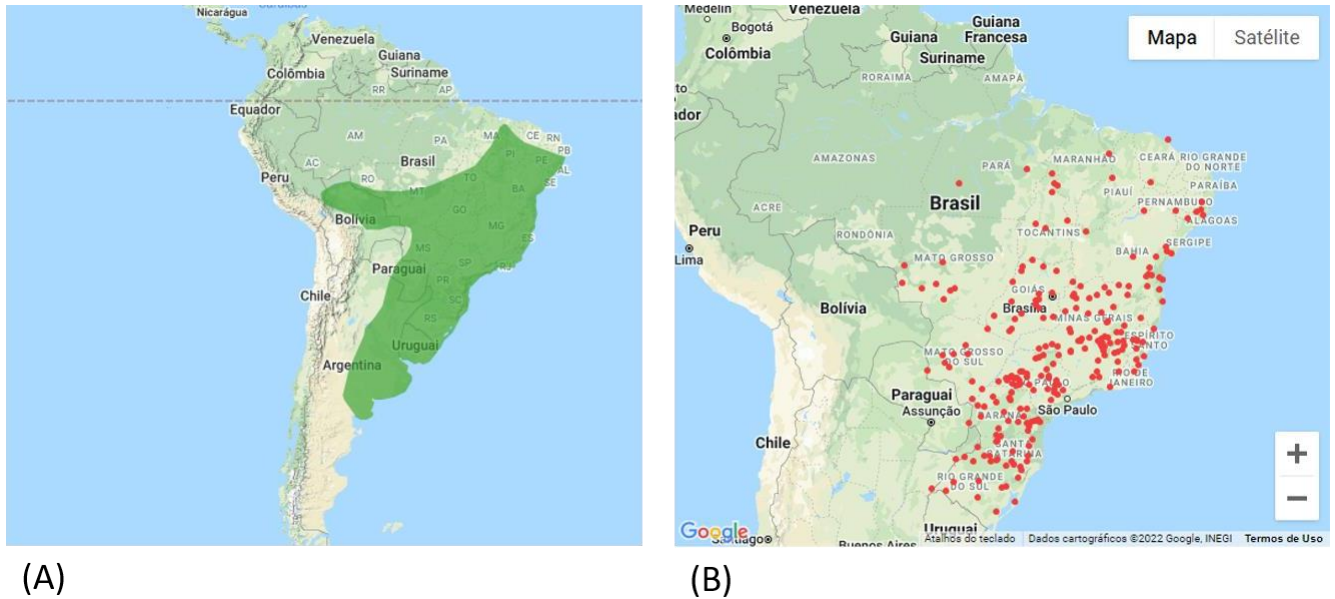


Figura 1. (A) Mapa da América do Sul evidenciando a área de distribuição geográfica de *R. rufescens* no Brasil (BirdLife, 2021) e (B) Mapa do Brasil indicando, de forma mais detalhada, registros de ocorrência da espécie (Táxeus, 2022).

Dotadas de bico forte, longo e ligeiramente curvo que a permite cavar a terra a procura de tubérculos e raízes para sua alimentação, as perdizes apresentam grande flexibilidade em sua dieta e, no Brasil, se alimentam especialmente de gafanhotos, cupins, lagartas e aranhas e também vegetais como amendoim com casca. Com musculatura bem desenvolvida, porém pouco irrigada, possuem capacidade reduzida de voo e deslocam-se por meio de batidas rápidas de asas, que permitem um voo mais ativo, seguidas de curtos voos planados (FOWLER, 1996; SICK, 1997).

Os exemplares adultos de *R. rufescens* têm cerca de 38 a 42 cm de comprimento, embora seu peso varie de acordo com o sexo. Os machos pesam entre 700 a 920 gramas e as fêmeas, um pouco maiores, pesam entre 815 e 1.040 gramas. Exceto pela sutil diferença de tamanho entre machos e fêmeas e pela presença de uma pequena crista negra em exemplares do sexo masculino, durante a maior parte do ano não exibem dimorfismo sexual aparente. Exceção ocorre no período reprodutivo em que os machos podem apresentar inchaço na região da cloaca (PEIXOTO, 2002; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2019).

Geralmente os machos emitem mais sons do que as fêmeas e quase exclusivamente no período de reprodução (PEIXOTO, 2002) e são estes que incubam os ovos já postos no ninho até sua eclosão (SICK, 1985; BRUNELI et al., 2005).

De acordo com as Listas Vermelhas do *Bird Life International* (2021) e da *International Union for Conservation of Nature* (2021), *R. rufescens* é classificadacom o “Least Concern”. Embora categorizada como de baixa preocupação, suas populações naturais vêm diminuindo em decorrência a atividades humanas, especialmente devido à intensificação do desmatamento, implantação de grandes monoculturas e caça para utilização de sua carne como fonte proteica, especialmente em regiões próximas a áreas urbanas (IUCN, 2022).

O tamanho de populações naturais desta espécie ainda não foi quantificado, mas esta é descrita como “comum e localmente abundante; rara em alguns lugares” (CABOT et al., 2020). Levantamentos feitos em uma área com grande pressão de caça no Rio Grande do Sul estimaram uma densidade de 0,025 indivíduos por Km² e indicaram a ausência da espécie em alguns locais (PINHEIRO E LOPEZ, 1999). Devido à pressão de caça, houve o desaparecimento de *R. rufescens* em algumas áreas no Brasil, como Guaíba e Barra de Ribeiro, no Rio Grande do Sul (PINHEIRO E LOPEZ, 1999; CABOT et al., 2020). Este cenário pode estar ocorrendo gradativamente no país, não somente devido ao uso da carne de perdiz para alimentação humana como também por envenenamento causado por inseticidas utilizados em lavouras. Adicionalmente, queimadas de locais destinados a pastagem e agricultura também têm levado ao declínio da espécie em algumas áreas. O desmatamento de florestas tropicais e habitats para formação de pastagens, também resulta em deslocamento de indivíduos para novas áreas (SICK, 1993), o que pode alterar a dinâmica populacional de *R. rufescens* e sua interação com outras espécies (SICK, 1993; CABOT et al., 2020).

A utilização, de forma responsável e sustentável, de espécies silvestres como *R. rufescens* para geração de carne e ovos para consumo humano pode constituir não

somente uma forma de produção comercial como também uma alternativa conservacionista, dado que isso pode levar à melhor compreensão de fatores associados à sua biologia e também à diminuição da caça desses animais. Nos últimos anos, a domesticação de perdizes tem atraído grande interesse devido às qualidades e sabor da carne, hábito onívoro, valor cinegético e excelente rendimento de carcaça, principalmente associado à produção de peito que apresenta excelente valor nutritivo e baixos níveis de colesterol (MORO, 2006), e também devido à adaptação da espécie a criadouros comerciais (HOSHIBA et al., 2003; COMBERG et al., 2007; QUEIROZ et al., 2013). Tais características despertam o interesse para ampliação de sua criação em cativeiro, o que permitiria também utilizar exemplares para repovoamento de ambientes naturais, diminuindo dessa forma a pressão da caça predatória (MORO et al., 2006).

Apesar de tais qualidades, a performance reprodutiva de *R. rufescens* em cativeiro ainda apresenta problemas e o manejo zootécnico precisa ser melhorado, especialmente visando uma produção em larga escala, já que a espécie ainda encontra-se em processo de domesticação (DUTRA et al., 2021). Desta forma, diversos aspectos biológicos associados a seu comportamento, nutrição, reprodução e estrutura populacional necessitam ser analisados. Embora dados genéticos para a espécie sejam ainda extremamente escassos e restrinjam-se à descrição de locos microssatélites (SANTOS et al., 2012) e à identificação forense de exemplares por meio de marcadores de DNA mitocondrial (CARMO et al., 2017), análises moleculares podem subsidiar a avicultura brasileira e, portanto, a produção de proteína animal não tão convencional. Dessa forma, análises genéticas direcionadas à identificação precisa de machos e fêmeas representam esforços ainda necessários não somente em programas que visem a reprodução e melhoramento genético de *R. rufescens* como também para ações de conservação. Os conhecimentos gerados podem ser utilizados para propor estratégias de manejo dos animais e o desenvolvimento de novas técnicas de produção de carne e ovos.

1.2 Sexagem molecular em aves

Uma ampla área de estudo em Genética Animal refere-se à análise de segmentos de DNA associados à determinação e diferenciação sexual e também à precisa identificação do sexo em diferentes grupos taxonômicos. Entre os vertebrados, a determinação do sexo tem sido atribuída a um ou mais genes (Genetic Sex Determination - GSD), que podem estar localizados em cromossomos autossômicos ou sexuais ou em ambos, e/ou a fatores externos (Environmental Sex Determination - ESD), como por exemplo a temperatura ambiental e pH (e.g. MANOLAKOU et al., 2006; BACHTROG et al., 2014) (Figura 4).

Tanto os mamíferos quanto as aves apresentam determinação sexual genética (CHARLESWORTH & MANK, 2010; GABLE & ZARKOWER, 2012; SMITH & SINCLAIR, 2014) (Figura 4). No entanto, as aves apresentam um sistema de cromossomos sexuais heteromórficos - normalmente claramente diferenciados, com extensas regiões não recombinantes - onde os machos são homogaméticos (ZZ) e as fêmeas são heterogaméticas (ZW), diferentemente ao padrão de cromossomos sexuais de mamíferos - XX para fêmeas e XY para machos (Figura 4). Dados de mapeamento genético comparativo demonstram que os cromossomos sexuais destes dois grupos de vertebrados evoluíram independentemente a partir de diferentes cromossomos autossômicos (GRAVES & SHETTY, 2001).

No grupo das aves, o cromossomo Z é altamente conservado entre as espécies (NANDA et al., 2000). Em contraposição, embora mostre-se altamente diferenciado do Z na maioria das espécies, o cromossomo W é quase idêntico em nível citológico entre as espécies, desde as consideradas mais basais, pertencentes ao grupo das Ratitas (avestruz, ema e emu), indicando que este pode ter sido o padrão ancestral do sistema de cromossomos sexuais em aves, a partir do qual os cromossomos Z e W das demais espécies deste grupo de vertebrados evoluíram (GRAVES, 2016).

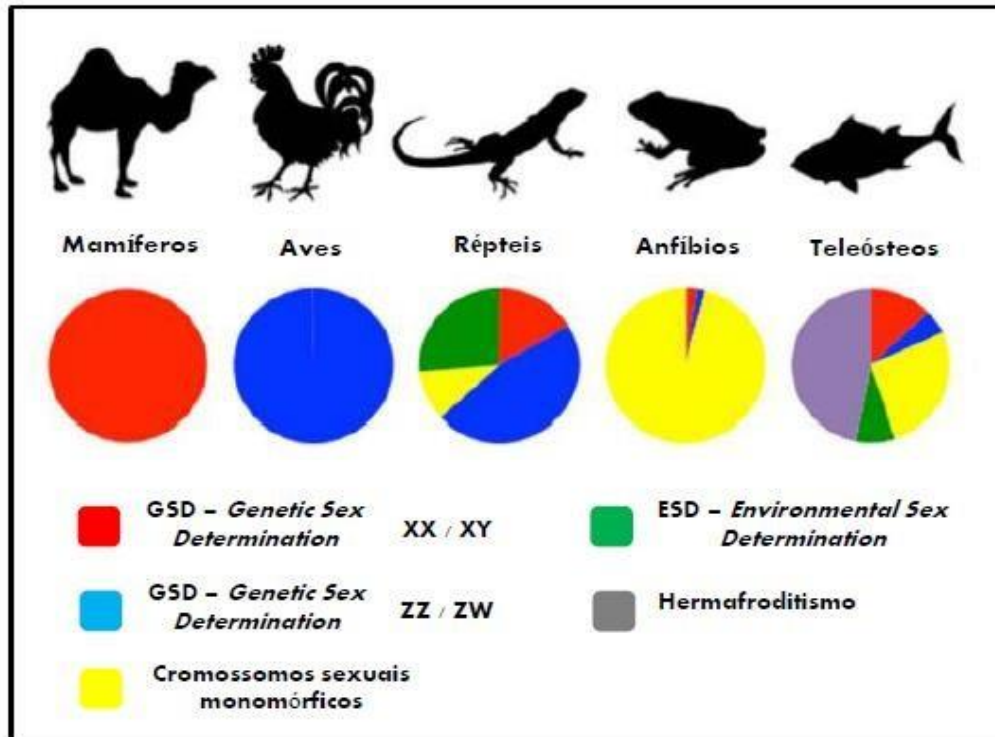


Figura 4. Diversidade de sistemas de determinação sexual em vertebrados.
(Adaptado de BACHTROG et al., 2014).

Quando se toma o universo de espécies que compõem o grupo das aves, aproximadamente 50% não apresentam dimorfismo sexual externo aparente que permita a diferenciação morfológica entre machos e fêmeas (DAWSON et al., 2016), ou seja, não possuem alguma característica fenotípica, como tamanho, coloração das penas e/ou bicos, que permita diferenciar morfológicamente indivíduos dos dois sexos de uma mesma espécie (POUGH & HARVEY, 1999). Desta forma, a identificação sexual pode ser realizada por meio da cariotipagem, ou seja, da identificação de seus cromossomos e pareamento de elementos homólogos que compõem os cariótipos. Tais análises permitem a correta distinção entre os sexos, já que fêmeas apresentam cromossomos sexuais distintos (Z e W), enquanto machos apresentam somente cromossomos Z. Entretanto, esta forma de sexagem, além de ser trabalhosa, demandar grande tempo e nem sempre gerar resultados satisfatórios, não pode ser utilizada em algumas espécies cujos cromossomos sexuais são visualmente idênticos ao microscópio para os dois sexos (MIYAKI et al., 1998).

Técnicas de laparoscopia e análise de esteróides fecais também podem ser utilizadas para identificar machos e fêmeas de espécies de aves. Entretanto, tanto a inspeção da cavidade abdominal com um endoscópio como a análise de hormônios apresentam algumas desvantagens, por serem invasivas e/ou por não serem totalmente confiáveis (GRANDO, 2002). O exame de laparoscopia, embora possa ser utilizado em qualquer espécie de ave, envolve grande manipulação dos animais e riscos cirúrgicos. A análise de esteróides fecais é baseada na razão entre estrógeno e testosterona, fator que nem sempre é altamente confiável para determinação do sexo em algumas espécies de aves. Adicionalmente, as amostras necessitam de manutenção adequada visando a não degradação dos hormônios durante a coleta em campo (MIYAKI et al., 1998).

Com o desenvolvimento das análises baseadas em segmentos de DNA, uma nova maneira de identificação do sexo das aves foi implementada na década de 90 - a chamada "sexagem molecular", realizada mais comumente por meio da amplificação de cópias de uma região dos genes *CHD-Z* e *CHD-W* (*chromo-helicase-DNA-binding*), localizados nos cromossomos sexuais. O gene *CHD-W* encontra-se no cromossomo W e, portanto, somente em fêmeas, enquanto o gene *CHD-Z* é encontrado no cromossomo Z, ocorrendo assim em ambos os sexos (GRIFFITHS et al., 1998). O padrão do sistema de determinação sexual das aves (ZZ/ZW) é altamente conservado, e a homologia entre os cromossomos, que é relativamente pequena, exibe estabilidade que pode ser datada de seu ancestral comum que viveu há cerca de 80-120 milhões de anos (SHETTY et al., 1999; MANK & ELLEGREN, 2007).

Desta forma, a identificação do gênero biológico em espécies de aves pode atualmente ser realizada por meio da utilização da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), empregando um único conjunto de *primers* para amplificar fragmentos homólogos dos genes *CHD-Z* e *CHD-W* referentes a íntrons que geralmente variam também de tamanho entre as espécies (GRIFFITHS et al., 1996; 1998; MIYAKI et al., 1998; GRIFFITHS, 2000; FRIDOLSSON & ELLEGREN, 2000; ANCIÃES & DEL LAMA, 2002; CHANG et al., 2008; RAMOS et al., 2009). O resultado, geralmente visualizado em gel de agarose ou

poliacrilamida, demonstra que as fêmeas, que possuem dois cromossomos sexuais diferentes, apresentam dois fragmentos de DNA, enquanto os machos, homogaméticos, apresentam somente um fragmento (GRIFFITHS *et al.*, 1998; FRIDOLFSSON & ELLEGREN, 2000; GRIFFITHS, 2000).

Entretanto, apesar do gene *CHD* ser o mais amplamente utilizado para sexagem molecular em aves, este apresenta uma eficiência de identificação precisa de machos e fêmeas de cerca de 80% para espécies não Ratitas (DAWSON, 2007). Desta forma, outros marcadores moleculares - como *ATP5A1* (DVORAK *et al.*, 1992), *PKCI* (HORI *et al.* 2000) e *chSPIN* (ITOH *et al.*, 2001) - também vêm sendo utilizados com o objetivo de gerar padrões diferenciais entre os sexos em determinados grupos de aves (e.g. DAWSON *et al.*, 2016; MAZZOLENI *et al.*, 2021).

Especificamente em relação à identificação molecular de machos e fêmeas de aves da ordem Tinamiformes, o gene *chSPIN* (*spindlin*) tem demonstrado maior aplicabilidade para geração de perfis sexo-específicos, uma vez que ele se apresenta de forma diferente nos cromossomos Z e W nos Tinamídeos (DE KLOET, 2002). Este gene possui uma evolução relativamente lenta e consiste em seis éxons e cinco íntrons que podem variar de mil a dezenas de milhares de pares de bases (DE KLOET & DE KLOET, 2003). Dado que o gene *chSPIN* ocorre em diferentes formas nos cromossomos sexuais W e Z de espécies dessa ordem de aves, este pode ser amplificado por meio de PCR para posterior visualização de fragmentos de DNA de tamanhos distintos entre os sexos. O uso de conjuntos de *primers* em PCR permite a identificação de fragmentos de até aproximadamente 1.400 pares de bases nitrogenadas em exemplares de ambos os sexos, além de um fragmento exclusivo às fêmeas, com cerca de 1.000 pares de bases. O resultado, geralmente analisado em gel de agarose ou poliacrilamida, demonstra que as fêmeas apresentam dois fragmentos de DNA enquanto os machos, homogaméticos, apresentam somente um fragmento (DE KLOET, 2002).

A identificação precisa de machos e fêmeas de aves sem dimorfismo sexual claramente perceptível, como ocorre em *Rhynchotus rufescens*, é fundamental para o

sucesso reprodutivo de espécies mantidas em cativeiro (RASO & WERTHER, 2004), sendo também importante para os estudos comportamentais e populacionais em espécies monomórficas de vida livre (FARIA et al., 2007). A sexagem em aves aplicada à sua manutenção e reprodução em cativeiro, sejam estes voltados às áreas de produção e/ou conservação, permite: (1) reduzir custos de manutenção de indivíduos jovens, já que a identificação de machos e fêmeas é dada poucos dias após o nascimento facilitando assim sua comercialização; (2) evitar a formação de casais do mesmo sexo, aumentando as chances de geração de descendentes; (3) facilitar o manejo (de criação e genético) em criações com sistema produção de aves por separação por sexo (GRANDO, 2002).

A procura por diagnósticos de sexagem molecular em aves geralmente ocorre por parte de tutores, criadores, zoológicos e proprietários de centros conservacionistas. Entretanto, no Brasil, laboratórios especializados oferecem testes associados geralmente a Passeriformes e estes nem sempre possuem efetividade para determinadas espécies. Desta forma, a implementação de novos testes diagnósticos no país, incluindo sua padronização para identificação de machos e fêmeas das perdizes *R. rufescens* poderá ampliar os esforços direcionados à produção da espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Dado o potencial das perdizes no mercado de corte avícola não convencional e o declínio de algumas de suas populações naturais, o presente projeto visou criar técnica e gerar dados associados à identificação precisa de machos e fêmeas de *Rhynchotus rufescens*, por meio de análises moleculares. Adicionalmente, visou-se gerar um material de divulgação científica sobre a espécie.

Objetivos específicos

- (1) Isolar amostras de DNA de exemplares de perdizes mantidas em um criadouro da UNESP com fins de pesquisa e comercialização;
- (2) Realizar a amplificação de regiões específicas do gene *spindlin* (*chSPIN*) associado aos cromossomos sexuais Z e W, de exemplares jovens e adultos de perdizes, para geração de perfis genéticos sexo-específicos;
- (3) Implementar um protocolo de sexagem molecular eficaz em perdizes para subsidiar o fornecimento de laudos técnicos em programas de reprodução em cativeiro e produção avícola;
- (4) Elaborar uma cartilha em linguagem simples para o público leigo com conteúdos acerca de características biológicas da espécie, sua distribuição geográfica, conservação e aplicação de análises de sexagem molecular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem biológica

Os animais utilizados nesta pesquisa pertencem à subespécie *R. rufescens rufescens* e são oriundos de um plantel inicialmente mantido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP) e posteriormente transferido, em 2016, ao Setor de Melhoramento Genético de Perdizes da Fazenda Experimental Lageado (Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP) (Figura 5).

Os dados de genealogia, obtidos de arquivos de registros de nascimentos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, indicavam 1.365 indivíduos nascidos entre os anos de 2005 a 2012. Não existem informações sobre os animais nascidos nos anos de 2013

em diante. Alguns destes indivíduos deram origem ao atual plantel mantido no Setor de Melhoramento Genético de Perdizes da Fazenda Experimental Lageado.



Figura 5: Área do Setor de Melhoramento Genético de Perdizes da Fazenda Experimental Lageado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu (Fotografia de Luiz Eduardo Cruz dos Santos Correia).

De forma a utilizar procedimentos não-destrutivos de amostragem biológica, amostras de penas e/ou sangue foram obtidas de todos indivíduos (202 animais) mantidos da Fazenda Lageado no segundo semestre de 2019, época de início do presente projeto. De forma a utilizar procedimentos não-destrutivos de amostragem biológica, amostras de penas e/ou sangue foram obtidas dos espécimes em estudo. Após contenção dos animais, o local de retirada das amostras biológicas foi higienizado com algodão embebido em álcool 70%. Preferencialmente, penas em crescimento foram utilizadas, já que estas possuem tecido rico em divisões celulares na região da polpa dérmica, e estas foram retiradas manualmente. Posteriormente, as penas coletadas foram mantidas em envelope de papel à temperatura ambiente até seu processamento ou, alternativamente, mantidas à temperatura ambiente em recipiente contendo álcool 100%. Foram também coletadas amostras de sangue dos animais,

em que aproximadamente 0,1 ml de sangue da veia braquial da asa foi retirado com seringa estéril descartável (Figura 6), tratado com os anticoagulantes heparina 10% ou tampão EDTA 10 mM, pH 7,0 (SSC 1x (NaCl 0,15 M e citrato de sódio 15 mM), e preservado em etanol absoluto a -4°C até seu processamento. O tempo de coleta foi reduzido para que não gerasse tanto estresse à ave, do tempo de contenção até o final da coleta, durou cerca de 2-3 minutos para cada ave.

Todos os procedimentos para coleta e manipulação de amostras biológicas foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP (Protocolo no.956-CEUA).

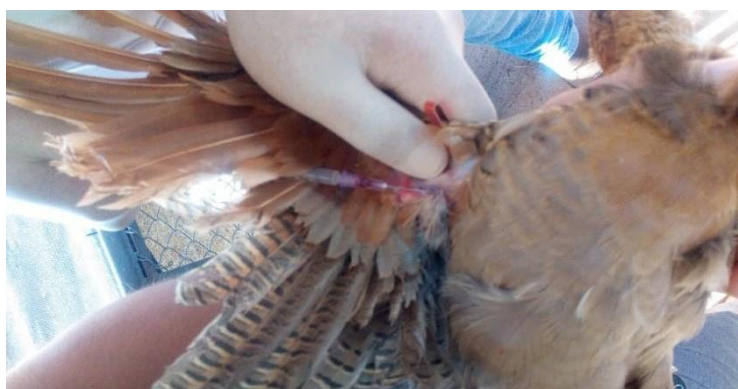


Figura 2. Coleta de amostra de sangue da veia braquial de exemplar de *R. rufescens rufescens* (Fotografia de arquivo pessoal).

3.2 Extração de DNA

Inicialmente, a extração de DNA de penas ou sangue foi realizada com o uso de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, segundo protocolo descrito em SAMBROOK & RUSSEL (2001), com algumas alterações. Este procedimento foi utilizado como teste em 10 amostras de sangue e penas para verificar sua efetividade.

Penas e/ou sangue de cada um dos animais foram colocadas em um cadinho estéril juntamente com nitrogênio líquido. Em seguida, o material foi macerado com auxílio de um bastão estéril. Foram posteriormente adicionados 5ml de solução de digestão composta por NaCl 0,4M, EDTA 0,1M pH 8,0, SDS 0,1% e RNase 40µg/ml, sobre o tecido já macerado. Após

homogeneização, transferiu-se as amostras para um tubo estéril de 15ml e este foi mantido em banho-maria em uma temperatura de 50°C por 1 hora. Posteriormente, foi adicionada solução de Proteinase K 40µg/ml e o tubo foi mantido em banho-maria a 50°C por mais 1-3 horas, homogeneizando o material periodicamente. Após este período, o tubo foi retirado do banho-maria e, em capela com exaustor ligado, acrescentou-se 5ml de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 50:48:2, respectivamente. O tubo foi então invertido cuidadosamente, durante 15 minutos e, posteriormente, foi centrifugado a 5.000 rpm por mais 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 15ml estéril, acrescentando-se solução de NaCl 1M calculada a partir do volume médio da amostra obtida. Posteriormente, o tubo foi completado com álcool 100% gelado para precipitação do DNA. A amostra de DNA obtida foi retirada do tubo com auxílio de uma micropipeta e o restante do material foi descartado. Posteriormente, o DNA foi devolvido ao tubo e foram adicionados 3ml de álcool etílico 70%. O álcool foi descartado e manteve-se a amostra de DNA em estufa a 37°C para secagem. Após a secagem, acrescentou-se 200µl de água filtrada autoclavada para eluição do DNA. As amostras de DNA obtidas foram transferidas para tubos estéreis de 1,5ml e mantidas a -20°C.

O processo de extração também foi realizado com amostras de sangue utilizando o *kit* DNA *DNeasy* - Qiagen. Este foi empregado seguindo as especificações do fabricante, com o objetivo de obter as amostras de DNA em um período mais curto de tempo. Para tanto, foram adicionados 20µl de proteinase K em um microtubo contendo 5-10µl de sangue dos animais. Posteriormente, o volume foi ajustado para 220µl com PBS e foram adicionados 200µl do *Buffer*AL. As amostras foram então levadas ao vórtex rapidamente e depois incubadas a 56°C por 10 minutos. Foram adicionados 200µl de etanol (96-100%) e, novamente, as amostras foram levadas ao vórtex rapidamente. Em seguida, as amostras foram transferidas para um microtubo de coluna e este foi centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. O líquido gerado e o tubo inferior foram descartados e a coluna foi transferida para um novo tubo, no qual foram adicionados 500µl de *Buffer* AW1. Este tubo foi então centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. Novamente, o líquido

gerado e o tubo inferior foram descartados e a coluna foi transferida para um novo tubo. A este, foram adicionados 500µl de *Buffer* AW2. O tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 3 minutos e, posteriormente, o líquido gerado e o tubo inferior foram descartados. A coluna foi transferida para um novo tubo e o DNA isolado foi eluído com 200µl de *Buffer* AE adicionado à membrana da coluna. Por último, o tubo foi mantido em temperatura ambiente por 1 minuto e depois centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. As amostras de DNA obtidas foram transferidas para tubos estéreis de 1,5ml e mantidas a -20°C.

3.3 Análise da qualidade e quantidade das amostras de DNA

A integridade e a quantidade das amostras de DNA foram analisadas em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com *Gel Red* (Uniscience) (0,1µl/10ml) e visualizado em transiluminador (Hoefer UV-25), sob luz ultravioleta. Para quantificação do DNA, as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro (Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific), através de absorbância a 260-280nm, em que amostras de boa qualidade apresentam valores entre 1,8 e 2,1.

3.4 Sexagem molecular

Para identificação do sexo dos animais, reações de amplificação (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) foram realizadas conforme protocolo descrito por DE KLOET (2002), com algumas modificações, utilizado os *primers* SPIN12 (*forward*) (5'-GCAGAATACAGCATGGATGGAA-3') e SPIN13 (*reverse*) (5'-AGGTGGGCATCACTAATTCGAG-3') que se anelam, respectivamente, nos nucleotídeos 167 e 383 do gene *spindlin* de *Gallus gallus* (galinha doméstica) (DE KLOET, 2002).

Cada reação de amplificação consistiu de 4,5µl de tampão de reação 10x, 2,0µl de cada *primer* (10mM), 2,0µl de dNTP (200mM), 2mM de MgCl₂, 0,5U de *Taq* DNA polimerase e 1 µl de DNA molde (30ng/µl). O volume dos tubos contendo as reações de amplificação foi

completado com água autoclavada para 50µl. Em termociclador, foi aplicado o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridação a 55°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 80 segundos. Um passo final de extensão a 72°C foi realizado por mais 10 minutos.

Controles positivos (correspondentes a amostras de DNA de dois exemplares adultos - 1 macho e 1 fêmea - para os quais foi possível identificar o sexo por meio de diferenças morfológicas externas durante o período reprodutivo) e um controle negativo (correspondente a uma reação de amplificação contendo todos os componentes da PCR exceto amostra de DNA, para monitorar qualquer possível contaminação) foram utilizados a fim de minimizar erros técnicos e de contaminação.

Os produtos de amplificação obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com *Gel Red* (Uniscience) (0,1µl/10ml) imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA) e visualizados no digitalizador de imagem GE *ImageQuant 300 Imager*, sob luz ultravioleta). Os pesos moleculares dos fragmentos amplificados foram estimados por meio de comparação com marcadores de peso molecular conhecido.

3.5 Produção de material de divulgação científica

Uma cartilha de divulgação científica (termo também conhecido como popularização científica, definida como o uso de processos e recursos técnicos para a comunicação da informação científica e tecnológica ao público em geral), em linguagem simples para o público leigo, foi elaborada abordando conteúdos acerca de características biológicas de *Rhynchotus rufescens*, sua distribuição geográfica, fatores de ameaça e aplicação de análises de sexagem molecular. A escolha de elaboração de uma cartilha baseou-se em seu propósito (ser utilizado como uma ferramenta de comunicação para informar produtos, atividades, conceitos ou projetos específicos, características técnicas ou ações sociais) e nas características deste

(material impresso e/ou digital, contendo ilustrações de forma a despertar a curiosidade para a abertura do mesmo e posterior leitura).

O programa computacional Power Point (Microsoft) e o editor de imagens e fotos *online* Canva Pro (www.canva.com) foram utilizados para diagramação da cartilha. As figuras incluídas neste material foram selecionadas também de bancos de imagens de domínio público como Pixabay (pixabay.com) e Shutterstock (www.shutterstock.com) e do aplicativo Adobe Creative Cloud (www.adobe.com).

A cartilha gerada deverá ser registrada na Câmara Brasileira do Livro (CBL) para geração de ISBN (*International Standard Book Number*) e será disponibilizada, de forma gratuita, na plataforma virtual Scribd (pt.scribd.com) que permite o compartilhamento de arquivos, incluindo e-books.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amostragem biológica e isolamento de DNA

O isolamento de DNA de boa qualidade muitas vezes mostra-se um fator limitante em análises moleculares quando pretende-se não causar estresse ou gerar um nível mínimo de perturbação em animais, estejam estes em cativeiro ou sejam de vida livre. Para isso, é necessário utilizar amostragens não-invasivas (em que os animais não são capturados) ou não-destrutivas (em que os animais são manipulados mas sem danos extremos). Entretanto, tais coletas geralmente levam à obtenção de quantidades reduzidas de amostras biológicas e, conseqüentemente, quantidades pequenas também de DNA e, muitas vezes, de baixa qualidade (PAULI et al., 2010; CHAVES et al., 2019; ZEMANOVA, 2020).

Amostragens não-destrutivas, por meio da retirada especialmente de penas e sangue, representam atualmente uma das formas mais amplamente utilizadas em estudos genéticos em espécies de aves e, visando a obtenção de DNA adequado para posteriores análises

moleculares, protocolos de extração devem ser testados e/ou implementados (HORVÁTH et al., 2005; PAULI et al., 2010; PETERS et al., 2019; ZEMANOVA, 2020). No presente estudo, amostras de sangue e penas foram utilizadas para isolamento de DNA dos exemplares de *R. rufescens rufescens*. Embora invasivas, as coletas destes materiais biológicos implicam somente em um pequeno período de estresse aos animais, dado que é necessário realizar a contenção e a manipulação destes (WAITTS et al., 2005; PAULI et al., 2009). Após a amostragem biológica das perdizes, não foram relatados quaisquer problemas associados a infecções, morte ou alterações no comportamento dos animais utilizados no presente estudo (Luiz Eduardo Cruz dos Santos Correia, informação pessoal).

Testes iniciais indicaram que as amostras de DNA obtidas de sangue, tanto utilizando o método de extração baseado no uso de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico como empregando o *kit* laboratorial, apresentavam valores de 1,8 a 2,1 ao espectrofotômetro, em comparações de absorbância a 260/280nm. Tais resultados indicam alta qualidade das amostras de DNA e baixo nível de impurezas associados a compostos fenólicos e proteínas. O *kit* empregado permitiu também a obtenção de DNA de sangue em um tempo significativamente reduzido (aproximadamente 120 minutos) quando comparado ao tempo despendido à obtenção de DNA pelo uso de fenol (cerca de 2 dias).

Tanto penas em crescimento quanto penas adultas das perdizes foram também utilizadas como fonte de DNA. Penas adultas, retiradas dos animais que não possuíam penas em crescimento, não permitiram o isolamento de DNA, provavelmente por já apresentarem polpa queratinizada (HODGES, 1974; HORVÁTH et al., 2005). Embora penas em crescimento possuam tecido rico em divisões celulares na região da polpa dérmica (TABERLET & BOUVET, 1991; SEGELBACHER, 2002), estas levaram à obtenção de amostras de DNA com valores muito abaixo dos parâmetros ideais de absorbância e quantidades reduzidas de DNA (5-10ng/μl), o que dificulta sua aplicação em análises moleculares.

Assim, amostras de sangue mostraram-se mais adequadas do que as penas retiradas de *R. rufescens rufescens*, fato que pode ser correlacionado aos eritrócitos das aves que são nucleados (CLAVER & QUAGLIA, 2009; CAPITELLI & CROSTA, 2013) sendo, portanto, uma excelente fonte de DNA nuclear. O DNA isolado foi eluído em água e estocado em freezer (-20°C) dado que sua manutenção em baixas temperaturas diminui atividades enzimáticas que poderiam degradá-lo. Essa forma de manutenção tem se mostrado mais adequada em longo prazo quando comparada a estocagens que utilizam etanol, tampão de lise ou papel filtro (SMITH & BURGOYNE, 2004; JACKSON et al., 2012; WONG et al., 2012)

Tais resultados iniciais levaram ao isolamento de amostras de DNA de sangue de 202 perdizes com o uso do *kit* laboratorial. Embora não tenha sido possível quantificar três amostras de DNA devido às suas reduzidas concentrações, as demais apresentaram valores variáveis de 3,5 a 114,85 ng/μl (Tabela 1) e todas atenderam o padrão de qualidade entre 1,8 e 2,1 em análise de absorvância a 260/280nm ao espectrofotômetro. Observações das amostras por meio de eletroforese em gel de agarose permitiram identificar a ausência de grandes arrastos o que indica DNA não degradado (Figura 7).

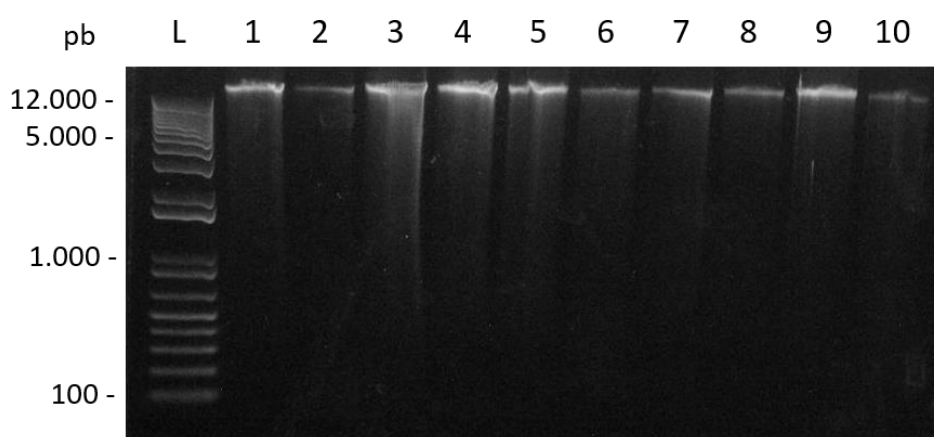


Figura 7: Resultado de eletroforese em gel de agarose de amostras de DNA total isoladas a partir de sangue de exemplares de *R. rufescens rufescens* (1 a 10) utilizando o kit DNA DNeasy - Qiagen. L, marcador de peso molecular (1Kb Plus); pb, pares de bases.

4.2 Padronização da técnica de PCR e implementação de teste de sexagem molecular

A ampla distribuição de *R. rufescens* na América do Sul, seus hábitos omnívoros e propriedades da carne, como baixos níveis de colesterol, alto rendimento da carcaça e do peito, tornam a espécie atrativa do ponto de vista econômico (MORO et al., 2001; BRUNELLI et al., 2005; MORO et al., 2006; QUEIROZ et al., 2013; SANTOS et al., 2020). Entretanto, ainda existem poucos trabalhos relacionados à uma produção já bem estabelecida e, especialmente, mais ampla. Para que a criação e domesticação dessa espécie, com o objetivo de produzir alimentos, possa auxiliar o Brasil a crescer no cenário internacional de geração de tecnologia e genética avícola, deve-se estabelecer as condições adequadas de manejo zootécnico, principalmente sob aspectos reprodutivos, para viabilizar sua produção em alta escala (NAKAGE et al., 2001; BRUNELLI et al., 2005).

Um dos fatores de extrema importância em programas de reprodução em cativeiro visando a produção avícola refere-se à identificação precisa de machos e fêmeas, especialmente em espécies que não apresentam dimorfismo sexual aparente. A sexagem de animais pode subsidiar a formação de casais e sua separação em recintos. A identificação do sexo também é um fator importante em análises genéticas e comportamentais e pode dar suporte a ações que visem a conservação de populações ameaçadas e/ou a criação de grupos de animais em cativeiro com a finalidade de restabelecer grupos em seu ambiente natural.

Dado que machos e fêmeas de *R. rufescens* apresentam somente sutis diferenças, observadas em indivíduos já adultos e/ou no período reprodutivo (PEIXOTO, 2002; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2019), a sexagem na espécie vem sendo realizada por meio da reversão da cloaca, como já comumente empregada em frangos de corte. Assim, é possível visualizar uma protuberância nos machos e a ausência deste em fêmeas, o que permite melhor delinear estratégias alimentares e reprodutivas (CROMBERG et al., 2007; QUEIROZ et al., 2011). Entretanto, essa técnica pode gerar resultados errôneos ou inconsistentes já que requer grande treinamento e as diferenças na cloaca são mais facilmente observadas somente no

período reprodutivo (MATTER et al., 2016). Técnicas de laparoscopia, análise de esteróides fecais e de cariotipagem não mostram-se adequadas atualmente para sexagem em aves pelo grande tempo dispendido e resultados muitas vezes incongruentes. Além disso, a laparoscopia é invasiva e pode envolver riscos aos animais (MIYAKI et al., 1998; GRANDO, 2002). Assim, a segura identificação do sexo em perdizes poderia ser feita por meio de análises de DNA, teste que até o momento não encontra-se estabelecido e, portanto, não disponibilizado em laboratórios comerciais ou de pesquisa.

De forma a implementar um diagnóstico de sexagem baseado na amplificação e análise de fragmentos de DNA que apresentem diferenças entre machos e fêmeas de *R. rufescens*, testes de padronização da técnica de PCR foram realizados com o objetivo de definir as concentrações ideais de DNA e demais reagentes da reação de amplificação e também as melhores temperaturas e tempo de anelamento dos *primers*, por meio de modificações na técnica previamente descrita por DE KLOET (2002). Ao contrário do observado na grande maioria das espécies de aves em que a sexagem molecular é realizada por meio da amplificação de segmentos do gene *CHD* (GRIFFITHS et al., 1998; FRIDOLFSSON & ELLEGREN, 2000; GRIFFITHS, 2000), este não é adequado para gerar fragmentos de DNA sexo-específicos em Tinamiformes (DE KLOET, 2002). Assim, os oligonucleotídeos utilizados na PCR no presente trabalho foram selecionados por já amplificarem um segmento do gene *spindlin* em galinha doméstica e algumas espécies de Tinamiformes, permitindo a identificação de machos e fêmeas (DE KLOET, 2002).

Os resultados em *R. rufescens* mostraram, após aplicação dos produtos de PCR à eletroforese em gel de agarose, dois fragmentos de cerca de 850 e 1.400 pares de bases para fêmeas, referentes a segmentos do gene *spindlin* presente nos cromossomos sexuais W e Z, respectivamente. Em machos, foi observado um fragmento de aproximadamente 1.400 pares de bases, referente a um segmento do gene *spindlin* encontrado nos dois cromossomos Z (Figura 8). Tais dados são similares aos já descritos para outras espécies de aves Tinamiformes em que foram observados fragmentos de cerca de 1.000 e 1.200 pares de

bases associados aos cromossomos W e Z, respectivamente. Embora os dois fragmentos observados em *R. rufescens* sejam um pouco distintos em tamanho dos descritos para *Eudromia elegans* (inhambu-de-crista), *Tinamus major* (inhambu serra), *Nothoprocta perdicaria* (perdiz chilena) e *Crypturellus boucardii* (inhambu-de-peito-azulado) (DE KLOET, 2002; DE KLOET & DE KLOET, 2003), tais diferenças podem ser correlacionadas ao número de nucleotídeos que compõem os íntrons e éxons do gene *chSPIN* e que pode ser variável entre espécies distintas.

Diferenças de tamanho em outros genes presentes em ambos cromossomos sexuais de aves já foram relatadas para várias espécies, incluindo o gene *CHD* também utilizado em testes de sexagem molecular (GRIFFITHS et al., 1996; 1998; MIYAKI et al., 1998; GRIFFITHS, 2000; FRIDOLSSON & ELLEGRENI, 2000; ANCIÃES & DEL LAMA, 2002; CHANG et al., 2008; RAMOS et al., 2009). Embora íntrons possam conter áreas sob pressão de seleção, como elementos regulatórios da transcrição, estes são geralmente seletivamente neutros e, portanto, podem sofrer uma taxa de mutação mais rápida, resultando em variações que são fixadas mesmo em espécies filogeneticamente próximas (LYNCH, 2002; HONG et al., 2006; ROSE, 2019).

Uma banda extra, de cerca de 1.300 pares de bases, foi evidenciada nos produtos de amplificação dos machos de *R. rufescens* (Figura 8). Entretanto, esta refere-se a uma banda espúria (inespecífica), característica que pode ocorrer na técnica de PCR (SOUZA et al., 2008; LORENZ, 2012), ou a polimorfismos no cromossomo Z, já relatados em algumas espécies de aves. Tais polimorfismos fazem com que os machos possuam dois fragmentos de DNA de tamanhos diferentes em seus dois cromossomos sexuais Z (DAWNSON, 2016). Apesar do fragmento extra observado nos produtos de PCR, este não leva a dúvidas quanto à identificação do sexo dos indivíduos – a banda extra não é confundida com o fragmento de DNA presente em fêmeas dados seus tamanhos bastante dissimilares (Figura 8). Além disso, os resultados de sexagem molecular em animais para os quais foi possível determinar

também o sexo por meio da visualização de características morfológicas externas mostram total correspondência (Tabela 1).

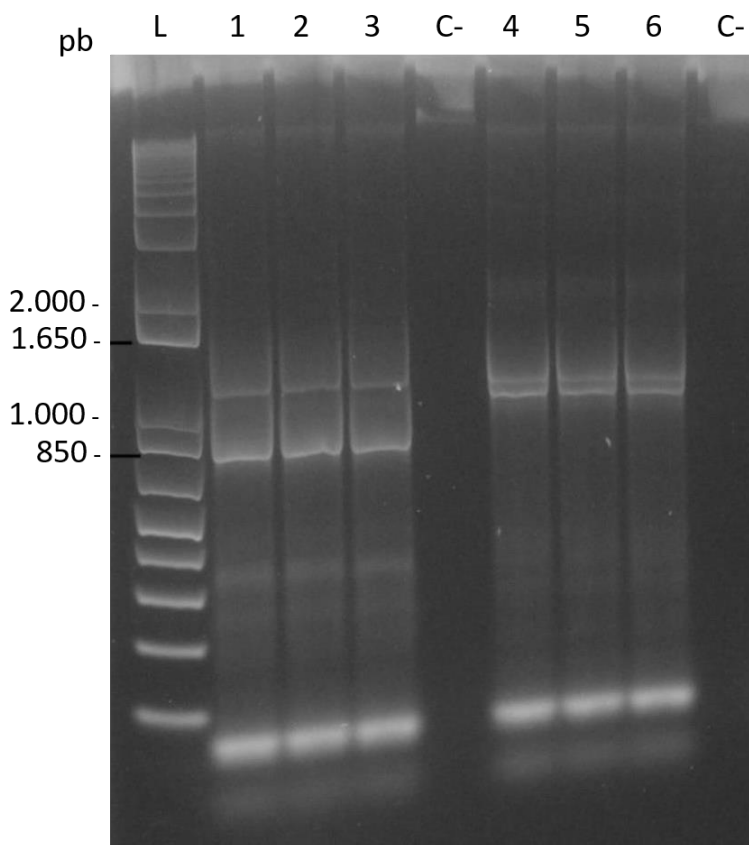


Figura 8: Resultado de eletroforese em gel de agarose de sexagem molecular em exemplares de *R. rufescens rufescens*. (1 a 3) amostras de DNA de fêmeas e (4 a 6) amostras de DNA de machos. C- (controle negativo); L, marcador de peso molecular (1Kb Plus); pb, pares de bases.

Após a padronização dos parâmetros da PCR e do teste de sexagem molecular, todas amostras de DNA isoladas dos exemplares de perdiz foram utilizadas para identificação do sexo. Das 202 amostras de DNA disponíveis, foi possível constatar o sexo de 188 animais (Tabela 1), o que corresponde a 93,06% de efetividade. Para as aves que tinham o sexo conhecido por observação comportamental, os resultados obtidos através das análises moleculares corresponderam 100% com o esperado. Os resultados indicaram que, no segundo semestre de 2019, o plantel do Setor de Melhoramento Genético de Perdizes da FMVZ era composto por 107 fêmeas (52,97% dos animais) e 81 machos (40,10% dos animais), mostrando uma quantidade de 1,32 fêmeas para cada macho.

Embora testes adicionais tenham sido realizados com as amostras para as quais os resultados mostraram-se inconclusivos ou em que não foram observados produtos de amplificação, não foram obtidos resultados satisfatórios. Como as amostras de DNA isoladas mostraram-se de boa qualidade, tal fato pode estar correlacionado à reduzida quantidade de DNA obtido de alguns animais e/ou à própria técnica de PCR que é extremamente sensível e a falta ou excesso de algum componente da reação pode diminuir a fidelidade do teste, incluindo análises de sexagem molecular (VIEIRA, 2009; MELO et al., 2012; BENTO et al. 2019).

Tabela 1: Dados das amostras de DNA de *R. rufescens rufescens* utilizadas na sexagem molecular e respectivos diagnósticos.

AMOSTRA (no. de registro do animal)	CONCENTRAÇÃO DO DNA (ng/ μ l)	SEXO MORFOLÓGICO*	SEXO MOLECULAR
08053	60,6		M
09120	31,2	MACHO	M
09163	18		M
09174	19,86		M
09203	30,58		M
09225	21,7	MACHO	M
09304	15,4		M
10015	29	MACHO	M
10413	14,1		F
10415	25,1		F
10419	27,8	FÊMEA	F
10420	31,7	FÊMEA	F
10421	13	FÊMEA	F
10422	16,8		F
10428	28,5	FÊMEA	F
10430	31,5	MACHO	M
10431	28,1		M
10433	13,8	FÊMEA	F
10435	29,2	FÊMEA	F
10436	35,5	MACHO	M
10441	24,6		F
10442	9	FÊMEA	F
10444	19,3		F
11069	39,1		F
11074	48,3	MACHO	M

11075	36,6		M
11084	46,8		M
11097	21,9	MACHO	M
11114	16,4	FÊMEA	F
11148	24,3		F
11158	17,06		M
13001	16,5		M
13002	23,6		F
13004	19,6		M
13005	28		M
13006	19,8		M
13007	62,5		F
13008	10,4		M
16204	19		M
16219	40,7		M
16222	42,7		M
16224	36,6	FÊMEA	F
16226	27,06		M
16231	18,6		F
16232	27		F
16240	39,5		F
16245	23,1		F
16247	20		M
16249	53,41		F
16250	14,35	MACHO	M
16260	18,7		M
16266	15		F
16272	70,5		F
16273	19	FÊMEA	F
16274	58,2		F
16277	59,3		F
16301	20,51		M
16302	18,95		M
16305	30,1		F
16306	27,5		F
16307	13,2		M
16308	23,3	MACHO	M
16311	17,6		M
16320	30,5		M
16321	18		F
16322	23,3		M
16327	58,9		F
16328	41,5		F
16329	25,5		M
16330	27,3		F

16332	28		F
16333	48,5		F
16334	15,1		F
16338	62,9		F
16339	15		M
16341	35,7		F
16342	31,5		F
16351	58,7		F
16352	18,6		F
16354	15,54		F
16357	14,7		M
16359	80,7		M
16361	25		F
16362	20		F
16363	66,9		F
16364	INSUFICIENTE		
16365	47,4/ 35,2		F
16366	20,1		F
16367	33,5		F
16368	36,6		M
16369	71,6		
16370	51,71		F
16371	61,6		F
16372	32,1		F
16373	12,22		F
16374	INSUFICIENTE		
16376	49,1		F
16377	25,5		M
16378	34,9		F
16379	50,5		
16380	32,9		F
16381	25,5		F
16383	19,3		M
16384	27,88		F
16385	19,5		F
16387	INSUFICIENTE		
16389	14,8		F
16390	32,6		F
16391	21		M
16392	74,3/69,2		F
16393	8,5		F
16394	43,3		F
16395	47,97		M
16401	100,5		M
16402	11,1		F

16403	18,26		M
16404	20,7		M
16405	34,3		F
16406	23		F
16407	36,45		F
16408	25		M
16409	18,3		M
16410	30,86		M
16411	37,7		M
16412	28,9		M
16413	35,65		M
16414	30,8		F
16415	24,1		F
16416	14,9		F
16417	19,1		F
16418	33,6		M
16419	28,74		F
16420	20		F
16421	22,6		F
16422	31,62		F
16423	53,5		F
16425	32,13		F
16427	37,31		M
16428	22		F
16429	28,5		
16430	43,1		
16432	24,7		M
16433	11,7		M
16434	49,77		F
16435	35,05		M
16436	16,1		F
16437	28,8		M
16438	23,68		M
16439	17		F
16441	40,4		F
16442	15,2		
16443	27		F
16444	24,8		F
16445	14,72		
16446	17,9		M
16447	39,92		M
16448	28,6		M
16449	18,5		M
16450	14,85		M
16451	114,85		F

16452	33,8		M
16453	30,9		F
16455	16,5		F
16456	30,2		M
16457	14,7		F
16458	37,6/ 58,8		M
16460	16,7		M
16461	45,3		M
16462	36		F
16464	25,72		F
16465	47,4		F
16467	8,27		F
16468	24,1		
16469	36,96		F
16473	57,1		M
16476	53,9		M
16477	63,64		M
16480	20,2		F
16481	26,7		F
16482	21,3		M
16483	18,83		M
16484	13,1		F
16485	7,97		M
16486	22,47		M
16487	30,48		
16488	45,8		F
16489	94,9		M
16490	34,52		M
16491	34,4		F
16492	19,9		F
16493	21,2		M
16494	4,6		F
16495	11		F
16496	27,4		F
16497	22		M
16498	12,6		F
16499	22,8		F
16500	10,3		F
sem anilha	3,5		F

*Observação comportamental: Animais adultos que apresentaram características morfológicas externas específicas e comportamentais durante o período reprodutivo de um determinado sexo e que, portanto, foi possível categorizar como machos ou fêmeas.

M, macho; F, fêmea; INSUFICIENTE refere-se a amostras de DNA cuja quantificação não foi possível.

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), por meio das portarias 117 e 118 de 15 de outubro de 1997 - que normatizam a criação de espécies nativas e comercialização de animais vivos, abatidos, partes e produtos da fauna nativa - propiciou que houvesse um incremento na criação legal desses animais. Estas portarias visam também colaborar com a conservação da fauna brasileira e combater a caça e o comércio de animais silvestres (ALLGAYER & CZIULIK, 2007). Para populações de perdizes já impactadas por efeitos antrópicos, sua criação é vista não só como lucrativa como também uma prática sustentável para a espécie. Entretanto, sua criação em cativeiro precisa ser realizada de forma planejada e multidisciplinar, incluindo análises genéticas.

O protocolo de sexagem descrito para *R. rufescens* no presente trabalho representa o primeiro teste molecular desenvolvido para a espécie e pode ser utilizado para subsidiar estratégias de manejo e reprodução em cativeiro voltados tanto à sua produção como também à sua conservação. Como o diagnóstico é correlacionado com o sistema de determinação sexual cromossômico das aves - ZZ (machos) / ZW (fêmeas) - a amplificação e visualização de um segmento de DNA encontrado unicamente no cromossomo sexual W pode ser considerado um marcador ideal para identificação do sexo neste grupo animal (MIYAKI *et al.*, 1998). A precisa identificação de machos e fêmeas por esse teste possibilitará que animais já previamente identificados como machos e fêmeas, inclusive ainda na fase juvenil, possam ser comercializados para novos criadores e também a formação de casais ou outros grupos reprodutores e o estudo de suas interações.

Dado que as perdizes são classificadas como poliândricas (SICK, 1997; MAGALHÃES, 1994; CROMBERG *et al.*, 2007), a identificação do sexo dos indivíduos facilita a proposição de estratégias de formação de grupos reprodutores com base no comportamento reprodutivo da espécie. Além disso, para animais mantidos em cativeiro que não possuem finalidade reprodutiva, a identificação do sexo também pode auxiliar na formação de grupos separados de fêmeas e machos com o objetivo de evitar conflitos, principalmente no caso de espécies

que apresentam dominância social e/ou em que os machos são territorialistas, como já descrito para aves Tinamiformes (CROMBERG et al., 2007; HANDFORD & MARES, 2008).

Os dados de sexagem gerados, visto que são os primeiros descritos na literatura, já estão sendo utilizados no Setor de Melhoramento Genético de Perdizes da FMVZ como subsidio para planejar melhores estratégias de acasalamento e reprodução. Embora as informações de genealogia das aves desse criadouro de perdizes, obtidas de arquivos de registros de nascimentos, mostram que foram gerados

1.365 animais durante os anos 2005 a 2012, não existem dados acerca de quais animais foram utilizados como reprodutores nas sucessivas gerações e que acabaram dando origem ao plantel atual. Desta forma, são ainda necessárias análises de diversidade genética, com o uso de marcadores nucleares e de DNA mitocondrial, para avaliar se este plantel, mesmo composto por um número relativamente grande de exemplares, apresenta alta diversidade genética, o que geralmente está associado a baixas taxas de endogamia. O endocruzamento, comum em populações de cativeiro ou altamente impactadas na natureza, pode resultar em drásticas consequências nos indivíduos, como reduzidas taxas de fertilidade, sobrevivência e crescimento, baixa resistência a doenças, anomalias fenotípicas, tamanho reduzido e baixa capacidade de se adaptar a mudanças ambientais (YOUNG et al., 1998; BRYANT; REED, 1999; FRANKHAM et al., 2002). Desta forma, os dados de sexagem molecular, associados às informações de diversidade genética, poderão futuramente também subsidiar a formação de reprodutores que apresentem genótipos e alelos distintos e que, assim, permitam manter ou mesmo ampliar o nível de diversidade genética do criadouro.

4.3 Cartilha de divulgação científica

Materiais voltados à produtores avícolas no Brasil podem ser encontrados facilmente por meio de buscas na internet. Produzidos por empresas e órgãos governamentais diversos como Embrapa, Sebrae e Secretaria de Educação, estes materiais são fortemente voltados a espécies não exóticas, embora alguns incluam dados relacionados a aspectos biológicos e

criação de perdizes. Dados mais consistentes sobre a produção de *R. rufescens* podem ser encontrados apenas em dissertações, teses e artigos científicos. Entretanto, estes são voltados ao público acadêmico. Aspectos relacionados à biologia, distribuição e conservação desta espécie são ainda raramente explorados tanto em materiais para o público leigo como também para a comunidade acadêmica.

Desta forma, no presente trabalho foi gerado um material de fácil compreensão, contendo figuras e texto com linguagem direcionada ao público leigo, com informações sobre as características biológicas, distribuição geográfica e fatores de ameaça de *Rhynchotus rufescens*, além da aplicação de análises de sexagem molecular em estudos conservacionistas (Anexo I). Este material, além de informativo, vem de encontro às ações de divulgação científica que têm se intensificado nos últimos anos para combate às *fake news*, negacionismo e valorização e compreensão da ciência (ESCOBAR, 2021; FREIRE, 2021; MANSUR et al., 2021; ALBUQUERQUE et al., 2022). Pesquisadores que atuam na popularização da ciência e transpõem para a sociedade seus dados podem assim contribuir para o letramento científico que refere-se tanto à compreensão de conceitos científicos como à capacidade de aplicá-los (CUNHA, 2017; BERTOLDI, 2020).

A cartilha gerada deverá ser utilizada em atividades do Programa de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na Unesp: Interação entre Pós-Graduação e Ensino Básico”. Os cursos de férias “Experimentando Genética”, que integram esse programa e são vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, são direcionados a estudantes do ensino médio público. Estes cursos exploram, entre diversos tópicos, a aplicação da genética conservacionista (BARBOSA, 2017). Por meio do uso de materiais como a cartilha elaborada, os cursistas participam de atividades que promovem o conhecimento, valores e atitudes voltados à proteção do meio ambiente e biodiversidade.

Assim, o material de divulgação científica gerado soma-se aos demais produtos já produzidos por estudantes de mestrado e doutorado do PPG C. Biológicas (Genética), como

livros, cartilhas, jogos e kits, e que são associados aos conteúdos de suas dissertações e teses, e vem de encontro à premissa da CAPES de que programas de pós-graduação apliquem a experiência em pesquisa e formação de estudantes de mestrado e doutorado na melhoria do ensino básico do país.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos, pode-se concluir que:

1. O gene *spindlin* (*chSPIN*) representa um excelente marcador molecular para diagnóstico de sexagem em *R. rufescens* e o teste padronizado poderá ser amplamente utilizado para geração de perfis sexo-específicos em exemplares da espécie.
2. A cartilha de divulgação científica gerada compreende um material que subsidiará ações de interface com a educação básica, associadas à inserção social, que já vêm sendo desenvolvidas junto a um programa de pós-graduação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE KA, SOUZA RF, COSTA DRM, VASCONCELOS SM. A contribuição dos textos de divulgação científica para a educação científica. *Cadernos de Saúde Pública* 22: 1118-1140, 2021.
- BARBOSA C. Panorama de atividades de ensino e divulgação científica em Genética: Interfaces entre o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) e o Ensino Básico. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, 2017.
- BENTO JMA, MORGADO TO, GRANJEIRO MDB, BIANCHINI MA, IGLESIAS GA, DUTRA V, NAKAZATO L, PAZ RCR. Sexagem em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) por meio do teste da reação em cadeia da polimerase. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* 71: 538-544, 2019
- BERTELLI S, PORZECANSKI AL. Tinamou (Tinamidae) systematics: a preliminary combined analysis of morphology and molecules. *Ornitologia Neotropical* 15: 1-8, 2004.
- BERTOLDI A. Alfabetização científica versus letramento científico: um problema de denominação ou uma diferença conceitual? *Revista Brasileira de Educação* 25: 1-17, 2020.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. *Species factsheet: Rhynchotus rufescens*. Disponível em: <http://www.birdlife.org>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2022.

BRUNELI FAT, THOLON P, ISAAC FL, DAMASCENO PR, TONHATI H, QUEIROZ SA. Caracterização da reprodução de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) em cativeiro. *Ars Veterinária* 21: 272-180, 2005.

CARMO RR, GARCEZ ARS, VASCONSELOS KR, LEITE DP, DANTAS ESOD, SILVA FGS, MATEUS RP. Identificação de espécies de animais silvestres por meio de sequências mitocondriais utilizados no combate aos crimes contra a fauna - Mato Grosso - Brasil. *Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics* 6: 378-404, 2017.

CHAVES LS, CASELLI CB, CARVALHO RA, ALVES RRN. Noninvasive sampling techniques for vertebrate fauna. *Methods and Techniques in Ethnobiology and Technoecology* 13: 309-321, 2019.

CLAVER JA, QUAGLIA AIE. Comparative morphology, development, and function of blood cells in non mammalian vertebrates. *Jornal of Exotic Pet Medicine* 18: 87-97, 2009.

CRONBERG VU, STEIN MS, BOLELI IC, TONHATI H, QUEIROZ SA. Reproductive and behavioural aspects of red-winged tinamous (*Rhynchotus rufescens*) in groups with different sex ratios. *Brazilian Journal of Poultry Sciences* 9: 161-166, 2007.

CUNHA RB. Alfabetização científica ou letramento científico? Interests involved in the interpretation of the concept of scientific literacy. *Revista Brasileira de Educação* 22: 169-186, 2017.

DAWSON DA. Genomic analysis of passerine birds using conserved microsatellite loci. UK: PhD Thesis, University of Sheffield, 2007.

DAWSON DA, DARBY S, HUNTER FM, A critique of CHD-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. *Molecular Ecology Notes*, 1: 201-204, 2001.

DAWSON DA, HORSBURGH GJ, KUPPER C, STEWART IRK, BALL AD, DURRANT KL, HANSSON B, BACON I, BIRD S, KLEIN A. New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility - As demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10: 475-494, 2010.

DAWSON DA, DOS REMEDIOS N, HORSBURGH GJ. A new marker based on the avian spindlin gene that is able to sex most birds, including species problematic to sex with CHD markers. *Zoo Biology* 35: 533-545, 2016.

DE KLOET SR. Molecular sex identification of tinamous with PCR using primers derived from the *spindlin* gene. *Molecular Ecology Notes* 2: 465-466, 2002.

DE KLOET SR Evolution of the *spindlin* gene in birds: independent cessation of the recombination of sex chromosomes at the *spindlin* gene in neognathous birds and tinamous, a palaeognathous avian family. *Genetica* 119, 333-342, 2003.

DEL HOYO J, ELLIOT A, CHRISTIE DA, JUANA E. *Handbook of the birds of the world alive*. Lynx Edicions, Barcelona, 2013.

DISLICH M. Tinamiformes (macuco, inhambu, perdiz). In: CUBAS ZS, SILVA RCR, CATÃO-DIAS JL *Tratado de animais selvagens. Medicina Veterinária*. Ed. Roca, 2007.

DUTRA DR, GUIMARÃES MFMA, VILLEGAS-CAYLLAHUA EA, MELLO JLM, SOUZA RA, GIAMPIETRO-GANECO A, FERRARI FB, BORBA H. Caracterização dos componenetes internos e qualidade dos ovos de perdiz brasileira (*Rynchotus rufescens*) durante 28 dias de armazenamento. *Reserarch, Society and Development* 10: 1-9, 2021.

DVORAK J, HALVERSON J, GULLICK P. cDNA cloning of a Z- and W-linked gene in gallinaceous birds. *Journal of Heredity* 83: 22-25, 1992.

ELLEGREN H. Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 188-192, 2000.

ESCOBAR H. A ciência contra o negacionismo. *Jornal da USP*, 2021 (<https://jornal.usp.br/ciencias/a-ciencia-contra-o-negacionismo/>).

FARIA LP, CARRARA LA, RODRIGUES M. Sexual size dimorphism in henna-capped folige-gleaner *Hylocryptus rectirostris* (Wied) (Aves, Furnariidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 24: 207-212, 2007.

FREIRE NP. Divulgação científica imuniza contra desinformação. *Ciência e Saúde Coletiva* 26: 15, 2021.

FRIDOLFSSON A-K, ELLEGREN H. Molecular evolution of the avian CHD1 genes on the A and W sex chromosomes. *Genetica* 155: 1903-1912, 2000.

GRANDO AP. *Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, SP, 2002.

GRIFFITHS PR. Sex identification in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 9: 14-26, 2000.

GRIFFITHS R, DOUBLE MC, ORR K, DAWSON RJG. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075, 1998.

HANDFORD P, MARES MA. The mating systems of ratites and tinamous: an evolutionary perspective. *Biological Journal of the Linnean Society* 25: 77-104, 1985.

HONG X, SCOFIELD DG, LYNCH M. Intron size, abundance and distribution within untranslated regions of genes *Molecular Biology and Evolution* 23: 2392-2404, 2006.

HORI T, ASAKAWA S, ITOH Y, SHIMIZU N, MIZUNO S. Wpkci, encoding an altered form of PKCI, is conserved widely on the avian W chromosome and expresses in early female embryos: Implications of its role in female sex determination. *Molecular Biology Cell* 11: 3645-3660, 2000.

HOSHIBA MA, TANAKA ALR, RODRIGUES GA, FIGUEIREDO G, THOLON P, JUNQUEIRA OM, TONHATI H, QUEIROZ SA. Resultados preliminares do consumo e desperdício de ração com diferentes tamanhos de péletes de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) em cativeiro. In: 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Santa Maria, RS, 2003.

ITOH Y, HORI T, SAITOH H, MIZUNO S. Chicken spindling genes on W and Z chromosomes: transcriptional expression of both genes and dynamic behavior of spindlin in interphase and mitotic cells. *Chromosome Research* 9: 283- 2001.

ITS - Integrated Taxonomic Information System - Report, 2021. Acesso em: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=174427#null

- LORENZ TC. Polymerase Chain Reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments* 63: 3998, 2012.
- LYNCH M. Intron evolution as a population-genetic process. *PNAS* 99: 6118-6123, 2002.
- MANSUR V, GUIMARÃES C, CARVALHO MS, LIMA LD, COELI CM. Da publicação acadêmica à divulgação científica. *Ciência e Saúde Coletiva* 37: 7, 2021.
- MATTER SV, PIACENTINI VQ, STRAUBE FC, CÂNDIDO JF, ACCORDI IA. *Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento*. Technical Books, 2016.
- MAZZOLENI S, NEMEC P, ALBRECHT T. Long-term stability of sex chromosome gene content allows accurate qPCR-based molecular sexing across birds. *Molecular Ecology* 21: 2013-2021, 2021.
- MELO NA, SANTOS JÚNIOR ER, ADRIÃO M, WISCHRAL A. Aplicações da técnica de PCR na reprodução animal. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 36: 105-112, 2012.
- MORO MEG, ARIKI J, SOUZA PA, SOUZA HBA, MORAES VMB, VARGAS FC. Carcass income and chemical composition of the native partridge (*Rhynchotus rufescens* - Tinamiformes) meat. *Ciência Rural* 36: 1678-1686, 2007.
- MYERS PR, ESPINOZA C.S, PARR T, JONES GS, HAMMOND D, DEWEY TA. The Animal Diversity Web (online), 2022. Accessed at <https://animaldiversity.org>
- PAULI JN, WHITEMAN JP, RILEY MD, MIDDLETON AD. Defining noninvasive approaches for sampling of vertebrates. *Conservation Biology* 24: 349-352, 2010.
- PETERS C, NELSON H, RUSK B, MUIR A. A novel method to optimize the utility of underused moulted plumulaceous feather samples for genetic analysis in bird conservation. *Conservation Genetic Resources* 12: 457-467, 2019.
- POUGH J, HARVEY F. *A vida dos vertebrados*. 2.ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1999.
- QUEIROZ FA, CARVALHO MM, SUGUI JK, NUNES J, FELIPE L, SANTOS EC. Meat and carcass traits of the red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*). *Brazilian Journal of Poultry Science* 15 :113-118, 2013.
- QUEIROZ SA. Gender-bases differences in stride and limb dimensions between healthy red-wing tinamou (*Rhynchotus rufescens*) Temminck, 1815. *Turkish Journal of Zoology* 35: 103-108, 2011.
- RASO TF, WERTHER K. Sexagem cirúrgica em aves silvestres. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* 56: 187-192, 2004.
- ROSE AB. Introns as gene regulators: a btick on the accelerator. *Frontiers in Genetics* 9: 672-679, 2019.
- SANTOS D, NETO FRA, SANTOS DJA, SANTOS FR, ASPILCUETA-BORQUIS, QUIROZ SA, TONHATI H. Genetic parameters for tonic immobility, body weight, and morphological traits of the red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*). *Tropical Animal Health and Production* 52: 243-247, 2020.
- SANTOS DO, MOREIRA L.R, TONHATI H, CAPARROZ R. Isolation and characterization of ten novel microsatellite loci in the red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*, Tinamiformes, Aves) and cross-amplification in other tinamous. *Molecular Biology Reports* 39: 4837-4840, 2012.

SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997.

SIGRIST T. *Avifauna Brasileira. The avian brazilian field guide to the birds of Brazil*. São Paulo, Editora Avis Brasilis, 2009.

SOUZA KK, KLEIN CS, KICH JD, DOLDEBELLA A, ALBERTONI GC. Otimização de técnica de PCR para a detecção de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Ciência Rural* 8: 2239-2244, 2008.

TÁXEUS - Lista de Espécies, 2022. Disponível em: <https://www.taxeus.com.br>

TREMEA FT, SILVA AC. O setor avícola no Brasil e sua distribuição regional. *Economia & Região* 8: 221-225, 2020.

VIEIRA JN. Sexagem molecular em aves via PCR - Avaliação de três técnicas de extração de DNA. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

ZEMANOVA MA. Towards more compassionate wildlife research through the 3Rs principles: moving from invasive to non-invasive methods. *Wildlife Biology* 1: 1-17, 2020.