



## **VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Oryzoborus angolensis* E *Oryzoborus maximiliani* CRIADAS EM CATIVEIRO, NO MUNICÍPIO DE MARINGÁ, PR**

Jessica Francis Prandi<sup>1</sup>; Alessandra Valéria de Oliveira<sup>2</sup>

**RESUMO:** Hoje percebemos muitas mudanças no meio ambiente, o que leva muitas vezes a extinção de espécies. Muitos criadores começam a procriar estas espécies em criadouros comerciais, o que ajuda na perpetuação das mesmas. Além disso, aves com belos cantos, como é o caso das espécies *Oryzoborus maximiliani* e *Oryzoborus angolensis* são alvo de melhoramento genético, visando a convergência da maior quantidade possível de genes de interesse a mesma espécie, tendo uma característica padrão para os criadores. Com base nisso se vê a necessidade do estabelecimento de técnicas para avaliar a variabilidade genética das populações. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade genética das espécies *Oryzoborus maximiliani* e *Oryzoborus angolensis* o que se torna importante para os criadores que buscam um melhor conhecimento sobre a variabilidade genética presente nesse grupo. As amostras tiveram seu DNA amplificado pela técnica de ISSR e SSR. Foram obtidos fragmentos de DNA espécie-específicos, que podem ser utilizados para estimativa de variabilidade genética entre as espécies. No entanto as técnicas utilizadas evidenciaram baixa diversidade genética intrapopulacional, pela grande quantidade de locos monomórficos encontrados.

**PALAVRAS-CHAVE:** ISSR, *Oryzoborus maximiliani*; *Oryzoborus angolensis*; SSR; Variabilidade genética.

### **1 INTRODUÇÃO**

Segundo o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO), o Brasil possui cerca de 1.801 espécies de aves, que representam 20% das 9.000 espécies existentes no mundo. É o terceiro país em diversidade de aves (atrás apenas da Colômbia e do Peru). No entanto, é o primeiro em número de espécies em extinção. Das 1.212 aves ameaçadas no mundo, 120 estão no país ([www.cbro.org.br/CBRO/ultim.htm](http://www.cbro.org.br/CBRO/ultim.htm), 2009). Também é considerado como um dos países com maior porcentagem de espécies endêmicas (10%), o que o torna um dos mais importantes em relação a investimentos em preservação de aves (ALLGAYER e CZIULIK, 2007).

O Curió (*Oryzoborus angolensis*) e o Bicudo (*Oryzoborus maximiliani*) são aves silvestres encontradas em quase todo o território nacional, sendo que o bicudo tem preferência por regiões quentes e próximas da água. Estas espécies são muito apreciadas por seu canto melodioso, o que atrai criadores. Nos últimos tempos estão se tornando comum nos criadouros comerciais e incomum nas áreas florestadas, pois são

1 Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). [jessicaprandi@hotmail.com](mailto:jessicaprandi@hotmail.com)

2 Orientadora, Professora Doutora do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. [alessoli@cesumar.br](mailto:alessoli@cesumar.br)

espécies ameaçadas de extinção em decorrência da caça gananciosa, predatória e a destruição de seus ambientes naturais. “A crescente degradação do meio ambiente provocada por desmatamentos, construções de barragens, poluição química produzida por indústrias e por acidentes com derramamentos de óleo, assim como o próprio desenvolvimento de centros urbanos ocupando áreas progressivamente maiores, vêm causando redução e fragmentação de inúmeros ecossistemas. Como consequência direta desses fatos, muitas espécies de aves caminham para a extinção” (ALMEIDA, 2003). A prática de procriação em criadouros é uma atividade nova, porém, muito importante para o Brasil, pois permite produzir aves nativas para fornecimento a outro criador, sem que ela seja capturada na natureza, impedindo a captura clandestina e os maus tratos dos animais, além de formalizar uma comercialização legal, inclusive para exportação, garantindo desta forma a perpetuação da espécie. Acredita-se que o comércio ilegal deverá reduzir progressivamente à medida que exista a possibilidade de aquisição de animais de maneira lícita e confiável, com documentação correta, saúde, origem controlada e nascimento em cativeiro. A regulamentação de criadouros conservacionistas pelo IBAMA trouxe uma nova visão do conceito de reprodução e manutenção de aves silvestres em cativeiro (ALLGAYER e CZIULIK, 2007).

Os criadores buscam a formação de um genótipo próprio para o seu criadouro, ou seja, buscam uma “marca registrada”, visando a predominância de uma característica, esta, tem como ponto de partida a seleção de animais portadores de herança genética da preferência do criador. Com base nisso se vê a necessidade do estabelecimento de técnicas para avaliar a variabilidade genética das populações.

Dessa forma o objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade genética das espécies *Oryzoborus maximiliani* e *Oryzoborus angolensis* o que se torna importante para os criadores que buscam um melhor conhecimento sobre a variabilidade genética presente nesse grupo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados para este trabalho amostras de pena e sangue de espécimes de *Oryzoborus angolienses* e *Oryzoborus maximiliani*.

### 2.1 EXTRAÇÃO DE DNA

A metodologia utilizada para a extração de DNA total foi baseada em fenol/clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989). Amostras de pena e sangue foram cortadas e homogeneizadas em tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e Sacarose 5%), tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, Sacarose 5%, Espermina 0,15 mM) PH 8,0 e proteinase K (20 µg/µL) por 90 minutos em banho-maria a 37 °C. Posteriormente, o DNA foi purificado por extração com fenol/clorofórmio (1:1) clorofórmio, respectivamente, e precipitado com solução salina (NaCl 5 M) e etanol absoluto gelado. O pellet foi ressuspenso em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) com RNase. A quantificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, por meio de comparação com DNA de fago λ de concentração conhecida.

### 2.2 AMPLIFICAÇÃO DO DNA

Cada um dos indivíduos teve seu DNA submetido a amplificação em um termociclador, que foi realizada via ISSR, com uso de um único *primer* com seqüências de microssatélites. Os *primers* utilizados na amplificação do DNA foram os seguintes: (GGAC)<sub>4</sub>, (GGAC)<sub>3</sub>C, (GGAC)<sub>3</sub>A. Além destes também foram utilizados tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20mM pH 8,4 e KCl 50mM), MgCl<sub>2</sub> 2mM, dNTP 0,19 mM, 1 U/reacção de Taq-

polimerase e água suficiente para completar 13 µl. A outra metodologia utilizada foi a de microssatélite (SSR), o mix utilizado na reação teve volume final de 15 µL, correspondente à 1,25 U de Taq polimerase, tampão de PCR (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl), 0,25mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada nucleotídeo, 0,2 µL de cada *primer* e por fim o DNA genômico, com concentrações variadas. As concentrações de DNA genômico testadas variaram de 10 a 50ng.

Após amplificados, os fragmentos de DNA foram separados gel de agarose 1,4 %, corado com brometo de etídio e em gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata.

A visualização foi feita em um transluminador sob luz UV. A análise foi realizada pelo registro dos comprimentos, em pb, das bandas produzidas.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de ISSR é conhecida por ser eficaz no estudo de variabilidade genética de espécies, devido não necessitar do conhecimento prévio do genoma estudado. No entanto, no presente estudo os *primers* utilizados não foram eficientes na amplificação de fragmentos de DNA que pudessem ser utilizados para estudos de variabilidade genética intrapopulacional. Como os estudos em aves são escassos, a metodologia não havia sido testada anteriormente nesse grupo.

A técnica de microssatélite (SSR) também tem sido bastante utilizada em estudos populacionais devido a apresentar diversas vantagens como simplicidade e a rapidez da técnica, pequena quantidade de DNA requerida e o grande poder de resolução (OLIVEIRA, 2006). As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, permitindo o desenho de *primers* para amplificações específicas desses locos, via reação em cadeia da polimerase (PCR) (OLIVEIRA, 2006). No presente estudo os *primers* utilizados foram úteis para gerar fragmentos de DNA espécie-específicos, que podem ser utilizados para estudos de diferenciação genética entre os grupos. Evidenciou-se também a presença de muitos locos monomórficos, que não variaram entre os indivíduos, sendo que em vários casos esses indivíduos eram homozigotos. Nas figuras 1 e 2 podemos observar a presença de locos monomórficos para cada uma das espécies estudadas. A espécie *Orizoborus angolensis* apresentou um marcador de 250 pb e a espécie *Orizoborus maximiliani* apresentou um marcador de 140 pb.

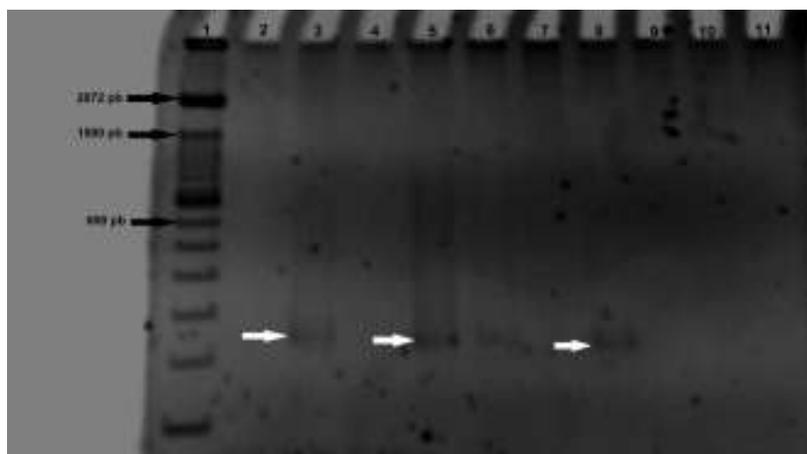


Figura 1. Fragmentos de DNA amplificados com o *primer* PCA 2. (1) Marcador de peso molecular Ladder 100 pb.(2) Controle negativo da reação. (3 a 11) Amostras *Orizoborus angolensis*. As setas brancas indicam a presença de bandas monomórficas nos indivíduos. Marcador de aproximadamente 250 pb.

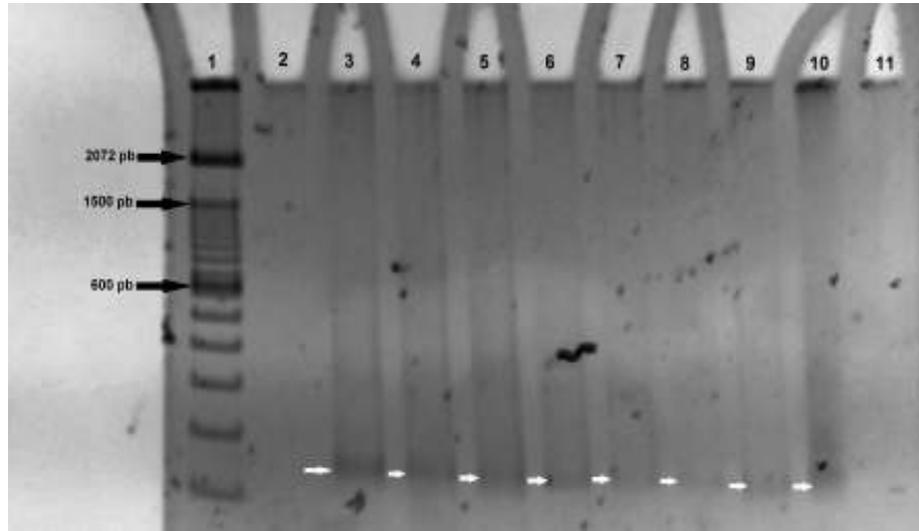


Figura 2. Fragmentos de DNA amplificados com o *primer* PCA 2. (1) Marcador de peso molecular Ladder 100 pb.(2) Controle negativo da reação. (3 a 11) Amostras de *Orizoborus maximiliani*. As setas brancas indicam a presença de bandas monomórficas nos indivíduos, marcador de aproximadamente 140pb.

A Figura 3 mostra um padrão de fragmentos de DNA apresentados pelas duas espécies, utilizando vários *primers* de microssatélites. 80% dos lócus obtidos foram monomórficos dentro das populações, indicando baixa variabilidade genética populacional.

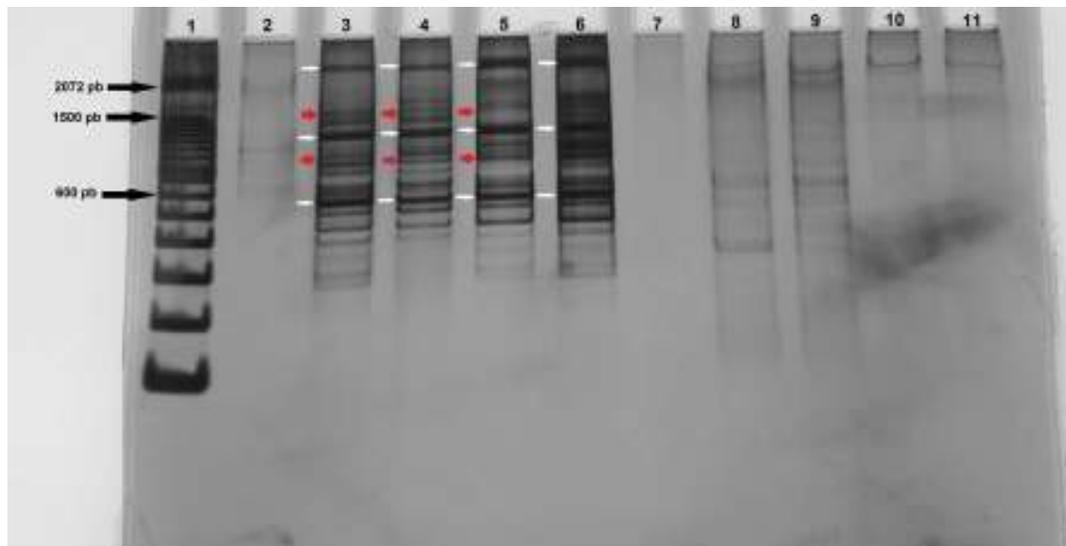


Figura 3. Fragmentos de DNA amplificados através da técnica de microssatélite (SSR).(1) Marcador de peso molecular Ladder 100 pb.(2 e 7) Controle negativo da reação. (3, 4, 5, 6) Amostras de *Orizoborus angolensis*. (8, 9, 10, 11) Amostras *Orizoborus maximiliani*. (Setas brancas indicam regiões que não ocorre variação, e as setas vermelhas indicam regiões que ocorrem variação nas amostras).

## 4 CONCLUSÃO

Com a utilização das técnicas ISSR e SSR para a amplificação do DNA das espécies *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani*, foram obtidos fragmentos de DNA espécie-específicos, que podem ser utilizados para estimativa de variabilidade genética entre as espécies. No entanto as técnicas utilizadas evidenciaram baixa diversidade genética intrapopulacional, pela grande quantidade de locos monomórficos encontrados.

## REFERÊNCIAS

ALLGAYER MC, CZIULIK M. **Reprodução de psitacídeos em cativeiro**. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.344-350, 2007. Disponível em: [www.cbra.org.br/publicacoes/rbra.do](http://www.cbra.org.br/publicacoes/rbra.do)

ALMEIDA M.A. **Influências dos sistemas artificial e natural de incubação e criação de Emas (*Rhea americana*) nos índices produtivos de criadouros do estado de São Paulo**. 2003. 75f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, SP.

**Espécies** novas descritas para o Brasil. Disponível em: <http://www.cbro.org.br/CBRO/ultim.htm>. Acessado em: 22 julho. 2011.

OLIVEIRA, E. J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 2006. 152 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, Universidade de São Paulo, 2006.

SAMBROOK, J.; FRIITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.