



## VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPOULAÇÕES DE *ORYZOBORUS ANGOLENSIS* E *ORYZOBORUS MAXIMILIANI* CRIADAS EM CATIVEIRO, NO MUNICÍPIO DE MARINGÁ, PR

Érika Simão Couto<sup>1</sup>; Angélica da Silva de Oliveira<sup>2</sup>; Alessandra Valéria de Oliveira<sup>3</sup>

**RESUMO:** A captura de pássaros que apresentam belos timbres e conseqüentemente um valor comercial muito grande tem preocupado significativamente pesquisadores e ambientalistas, isto porque a grande procura por estas aves por apreciadores incentiva o comércio ilegal destes animais e como resultado obtemos o risco de extinção das espécies que apresentam esta característica. A observação na diferenciação de timbres no cantar dos pássaros das espécies *Oryzoborus maximiliani* e *Oryzoborus angolensis*, fez despertar o interesse por parte de observadores e criadores de pássaros desse porte utilizados para competições. A origem destes criadouros ajuda na preservação das espécies, pois, impede o contrabando e comércio ilegal das mesmas e investe em melhoramento genético, visando a obtenção de características 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 é 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. Amostras de bulbo, sangue e pena foram submetidas ao processo de extração de DNA baseada em fenol/clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989) e tiveram seu DNA amplificado pela técnica de RAPD realizada com *primers* inespecíficos. A presença de grande quantidade de fragmentos monomórficos indicou baixa variabilidade genética intrapopulacional.

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

### 1 INTRODUÇÃO

Segundo o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO), o Brasil possui cerca de 1801 espécies de aves, que representam 20% das 9.000 espécies existentes no mundo. É o terceiro país em diversidade de aves. No entanto, segundo a CBRO é o primeiro em número de espécies em extinção, das 1212 aves ameaçadas no mundo, 120 estão no país.

Também é considerado como um dos países com maior porcentagem de espécies endêmicas, o que o torna um dos mais importantes em relação a investimentos em preservação de aves (ALLGAYER e CZIULIK, 2007). As principais causas do

<sup>1</sup> Acadêmica do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – Cesumar, Maringá – Paraná. Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). erika\_couto@hotmail.com

<sup>2</sup> Acadêmica egressa do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – Cesumar, Maringá – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar – PROBIC. angelsinha15@hotmail.com

<sup>3</sup> Orientadora e Docente do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – Cesumar, Maringá – Paraná. alessoli@cesumar.br



desaparecimento de espécies é a destruição de seu habitat natural devido principalmente ao desmatamento (WILSON, 1992), além de construções de barragens, poluição química produzida por indústrias e também o próprio desenvolvimento urbano que ocupando de forma desorganizada o meio ambiente fragmentando inúmeros ecossistemas. (ALMEIDA, 2003).

Segundo Sick(2001), a fauna brasileira é tratada como uma simples mercadoria e tende acabar. Não há fauna no mundo que resista a uma sangria como é o comércio ilegal de aves do Brasil, Le Duc (2006) afirma que o tráfico de animais silvestre é o terceiro maior comércio ilegal do mundo. O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), estima que anualmente cerca de 12 milhões de animais silvestre sejam retirados do seu habitat natural no Brasil (IBAMA, 2010), sendo em sua maioria aves de diversas espécies.

Dentre elas a *Oryzoborus angolensis* (Figura 1) descrito por Linnaeus (1766), é conhecido popularmente como Curió ou Avinhado dependendo da região (BAÍÁ JÚNIOR, GUIMARÃES, 2004), é mais comum em áreas arbustivas, capoeira e borda de mata, muito cobiçado como ave de gaiola por seu belo canto, uma longa sequência de assobios musicais (RIDGELY, 2010). Segundo Olson (1981) o macho desta ave, assim como os outros do mesmo gênero, no início da sua vida tem as penas na coloração marrom, após completar em média 420 dias, inicia a troca de cor das penas, passando a ser pretas, existe uma pequena mancha branca em suas asas e no peito carrega uma faixa de cor vinho. Olson (1981) ainda descreve as fêmeas como tendo uma cor mais marrom em seu dorso, e um tom mais claro no peito, mesmo quando já estão com maior tempo de vida que é de aproximadamente de seis a dez anos.

Outra espécie também conhecida pelo tráfico de animais é o *Oryzoborus maximiliani* (Figura 2) descrito por Cabanis (1851), é conhecido popularmente como Bicudo (BAÍÁ JÚNIOR, GUIMARÃES, 2004), é encontrada desde a América central até a Bolívia, Colômbia e Brasil, estas espécies são muito conhecidas do tráfico de animais devido ao seu grande valor comercial (ZAGO, 2009), pois assim como o Curió ele também é muito prestigiado nos campeonatos de cantos.



**Figura 1:** Exemplar de *Oryzoborus angolensis*



**Figura 2:** Exemplar de *Oryzoborus maximiliani*

Segundo Olson (1851) o Bicudo quando canta Toma postura ereta, com o peito empinado e a cauda abaixada, destacando sua valentia e disposição para disputas



territoriais. O macho desta espécie também, após algum tempo de vida, tem suas penas escurecidas tornando-o preto, com uma mancha na parte externa da asa. (Olson 1851)

A fêmea, assim como os filhotes tem uma coloração parda com tons de castanho tendo preferência por regiões de clima quente, habita local onde exista principalmente o capim-navalha (*Hypolytrum pungens*), seu alimento básico na natureza.

Devido as suas características o IBAMA tem intensificado o controle e fiscalização nas que ainda estão em seu habitat natural, e para um controle mais efetivo uma metodologia adotada por este órgão fiscalizador é a da identificação por anilha de metal onde são especificados os dados biológicos e morfométricos do animal (IBDF, 1981; IBAMA, 1994). Outras técnicas que estão sendo implementadas são os testes de paternidade e fingerprint das aves, para que possa ser criado um banco de dados sobre cada indivíduo, garantindo assim a procedência dos animais tanto para o IBAMA quanto para os criadores legais.

O Curió e o Bicudo são aves silvestres encontradas em quase todo o território nacional, e nos últimos tempos estão se tornando comum nos criadouros comerciais e incomum nas áreas florestadas, pois são espécies ameaçadas de extinção em decorrência da caça gananciosa, predatória e a destruição de seus ambientes naturais.

Como consequência direta desses fatos, muitas espécies de aves caminham para a extinção (ALMEIDA, 2003). Esta 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).

A observação na diferenciação de timbres no cantar dos pássaros Curió e Bicudo, fez despertar o interesse por parte de observadores e criadores de pássaros desse porte. Com isso cada vez mais, há criadores interessados em fazer o melhoramento genético de



seus pássaros para que assim eles obtenham somente pássaros campeões em torneio de canto. A variabilidade genética total das espécies é representada pela contribuição das variabilidades inter e intra-raciais. Verifica-se, portanto, a importância de se medir a variabilidade genética dos animais, visto que a conservação dos recursos genéticos está efetivamente relacionada à manutenção das variabilidades inter-racial (evita a extinção das raças) e intra-racial (evita a erosão genética) e se torna também importante para os criadores que buscam um melhor conhecimento sobre a variabilidade genética presente nas espécies.

A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) baseia-se na amplificação *in vitro* (por PCR; Reação em Cadeia da Polimerase) de fragmentos de DNA de tamanhos variados, e tem a vantagem de permitir a detecção de polimorfismos genéticos nas espécies em estudo sem necessidade do conhecimento prévio de seqüências do genoma (WILLIMS *et al.* 1990, FRITSCH e RIESEBERG 1996, FERREIRA e GRATTAPAGLIA 1998 apud Viala *et al.* 2006, p. 29).

A técnica de RAPD baseia-se na repetição cíclica da extensão enzimática de iniciadores (pequenas seqüências complementares de DNA) que se anelam nos dois extremos opostos de uma fita de DNA que serve como molde. Nesta, utiliza-se apenas um único primer ao invés de um par, como na PCR e esse primer tem sua seqüência arbitrária, e, portanto sua seqüência alvo é desconhecida (ARAUJO *et al.* 2003). Dessa forma, estudos de variabilidade genética podem ser realizados nas espécies mencionadas acima, com a utilização dessa técnica.





## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 METODOLOGIA

#### 2.1.1 Coleta das amostras

As amostras de sangue, pena e cartucho de *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani* foram cedidas pelo laboratório São Camilo – Setor de Biologia Molecular e Biotecnologia do município de Maringá-PR e são provenientes de criadouros particulares.

#### 2.1.2 Extração de DNA

A metodologia utilizada para a extração de DNA total foi baseada em fenol/clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989). Amostras de tecido muscular retiradas de cada indivíduo foram maceradas em nitrogênio líquido 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 e Espermidina 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) e clorofórmio, respectivamente, e precipitado com solução salina (NaCl 5 M) e etanol absoluto gelado. O *pellet* foi ressuspensionado em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) com RNase. Foi feita quantificação através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, por meio de comparação com DNA de fago λ de concentração conhecida.

#### 2.1.3 Amplificação do DNA

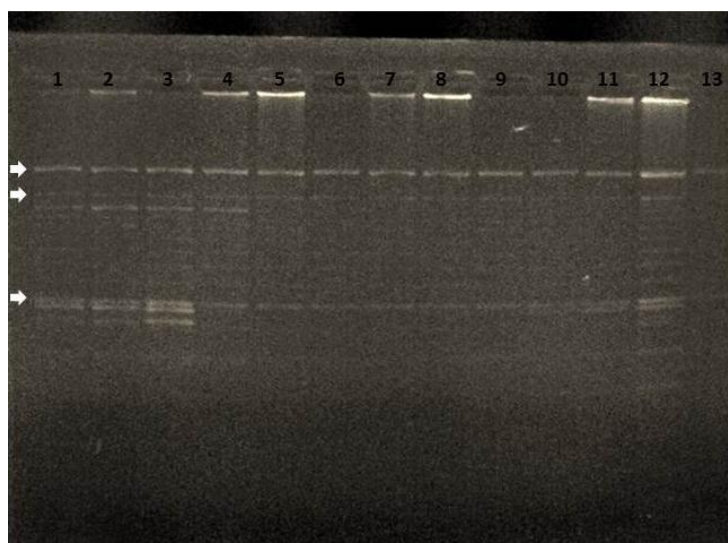
Cada um dos indivíduos teve seu DNA submetido a amplificação em um termociclador, que foi realizada via RAPD, com uso de *primers* inespecíficos. Além destes também foram utilizados tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub>

2mM, dNTP0,19 mM, 1 U/reação de Taq-polimerase e água suficiente para completar 13 µl. Após amplificados foram utilizados para separação gel de agarose 1,4 %, corado com brometo de etídio. A visualização foi feita em um transluminador sob luz UV. A análise foi realizada pelo registro dos comprimentos, em pb, das bandas produzidas.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de RAPD é conhecida por ser eficaz no estudo de variabilidade genética de espécies. Segundo CASTIGLIONI (2003) a técnica de RAPD é composta de *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio da seqüência a ser amplificado, o que facilita o estudo do DNA. No presente estudo os *primers* utilizados foram eficientes na amplificação de fragmentos de DNA que pudessem ser utilizados para estudos de variabilidade genética intrapopulacional.

A técnica de RAPD 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). Nas 2 espécies estudadas evidenciou-se a presença de muitos lócus monomórficos, que não variaram entre os indivíduos, sendo que em vários casos esses indivíduos eram homozigotos. Na Figura 3 podemos observar a presença de lócus monomórficos para os espécimes da espécie *Oryzoborus angolensis*.



**Figura 3:** Fragmentos de DNA de *Oryzoborus angolensis* amplificados através da técnica de RAPD. As setas brancas indicam a presença de fragmentos monomórficos



Dos 7 *primers* testados, apenas quatro foram úteis para os estudos moleculares, gerando bandas nítidas e reproduzíveis. Um total de vinte e dois loci foram obtidos, com tamanhos de 220 pb a 1700 pb. A espécie *Oryzoborus angolensis* apresentou fragmentos variando de 220 pb a 1700 pb, e a espécie *Oryzoborus maximiliani* apresentou fragmentos de 320 pb a 1450 pb.

Freitas et al. (2011) também realizaram estudos de variação genética com as duas espécies estudadas, através da técnica ISSR e SSR e encontraram 80% de loci monomórficos, evidenciando baixa variabilidade genética populacional. No presente estudo 85% do loci obtidos foram monomórficos.

Populações oriundas de criadouros, como é o caso das populações estudadas, podem apresentar baixos valores de variabilidade genética, devido a diversos fatores. Geralmente as populações formadas são oriundas de poucos exemplares, o que favorece o efeito conhecido como efeito do fundador. O baixo número de indivíduos na população também pode favorecer a endogamia, ou seja, o acasalamento entre indivíduos aparentados o que tem como consequência o aumento do número de homozigotos e diminuição da variação.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a utilização da técnica de RAPD para a amplificação do DNA das espécies *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani*, foram obtidos fragmentos de DNA que podem ser utilizados para estimativa de variabilidade genética das espécies. A técnica utilizada evidenciou baixa diversidade genética intrapopulacional, pela grande quantidade de locos monomórficos encontrados.

### REFERENCIAS

ALLGAYER MC, CZIULIK M. Reprodução de psitacídeos em cativeiro. **RevBrasReprod Anim.**v.31, p.344-350, 2007. Disponível em: [www.cbpa.org.br/publicacoes/rbra.do](http://www.cbpa.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**. 75f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, SP. 2003

BAÍA JÚNIOR, P. C.; GUIMARÃES, D. A. A. Parque ambiental de Belém: Um estudo da conservação da fauna silvestre local e a interação desta atividade com a comunidade do entorno. **Revista científica da Universidade Federal do Pará**, v. 4, 18p: 2004. Disponível em: <[http://www.ufpa.br/rcientifica/ed\\_anteriores/pdf/ed\\_04\\_pcbj.pdf](http://www.ufpa.br/rcientifica/ed_anteriores/pdf/ed_04_pcbj.pdf)>

CASTIGLIONI, Lilian; BICUDO Hermione E. M. C. A técnica de RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*) e suas aplicações para estudos em genética molecular. **Revista UNORP**, São Jose do Rio Preto, v.3, n.2, p. 63-77, Abr. 2003. Disponível em <<http://www.unorp.br/asp/..%5Crevista%5Csaudel%5C7.pdf>> acessado em 12 de Agosto de 2012.

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

CORRÊA, C. L; COLLEVATTI, R. G; CAPARROZ, R. Isolation and Characterization of Microsatellite Loci for *Neothraupis fasciata*, (Emberizidae, Passeriformes) with Widely Cross Amplification in Neotropical Passerines. **Journal of Heredity**, v. 101, n. 3, p. 385-389, 2010.

FREITAS, TIAGO P. **AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES DE MICROSSATÉLITES DO DNA DE DUAS ESPÉCIES DE AVES DA FAUNA BRASILEIRA: *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani* (Passeriformes)**. VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica. Maringá – PR, 2011.

IBAMA. Campanha nacional de proteção à fauna silvestre. Brasília, **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**: 2010.

IBAMA. Manual de anilhamento de aves silvestres. Brasília, **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**: 1994

IBDF. Manual de Anilhamento de Aves. Brasília, **Centro de Estudos e Migrações de Aves**: 1981

LE DUC, J. P. Trafficking in animals and plants: a lucrative form of crime. **International Criminal Police** v.458/459 p.19-31:1996



ORSON, S. L., AND H.F. JAMES. **Prodromus of Maui Creeper. Elepaio the fossil avifauna of the Hawaiian islands.** Aves sonian Contr. to Zool: 1982

RIDGELY, R.S. **Curió, Avinhado, Oryzoborus angolensis.** In: GWYNNE, J.A.; TUDOR, G. et al. Aves do Brasil, vol. 1. Pantanal & Cerrado. São Paulo: Editora Horizonte, 2010

SICK, Helmut. **Ornitologia brasileira.** Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001.

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

ZAGO, D. C. **Animais da fauna silvestre mantidos como animais de estimação.** 40f. (Monografia). Universidade Federal de Santa Maria: 2008

WILSON EDWARD O. **A Situação atual da diversidade biológica em Biodiversidade.** Nova Fronteira: Rio de Janeiro, 1997.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.A. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.