

# Similaridade genética em GRUPOS DE AVESTRUZES

Similaridade genética em grupos de avestruzes (*Struthio camelus*) na Amazônia

## José Ribamar Felipe Marques

Zootecnista., Dr. em Genética  
Embrapa Amazônia Oriental  
marques@cpatu.embrapa.br

## Maria Rosa Costa

Eng. Agro., M.Sc. em Genética  
Embrapa Amazônia Oriental  
mrcoc@cpatu.embrapa.br

## Silvaney Fonseca Ferreira

Bolsita PIBIC/CNPq/UFPa  
Embrapa Amazônia Oriental

## Paulo Henrique Sá Maia

M. Veterinário  
PG - Ciência Animal UFPa/EMBRAPA

## Raimundo Nonato Camargo Jr.

M. Veterinário  
PG - Ciência Animal / UFPa / EMBRAPA

Ilustrações cedidas pelos autores

## Caracterização e uso de recursos genéticos animais

A criação de avestruzes ou estrutiocultura apresenta grande desenvolvimento no País e, na região amazônica, o número de criadores vem aumentando bastante nos últimos anos, o que faz deduzir que, em pouco tempo, essa atividade assumirá papel importante no âmbito da produção animal. Algumas pesquisas sobre o comportamento e o manejo desses animais estão sendo desenvolvidas em alguns criatórios regionais e, dentro de pouco tempo, darão importantes respostas para a criação dessas aves na Amazônia.

Na área da biologia molecular não há informações, até o momento, de qualquer estudo, com a espécie, na região, contudo, na região Sudeste,

alguns autores têm desenvolvido análises de PCR voltados para sexagem (Bello & Sánchez, 1999; Malagó Jr. et al., 2002;) e, fora do país, há informações de estudos com marcadores microsatélites na detecção de polimorfismos na espécie (Kumari & Kemp, 1998).

Este estudo é pioneiro no bojo de um projeto mais abrangente que visa desenvolver tecnologias de manejo associadas à detecção de índices zootécnicos para um sólido estabelecimento do avestruz na região amazônica, respeitando-se as peculiaridades de clima, solo e outras variáveis que interferem na criação animal.

O Avestruz (*Struthio camelus*) pertence ao grupo das ratitas, ou seja, é uma ave corredora, sendo originária da África do Sul. Apresenta temperamento dócil e grande rusticidade (Negrini, 2002; Taguchi, 2002; Nithack,



Figura 1 Animais da fazenda MARAVEST

**Tabela 1.** Identificação dos indivíduos. Belém – PA, 2004.

Nº		Localidade
AV1	321F	Imperatriz, MA <sup>1</sup>
AV2	156	Imperatriz, MA <sup>1</sup>
AV3	40F	Imperatriz, MA <sup>1</sup>
AV4	62F	Imperatriz, MA <sup>1</sup>
AV5	751AM	Imperatriz, MA <sup>1</sup>
AV6	210F	Imperatriz, MA <sup>1</sup>
AV7	306F	Imperatriz, MA <sup>1</sup>
AV8	209M	Imperatriz, MA <sup>1</sup>
AV9	185M	Imperatriz, MA <sup>1</sup>
AV10	172M	Imperatriz, MA <sup>1</sup>
AV11	314F	Imperatriz, MA <sup>1</sup>
AV12	208	Imperatriz, MA <sup>1</sup>
AV13	PIQUETE 13F	Tracuateua, PA <sup>1</sup>
AV14	PIQUETE 5F	Tracuateua, PA <sup>1</sup>
AV15	22F LEG MENOR	Tracuateua, PA <sup>1</sup>
AV16	22F LEG MAIOR	Tracuateua, PA <sup>1</sup>
AV17	22M Leg Grande	Tracuateua, PA <sup>1</sup>
AV18	22M Leg	Tracuateua, PA <sup>1</sup>
AV19	5F	Tracuateua, PA <sup>1</sup>
AV20	7M24	Tracuateua, PA <sup>1</sup>
AV21	17M29	Tracuateua, PA <sup>1</sup>
AV22	15F	Tracuateua, PA <sup>1</sup>
AV23	13M	Tracuateua, PA <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Localidade

2001).

Podem ser classificadas em subespécies, ou seja, *S. camelus camelus*, *australis*, *siriacus*, *domesticus*. No Brasil encontra-se em maior escala a Black Neck (Pescoço Preto) denominada, em geral, de African Black, sendo a mais difundida pelo temperamento dócil, rusticidade e, conseqüentemente, alta produtividade, estando adaptada às diversas regiões, onde são criadas, comercialmente. Em menor escala encontra-se a Red Neck (Pescoço Vermelho) e a Blue Neck

(Pescoço Azul) (Kiss, 2002; Nithack, 2001).

A importância da atividade decorre em função dos produtos e subprodutos que oferece, sendo que a carne, além de apreciada pelo paladar, possui todos os requisitos atuais de um alimento altamente saudável: baixíssimo teor de colesterol, pouca gordura, alto teor de proteína e alto teor de ferro, etc. (Taguchi, 2002). A característica de carne magra se deve à distribuição da gordura no corpo, que se concentra em volta do estômago e

abaixo da pele (Negri, 2002). Os derivados como couro (pele), as plumas e ovos e, ainda, o aproveitamento secundário de tendões, córneas e gordura (Nithack, 2001) a tornam imbatível em valor agregado, sendo altamente rentável. Por outro lado, os ovos, além da incubação, podem ser utilizados na alimentação, por possuírem propriedades nutricionais semelhantes ao ovo de galinha. Os ovos não-fecundados são utilizados em artesanato na fabricação de peças decorativas que alcançam cotações bastante expressivas no mercado de arte (Taguchi, 2002). O óleo é utilizado na indústria de medicamentos e cosméticos, assim como as pestanas na fabricação de pincéis. As córneas por se assemelhar à córnea humana, estão em estudo para serem utilizadas em transplante para seres humanos (Taguchi, 2002).

Por tudo isso, o mercado potencial para essas aves na região é muito grande, inclusive para o aproveitamento de áreas já abertas, degradadas e improdutivas, sem abertura de novas fronteiras de pastagens, o que a torna, ainda, uma importante alternativa de produção de proteína nobre ecologicamente correta, pois o Brasil é bastante favorecido pelo seu clima e solo, sendo considerado pela comunidade mundial como um dos países de maior potencial para o crescimento dessa atividade.

O presente trabalho tem como objetivo efetuar uma análise preliminar de alguns grupos genéticos criados na Amazônia, avaliando o grau de similaridade, como ferramenta para o desenvolvimento de ações de melhoramento genético, utilizando mais racionalmente a variabilidade existente nos plantéis, visando a maior produtividade animal.

## Material e métodos

### Germoplasma

O material investigado foi composto de 23 indivíduos, provenientes das fazendas MARAVEST (12), localizada em Imperatriz – MA (Figura 01) e PERI-CIGANO (11), em Tracuateua – PA (Figura 02).

Os animais em ambas as propriedades são pertencentes à raça Black



**Figura 2** – Detalhe de animais da fazenda PERI – CIGANO

Neck ou African Black, conforme especificado na Tabela 01.

O sangue foi coletado em tubos vacutainer de 5ml contendo EDTA (anticoagulante) e mantido em refrigeração até o processamento no Laboratório de Genética e Biologia Molecular - LABGEN da Embrapa Amazônia Oriental. O DNA genômico foi extraído a partir de 150 µl de sangue total ao qual foi adicionado 5 ml de tampão STE, 250 µl de SDS 10% e 100 µl de proteinase K (10mg/ml), deixando-se 40 minutos a 55 °C em contínua agitação. Em seguida adicionou-se 2ml de NaCL 5M, agitando

cuidadosamente por 15 segundos e acrescentou-se 5ml de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) agitando por inversão durante 15 minutos até a completa homogeneização. Após centrifugar por 15 minutos a 4 °C e 12.000 rpm. A parte superior foi cuidadosamente isolada e submetida a etanol absoluto, o que ocasionou a precipitação do DNA que foi, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 4 °C e 12.000 rpm, lavado com 1000µl de etanol 70 %, para remover sais e, posteriormente, seco à temperatura ambiente, por aproximadamente 12 horas. O DNA foi ressuscitado com 100 µl de TE. A concentração de DNA foi estimada em gel de agarose 1,0 %, pela comparação do DNA total com três concentrações do DNA lambda. As amostras utilizadas no RAPD, após a quantificação, partiram de diluições da amostra total em água estéril, de modo a conter 5 ng/µl de DNA. As alíquotas foram armazenadas a -20 °C. Para a triagem dos “primers” foram selecionados 6 indivíduos aleatoriamente e foram testados 160 “primers” de 8 kits da Operon Technologies. Os “primers” que apresentaram padrão de amplificação de má qualidade, bandas fracas ou rastros foram excluídos. Dentre os primers polimórficos foram selecionados aqueles que possuíam pelo menos três bandas.

Os primers randômicos utilizados no RAPD foram: OPB03, OPB09, OPQ04, OPQ05, OPQ06, OPQ07, OPQ09, OPQ20, OPF09, OPF10,

OPAW08, OPO08, OP015 e OPO19.

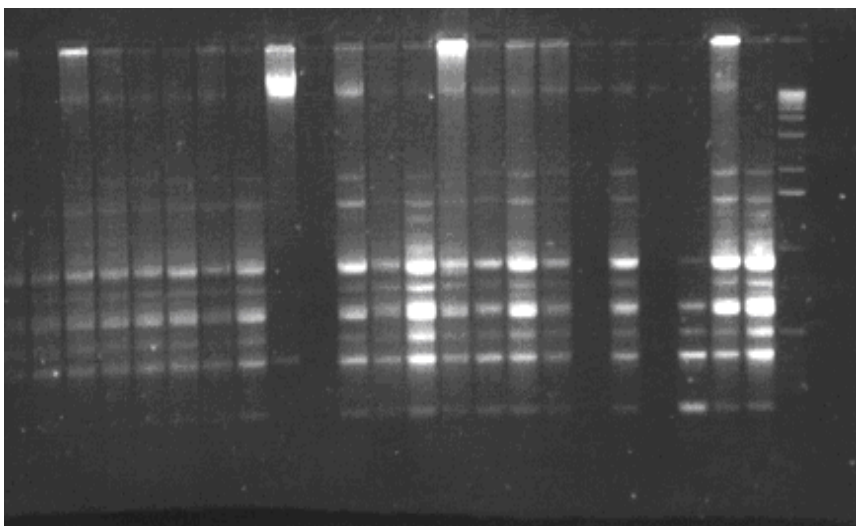
As reações RAPD foram desenvolvidas, de acordo com o protocolo de Williams et al. (1990), modificado, num volume final de 13 µl, contendo água destilada autoclavada; 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM KCl; 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de cada dNTP; BSA purificada (2,5 mg/ml); 1,3 µM primer arbitrário; 1U.I. Taq DNA polimerase e 15 ng de DNA genômico, cobertas com duas gotas de óleo mineral.

As amplificações foram realizadas em termociclador de DNA Thermolyne Amplitron II, modelo DB.80225, sendo realizados 40 ciclos de 1' a 94 °C, 1' a 37 °C e 2' a 72 °C, seguidos de mais 7' a 72 °C, para a completa extensão dos produtos amplificados. O método utilizado para a separação dos produtos amplificados foi a eletroforese horizontal, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio 1mg/ml. Utilizou-se 13 µl de cada reação, acrescido de 2 µl de uma solução de azul de bromofenol (40 %), mais sacarose. Utilizou-se TBE (Trizma base 0,1 M; Ácido bórico 1M e EDTA 0,5M), como tampão do gel e de corrida.

Após a eletroforese, os géis foram visualizados e fotografados em equipamento de foto documentação, por transiluminação em ultravioleta.

Aplicou-se um ladder de 1Kb no início e no final do gel para definir o tamanho aproximado dos fragmentos gerados nas PCRs.

Inicialmente, construiu-se uma matriz para os fragmentos polimórficos amplificados com presença (1) e ausência de banda (0). Somente foram consideradas as bandas que não davam margens a dúvidas. Bandas muito fracas, de difícil resolução, não foram incluídas. Para análise dos dados, utilizou-se o NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 2.02. A similaridade entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de Jaccard, que gerou a matriz de similaridade. A partir dessa matriz, foi gerado o cluster, pelo método UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average”), que foi expresso na forma de um dendograma (Figura 5)



**Figura 3.** Eletroforese do RAPD gerado pelo primer OPQ06. A primeira e última colunas correspondem ao marcador Ladder e as demais aos genótipos analisados.

## Resultados e discussão

	Av1	Av2	Av3	Av4	Av5	Av6	Av7	Av8	Av9	Av1	Av11	Av12	Av13	Av14	Av15	Av16	Av17	Av18	Av19	Av20	Av21	Av22	Av23	
Av1	1.00																							
Av2	0.56	1.00																						
Av3	0.57	0.62	1.00																					
Av4	0.62	0.64	0.71	1.00																				
Av5	0.53	0.64	0.65	0.73	1.00																			
Av6	0.66	0.62	0.63	0.79	0.70	1.00																		
Av7	0.62	0.55	0.59	0.83	0.70	0.76	1.00																	
Av8	0.46	0.64	0.58	0.58	0.60	0.56	0.49	1.00																
Av9	0.36	0.16	0.31	0.34	0.27	0.33	0.38	0.10	1.00															
Av1	0.33	0.22	0.21	0.25	0.18	0.40	0.25	0.18	0.27	1.00														
Av11	0.51	0.50	0.54	0.57	0.73	0.55	0.63	0.48	0.35	0.14	1.00													
Av12	0.43	0.37	0.52	0.64	0.43	0.53	0.49	0.38	0.34	0.37	0.34	1.00												
Av13	0.31	0.33	0.42	0.39	0.45	0.38	0.42	0.37	0.20	0.18	0.47	0.48	1.00											
Av14	0.43	0.54	0.61	0.67	0.64	0.56	0.54	0.63	0.19	0.18	0.59	0.53	0.42	1.00										
Av15	0.40	0.39	0.43	0.48	0.59	0.49	0.56	0.44	0.26	0.10	0.75	0.27	0.36	0.62	1.00									
Av16	0.50	0.60	0.67	0.75	0.72	0.63	0.66	0.62	0.24	0.20	0.62	0.53	0.52	0.66	0.52	1.00								
Av17	0.42	0.36	0.52	0.55	0.52	0.56	0.52	0.37	0.36	0.39	0.41	0.66	0.52	0.45	0.37	0.54	1.00							
Av18	0.36	0.35	0.33	0.41	0.45	0.40	0.45	0.34	0.25	0.17	0.51	0.21	0.27	0.36	0.46	0.47	0.25	1.00						
Av19	0.48	0.47	0.53	0.63	0.58	0.72	0.58	0.51	0.30	0.38	0.53	0.54	0.43	0.60	0.50	0.60	0.57	0.40	1.00					
Av20	0.36	0.51	0.45	0.50	0.52	0.43	0.38	0.50	0.16	0.23	0.42	0.34	0.30	0.60	0.34	0.50	0.34	0.41	0.49	1.00				
Av21	0.52	0.38	0.36	0.41	0.40	0.48	0.46	0.40	0.17	0.35	0.41	0.34	0.32	0.40	0.43	0.39	0.31	0.34	0.43	0.32	1.00			
Av22	0.54	0.53	0.59	0.75	0.69	0.75	0.69	0.50	0.32	0.32	0.60	0.57	0.49	0.63	0.50	0.74	0.63	0.39	0.77	0.52	0.42	1.00		
Av23	0.30	0.24	0.28	0.31	0.29	0.44	0.29	0.30	0.23	0.43	0.21	0.45	0.26	0.28	0.23	0.31	0.46	0.07	0.48	0.13	0.34	0.43	1.00	

**Figura 4.** Matriz de distância genética estimada pelo coeficiente de Jaccard para todos os indivíduos analisados.

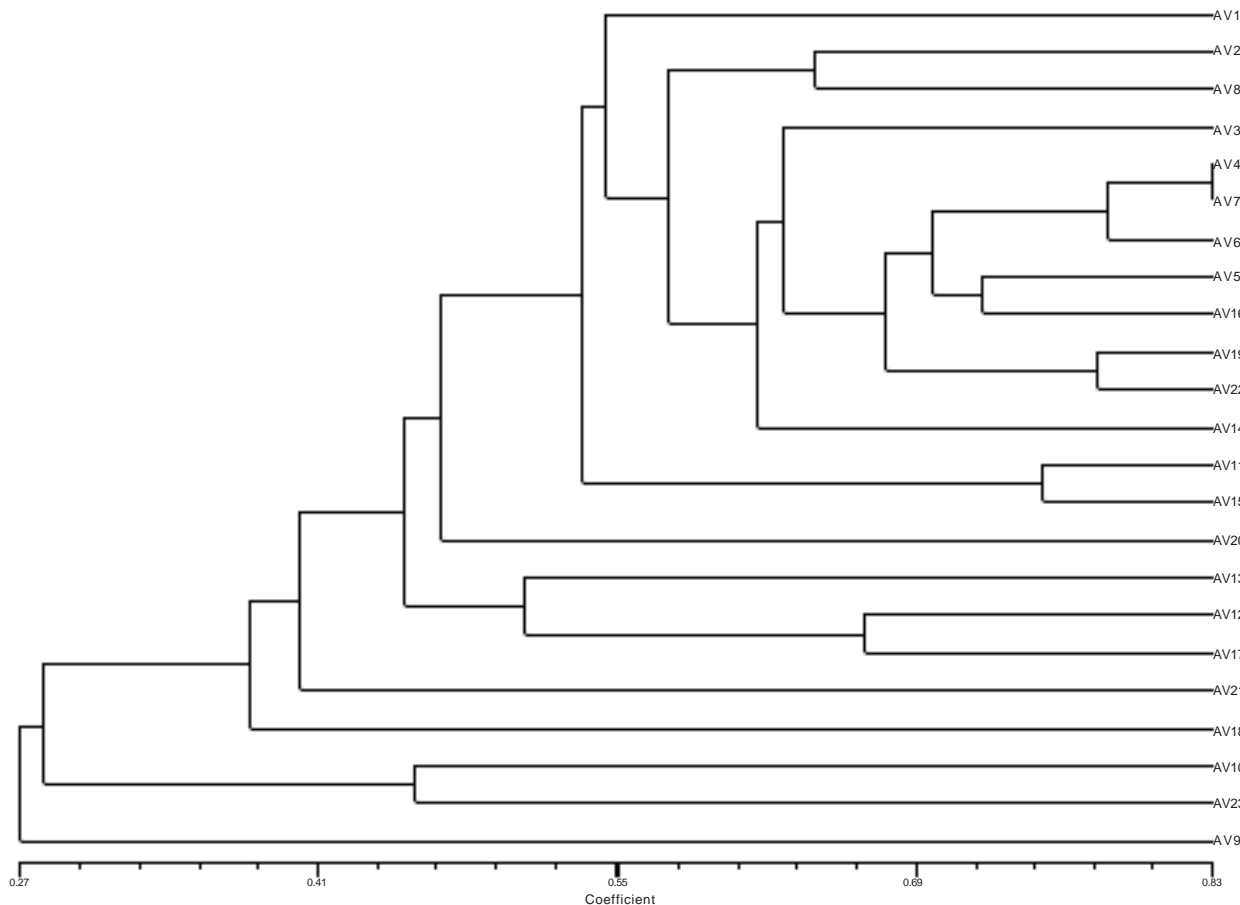
Um total de 76 marcadores RAPD, com tamanhos variando de 300pb a 2200 pb, foi amplificado pelos 14 *primers* utilizados, onde todos foram polimórficos. O número de fragmentos polimórficos por *primervariou* de 11 (OPQ-06) a 01 (OPQ-04, OPB-03 e

09). Observou-se dentre os fragmentos amplificados, a ocorrência de bandas específicas aos indivíduos. Na Figura 3, visualizam-se exemplos destes marcadores. Estimaram-se os índices de similaridade para todos os indivíduos analisados (Figura 4). A maior

dissimilaridade foi obtida, comparando-se o indivíduo Av23 com o Av18 (7%) de Tracuateua-PA. Isso indica que estes indivíduos são candidatos potenciais, como fonte de variabilidade, visando o melhoramento genético, pois se trata de genótipos com características gênicas diversas. Por outro lado, a maior similaridade genética foi entre o Av7 e o Av4 (83%) de Imperatriz-MA, indicando que, para a realização de acasalamentos, os machos escolhidos como reprodutores devem ser de diferentes origens, para aumentar a variabilidade dos descendentes.

Na Figura 5, encontra-se o dendograma, gerado pelo método UPGMA, através do programa NTSYS-pc, 2.02. Esta análise de distância genética gerou o cluster, que mostra a separação dos acessos, em dois grupos principais. No primeiro grupo encontra-se isolado o indivíduo AV9, indicando ser ele um potencial reprodutor, em função de, provavelmente, possuir um conjunto gênico diferenciado. No segundo grupo, que se subdividiu em dois subgrupos, com coeficiente de similaridade, variando de 7% a 83%, incluem-se 22 indivíduos, oriundos das duas localidades, demonstrando que num trabalho de melhoramento genético deve-se lançar mão para ordenar os acasalamentos dos indivíduos mais dissimilares, ou

seja, quanto menor for a similaridade dos indivíduos maior será a resposta fenotípica, isto é, a produtividade de carne, a fertilidade e quantidade de ovos, além da apresentação dos animais como um todo. Observou-se grande divergência em alguns materiais, oriundos da mesma localidade, indi-



**Figura 5.** Dendrograma gerado pelo método de análise cluster UPGMA para o coeficiente de Jaccard, para as 76 bandas geradas pelo RAPD.

cando, talvez, que houve aquisição de animais de origens diversas, o que pode ser importante para imprimir maior variabilidade ao plantel, sendo fundamental para o estabelecimento de linhas de melhoramento genético mais eficazes.

### Conclusões

Os marcadores RAPD mostraram-se eficientes para detectar polimorfismo nesta espécie e podem ser utilizados como uma poderosa ferramenta na obtenção de informações úteis para o manejo e o direcionamento de programas de melhoramento genético.

Este estudo de diversidade genética permitiu a obtenção de informações úteis, entretanto, acredita-se que, incluindo outras populações e outras técnicas moleculares, pode-se obter um quadro geral da diversidade na espécie na região.

### Agradecimentos

Os autores agradecem aos proprietários das fazendas MARAVEST, Drs. Pedro e Lécio Galleti (Imperatriz – MA) e PERI-CIGANO, Dr. Luís Nogueira (Tracuateua – PA) que estão apoiando os trabalhos de pesquisa na região e cederam o material biológico para este trabalho.

### Referências bibliográficas

BELLO N, SÁNCHEZ A: The identification of a Sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Molecular Ecology*, 1999, 8(4):667-669.

KISS, J. Avestruz. Hora da decolagem. *Globo Rural*, São Paulo, Ano 17, n. 17, p. 32-38, março. 2002.

KUMARI P, KEMP S.J: Polymorphic microsatellite markers in the ostrich (*Struthio camelus*). *Molecular Ecology*, 1998, 7:133-140.

MALAGÓ JR, W.; FRANCO, H.

M.; ATHEUCCI JR, E.; MEDAGLIA, A.; HENRIQUE-SILVA, F. Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers. *BMC Biotechnology*, 2002, 2:19.

NEGRINI, M. A Invasão do Avestruz. *Escala Rural*, São Paulo, Ano III, n. 19, p. 12-17. 2002.

NITHACK, A. L. Estruticultura. Uma opção de criação. *Ver. Bras. de Agrop.* São Paulo, Ano II, n. 16, p 6-19. 2001.

TAGUCHI, V. Estruticultura. Organizando o Mercado. *Escala Rural*, São Paulo, Ano III, n. 22, p. 42-45. 2002.

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