



## **AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES DE MICROSSATÉLITES DO DNA DE DUAS ESPÉCIES DE AVES DA FAUNA BRASILEIRA: *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani* (Passeriformes)**

*Tiago Pereira de Freitas*<sup>1</sup>; *Angélica da Silva Oliveira*<sup>2</sup>; *Alessandra Valéria de Oliveira*<sup>3</sup>

**RESUMO:** Nos dias atuais o Brasil vem sofrendo muito com os danos causados pelo avanço da destruição da flora silvestre e pela caça e captura de animais, principalmente aves, por seu prestígio e alto valor comercial, como é o caso das espécies *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani*. Estes são alguns dos motivos para que o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA), aumente a fiscalização de locais onde estas aves são criadas. Técnicas moleculares estão sendo utilizadas para realização de testes de paternidade e *fingerprint* em aves, o que poderia garantir a procedência dos animais tanto para o IBAMA quanto para os criadores legais. Isto também permite um maior controle das aves de cativeiro, tanto no momento em que o criador irá comprar ou vender animais. Assim, este trabalho teve como objetivo amplificar regiões de microssatélites no DNA das espécies *Oryzoborus angolensis*, *Oryzoborus maximiliani*, visando o desenvolvimento de testes de paternidade e *fingerprint* genético para esse grupo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Microssatélites; *Oryzoborus angolensis*; *Oryzoborus maximiliani*.

### **1 INTRODUÇÃO**

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), estima que anualmente cerca de 12 milhões de animais silvestres sejam retirados do seu habitat natural no Brasil (IBAMA, 2010). Devido a esta grande quantidade de animais sendo retirado do meio ambiente, o IBAMA vem intensificando a fiscalização, principalmente de aves. Dentre estas estão às espécies *Oryzoborus angolensis* descrito por Linnaeus (1766) e *Oryzoborus maximiliani* descrito por Cabanis (1851) que popularmente são conhecidas como Curió e Bicudo respectivamente, estas são as principais espécies envolvidas no tráfico devido ao seu grande valor comercial (Zago, 2009), por serem aves de grande prestígio em concursos de canto.

Devido às características destas espécies, o IBAMA tem diversas formas de controle dos animais que ainda estão em seu habitat natural. Uma das formas mais comumente adotadas é a captura destes, sua identificação com uma anilha de metal,

<sup>1</sup> Discente do Curso de Biomedicina. Departamento de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá - Cesumar, Maringá, Paraná. Bolsista PIBIC/CNPq-Cesumar. [tiago.88@terra.com.br](mailto:tiago.88@terra.com.br)

<sup>2</sup> Discente do Curso de Biologia. Departamento de Biologia do Centro Universitário de Maringá – Cesumar, Maringá, Paraná. [angelsinha15@hotmail.com](mailto:angelsinha15@hotmail.com)

<sup>3</sup> Orientadora e docente do Curso de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – Cesumar, Maringá, Paraná. [alessoli@cesumar.br](mailto:alessoli@cesumar.br)

onde é especificado 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. Isto também permite um maior controle dos animais de cativeiro, tanto no momento em que o criador irá comprar ou vender animais.

Nestas análises genéticas são utilizados marcadores moleculares microssatélites que primeiramente foram utilizados no melhoramento de plantas no início da década de 80 (Alzate-Marin, 2005) e hoje tem sido muito utilizados em estudos de variabilidade genética e caracterização molecular de diversas populações de organismos, incluindo aves.

Sendo assim este trabalho teve como objetivo realizar a amplificação de lócus de microssatélites nas espécies *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani*, que possam ser utilizados para o desenvolvimento de testes de paternidade e *fingerprint* genético dessas aves.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas foram de sangue coletado em papel absorvente, cartucho de pena contendo sangue e bulbo de pena, das aves *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani*, totalizando 40 amostras.

### 2.1 EXTRAÇÃO DE DNA

O protocolo de extração alcalina descrita por Rudbeck *et al.*(1998), que é variável dependendo do tipo de amostra a ser extraído o DNA, foi utilizado para obter as amostras de DNA.

Amostras de sangue foram misturadas com NaOH (0,05 M) ficando 10 minutos em banho-seco a 74°C. Em seguida para neutralização foi adicionado Tris-HCl pH 8, após para a precipitação foi adicionado NaCl (0,2 M) e etanol absoluto. As amostras foram congeladas instantaneamente com nitrogênio líquido e centrifugadas a 4° C por 20 minutos. Para ressuspender a amostra foi utilizado tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) com pH 8.

Os bulbos de penas e cartuchos contendo sangue, foram triturados e homogeneizados com NaOH (0,2 M) e levados a banho-seco por 20 minutos a 74°C, para neutralização foi adicionado Tris-HCl com pH 8 em seguida para precipitação foi adicionado NaCl (0,2 M) e etanol absoluto. As amostras foram congeladas instantaneamente com nitrogênio líquido e centrifugadas a 4°C por 20 minutos, e para depois ressuspender a amostra foi utilizado tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) com pH 8,0.

### 2.2 AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Na amplificação das amostras foi utilizado como base o protocolo descrito por Double *et al.*(1997). O mix utilizado na reação tem volume final de 15 µL, correspondente à 1,25 U de Taq polimerase, tampão de PCR (constituído de 50 mM de KCl, 1,5 mM de, 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 das amostras. Os *primers* utilizados foram MCY1, MCY2, MCY3, MCY4, MCY5, MCY6, PCA1, PCA2, PCA4, PCA5, PCA6, PCA7, totalizando assim 12 *primers* utilizados neste estudo.

As condições que foram programadas no termociclador são: um ciclo de três minutos a temperatura de 94°C, um minuto a temperatura de *Ta* (onde *Ta* varia em 55,

60, 63 e 65°C) e um minuto a temperatura de 72°C, seguido de 29 ciclos que passam por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a  $T_a$  e 30 segundos a 72°C. A temperatura  $T_a$  sofreu variação, pois esta é a temperatura de anelamento dos *primers*. Esta variação pode influenciar na ligação ou não ligação dos *primers* utilizados em sequências complementares do DNA.

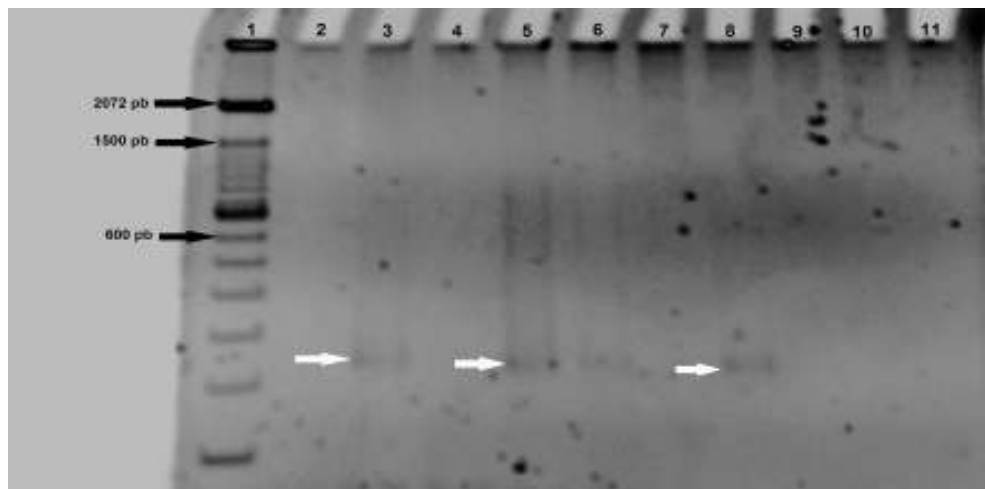
Outra variante testada nas amplificações, foi a concentração de componentes que contém no mix da reação, os principais que foram alterados foram, o  $MgCl_2$  que teve variação entre 0,25 mM a 0,50 mM  $\mu L$  no mix e o DNA que foi testado nas concentrações de 5 a 20 ng.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

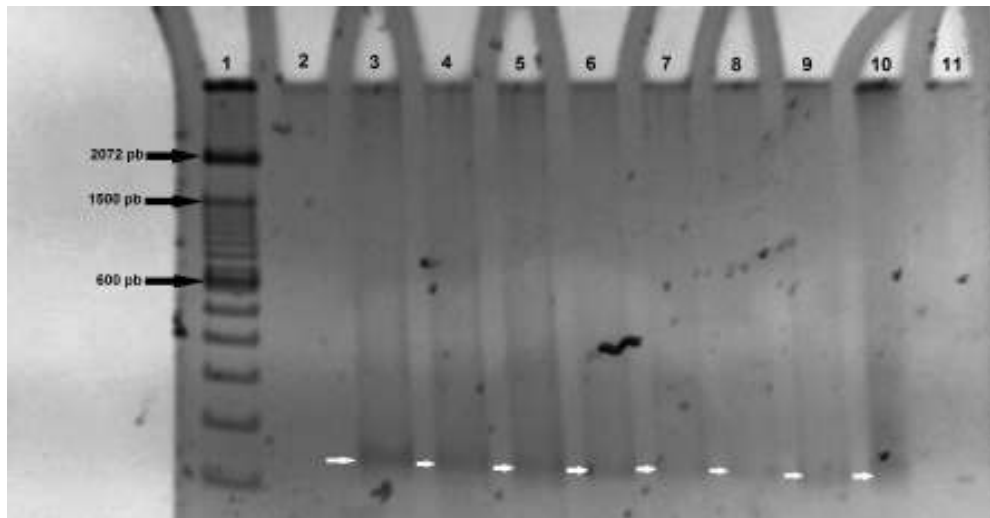
Estudos com a família das aves Passeriformes vêm aumentando ano após ano, devido ao alto valor comercial de muitas espécies desta família. Corrêa (2010) utilizou microssatélites para identificação e caracterização da espécie *Neothraupis fasciata*, demonstrando assim a larga utilização desta técnica.

Neste trabalho foram analisados os padrões de bandas obtidos com a amplificação do DNA das espécies *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani*. Dos *primers* testados, apenas três foram úteis para os estudos moleculares, gerando bandas nítidas e reproduzíveis. Um total de seis lócus foram obtidos, com tamanhos de 120 pb a 300 pb. A espécie *Oryzoborus angolensis* apresentou fragmentos variando de 120 pb a 250 pb, e a espécie *Oryzoborus maximiliani* apresentou fragmentos de 140 pb a 300 pb. (Figuras 2 e 3).

As condições ideais de amplificação foram obtidas em uma temperatura de anelamento dos *primers* de 57°C, com uma concentração de  $MgCl_2$  de 0,35 mM (o  $MgCl_2$  é um co-fator da enzima *Taq* DNA polimerase, sua modificação limita a função da enzima utilizada e assim a área transcrita pela mesma). A concentração ideal de DNA genômico foi de aproximadamente 15 ng.



**Figura 1.** (1) Marcador de peso molecular Ladder 100 pb.(2) Controle negativo da reação. (3 a 11) Amostras *Oryzoborus angolensis*. (Setas brancas mostrando fragmentos de DNA monomórficos com aproximadamente 250 pb).



**Figura 2.** (1) Marcador de peso molecular Ladder 100 pb.(2) Controle negativo da reação. (3 a 11) Amostras *Orizoborus maximiliani*. (Setas brancas mostrando fragmentos de DNA monomórficos com aproximadamente 140 pb).

Foram obtidos fragmentos de DNA monomórficos em ambas as espécies utilizadas neste trabalho, que poderão ser utilizados para discriminação dessas espécies. Não foram observados fragmentos polimórficos com os *primers* utilizados.

#### 4 CONCLUSÃO

A metodologia para amplificação das regiões de microsatélite das espécies *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani* foi padronizada e foram obtidos fragmentos de DNA monomórficos em ambas as espécies. Mais *primers* deverão ser testados e mais regiões do DNA deverão ser amostradas para estudos de *fingerprint* genético.

#### REFERÊNCIAS

ALZATE-MARIN, A. L; CERVIGNI, G. D. L; MOREIRA, M. A; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 333-342, 2005.

IBAMA. 2010. Campanha nacional de proteção à fauna silvestre. Brasília, **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**, 10p.

IBAMA. 1994. Manual de anilhamento de aves silvestres. Brasília, **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**, 146p.

IBDF. 1981. Manual de Anilhamento de Aves. Brasília, **Centro de Estudos e Migrações de Aves**, IBDF, 106p.

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.

DOUBLE, M. C.; DAWSON, D.; BURKE, T.; COCKBURN, A. Finding the fathers in the least faithful bird: a microsatellite-based genotyping system for the superb fairy-wren *Malurus cyaneus*. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 691-693, 1997.

RUDBECK, L.; DISSING, J. Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. **Biotechniques**.v. 25, n. 4, p. 588-90, 1998