



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
NÚCLEO DE ESTUDOS EM CIÊNCIA ANIMAL
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

SILVANEY FONSECA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE AVESTRUZES (*Struthio
camelus*) USANDO MARCADORES RAPD**

Belém - Pará
2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
NÚCLEO DE ESTUDOS EM CIÊNCIA ANIMAL
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

SILVANEY FONSECA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE AVESTRUZES (*Struthio
camelus*) USANDO MARCADORES RAPD**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Amazônia Oriental e da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Ribamar Felipe Marques.

Belém - Pará
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –
Biblioteca do Centro de Ciências Agrárias / UFPA, Belém-PA

Ferreira, Silvaney Fonseca

Caracterização genética de avestruzes (*Struthio camelus*) usando marcadores RAPD / Silvaney Fonseca Ferreira; orientador, José Ribamar Felipe Marques. - 2007.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Núcleo de Estudos em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

1. Avestruz – Melhoramento genético. 2. Melhoramento genético. I. Título.

CDD 572.8



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
NÚCLEO DE ESTUDOS EM CIÊNCIA ANIMAL
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

SILVANEY FONSECA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE AVESTRUZES (*Struthio
camelus*) USANDO MARCADORES RAPD**

Data:02/04/2007

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Ribamar Felipe Marques
Embrapa Amazônia Oriental

Prof. Dra. Maria Lúcia Harada
Universidade Federal do Pará

Dr. Cláudio Vieira de Araújo
Universidade Federal Rural da Amazônia

Belém - Pará
2007

“Aos meus pais, meu namorado e irmãos, pessoas que tanto amo, que sempre souberam me dar estímulo e nunca mediram esforços para minha formação profissional, pela confiança e apoio nas decisões tomadas mesmo sem concordar com as mesmas.”

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida. Por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho desde o momento em que nasci até a realização deste trabalho.

Aos meus pais, por serem maravilhosos me auxiliando e dando-me a devida educação, carinho, amor, compreensão, cuidado, estímulo, esperança, os ensinamentos mais valiosos, enfim por tudo.

Aos meus irmãos, Altemir, Silvia, Júnior, André, Simone e Andrele por sempre estarem presentes em minha vida. Aos meus sobrinhos maravilhosos que eu tanto amo.

Ao amor de minha vida, Tonny, por ser companheiro, amigo, atento, cuidadoso, amoroso, ...

Ao Prof. Dr. José Ribamar Felipe Marques, pela orientação, ensinamentos e os bons momentos de trabalho em conjunto.

À Dra. Maria Rosa Costa por ter aberto as portas do Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental a mim, ensinando-me e orientando-me em minha formação profissional, dando exemplo maravilhoso de ética e profissionalismo.

À Carla e ao Izaias que foram amigos nos momentos de angústia e indecisão.

À Dra. Socorro Padilha por ser amiga e profissional, ajudando-me na trilha do conhecimento.

À Universidade Federal do Pará - UFPA, Embrapa Amazônia Oriental, e Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, pela possibilidade de agregar importantes conhecimentos.

Aos funcionários, estagiários, professores e pesquisadores da Embrapa Amazônia Oriental que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos proprietários das fazendas MARAVEST, Drs Pedro e Lecio Gallet (Imperatriz-MA); PERI – CIGANO, Dr. Luís Nogueira (Tracuateua-PA); W F AVESTRUZ, Dr. Wagner Micheli (Palmas-TO) e SÍTIO TOCA DA RAPOSA, Dra. Cristiane Souza (Ipatinga-MG) que possibilitaram a realização deste trabalho, cedendo e coletando o material biológico.

Aos Drs. Paulo Henrique Sá Maia e Raimundo Nonato Colares Camargo Jr. pela coleta nas fazendas MARAVEST e PERI – CIGANO.

Sem a colaboração de vocês este trabalho não se realizaria!

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética de populações de avestruzes (*Struthio camelus*) por meio de marcadores RAPD (Polimorfismos de DNA amplificado ao acaso). Foram coletadas 121 amostras de indivíduos procedentes dos estados do Pará, Maranhão, Tocantins e Minas Gerais. O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total. A triagem de iniciadores permitiu a seleção de 15 entre os 60 analisados que foram amplificados pelo método PCR. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% e foi gerada uma matriz binária para os fragmentos amplificados com presença (1) e ausência (0) de banda. Para a verificação do número ótimo de bandas polimórficas foi realizada a análise de *bootstrap* por meio do *software* GQMOL. Para a análise dos dados foi utilizado o programa NTSYS-pc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*), versão 2.02. A similaridade entre as amostras foi analisada através do coeficiente de Jaccard. Foi gerada uma matriz de distância cofenética, usando o módulo Sahncof, do programa NTSYS 2.2. Para realização da estruturação gênica o procedimento empregado foi a análise de variância molecular (AMOVA), processada no *software* Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2000). Os 15 iniciadores geraram um total de 109 bandas polimórficas. A análise de *bootstrap* mostrou que a partir de 100 bandas o trabalho já se torna mais confiável, uma vez que a magnitude da correlação foi bem próxima do valor máximo ($r=0,99$), como também a soma de quadrados dos desvios (SQd) atingiu valor baixo 1,25 e o valor do estresse (E) foi de 0,05. Na análise entre pares de grupos, foi verificado que a maior e menor similaridade estão em torno, respectivamente, de 0,86 e 0,00. No que diz respeito à distribuição de frequência das similaridades obtidas entre os 5.644 pares formados na matriz genética, pode-se verificar que 32,69 % dos pares ficaram incluídos nas classes com similaridades variando de 0,01 a 0,10. Nota-se que a maior porcentagem (85,59%) dos pares ficou distribuídos nas três primeiras classes das extremidades e que a minoria deles (14,41%) apresentou similaridades variando de 0,21 a 1,00. O teste de Mantel mostrou correlação de 0,81 e o dendrograma gerou 67 grupos delimitados pela Sm que foi de 0,49. A maior similaridade foi de 0,86 e a menor de 0,06. Os dados relativos à análise de variância molecular mostraram que a porcentagem de variação genética entre procedências foi baixa e significativa (24,03%, $p < 0,0001$), evidenciando que grande parte da variação encontra-se dentro das populações (75,97 %). Os marcadores RAPD foram eficientes na caracterização da similaridade genética.

Palavras chaves: Avestruzes, Variabilidade, Melhoramento genético, Conservação, DNA.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the genetic variability of ostrich populations (*Struthio camelus*) through RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA). 121 samples of individuals were used from Pará, Maranhão, Tocantins and Minas Gerais States. The genomic DNA was extracted from total blood. Fifteen primers were selected among the 60. The products of the PCR were visualized in agarose gel 1.5% and, a binary matrix was generated considering the presence (1) of a amplified fragment and its absence (0). The ideal number of polymorphic bands was estimated through the bootstrap analysis using the GQMOL software. The genetic similarity was estimated through the Jaccard coefficient using the NTSYS-PC (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) software, version 2.02. The origin of the genetic diversity was quantified by the analysis of molecular variance (AMOVA) using the Arlequin 2,0 software. The 15 primers generated a total of 109 polymorphic bands and the *bootstrap* analysis showed that at least 100 bands is the ideal number for sampling the genetic diversity, as determined by the high value of correlation ($r=0,99$), the low value of the squared deviation sum (1,25), and the low stress (0,05). The results suggest that the studied populations are from the same origin. Management measures must be adopted in these breeding, even using other molecular markers in the way to amplify the genetic variability and the conservation of this important genetic resource. RAPD

.The bootstrap analysis showed that from 100 bands the work already becomes more trustworthy, a time that the magnitude of the correlation was well next to the maximum value ($r=0,99$), as also the addition of squares of shunting lines (SQd) reached low value 1,25 and the value of it estresse (e) was of 0,05. In the analysis between pairs of groups, it was verified that the greater and minor similarity are in lathe, respectively, of 0,86 and 0,00. In that it says respect to the distribution of frequency of the similarities gotten between the 5,644 pairs formed in the genetic matrix, it can be verified that 32,69 % of the pairs had been enclosed in the classrooms with similarities varying of 0,01 the 0,10. One notices that the biggest percentage (85,59%) of the pairs was distributed in the three first classrooms of the extremities and that the minority of them (14,41%) presented similarities varying of 0,21 the 1,00. The test of Mantel showed correlation of 0,81 and the dendrograma generated 67 groups delimited for the Sm that was of 0,49. The biggest 0,86 similarity was of and the minor of 0,06. The relative data to the analysis of molecular variance had shown that the percentage of genetic variation between origins was low and significant (24,03%, $p < 0,0001$), evidencing that great part of the variation meets inside of the populations (75,97 %). markers RAPD they had been efficient in the characterization of the genetic similarity.

Words keys: Ostriches, Variability, Animal breeding, Conservation, DNA.

SUMÁRIO

	Pág
1	INTRODUÇÃO..... 10
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA..... 12
2.1	ASPECTOS GERAIS DOS AVESTRUZES..... 12
2.2	ESTRUTIOCULTURA..... 15
2.3	MARCADORES MOLECULARES..... 19
2.4	UTILIZAÇÃO DE RAPD NO MELHORAMENTO GENÉTICO ANIMAL..... 22
3	MATERIAL E MÉTODOS..... 27
3.1	AMOSTRAS..... 27
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA..... 28
3.3	QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DO DNA GENÔMICO..... 28
3.4	REAÇÃO DE RAPD..... 30
3.4.1	Seleção de iniciadores..... 30
3.4.2	Condições da PCR..... 33
3.5	ANÁLISE DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO..... 33
3.5.1	Preparo do gel 1,5%..... 34
3.5.2	Aplicação das amostras no gel de agarose..... 34
3.6	ANÁLISE DOS DADOS..... 35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 38
4.1	SELEÇÃO DE INICIADORES..... 38
4.2	REAÇÕES RAPD 39
5	CONCLUSÕES..... 49
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 50
	ANEXOS..... 56

1. INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos são considerados como conjunto de amostras populacionais de vegetais, animais e microrganismos, com objetivo de tornar disponíveis caracteres genéticos úteis, com valor atual e potencial (ARAGÓN, 1997).

Segundo Hetzel (1995) um dos elementos importantes nas estratégias de melhoramento e conservação animal é a caracterização genética que fornece um quadro da diversidade da população a ser utilizada e conservada.

Telles *et al.* (2003) afirmaram que a análise da variabilidade genética das espécies nativas passou a ter hoje um papel de destaque na definição das estratégias de conservação e manejo de populações naturais, dentro do contexto de pecuária alternativa. Assim sendo, análises dessa natureza são essenciais para os trabalhos de melhoramento genético.

A caracterização de coleções de germoplasma pode ser realizada através de marcadores moleculares que permitem a detecção de polimorfismo em nível de DNA (SAIKI *et al.*, 1988).

Os marcadores moleculares têm-se mostrado uma poderosa ferramenta de estudo tanto de populações naturais quanto domesticadas, auxiliando na identificação de parâmetros genéticos importantes para a conservação e/ou para a utilização dos recursos genéticos das diversas espécies (HILLIS *et al.*, 1996; RUANE, 1999; KANTANEN *et al.*, 1999; RITZ *et al.*, 2000). Estes marcadores têm permitido um grande avanço tanto em estudos que visam a análise da variabilidade genética entre e dentro de populações, quanto naqueles que pretendem acessar a

mesma existente em raças, espécies ou outros grupos taxonômicos (BLOTT *et al.*, 1999; MOMMENS *et al.*, 1999; NAGAMINE, 2001).

A técnica RAPD (Polimorfismos de DNA amplificados ao acaso), desenvolvida por Williams *et al.* (1990), tem atraído muitos pesquisadores devido a sua relativa simplicidade, rapidez e baixo custo, sendo mais utilizada na caracterização das espécies eucariotas e procariotas. Essa técnica é uma das variantes da PCR que utiliza um “único” iniciador composto por dez pares de bases de seqüências nucleotídicas arbitrárias, tendo, portanto, sua seqüência alvo desconhecida (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998), ao contrário das outras que requerem informações prévias de seqüência de DNA alvo para a amplificação. Sua utilização possibilitou a detecção de vários polimorfismos em diferentes populações e/ou indivíduos através da presença ou ausência dos produtos de amplificação (WILLIAMS *et al.*, 1990; FAIRBANKS *et al.*, 1991).

Segundo Marques *et al.* (2004), a criação de avestruzes ou estruticultura apresenta grande desenvolvimento no país, algumas pesquisas sobre o comportamento e manejo estão sendo desenvolvidas. Na área da biologia molecular os estudos estão iniciando-se no Brasil e fora do país já tem estudos que enfatizam essa área.

Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar a variabilidade genética de populações de avestruzes (*Struthio camelus*) de diferentes localidades, utilizando marcadores RAPD, a fim de construir cladograma genético e comparar as matrizes de similaridade genética das populações estudadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ASPECTOS GERAIS DOS AVESTRUZES

A espécie *Struthio camelus* teve sua origem na África do Sul, onde pinturas rupestres demonstraram que há mais de nove mil anos o avestruz já era conhecido do homem. Os egípcios utilizavam as plumas como sinal de justiça e poder às civilizações antigas da Síria (PIGEM, 2001).

Essa espécie vive em zonas semi-desérticas, podendo atingir até 2,70 metros de altura e 160 Kg de peso. Seu ciclo de vida alcança 70 anos, mantendo sua capacidade reprodutiva até os 40 anos (TORRICO, 2003). Vulgarmente a família desta ave é chamada de ratita por possuir asas atrofiadas e ter grande potencial para correr (ROTTA, 2004).

Segundo o mesmo autor, os avestruzes possuem a seguinte classificação zoológica:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Aves

Ordem: Struthioniformes

Família: Struthionidae

Gênero: *Struthio*

Espécie: *Struthio camelus*

O sistema esquelético do avestruz é constituído por ossos compactados, onde o esterno não tem quilha. Este osso é extremamente forte funcionando como

escudo. Possui cabeça pequena em relação ao seu corpo, contendo dois grandes olhos, com os ouvidos logo atrás dos olhos protegidos por penugem; as narinas ficam na porção superior do bico, auxiliando na respiração e evaporação do animal. (KREIBICH & SOMMER, 1995).

O pescoço é extremamente longo, bastante flexível e móvel para todos os lados, internamente tem-se a traquéia e o esôfago. As asas são proporcionalmente pequenas, sendo utilizadas principalmente no equilíbrio. Possuem pernas longas e fortes, desenvolvidas para correr. Ele não possui glândula uropigiana, portanto, as plumas não são impermeáveis à água. A pele dos avestruzes comunica o meio interno com o externo, protegendo o corpo contra desidratação e regulando a temperatura corporal. Atua também como local de inserção das plumas e barreira protetora; apresenta grandes calosidades como forma de proteção em regiões áridas (KORNEFELD, 2001).

O sistema digestório é completo, apresentando o bico bastante forte com uma pequena língua, esôfago que se prolonga por todo o pescoço, proventrículo, ventrículo, intestino delgado, ceco ou apêndices e intestino grosso. O proventrículo é o estômago glandular, responsável pela digestão química dos alimentos. O ventrículo é o segundo, sendo o estômago mecânico, possui pedras que facilitam a trituração dos alimentos mais rígidos e das grandes massas alimentares (KREIBICH & SOMMER, 1995).

Possui um longo intestino que permite que a flora microbiana tenha tempo hábil para fermentar a fibra ingerida, o que lhe permite digerir até 60 % da planta (SCHEIDELER, 1997). Os produtos desta fermentação anaeróbica, os ácidos graxos voláteis, são formados, absorvidos e utilizados como fonte de energia, provavelmente, ocorrendo uma considerável síntese de aminoácidos e vitaminas do

complexo B, ficando ambos disponíveis, principalmente pela característica peculiar de coprofagia, o que permite o aproveitamento dessas substâncias. O avestruz é a única ave que elimina a urina e as fezes separadamente, o que favorece a coprofagia dessas aves (GARCIA, 2001).

O sistema respiratório é semelhante ao das aves domésticas, sendo formado pela traquéia, pulmões e sacos r

2.2. ESTRUTIOCULTURA

O avestruz foi domesticado por volta 1840, na África do Sul. No fim do século XIX já havia nesse país a criação de incubadora para ovos desse animal que se tornou o produto principal do país (ULLOA, 1998). Isso porque as plumas eram obtidas junto às populações silvestres de avestruzes. Com a intensa procura por esse produto houve declínio drástico da população silvestre (CARRER, 2003), o que deu início a estrutiocultura propriamente dita.

O nome estrutiocultura refere-se à criação racional de avestruz e deriva da denominação do gênero, *Struthio*. As instalações para a estrutiocultura devem ser realizadas com cercas, para facilitar o manejo, oferecendo conforto e segurança. Divide-se em quatro etapas: cria, recria, reprodução e incubação (KREIBICH & SOMMER, 1995).

A fase de cria ocorre com animais até 4 meses, exige maior atenção e os animais necessitam de um local com aquecimento no período noturno e para dias chuvosos, para depois serem transportados a piquetes pequenos. A fase de recria, ocorre em animais de 6 a 24 meses, e consiste em viver em piquetes maiores, com espaço para o exercício e descanso dos avestruzes. A fase de reprodução, que ocorre a partir dos 24 meses, começa com a maturação sexual, e podem ser separados por casais ou por grupos. A última fase deste ciclo é a incubação e consiste no desenvolvimento do embrião em local asséptico e adequado, denominado de incubadora (LUCHINI, 1998).

A África do Sul é o berço mundial da criação comercial de avestruz, cujo objetivo inicial foi a produção de plumas (CARRER, 1999), e o aumento desse

comércio acarretou numa redistribuição geográfica dessa espécie. Com o passar dos anos o sucesso dessa produção aumentou e a estruturacultura diversificou o tipo de produto final e espalhou-se por muitos lugares do mundo. Atualmente, esses animais são encontrados também na Áustria, Israel, EUA e Brasil sendo nosso país considerado como um dos que possui maior potencial para a criação dessa ave.

Existem três subespécies que são utilizadas para o comércio de avestruz, sendo elas: a *Blue neck*, *Red neck* e *African black*. A raça *Blue neck* (pescoço azul) possui temperamento agitado, de médio a grande porte e adapta-se melhor ao clima tropical. A raça *Red Neck* (pescoço vermelho) é oriunda do norte da África, possui temperamento mais agressivo, grande porte, inicia a reprodução mais tarde do que as demais raças e adapta-se melhor ao clima árido. Por fim, a raça *African Black* (preto africano), embora seja a de menor porte, é a mais indicada para iniciar a criação. São animais dóceis, fáceis de lidar e com início precoce da fase de postura.

No Brasil, a criação de avestruz vem sendo considerada como um novo grande negócio, com um plantel em formação de cerca de 200 mil aves distribuídas em várias regiões do país, estima-se que sua plena industrialização, deva ocorrer nos próximos 3 anos. O país já mostra, através da experiência de seus criadores, que a estruturacultura é uma ótima opção econômica, pois o país oferece boas características naturais tais como: clima, alimentos, mão-de-obra e infra-estrutura pecuária de fácil adaptação. Em relação ao mercado mundial, em virtude da grande demanda pelos produtos de alto valor agregado, atualmente, a criação de avestruz vem se popularizando e já é um sucesso em diversos países além da África do Sul, tais como: Áustria, Israel, EUA e Brasil. O rebanho mundial explorado zootecnicamente já se aproxima de 4 milhões de aves (ACAB, 2007).

A estruturação do mercado alimentar, ocorrida nas últimas décadas, tem dado suporte para o aumento considerável da atividade devido aos seguintes fatores: é um mercado alternativo à produção de carne vermelha, constitui-se como alternativa na produção de bens de qualidade para a demanda internacional da agroindústria, é um método de produção com menores impactos ambientais. A expansão foi tanta que, atualmente, aproveita-se praticamente tudo do avestruz (KORNFELD, 2001).

Samua (2006) cita que além do comércio de animais vivos (futuros reprodutores), que inclui ovos fecundados, filhotes e adultos que serão disponibilizados a venda, da estrutiocultura obtêm-se os seguintes produtos:

- Plumas: produto valorizado pela beleza ornamental, sendo vendidas naturais ou tingidas das mais diversas formas. São utilizadas no carnaval, bem como em outras festas populares como boi-bumbá e desfiles de alta costura. Segundo Oliveira (2003), o mercado brasileiro já é o maior consumidor mundial de plumas do mundo.

As plumas podem ser obtidas de aves de até 40 anos de idade. Mas, as melhores plumas são de aves com idade entre 3 a 12 anos (SOUZA, 2004).

- Couro: está sendo bastante comercializado, sendo um forte concorrente para o couro de crocodilo, visto que ele possui maior resistência à umidade, dentre outros fatores, e como não está em vias de extinção, passou a ser alternativa em face à preservação do crocodilo, tendo grande qualidade e beleza, grande aceitação e procura no mercado internacional (SAMUA, 2006).

- Ovo: além da reprodução propriamente dita, os refugados são peças importantes de artesanato e no mercado de arte, principalmente em pintura. Constitui-se ainda em uma alternativa para alimentação, pois apresenta qualidades

similares ao ovo de galinha, podendo ser consumido normalmente (TORRICO, 2003). Pesam entre 1,2 e 1,8 Kg, têm sabor muito semelhante ao ovo de galinha. Hoje ainda não é muito consumido, porque está sendo usado na formação de plantéis reprodutores (SAMUA, 2006).

- Carne: pela adaptação muscular anatômica do avestruz, a carne aproveitada comercialmente provém da coxa e sobrecoxa. É o produto que está dando mais impulso à criação comercial de avestruzes atualmente. A carne está sendo redescoberta por ser semelhante a carne de bovinos em termos de aspecto, sabor e textura, mas com a vantagem de ter baixos teores de gordura e colesterol. Esta característica da carne se deve à distribuição de gorduras no organismo do animal: estas localizam-se em volta do estômago e sob a pele, propiciando cortes de carne magra e couro extremamente macio (SAMUA, 2006).

condições de produzir um avestruz nacional adaptado às condições de clima, manejo e ao mercado consumidor (CARRER, 2005).

2.3. MARCADORES MOLECULARES

Tem-se observado o avanço de várias técnicas que permitem identificar a variabilidade em nível de DNA. Pode-se notar através do estudo de DNA, a existência de um grande número de marcadores genéticos polimórficos, os quais são amplamente utilizados na identificação de paternidade, no mapeamento genético e nos estudos evolucionários (GIBSON & SMITH, 1989; BECKMANN, 1989; WILLIAMS *et al.*, 1990).

Os marcadores moleculares têm-se mostrado uma poderosa ferramenta no estudo tanto de populações naturais quanto domesticadas, auxiliando no descobrimento de muitos parâmetros genéticos importantes para a conservação e/ou para a utilização dos recursos genéticos das diversas espécies (HILLIS *et al.*, 1996; RUANE, 1999; KANTANEN *et al.*, 1999; RITZ *et al.*, 2000).

Após o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) por Saiki *et al.* (1988), muitos dos estudos ao nível de marcadores tornaram-se possíveis ou simplificados. A reação envolve um processo cíclico, no qual a enzima DNA-polimerase permite que o DNA de uma região selecionada do genoma seja amplificado várias vezes, para qual são fornecidos os iniciadores (*primers* – oligonucleotídeos específicos). O processo envolve três fases: a) desnaturação das fitas de DNA pelo calor que logo em seguida são resfriadas; b) anelamento dos oligonucleotídeos e c) extensão e polimerização pela enzima taq DNA-polimerase.

Então, o ciclo se repete e em cada ciclo o número de cópias da seqüência alvo é duplicado, resultando numa amplificação exponencial (LANDDERGREN, 1993; ALBERT, 1997; SOUTO *et al.*, 2000).

Godoy *et al.* (2005) afirmaram que a utilização de técnicas moleculares permite a identificação de pontos de referência do DNA, denominados marcadores genéticos. Diversas técnicas estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética na seqüência do DNA, indicando os polimorfismos existentes.

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade a nível de DNA, e assim variam quanto a habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (POLASTRI, 2002).

Segundo Milach (1997) as metodologias para identificar os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos: por hibridização ou por amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição) e minissatélites ou locos VNTR (em inglês "*Variable Number of Tandem Repeats*"). Dentre os revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), Microsatélites e AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados).

A classe de marcadores identificados por amplificação de DNA com variações na PCR, em comparação com as técnicas que envolvem a hibridização de DNA, geralmente, é de custo relativamente menor, mais fácil e de menor tempo para a obtenção dos resultados (MILACH, 1997; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Williams *et al.* (1990) e Welsh & McClelland (1990) propuseram a técnica RAPD que baseia-se na amplificação de DNA pela PCR, com iniciadores arbitrários.

O polimorfismo de DNA amplificado ao acaso é detectado pela presença de um fragmento específico amplificado em um indivíduo comparado com a ausência do mesmo em outro indivíduo (WILLIAMS *et al.*, 1990; FAIRBANKS *et al.*, 1991). Como os sítios de ligação do iniciador estão distribuídos ao acaso pelo genoma, polimorfismos nesses sítios resultam em diferentes produtos de amplificação (BARDAKCI & SKIBINSKI, 1994).

A natureza molecular do polimorfismo RAPD não é inteiramente conhecida. Entretanto, evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementaridade do iniciador (seqüenciador) de iniciação (WILLIAMS *et al.*, 1990).

Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação ou inserções que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer. Assim, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o seguimento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente (POLLASTRI, 2002).

A detecção de vários polimorfismos por RAPD é simples, fácil, rápida e necessita de pequenas quantidades de DNA genômico (HU & QUIROS, 1991; WILLIAMS *et al.*, 1990). Esta técnica tornou-se amplamente utilizada para identificação de marcadores genéticos associados a determinados fenótipos para estudos de variabilidade genética, assim como para a identificação de organismos e na resolução de grupos taxonômicos (ROSATO *et al.*, 2002).

Sua rapidez é uma das vantagens na caracterização de recursos biológicos quando comparada com as análises de isoenzimas ou RFLP (ANDERSEN & FAIRBANKS, 1991).

A não discriminação dos heterozigotos é uma das desvantagens dessa técnica. Como os marcadores RAPD se comportam como marcadores genéticos dominantes, não é possível distinguir se a presença de uma banda é gerada pela amplificação de um loco homozigoto ou heterozigoto (WILLIAMS *et al.*, 1990).

2.4. UTILIZAÇÃO DE RAPD NO MELHORAMENTO ANIMAL

As tecnologias de marcadores moleculares ou genéticos são vistas como as mais promissoras para uso no melhoramento genético animal. Além disso, a utilização de marcadores polimórficos tem tornado o processo de identificação de parentesco mais compreensivo e preciso, além de permitir a rápida eliminação de genes recessivos deletérios de populações (LEDUR & SCHIMIDT, 1998).

Telles *et al.* (2003) analisaram o padrão de amplificação de quarenta iniciadores de marcador tipo RAPD, a fim de avaliar o nível de polimorfismo identificado por cada iniciador para varas de queixada (*Tayassu pecari*), na região do Parque Nacional das Emas, GO. Trinta iniciadores foram amplificados com sucesso, fornecendo um total de 203 locos, com uma média de 7 locos por iniciador. Considerando as duas varas analisadas, cerca de 72% dos locos foram polimórficos. Uma análise de coordenadas principais confirma esses resultados, sugerindo que a espécie tende a formar bandos que podem ser unidades reprodutivas.

Gimenez *et al.* (2003) realizaram a análise cromossômica e molecular de animais presentes em diferentes criações de javalis no estado de São Paulo, com o intuito de auxiliar a identificação de javalis "puros" e híbridos provenientes do cruzamento com o suíno doméstico. Utilizaram avaliação fenotípica, análises citogenéticas e molecular com a técnica RAPD. O estudo do número de

cromossomos nas células diplóides em 104 animais destinados a análise citogenética e fenotípica, revelou polimorfismo de $2n=36$, 37 e 38 cromossomos. Por meio da técnica de bandamento GTG foi possível identificação da translocação Robertsoniana entre os cromossomos 15 e 17 como responsável por esse polimorfismo.

Esses autores enfatizaram que somente com a análise citogenética isolada, não foi possível determinar se a origem desse polimorfismo era decorrente das hibridações com o suíno doméstico ou se eram características inerentes ao javali. Entretanto, quando associaram a análise citogenética com as características fenotípicas, foi possível identificar a existência de hibridações. A análise citogenética nos animais submetidos a técnica de RAPD revelou $2n=36$ cromossomos nos 16 javalis assim como $2n=38$ cromossomos nos 11 suínos e, por meio dessa técnica, foram possíveis agrupamentos, separando o suíno doméstico, javali e um possível híbrido, revelando-se uma técnica com potencial no auxílio da identificação de híbridos.

Com o objetivo de selecionar marcadores RAPD em bovinos e avaliar o padrão de similaridade genética entre dois rebanhos nelore e um holandês, Telles *et al.* (2001) utilizaram 40 iniciadores, dos quais 16 não apresentaram bom padrão de amplificação ou não amplificaram e os 24 restantes apresentaram 133 bandas, sendo 65 deles polimórficos. A análise de agrupamento UPGMA mostrou que os dois rebanhos de nelore foram mais próximos entre si, com similaridade genética (Jaccard) de 0,785, o holandês foi o mais distante geneticamente do grupo dos nelore, com valor médio de Jaccard igual a 0,589.

Povh *et al.* (2005) estimaram, pela técnica RAPD, a divergência e a variabilidade genética nas linhagens de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*),

Bouaké e Chitralada em duas gerações de reprodutores do rio Nilo. Foram utilizados 20 animais de cada linhagem. A matriz de coeficientes de similaridade de Jaccard entre indivíduos foi utilizada para a construção de um dendrograma. As linhagens Bouaké e Chitralada formaram grupos distintos. A primeira apresentou menor divergência e variabilidade genética em relação à segunda. A variabilidade genética foi semelhante entre as duas gerações de reprodutores em ambas as linhagens.

Rangel *et al.* (2004) verificaram a similaridade genética entre animais de duas raças bovinas brasileiras (Crioulo Lageano e Junqueira) estimada pela análise de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), tendo como referência (*outgroups*) animais de raças comerciais das espécies *Bos taurus* e *B. indicus*. Estas duas raças possuem grande similaridade fenotípica, sugerindo uma origem genética comum. Ao contrário do que era previsto, com base nas semelhanças morfológicas das duas raças, os animais das raças Crioulo Lageano e Junqueira não apresentaram similaridade elevada entre si quando comparados com animais de outras raças comerciais. Os dados indicaram que as duas raças sofreram contribuições genéticas distintas no processo de formação racial.

Spritze *et al.* (2003) avaliaram a caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores RAPD em comparação com as raças Holandesa e Nelore. Foram selecionados 43 iniciadores, que geraram 77 bandas polimórficas, onde os animais foram distribuídos em cinco subgrupos de Crioulo Lageano, um subgrupo em cada uma das raças Holandesa e Nelore. A maior parte da variância genética total foi causada pela diferença de indivíduos dentro dos grupos e o restante pelas diferenças entre grupos. A diversidade gênica se manteve ao longo das gerações no núcleo de conservação do Crioulo Lageano. A raça Holandesa apresentou a menor diversidade gênica (0,1204), e a Crioulo Lageano a maior (0,3154). A maior distância

genética (0,3747) foi entre as raças Nelore e Holandesa. Os grupos de Crioulo Lageano apresentaram diferenças entre si e apenas alguns indivíduos de cada grupo posicionaram-se junto a outros grupos. Esse autor concluiu que a técnica RAPD foi capaz de estimar a distância genética entre raças ou populações e auxiliou na escolha de indivíduos, visando os trabalhos de conservação de recursos genéticos.

Marques *et al.* (2004) analisaram 23 indivíduos de duas populações de avestruzes (*Struthio camelus*) dos estados do Pará e Maranhão, utilizando 14 marcadores RAPD a fim de avaliar a variabilidade genética. Obteve um total de 76 bandas amplificadas com tamanhos variando de 300 pb a 2200 pb. O número de fragmentos polimórficos por iniciador variou de 11 (OPQ-06) a 01 (OPQ-04, OPB-03 e 09), observando dentre os fragmentos amplificados, a ocorrência de bandas específicas aos indivíduos. O índice de similaridade para todos os indivíduos analisados foi o de Jaccard, o dendrograma foi gerado pelo método UPGMA, através do programa NTSYS-pc 2.02. A menor similaridade foi de 27 % e a maior de 83%. Os marcadores RAPD mostraram-se eficientes para detectar polimorfismo na referida espécie; os autores concluem ainda, que os marcadores RAPD podem ser utilizados como ferramenta na obtenção de informações úteis para o manejo e o direcionamento de programas de melhoramento genético.

Godoy *et al.* (2005) coletaram amostras de sangue de 30 animais, machos e fêmeas, das subespécies *Blue Neck*, *African Black* e *Red Blue*, para extração de DNA. Os produtos foram analisados e interpretados pela técnica RAPD, fornecendo dados de similaridade genética entre os indivíduos com a utilização do coeficiente de Jaccard e dados de distância genética entre as subespécies e diversidade genética dentro dessas subespécies através do coeficiente de Nei. A similaridade variou de

42 % a 85,7 %, entretanto este último utilizou apenas 10 animais *African Black* para realização do referido trabalho. Os resultados alcançados demonstraram ainda, baixa similaridade entre os indivíduos analisados de cada subespécie, porém as distâncias genéticas entre as subespécies não foram significativas, indicando que não houve diferenciação genética entre subespécies. Os valores de diferenciação genética entre a subespécie *Blue Neck* e *Red Blue* ficaram próximos da significância, sugerindo uma maior diversidade genética entre elas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS

Os animais estudados pertencem à raça *African Black*. As coletas de material biológico (sangue) foram realizadas em vários municípios e o número total de amostras foi de 121, sendo 15 de Palmas, 24 de Tracuateua, 42 de Imperatriz e 39 de Ipatinga; nos estados do Tocantins, Pará, Maranhão, e Minas Gerais, respectivamente (Tabela 01).

Tabela 01. Procedências e respectivas amostras utilizadas no presente estudo.

No. de Amostras	Procedência	Fazenda
24	Tracuateua-Pa	Peri-Cigano
42	Imperatriz-Ma	MARAVEST
39	Ipatinga-MG	S. T. Raposa
43	Minas Gerais	S. T. Raposa

A coleta do material biológico (sangue) foi realizada em tubos com EDTA, devidamente identificados, no volume de 1,0 ml. Após a coleta, as amostras foram mantidas em baixa temperatura em isopor com gelo, para conservação até serem transportados para o Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Amazônia Oriental (LABGEN), onde foram realizados todos os procedimentos experimentais.

3.2. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído através da utilização de 150µl de cada amostra de sangue total, transferido a tubos respectivos de 15 ml e misturados com tampão STE até completar um volume final de 5 ml. A esse volume foram adicionados 250µl de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 10 % (pH:7,2), 100µl de Ribonuclease (10 mg/ml) para degradar o RNA e 100µl de Proteinase K (10 ng/ml), deixando-os por 40 min à 55 °C em contínua agitação. Em seguida, foram adicionados 2ml de NaCl (5M) à temperatura ambiente, com agitação suave por 15s e centrifugados a 4.000 rpm por 20 min, promovendo a separação do material em três fases.

O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para tubos limpos devidamente identificados. A esses tubos foi adicionado igual volume de Clorofórmio-álcool isoamil (24:1) e a mistura foi homogeneizada por 10 min, seguido de centrifugação à 3.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi transferido e o DNA foi precipitado com etanol absoluto gelado.

O DNA genômico foi ressuspenso com 0,2 a 0,6 ml de tampão TE pH 8,0 a 37 °C por aproximadamente 1 hora, o qual foi armazenado a -20 °C, para posterior quantificação.

3.3. QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA extraído foi submetido a eletroforese horizontal e quantificado em gel de agarose a 1%, a partir da comparação de concentrações crescentes de DNA *lambda* (50, 100 e 200 ng/µl). Neste procedimento, foram utilizados 5 µl de DNA, acrescido

de 2 µl de tampão de carregamento e 4 µl de água destilada autoclavada. A interpretação da concentração foi baseada na intensidade da banda do DNA de avestruz comparada com a intensidade das bandas do DNA *lambda*.

Após a quantificação, o DNA foi diluído a partir da amostra total com água destilada autoclavada para a concentração de trabalho de 5 ng/µl. As alíquotas foram armazenadas a -20° C.

A diluição do DNA foi realizada considerando-se a fórmula $C.V = C_1.V_1$, onde:

C = é a concentração do DNA obtida na quantificação;

V = é o volume desejado a ser pipetado do DNA concentrado;

C_1 = é a concentração de trabalho correspondente a 5 ng/µl;

V_1 = é o volume final correspondente a 500 µl.

Exemplo da diluição do DNA genômico.

$$C.V = C_1 . V_1$$

$$20 \text{ ng}/\mu\text{l} . V = 5 \text{ ng}/\mu\text{l} . 500 \mu\text{l}$$

$$V = \frac{5 \cdot 500}{20}$$

$$20$$

$$V = 125 \mu\text{l}$$

Portanto, para se obter uma concentração de 5 ng/µl, acrescenta-se 375 µl de água estéril ao volume de 125 µl de DNA concentrado.

As extrações de DNA genômico possibilitaram a obtenção de DNA em concentrações que variaram de 4,2 ng/µl a 400 ng/µl. A quantidade de DNA pode ser vista na Figura 01.



Figura 01. DNA genômico com presença de RNA

3.4. REAÇÃO DE RAPD

O protocolo utilizado foi o descrito por Williams *et al.* (1990) com modificações. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 13 μ l contendo água destilada autoclavada, tampão para PCR (20 mM de Tris HCl pH 8,0 e 50 mM de KCl), 2 mM de $MgCl_2$, 1mM dNTP, iniciador arbitrário 1,3 μ M, 1 U.I. de *Taq* polimerase e 15 ng de DNA genômico.

3.4.1. Seleção dos iniciadores

Para esta etapa do trabalho foram selecionados 03 kits de iniciadores mais polimórficos e que produzem melhor rendimento segundo Ferreira (2004), buscando-se um total de fragmentos polimórficos que possibilitassem a discriminação dos indivíduos.

Para a seleção de iniciadores foram analisadas seis amostras, sendo três de avestruzes de Tracuateua e três de Imperatriz (Tabela 02).

Tabela 02. Identificação das amostras dos avestruzes, utilizados na seleção dos iniciadores.

Nome	Localidade	Sexo	Identificação no tubo
172 M	Imperatriz	M	172 M
314 F	Imperatriz	F	314 F
208	Imperatriz	-	208
Piquete 13 F	Tracuateua	F	T. piq. 13 F
Piquete 5 F 20	Tracuateua	F	T. piq. 5 F 20
Piquete 22 F leg menor	Tracuateua	F	T. piq. 22 F leg menor

Foram testados 60 iniciadores compostos por 10 bases de nucleotídeos (Tabela 03), oriundos da *Operon Technologies* (Alameda, CA, USA), contendo 60-70 % de G+C. Cada iniciador foi ressuspensão em água esterilizada autoclavada, e mantido em uma concentração estoque de 50 μ M e armazenado à -20° C. Para isso, primeiramente, os iniciadores foram levemente agitados e em seguida acrescentou-se água autoclavada. Posteriormente foram colocados na estufa à 37° C, durante uma hora. Para o uso corrente, os iniciadores foram diluídos para a concentração de 1,3 μ M.

Cada iniciador foi analisado individualmente. As bandas que apresentaram a mesma mobilidade no gel foram consideradas idênticas. As bandas muito fracas ou que ocorreram em um só indivíduo foram desconsideradas. Foram considerados o grau de polimorfismo e o padrão de amplificação.

3. 4.2. Condições da PCR

As amplificações foram realizadas no termociclador Amplitron II, modelo DB 80225. O programa utilizado na PCR consistiu de 40 ciclos, sendo cada um de 1

minuto a 94 °C (desnaturação das fitas de DNA), 1 minuto a 37 °C (anelamento dos oligonucleotídeos) e 2 minutos a 72 °C (extensão pela enzima taq DNApolimerase), seguidos de mais 7 minutos a 72 °C, para a completa extensão dos produtos amplificados.

O volume final e os procedimentos de elaboração das mesmas foram iguais aos da seleção de iniciadores. Ao fim desta etapa, foram escolhidos os 15 iniciadores mais polimórficos para a realização das reações RAPD (realizadas nas mesmas condições) para as 121 amostras de avestruzes.

3.5. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO

Para separação dos produtos amplificados foi utilizada a eletroforese horizontal, em gel de agarose a 1,5 %, corado com brometo de etídio para visualização do DNA sob luz ultravioleta. Após a amplificação, a cada 13 µl de reação foram adicionados 3 µl de azul de bromofenol para o monitoramento da eletroforese. Foi utilizado TBE (Trizma –base 0,1 M; ácido bórico 1M e EDTA 0,5M) como tampão do gel e de eletroforese.

Após a eletroforese os géis foram visualizados e fotografados em equipamento de fotodocumentação por transiluminação em ultravioleta, para posterior análise.

3.5.1. Preparo do gel 1,5 %

Foram utilizados 4,0 g de agarose ultrapura em 350 ml de TBE 1X. Ferveu-se a suspensão em forno de microondas, agitando-se suavemente o frasco a intervalos regulares durante o processo de fervura até que as partículas de agarose em suspensão ficassem invisíveis (cerca de três a quatro minutos). Após a completa dissolução da agarose, a mistura foi colocada sob água para resfriamento até atingir uma temperatura entre 40 °C a 60 °C e então acrescentados 50 µl de brometo de etídio (1 mg/ml).

Após o preparo, a solução foi vertida no suporte de gel e, em seguida, foram colocados dois pentes (cada um com 26 dentes), sendo um em uma das extremidades e outro cerca de dez centímetros de distância daquele já citado para formar, quando removidos, os “poços” ou canais onde se aplicam as amostras.

3.5.2. Aplicação das amostras no gel de agarose

As reações amplificadas foram retiradas do termociclador e carregadas com 4 µl de tampão de carregamento 6x (azul de bromofenol).

Foi aplicada em cada “poço” uma alíquota de 13 µl de volume final, sendo que nas extremidades de ambas as linhas foram aplicados 12 µl de DNA padrão (*Ladder*). Após esta etapa o gel foi colocado no tanque de aparato de eletroforese, submerso na solução. O tampão de eletroforese teve a mesma composição do tampão utilizado na confecção do gel. O tempo de corrida foi aproximadamente duas horas e trinta minutos até que a solução corante atingisse a região próxima da borda inferior do gel. Aplicou-se durante a eletroforese, uma voltagem constante de 80V.

3.6. ANÁLISE DOS DADOS

Inicialmente foi efetuada a matriz binária para os fragmentos amplificados com presença (1) e ausência (0) de banda.

Para verificação do número ótimo de bandas polimórficas geradas pelos 15 iniciadores RAPD foi realizada a análise de *bootstrap*. Para cada par de acessos, a similaridade genética foi estimada a partir de simulações com reamostragens de diferentes tamanhos (10, 20, 30,..., 240, 250, 260 bandas), sendo cada uma repetida 10.000 vezes por meio do software GQMOL (CRUZ & SCHUSTER, 2004). Este aplicativo obtém as estimativas de correlação de valores da matriz de similaridade original com os de outras matrizes de similaridade, as quais são obtidas levando em consideração diferentes números de bandas. O programa disponibiliza também dois outros parâmetros: a soma de quadrados dos desvios em relação às reamostragens e o valor de estresse (E), que indica o ajuste entre a matriz original e a matriz amostral, por meio da expressão:

$$E: \sqrt{\frac{(s_{ij}^* - s_{ij})^2}{\sum s_{ij}^{*2}}}$$

Onde:

s : similaridade genética média entre todos os pares de acessos estimada para cada amostragem;

$ij s$: similaridade genética média entre todos os pares de acessos estimada a partir do total de bandas polimórficas.

Para a análise dos dados foi utilizado o programa NTSYS-pc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*), versão 2.02. A similaridade entre as

amostras foi analisada através do coeficiente de Jaccard. O coeficiente pode ser representado da seguinte forma:

$$\text{Jaccard: } S_j = \frac{a}{a+b+c}$$

Onde a = bandas compartilhadas pelas populações;

b + c = presença de bandas em uma e ausência em outra população.

A partir da matriz de similaridade, a análise de agrupamento foi gerada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average*) que foi expresso na forma de dendrograma. Com a finalidade de verificar a consistência dos agrupamentos no dendrograma, foi gerada uma matriz de distância cofenética, usando o módulo Sahncof do programa NTSYS 2.2. Desta forma, a matriz de similaridade original foi correlacionada com a matriz de distância cofenética usando o módulo MXCOMP do mesmo programa, que gerou um teste subjetivo para medir a qualidade do ajuste. Em seguida foi realizado o teste de Mantel para determinar o nível de significância do coeficiente de correlação entre as referidas matrizes.

Para o estudo da estruturação gênica o procedimento empregado foi a análise de variância molecular (AMOVA), no *software* Arlequin 2.0 (SCHNEIDER *et al.*, 2000), tendo como fontes de variação 4 procedências, representando a origem dos indivíduos estudados, conforme consta na Tabela 01.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 1. SELEÇÃO DE INICIADORES

Foram selecionados somente os iniciadores que apresentaram 3 ou mais bandas polimórficas e boa resolução. Através deste critério a Tabela 04 mostra o desempenho dos kits de iniciadores em relação ao critério de qualidade de amplificação.

Tabela 4. Resultados obtidos na seleção de iniciadores.

Kit	Iniciadores Monomórficos	Iniciadores polimórficos	Iniciadores com má amplificação (ou com rastros)	Iniciadores s/ amplificação
B	4	15	1	0
F	5	12	1	2
Q	5	10	5	0

Na Figura 02 pode ser visualizado um dos experimentos realizados para a seleção dos iniciadores. Neste exemplo foram utilizados, numa mesma PCR, três dos vinte iniciadores que compunham o kit Q. Como pode ser observado, cada iniciador apresenta um padrão de amplificação diferente.

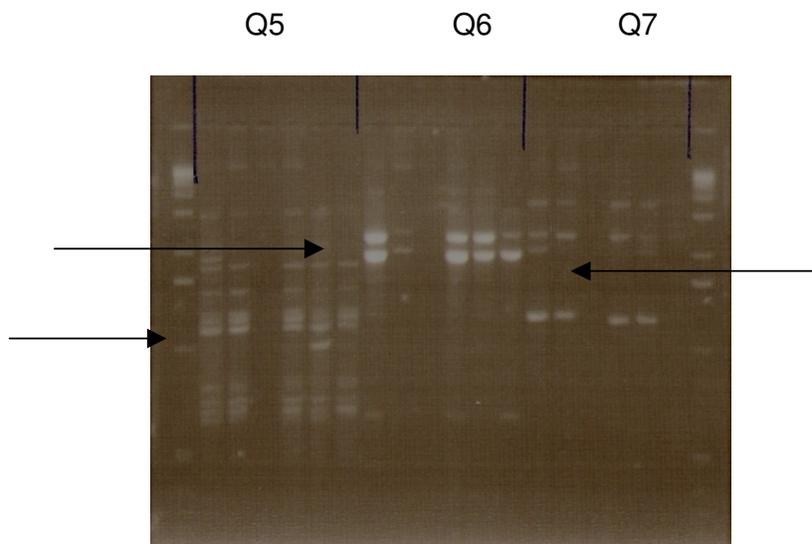


Figura 02. Triagem do Kit Q. As setas indicam polimorfismos encontrados.

Com os 60 iniciadores utilizados, inicialmente, nos experimentos obteve-se um total de 192 bandas amplificadas, das quais 132 foram polimórficas, gerando 68,75 % de polimorfismo.

4.2 – REAÇÕES RAPD

Os iniciadores OPB-03, OPB-08, OPB-09, OPB-13, OPB-14, OPB-19, OPF-03, OPF-04, OPF-07, OPF-09, OPF-10, OPQ-05, OPQ-06, OPQ-07 e OPQ-09, que obtiveram o melhor desempenho quanto ao número de bandas, foram selecionados para realizar a análise RAPD em todas as amostras coletadas.

Um total de 109 marcadores RAPD, com tamanhos variando entre 450 pb a 2200 pb, foi gerado pelos 15 iniciadores utilizados, sendo todos polimórficos. O

número de fragmentos polimórficos por iniciador variou de 3 (OPB14) a 11 (OPB08 e OPF06), com média de 7,26 bandas por iniciador (Tabela 05).

Tabela 05. Número de bandas polimórficas, geradas por cada iniciador utilizado no presente estudo.

No.	Iniciador	No. de bandas polimórficas
1	OPB 03	09
2	OPB 08	11
3	OPB 09	07
4	OPB 13	07
5	OPB 14	03
6	OPB 19	07
7	OPF 03	05
8	OPF 04	08
9	OPF 07	06
10	OPF 09	04
11	OPF 10	06
12	OPQ 05	10
13	OPQ 06	11
14	OPQ 07	09
15	OPQ 09	06
TOTAL		109

Marques *et al.* (2004) avaliaram a similaridade entre grupos de avestruzes da Amazônia utilizando 13 iniciadores e, obtiveram bandas polimórficas que variaram de 01 a 11, com uma média de 5,85 bandas por iniciador. Resultado semelhante foi obtido por Godoy *et al.* (2005) quando realizaram o trabalho de variabilidade em sub-grupos de avestruzes, tendo com o maior e menor número de bandas polimórficas, respectivamente, 14 e 4 por iniciador.

Por sua vez, Bouzat (2001) pesquisou a estrutura genética de Emas (*Rhea americana*) com marcadores RAPD e encontrou um total de 54 polimorfismos utilizando 18 iniciadores. Considerando que esse número pode variar de acordo com a população estudada, os resultados obtidos estão dentro do esperado.

Como os trabalhos realizados variam quanto ao número de bandas polimórficas, existe a dúvida quanto ao número ótimo das mesmas para determinada análise. Assim, a análise de *bootstrap* dá maior segurança sobre o número de bandas adequadas para realizar estudos de variabilidade genética. Desta forma, foram realizadas análises de reamostragens, empregando-se as 109 bandas geradas nas 121 amostras. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Figura 03.

Houve uma relação direta entre o número de bandas e o valor de correlação dos valores da matriz de similaridade original com os das outras matrizes de similaridade, a partir das amostras dos diferentes números de bandas. A partir de 70 bandas, a estimativa de correlação apresentou alta magnitude ($r=0,91$), mas a soma dos quadrados dos desvios em relação às reamostragens ($SQd=28,22$) e o valor do estresse ($estresse=0,27$) ainda foram altos, o que é considerado por Kruskal (1964) como baixa consistência na associação das matrizes.

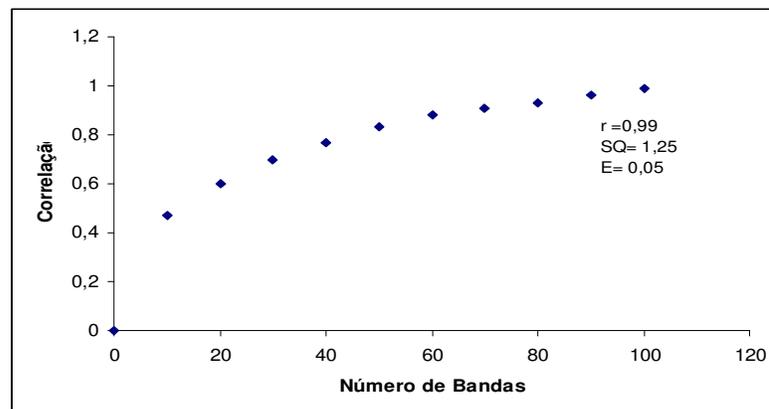


Figura 03. Resumo da análise de *bootstrap*.

Somente a partir de 100 bandas houve um bom ajuste entre os valores da matriz de similaridade original com os das outras matrizes de similaridade. Assim, para este número de bandas, a magnitude da correlação foi bem próxima do valor

máximo ($r=0,99$), apresentando alta confiabilidade, uma vez que cada reamostragem foi repetida 10.000 vezes. A soma de quadrados dos desvios (SQd) atingiu valor baixo 1,25 e o valor do estresse (E) de 0,05. Para Kruskal (1964) valores de estresse iguais ou inferiores a 0,05 representam um excelente indicativo de precisão, o que confirma o valor mencionado.

Como este trabalho gerou 109 bandas polimórficas para o marcador dominante (RAPD), estimando os complementos aritméticos das similaridades genéticas entre indivíduos, pode-se sugerir que as bandas polimórficas empregadas neste estudo sejam confiáveis para avaliar relações genéticas entre as amostras estudadas.

As estimativas de similaridades genéticas obtidas para os 121 indivíduos, a partir da matriz de Jaccard, estão presentes na Figura 04. Na análise entre pares de grupos, foi verificado que a maior e menor similaridade estão em torno, respectivamente, de 0,86 e 0,00, quando se comparam os indivíduos Av119 e Av 118 ($S_j = 0,86$), Av1 e Av92, Av3 e Av92, Av3 e Av101, Av4 e Av115, Av4 e 104 e Av6 com o Av119 ($S_j = 0,00$).

No que diz respeito à distribuição de frequência das similaridades obtidas entre os 5.644 pares formados na matriz genética, pode-se verificar que 32,69 % dos pares ficaram incluídos nas classes com similaridades variando de 0,01 a 0,10, cujo ponto médio apresentou valor de 0,05. Nota-se que a maior porcentagem (85,59%) dos pares ficaram distribuídos nas três primeiras classes das extremidades e que a minoria deles (14,41%) apresentou similaridades variando de 0,21 a 1,00, fazendo com que o padrão de distribuição das classes mostrasse um perfil decrescente e depois tendendo a crescer, exibindo uma tendência de distribuição polinomial. A maior parte dos indivíduos obteve baixa similaridade.

distintos (Figura 06). A maioria (63) dos grupos foi formada por um ou poucos indivíduos; os demais (03) agrupamentos foram constituídos por onze indivíduos. O indivíduo Av91 (proveniente do estado de Minas Gerais) apresentou 6 % de similaridade.

Os indivíduos apresentaram similaridade média de 0,49 (49 %), destacando-se como mais similares os indivíduos Av48 e Av49 (cerca de 83 %) provenientes do Maranhão e Av118 e Av119 (com 86 %), de Minas Gerais. A população proveniente do Pará apresentou como menor similaridade 29 % e maior 69 %, tendo como indivíduos mais próximos o Av3 e Av16. A população do Maranhão apresentou grande diferença entre os indivíduos, a maior e menor similaridade entre os mesmos foi, respectivamente, de 83 % e 46 %. Os mais próximos foram Av48 e Av49.

A maior similaridade entre os indivíduos de Tocantins foi de 80% entre o Av27 e Av29; a menor similaridade foi de 27% entre Av37 e o grupo formado por Av26, Av27, Av28, Av29 e Av34.

Apesar da população de Minas Gerais ter apresentado a maior e menor similaridade deste estudo, não há diferenças significativas de similaridade entre os demais indivíduos dessa população. Das 39 amostras utilizadas neste trabalho, 24 apresentam-se formando dois grupos fechados, sem quaisquer indivíduos das outras populações. Os demais se encontram poucos similares entre si e com as demais amostras, exceto o Av84 que apresentou 43 % de similaridade com o Av80 que faz parte da população do Maranhão.

Percebe-se ainda na Figura 06 que há uma relação de similaridade de 60 % entre os indivíduos Av10, do Pará, com o Av50 do Maranhão.

Entre os indivíduos do Maranhão e Tocantins, a maior similaridade ocorreu entre os indivíduos Av36 e Av86 que foi de 58%.

Vale ressaltar que o número de amostras do estado de Tocantins foi bastante inferior as dos demais Estados envolvidos neste estudo, o que pode ter influenciado na relação de similaridade entre essa população e as demais.

Marques *et al.* (2004) estudando grupos de avestruzes oriundos de duas populações dos estados do Pará e Maranhão obteve similaridade entre 27 % e 83 %. Já Godoy *et al.* (2005) observaram que a similaridade variou de 42 % a 85,7 %, entretanto este último utilizou apenas 10 animais *African Black* para realização do referido trabalho.

Marques *et al.* (2004) encontraram 77,4 % de similaridade entre os indivíduos da população do Pará. A população do estado Maranhão apresentou diferença grande entre os indivíduos; segundo os autores, esses animais provavelmente são oriundos de diferentes origens.

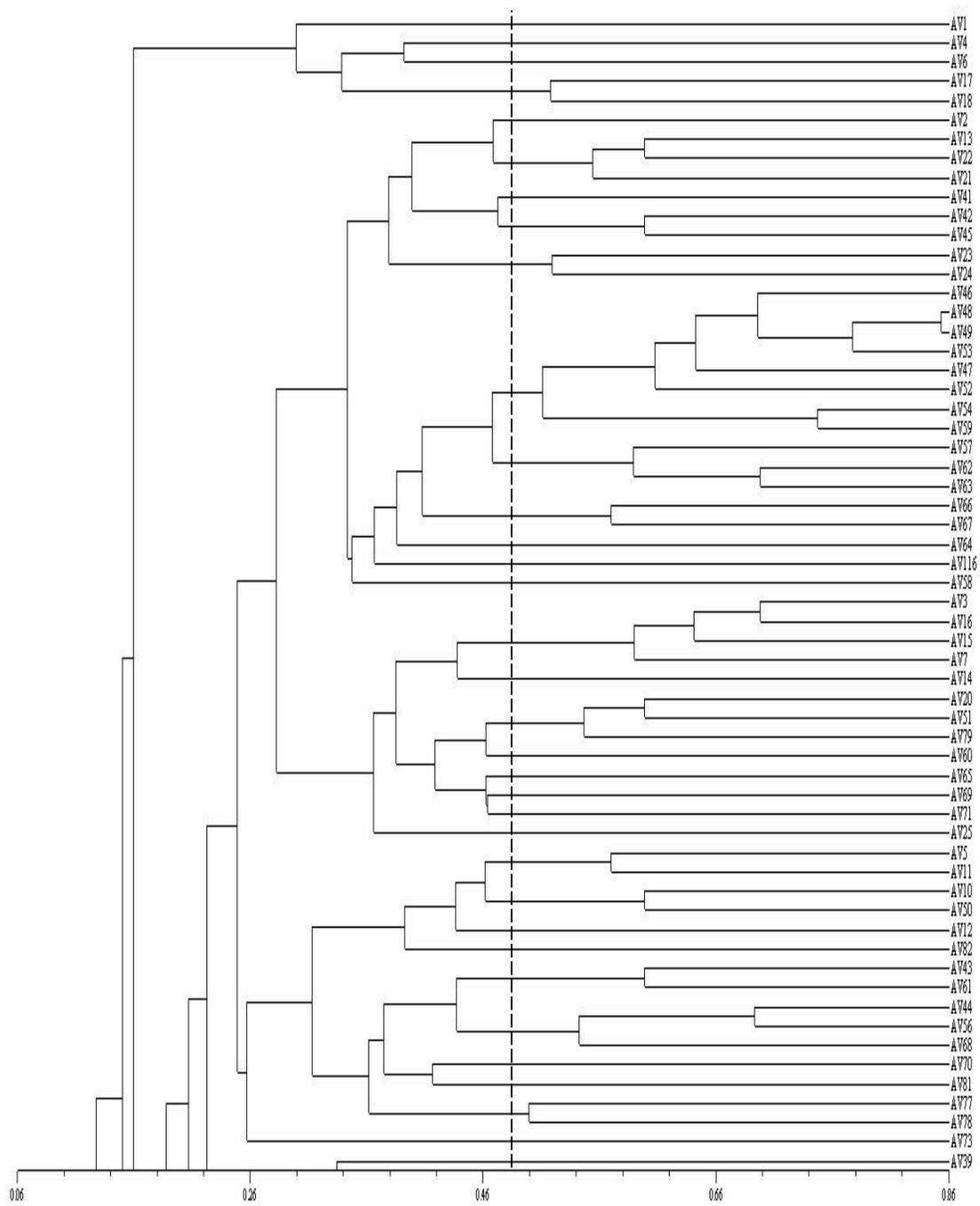
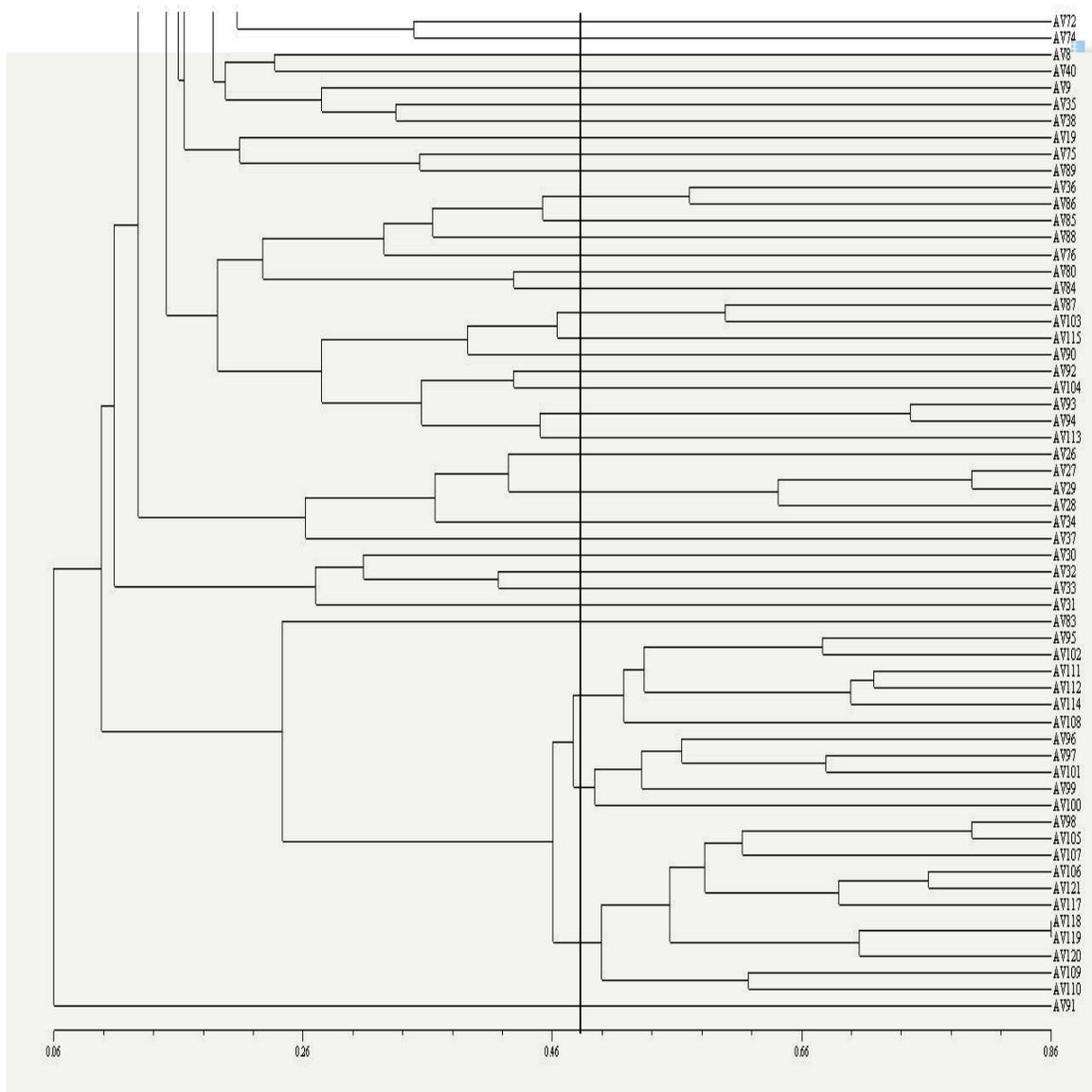


Figura 06. Dendrograma gerado pelo método UPGMA a partir das estimativas de similaridades genéticas, expressas pelo complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, com base em 109 bandas polimórficas de RAPD geradas nas 121 amostras de avestruz. $S_{dg} = 0,49$ (Continua...)



“Figura 06, Cont.”

Os dados relativos à análise de variância molecular realizada para as 4 procedências das 121 amostras de avestruz, estão presentes na Tabela 06. Como se pode constatar, a porcentagem de variação genética entre procedências foi baixa e significativa (24,03%, $p < 0,0001$), evidenciando que grande parte da variação encontra-se dentro das populações (75,97 %).

Tabela 06. Análise de variância molecular obtida para as 4 procedências de avestruz, com base em 109 bandas polimórficas de RAPD geradas em 121 indivíduos.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	VARIÂNCIA	VARIAÇÃO (%)	F_{ST}
Entre Procedências	3	2,6521	24,03	0,240
Dentro de Procedências	117	8,3836	75,97	
Total	120	11,0357	100	

A baixa divergência constatada entre os plantéis dessas quatro procedências e o valor de F_{ST} obtidos no presente estudo indicam pouca diferenciação entre as populações investigadas. Por outro lado, esta análise destacou forte agrupamento entre os indivíduos dentro de cada procedência, sugerindo que há tendência de estruturação genética entre eles, o que era esperado uma vez que os animais de cada plantel acasalam entre si.

Resultados semelhantes foram obtidos por Telles *et al.* (2003) estudando a estruturação genética por meio deste procedimento (AMOVA) em varas de queixada, tendo constatado grande variação dentro das varas. Como também, por Spritze *et al.* (2003) em rebanhos de bovinos da raça Crioulo Lageano onde detectaram a maior parte de variância dentro dos grupos (74,72 %).

5. CONCLUSÕES

- Os marcadores RAPD foram eficientes na caracterização da similaridade genética;
- Pode-se deduzir que alguns indivíduos, provavelmente, têm a mesma origem;
- Alguns indivíduos como Av91, Av58, Av1 e Av40, dentre outros, podem ser potencialmente selecionados para programa de melhoramento genético para essa espécie;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; TAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 294p. 1997.

ANDERSEN, W. R.; FAIRBANKS, D. J. **Molecular markers: Important tools for plant genetic resource characterization**. *Diversity* 6 (3,40): 51-53. 1990.

ARAGÓN, L. E. **Educação, Ciências e Tecnologia: Bases para o desenvolvimento sustentável da Amazônia**. Associação de Universidades Amazônicas, UNESCO, Belém, 1997.

BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. **Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification**. *Heredity* v.73,p.117-123, 1994.

BECKMANN, J.S. **Genomic Genetics**. Agricultural Research Organization, The Valcani Center, Bet Dagan, Israeli, n^o 2658-E. Series. 15 pages. 1989.

BLOTT, S. C.; WILLIAMS, J. L.; HALEY, C. S. Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity*, v.82, n.6, p. 613-619, 1999.

CARRER, C.da C. Avaliação do crescimento da estrutiocultura no Brasil. **Anuário da ACAB**, Dezembro, 2005.

CARRER, C.da C. Os desafios do mercado de avestruzes no Brasil. **A Lavoura**, Dezembro, 2003.

CARRER, C.da C. et al. **A Criação de Avestruzes no Brasil**. Pirassununga. São Paulo: C. C. Carrer, 1999.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL – Aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos**. Versão 2004. 2.1. Viçosa, MG: UFV, 2004.

FAIRBANKS, D. J.; ANDERSEN, W. R.; MAUGHAM, P. J. **Analyses for biological resource characterization**. a laboratory manual. Provo, Utah: Brigham Young University, 27 p.1991.

- FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.220p.
- FERREIRA, S. F. **Seleção de primers para análise RAPD (Polimorfismos de DNA Amplificados ao acaso) em avestruzes (*Struthio camelus*)**. Trabalho de conclusão de curso – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, 2004.
- GARCIA, M. N. Nutrição de Avestruzes. **I Seminário Paulista de Estrutociultura. I Encontro ABRE de Pesquisas e Estudos Direcionados a Estrutociultura**. São Paulo, 2001.
- GIBSON, J. P.; SMITH, C. **The incorporation of biotechnologies into animal breeding strategies**. In: Moo-Young, M.; Babink, L. A.; Philips, J. P. *Animal Biotechnology: Comprehensive Biotechnology*. First Supplement. 1 st ed. 204-231. 1989.
- GIMENEZ, D. L.; MOTA, L. S. L. S.; CURI, R. A.; ROSA, G. J. M.; GIMENES, M.A.; LOPES, C. R.; LUCCA, E. J. de. Cytogenetic and molecular analysis of a european wild boar *Sus scrofa scrofa* and domestic swine *Sus scrofa domesticus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, n.2, 2003.
- GODOY, L. C.; CARDOZO, R. M.; MORAES, G. V. Avaliação de diversidade genética em subespécies e cruzamento de avestruzes (*Struthio camelus*) com o uso de marcadores RAPD. **Animal Sciences**, v. 27, no. 2, p. 199-206, Abr./Jun, 2005.
- HETZEL, D. J. S. **The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species**. *Genomics* 10:654-660, 1995.
- HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. **Molecular Systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996.
- HU, J.; QUIROS, C.F. **Identification of broccoli and cauliflower cultivar with RAPD markes**. *Plant Cell Reports*. v.10, 505-511p. 1991.

- KANTANEN, J.; OLSAKER, L. I.; ADALSTAINSSON, S.; SANDBERG, K.; EYTHORSDDOTTIR, E.; PIRHONEN, K. HOLM, L-E. Temporal changes in genetic variation of north European cattle breeds. ***Animal Genetics***, v.30, n.1, p. 16-28, 1999.
- KORNEFELD, M. E. **Curso de Criação de Avestruzes**. Copyright Brasil Ostrich, p 9-11, 72p, 2001.
- KREIBICH, A. & SOMMER, M. **Ostrich Farm Management**, Germany, 1995.
- KRUSKAL, J.B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a no metric hypothesis. ***Psychometrika***, Williamsburg, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964.
- LANDERGREN, U. **Molecular mechanics of nucleic acid sequence amplification**. T.I.G. v.9, n.6, p.199-204,1993.
- LEDDUR, M. C.; SCHIMIDT, G. S. **Genética molecular na avicultura**. Embrapa, Concórdia, 1998. Disponível em < <http://www.bichoonline.com.br/artigos.htm>> acesso em 10 de dezembro de 2006.
- LUCHINI, L. COSTA, M. **A hora é do Avestruz**. A Lavoura. Edição especial-Centenário da SNA. Congresso de Agrobusiness e Destaques A Lavoura. Ano 100. No 624, Março. 1998.
- MARQUES, J. R. F.; COSTA, M. R.; FERREIRA, S. F.; MAIA, P. H. S.; CAMARGO, R. N. Jr. Similaridade genética em grupos de avestruzes (*Struthio camelus*) na amazônia. ***Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento***, v.7, n. 33, Jul/Dez, 2004.
- MILACH, S. C. K.; RINES, H. W.; PHILLIPS, R. L. **Molecular genetic mapping of dwarfing genes in oat**. Theoretical and Applied Genetics, v.95, p.783-790, 1997.
- MOMMENS, G.; PEELMAN, L. J.; VANZEVEEREN, A.; IETEREN, G. D.; WISSOCQ, N. Microsatellite variation between an African and five European taurine breeds results in a geographical phylogenetic tree with a bison outgroup. ***Journal of animal breeding and genetics***, v.116, n.5, p.325-330, 1999.

- NAGAMINE, H. Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers. **Journal of animal breeding and genetics**, v.118, n.2, p.101-109, 2001.
- NITHACK, A. L. **Estruticultura. Uma opção de criação.** Revista brasileira de agropecuária. Ano II, no. 16, p. 6-19, São Paulo, 2001.
- OLIVEIRA, M. do S. P. de. **Caracterização molecular e morfo-agronômica de germoplasma de açaizeiro.** Tese (Doutorado em Agronomia) – Centro de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal de Lavras, 2005.
- OLIVEIRA, P.P. de. **Plumas- curiosidades e cuidados durante a produção.** Struthio e Cultura. Ano II, No 06. Jun/Ago-2003.
- PIGEM, N. B. **Desarrollo de marcadores moleculares em el avestruz (*Struthio camelus*).** Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade Autônoma de Barcelona, Faculdade de Veterinária, 2001.
- POLLASTRI, J. R. R. **Marcadores moleculares.** UFV, 2002.
- POVH, J. A.; MOREIRA, H. L. M.; RIBEIRO, R. P.; PRIOLI, A. J.; VARGAS, L.; BLANCK, D. V.; GASPARINO, E.; STREIT, D. P. Jr. Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Animal Sciences**, v. 27, no. 1, p. 1-10, Jan./Mar, 2005.
- RANGEL, P. N.; ZUCCHI, M. I.; FERREIRA, M. E. **Similaridade genética entre raças bovinas brasileiras.** **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.39, n.1, Janeiro, 2004.
- RITZ, L. R. *et al.* Phylogenetics analysis of the tribe bovini using microsatellites. **Animal genetics**. V.31, n.3, p.178-185, 2000.
- ROSATO, Y. B. *et al.* Diagnóstico molecular de doenças em plantas: detecção de fitopatógenos bacterianos. *In*: SERAFINI, L. A. *et al.* (Ed)**Biotecnologia: avanços na agricultura e agroindústria.** Caxias do Sul: EDUCS, 2002, cap. 3, p. 71-100.
- ROTTA, D.M. *et al.* **Manejo de Avestruzes :da cria à produção.** Poços de Caldas-Minas Gerais, 2004.

- RUANE, J. A critical review of the value of genetic distance studies in conservation of animal genetic resources. **Jornal of animal breeding and genetics**, v.116, n. 5, p. 317-323, 1999.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.; HIGUCHI, R. H.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ELRICH, H. A. **Primer – detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**. Science, v.239, p.487-491, 1988.
- SAMUA. Comercial e agropecuária. **Criação comercial de avestruzes**. <http://www.samua.com.br>. Araraquara. São Paulo. 2006.
- SCHEIDELER, S. E. **Nutrition guidelines for ostriches and emus**. Iowa state university, Janeiro, 1997.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin**: a software for population genetics data analysis, version 2.000. Switzerland: University of Geneva. Genetics and Biometry Laboratory, 2000.
- SOUTO, E. R.; TESSMAN, D. J.; NUNES, W. M. C. **Métodos de PCR aplicados à fitopatologia**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 33., 27p Belém, PA. 2000.
- SOUZA, J. D. S. **Criação de avestruz**. 210 pág. Editora aprenda fácil. Viçosa. 2004.
- SPRITZE, A.; EGITO, A. A.; MARIANTE, A. da S.; MCMANUS, C. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.38, n.10, Outubro, 2003.
- TAGUCHI, V. **Estruticultura. Organizando o mercado**. Escala Rural, Ano III, no. 22, p 42-45. São Paulo, 2002.
- TELLES, M. P. C.; JÁCOMO, A. T. de A.; SILVEIRA, L. Avaliação do padrão de amplificação de marcadores RAPD. **Ciência Animal Brasileira**, v.4, n. 1, p. 7-14, jan./jun. 2003.
- TELLES, M. P. C.; MONTEIRO, M. S. R.; RODRIGUES, F. M.; SOARES, T. N.; RESENDE, L. V.; AMARAL, A. das G.; MARRA, P. R. Marcadores rapd na análise da divergência genética entre raças de bovinos e número de *locos* necessários para a estabilidade da divergência estimada. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 87-95, jul./dez. 2001.

TORRICO, R. **Avestruz conquista espaço no campo**. Panorâma Rural. Ano IV, No 53. Jul/2003.

ULLOA, J. L. **Carne de avestruz, alternative de alimentación**. Gaceta universitária, outubro, 1998.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. **Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers**. Nucleic Acids Reserch 19 (4): 861-866.1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. **DNA polymorphisms amplified by arbitry primers are usful as genetic markers**. Nucleic Acids Research, v.18, n.9, p. 6531-6535, 1990.

www.acab.org.br. 2007, 19 de Janeiro. Estrutiocultura.acab@acab.org.br

ANEXOS

1 – Brometo de etídio (10 mg/ml)

Adicionar 1 g de brometo de etídio a 100 ml de água estéril. Agitar vigorosamente em agitador magnético por várias horas, até ter certeza de que o corante esteja dissolvido. Armazenar a temperatura ambiente em recipiente de cor escura ou envolvido em folha de alumínio.

Diluição do Brometo de etídio 10mg/ml para 1 mg/μl.

Obs: o brometo de etídio é um poderoso mutagênico e moderadamente tóxico. Durante o uso deste produto ou soluções que o contenha, é recomendável o uso de luvas e máscaras. Após o uso deste produto todos os recipientes devem ser descontaminados utilizando-se métodos apropriados

2 – Bromophenol blue (Azul de bromofenol) – Tampão de carregamento (10 ml)

Adicionar 0,042 g de azul de bromofenol a 7,0 ml de TAE 1x e 3,0 ml de glicerol. Estocar à temperatura ambiente.

3 – Clorofórmio : Álcool Isoamil (24:1)

Juntar 24 partes de Clorofórmio a uma parte de Álcool isoamil.

4 – DNA Padrão (Solução de trabalho)

Juntar 7,0 μl do DNA ladder, 97 μl de TE pH 8,0 e 100 μl do tampão de carregamento. Armazenar a -20 °C.

5 – dNTPs (Deoxyribonucleoside triphosphates) 10 mM – 500 μl

Diluir 50 μl de cada dNTP em 450 μl de água estéril para obter a solução estoque de 10 mM de cada dNTP. Armazenar a -20 °C.

6 – dNTPs (Deoxyribonucleoside triphosphates) 1 mM – 1000 μl

Para obter a solução de trabalho na concentração de 1 mM dos quatro nucleotídeos juntos, deve-se juntar 100 μl da solução diluída 10 mM de cada dNTP a 600 μl de água estéril. Armazenar a -20 °C.

7 – Proteínase K – 50 μg/ml –Estoque – 20 mg/ml

A quantidade de tampão a ser usada na diluição é obtida pela fórmula: $(T \times \text{CFP}) / (\text{CIP} \times 10^3)$. Onde:

T= Volume do tampão a ser usado (N° amostras \times 700 + 10%)

CFP= Concentração final da proteínase (50 $\mu\text{g/ml}$)

CIP= Concentração inicial da proteínase (20 mg/ml)

8 – Ribonuclease A 10 mg/ml – 1ml (Solução estoque)

Dissolver 10 mg de RNase A em 1,0 ml de acetato de sódio 0,01 M (pH 5,2). Ajustar o pH para 7,4 adicionando Tris HCl 1 M pH 8,0 (TE). Aquecer até 100 °C por 15 minutos. Deixar esfriar lentamente à temperatura ambiente. Dividir em alíquotas e armazenar a -20 °C.

9 – Ribonuclease A 10 $\mu\text{g/ml}$ em tampão TE – 1 ml

Juntar 10 μl de Tris HCl 1 M pH 8,0, 2 μl de EDTA 0,5 M pH 8,0, 1 μl de RNase (10 mg/ml) e 987 μl de água estéril. Armazenar a 4 °C.

10 – Solução de EDTA 0,5 M - pH 8,0 (1,0 litro)

Adicionar 186,1 g de dissodium ethylenediaminetetra-acetate $2\text{H}_2\text{O}$ (EDTA) a 800 ml de água estéril. Agitar vigorosamente em agitador magnético. Mantendo a solução sobre o agitador magnético, ajustar o pH para 8,0 com a adição de NaOH (aproximadamente 20 g de NaOH peletizado). O sal dissódico EDTA não dissolve enquanto o pH da solução não se aproximar de 8,0. Dividir o volume em vasilhames de 250 ml, esterilizar por autoclavagem e armazenar a 4 °C.

11 – Solução de NaCl 5M (1,0 litro)

Dissolver 292,2 g de NaCl em 800 ml de água estéril. Ajustar o volume para 1 litro com água estéril. Dividir o volume em vasilhames de 250 ml, esterilizar através de autoclavagem e armazenar a 4 °C.

12 – Solução de SDS 10 % (100ml)

Juntar 10 g de SDS em 50 ml de água estéril, levar para homogeneizar na barra magnética. Completar o volume e autoclavar. Armazenar a 4 °C.

13 – Solução de Tris – HCL 1 M (1,0 litro)

Dissolver 121,1 g de Tris base em 800 ml de água estéril. Ajustar o pH para 8,0 adicionando aos poucos aproximadamente 42 ml de HCl concentrado. Aguardar a solução esfriar até a temperatura ambiente antes de fazer o ajuste final do pH. Ajustar o volume da solução para 1,0 litro com água estéril. Dividir o volume em vasilhames de 250 ml e esterilizar por autoclavagem. Armazenar à temperatura ambiente.

Ao final, se a solução apresentar-se com coloração amarelada, deve-se descartar e obter Tris de melhor qualidade.

Alguns eletrodos não medem o pH de Tris com precisão, é ideal comparar as medidas com outros eletrodos a fim de detectar aquele com maior confiabilidade.

O pH da solução de Tris é dependente da temperatura e decresce aproximadamente 0,03 unidades com pH para cada aumento de 1 °C de temperatura. Por exemplo: Uma solução de 0,05 Molar tem valores de pH 9,5, 8,9 e 8,6 a 5 °C, 25 °C e 37 °C, respectivamente.

14 – TBE (Tris bórico) 5X (1,0 litro) – (solução estoque)

Dissolver em água estéril 54 g de Tris-base (PM 121,1), 27,5 g de ácido bórico e 20 ml de EDTA 0,5 M (pH = 8,0). Completar o volume para 1000 ml e armazenar à temperatura ambiente.

15 – TBE (Tris bórico) 1X (1,0 litro) – (solução de trabalho)

Diluir 200 ml de solução estoque 5X em 800 ml de água estéril. Armazenar à temperatura ambiente ou a 4 °C para um período mais longo.