

Avaliação de diversidade genética em subespécies e cruzamento de avestruzes (*Struthio camelus*) com o uso de marcadores RAPD

Lisandra Cunha Godoy*, Rejane Machado Cardozo e Gentil Vanini de Moraes

Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência. e-mail: lisandragodoy@yahoo.com.br

RESUMO. Na estruicultura as ligações entre características físicas e desempenho precisam de investigação adicional e as informações sobre diversidade genética são mínimas. Portanto, o presente trabalho representa um importante passo em estudos de genética de avestruzes. Foram coletadas amostras de sangue de 30 animais, machos e fêmeas, das subespécies Blue Neck, African Black e do cruzamento Red Blue (Red Neck X Blue Neck), para extração de DNA. Após amplificação, 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 de subespécies através do coeficiente de Nei. Os resultados alcançados demonstraram baixa similaridade e alta diversidade genética 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 o cruzamento Red Blue ficaram próximos da significância, sugerindo uma maior diversidade genética entre elas.

Palavras-chave: avestruzes, Blue Neck, African Black, Red Blue, RAPD, diversidade genética.

ABSTRACT. Evaluation of genetic diversity in subspecies and crossing of ostriches (*Struthio camelus*) with the use of RAPD markers. Concerning Strutioculture, the links between physical characteristics and performance need additional study, and, the pieces of information on genetic variability are minima. Therefore, the current work represents an important step in studies of ostrich genetics. Blood samples of 30 animals were collected, males and females, of the sub species Blue Neck, African Black and the crossing Red Blue (Red Neck X Blue Neck), to DNA extraction. After amplification, the products were analyzed and interpreted through the RAPD technique, providing data of genetic similarity among the individuals with the use of Jaccard coefficient, and data of genetic distance among sub species and genetic diversity within the sub species through the Nei coefficient. The obtained results demonstrated low similarity and high genetic diversity among analyzed individuals of each sub specie, however the genetic distances among the sub species were not significant, indicating that there was no genetic differentiation among the subspecies. The values of genetic differentiation between the sub specie Blue Neck and the crossing Red Blue were next to the significance, suggesting a bigger genetic diversity between these sub species.

Key words: ostriches, Blue Neck, African Black, Red Blue, RAPD, genetic diversity.

Introdução

O avestruz está ganhando cada vez mais interesse como um animal de criação, devido ao seu potencial de produzir carne vermelha saudável, com um baixo teor de gordura (Cooper e Horbańczuk, 2002).

A criação comercial de avestruzes é denominada Estruicultura, proveniente do seu nome de origem *Struthio camelus*. No meio comercial, o avestruz está classificado em três raças: Red Neck, Blue Neck e

African black, este último originário do cruzamento de três subespécies (*australis*, *camelus* e *syriacus*). Essa classificação das raças se baseia na coloração da pele dos animais adultos, pois todos apresentam a mesma coloração de plumas.

Segundo Luchini (1999), citado por Caprio e Carrer (1999), há muita discussão sobre as vantagens de uma raça sobre as outras, mas hoje não se pode afirmar que uma raça seja, em absoluto, superior às

outras. Cada raça apresenta vantagens e desvantagens.

Na estrutuicultura, as ligações entre características físicas e desempenho precisam de investigação adicional (Huchzermeyer, 2000).

Um programa científico de avaliação de rebanhos permite a separação de efeitos de resultado de origem genética daqueles de origem ambiental, possibilitando uma adequada identificação de reprodutores e de matrizes a serem utilizados para a multiplicação do rebanho comercial de avestruzes (Caprio e Carrer, 1999). Neto e Bered (1998) citam que, para a obtenção eficiente de ganhos genéticos, é necessário um conhecimento detalhado da constituição e da variabilidade genéticas das espécies.

A genética genômica, por meio de utilização de técnicas moleculares, permite a identificação de pontos de referência no DNA, denominados marcadores genéticos. Diversas técnicas estão disponíveis para detecção da variabilidade genética na seqüência de DNA, identificando polimorfismos existentes. A tecnologia do DNA recombinante e a reação em cadeia da polimerase (PCR) são as ferramentas básicas para a detecção dos marcadores genéticos (Faria *et al.*, 2000).

O marcador genético serve para relacionar, favoravelmente, alelos de características quantitativas identificadas no mesmo cromossomo e sua detecção propicia informações sobre o modo de ação gênica individual e suas interações, auxiliando na compreensão da variação quantitativa e sua utilização prática na produtividade animal (Faria *et al.*, 1999).

A importância de raças individuais é complementar e não-excludente dos objetivos para a formação de rebanhos com altos índices de produtividade, atendendo às necessidades futuras do mercado consumidor e da estrutuicultura brasileira. O progresso genético do rebanho nacional será muito mais rápido e satisfatório, se a resposta produtiva dos genótipos disseminados for devidamente mensurada e efetivamente selecionada ao nosso ambiente (Caprio e Carrer, 1999).

O uso de técnicas moleculares permite identificar o polimorfismo diretamente do DNA e associar a genes de grande efeito (caracteres qualitativos). A associação de diferentes fenótipos tem sido utilizada há longo tempo nos programas de melhoramento. Entretanto, com marcadores moleculares, será possível ter, para cada gene de grande efeito, um ou mais marcadores que podem ser utilizados para a identificação do fenótipo desejado (Federizzi, 1998).

As tecnologias de marcadores moleculares ou genéticos são vistas como as de maior promessa para

uso no melhoramento genético. 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 e Schmidt, 1998).

Prioli *et al.* (1999), citam que o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é um método rápido e eficiente para se conduzir estudos de análise genética de populações e na detecção de variação genética em espécies e populações de diversos organismos.

A técnica de RAPD tornou-se amplamente utilizada para identificação de marcadores genéticos associados a determinados fenótipos, para estudos de diversidade genética, assim como para identificação de organismos e na resolução de grupos taxonômicos (Rosato *et al.*, 2002).

Com base nesses estudos, o objetivo deste experimento foi a avaliação da diversidade genética em duas subespécies de avestruzes encontradas na estrutuicultura (African Black e Blue Neck) e no cruzamento "Red Blue" (Red Neck X Blue Neck) com a utilização de marcadores moleculares RAPD.

Material e métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução e Biotecnologia do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná.

O experimento foi conduzido com avestruzes adultos de 12 a 18 meses (5 machos e 5 fêmeas de cada subespécie e cruzamento) do criatório Reino do Avestruz, localizado no município de Bofete, Estado de São Paulo.

Amostras de sangue (5 mL) da veia braquial da asa desses avestruzes foram coletadas usando-se tubos a vácuo - "vacutainer", contendo anticoagulante citrato de sódio. Para a extração e a purificação do DNA das amostras, utilizou-se o protocolo de Sharma *et al.* (2000), adaptado.

As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria (comprimento de onda de 260 nm) e padronizadas para 20 ng/µL.

A integridade do DNA extraído foi analisada através de eletroforese em gel de agarose (0,7%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão TBE 1X (Tris, Ácido Bórico e EDTA), com tempo de corrida de 40 minutos a 75 V.

Para comparação de DNA das amostras através da técnica de RAPD, utilizou-se uma mistura de reação com um volume total de 25 µl: 1 µl de DNA (20 ng), 2,5 µl de dNTPs (0,2 mM), 1 µl de primer (100 mM), 0,75 µl de Mg²⁺ (1,5 mM), 0,2 µl de Taq polimerase - 5 U/µl, 2,5 µl de tampão PCR (20 mM

Tris-HCl pH 8,0; 50 mM KCl) e água ultra pura (autoclavada) para completar o volume.

As amostras de DNA e um controle negativo (sem DNA) foram amplificadas via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em um termociclador "Mastercycler Gradient Eppendorf[®]", utilizando-se as seguintes temperaturas para amplificação: 1) 5 minutos a 95°C (desnaturação do DNA), 2) 2 minutos a 94°C, 3) 1 minuto a 36°C (anelamento do *primer*), 4) 2 minutos a 72°C, sendo as etapas dois a quatro repetidas 40 vezes, e, para completar a extensão, uma etapa final de cinco minutos a 72°C.

Foram testados 18 *primers* (%GC – 60% a 70%) fornecidos pela "Invitrogen Brasil", dos quais foram selecionadas 7, de acordo com a nitidez das bandas produzidas.

Para a visualização dos fragmentos de DNA, foram aplicados 10 µl do produto amplificado mais 2 µl de tampão de amostra em gel de poli-acrilamida 6% (com uma solução de Acrilamida/bis-acrilamida 29:1); esse material foi submetido à corrida eletroforética em cuba vertical a 100 V por 16 horas. Para a visualização das bandas, o gel foi corado com nitrato de prata (Bassan *et al.*, 1991). Os fragmentos gerados foram analisados para se estimar seus tamanhos em pares de base por comparação com um marcador padrão (øX174DNA/*HaeIII* – Gibco BRL[®]).

Foram realizadas análises dos padrões de RAPD para cada indivíduo. Foi atribuído escore um (1) se a banda estivesse presente e zero (0), se ausente. Através desses escores, obteve-se uma matriz binária que foi utilizada para o cálculo dos coeficientes de similaridade. O índice de similaridade genética (identidade) entre indivíduos foi calculado pelo coeficiente de Jaccard, através da fórmula:

$$S_{ij} = a / a + b + c$$

onde a é o número de *locos* comuns às subespécies i e j, enquanto b e c são os números de *locos* presentes apenas em cada uma das subespécies. Valores de S_{ij} próximos a 1,0, indicam elevada semelhança genética entre subespécies.

A matriz de similaridade foi utilizada para construir os dendrogramas, usando o método de análises de grupo-pareada não-ponderada (UPGMA - *Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*) (Sneath e Sokal, 1973, citados por Avise, 1994).

O aplicativo computacional utilizado para se determinar o grau de similaridade de jaccard existente entre as amostras foi o "NTSYS" (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*).

Para comparação de dados, utilizou-se também o aplicativo computacional POPGENE32 que, através do coeficiente de Nei (1978), forneceu resultados de diversidade genética em cada subespécie, identidade e distância genética entre subespécies. Obteve-se, com esses dados, outro dendrograma UPGMA.

Resultados e discussão

O protocolo de extração de DNA foi adaptado a fim de se obter maior quantidade de sobrenadante sem impurezas, resultando, dessa forma, em uma melhor qualidade de DNA extraído. Isso foi confirmado através de espectrofotometria e checagem de integridade em gel de agarose.

A concentração de DNA genômico é a variável mais importante a ser padronizada. O excesso de DNA pode reduzir ou inibir a atividade de polimerização da enzima Taq polimerase, devido à altas concentrações de impurezas, resultando na ausência de amplificação. Por outro lado, o DNA em concentração muito baixa pode dar origem a padrões de amplificação não-reprodutíveis, podendo ocorrer acréscimo ou diminuição de bandas, mesmo entre repetições (Fungaro, 2002).

Os 7 *primers* selecionados, dos 18 *primers* testados, produziram um total de 50 *locos*, dos quais 42 foram polimórficos. O número de *locos* gerados por *primer* variou de 4 a 14 e o tamanho dos fragmentos amplificados variou de 215 a 1360 pb (Tabela 1). Esses *primers* geraram um total de 84% de polimorfismo, alcançando, assim, um alto grau de polimorfismo entre os indivíduos analisados.

Bouzat (2001), pesquisando a estrutura genética de Emas (*Rhea americana*), com marcadores RAPD, encontrou um total de 54 *locos* polimórficos utilizando 18 *primers*. Mesmo com a utilização de um maior número de *primers*, o número de *locos* polimórficos encontrados foi proporcionalmente inferior ao encontrado no presente trabalho.

Tabela 1. Número de *locos* detectados, número de *locos* polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados.

Primers	Seqüência	N.º de <i>locos</i> detectados	N.º de <i>locos</i> polimórficos	Tamanho dos fragmentos
C05	CAG GCC CTT C	6	4	234 - 740
C06	TGC CGA GCT G	8	6	271 - 700
C07	AGT CAG CCA C	4	3	215 - 480
C08	AAT CGG GCT G	5	3	380 - 630
C12	GTG ACG TAG G	14	14	250 - 1360
D01	GGG TAA CGC C	4	3	250 - 603
D07	TTC CGA ACC C	9	9	330 - 690

Os *primers* selecionados produziram diferentes padrões de bandas, mas, com exceção do *primer* C12, amplificaram fragmentos de tamanhos inferiores a 750 pb.

O *primer* C05 amplificou dois *loci* 100% monomórficos (Figura 1), ou seja, as bandas com tamanho estimado de 500 pb e 740 pb, foram constatadas em todos os indivíduos, o que, com auxílio de investigação adicional, poderá representar um marcador para a espécie.

O crescente marketing mundial de incentivo ao consumo de carne de avestruzes estimula a necessidade de se proteger o consumidor de possíveis adulterações fraudulentas, como a venda de carnes de valores menos estimados, como a carne de Emu (Colombo et al., 2000), o que ressalta a importância de se selecionar *primers* que diferenciem o avestruz de outras espécies que possuam carne semelhante a essa espécie. Martinez e Yman (1998) concluíram que marcadores RAPD identificam com habilidade diferentes espécies, amostras de diferentes origens e submetidas a diferentes condições de industrialização. Chai et al. (1997), utilizando o método RAPD para gerar padrões de impressão de DNA para diferentes espécies de aves (galinha doméstica, faisão, perdiz, pato local, pato do mallard, galinha d'angola, pombo, emu e avestruz), concluíram que esse método pode ser usado para discriminação entre essas aves.

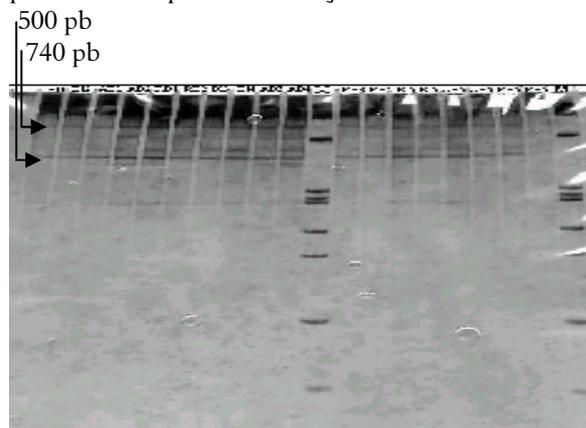


Figura 1. Perfil eletroforético de DNA de avestruzes machos e fêmeas (indicados por números ímpares e pares respectivamente) das subespécies Blue Neck (Bl) e African Black (AB), e do cruzamento Red Blue (RB), gerados pelo *primer* C05, através da técnica RAPD. O marcador \emptyset X 174 / *HaeIII*, utilizado para comparação do tamanho dos fragmentos, está indicado pela letra M.

O dendrograma obtido pelo método UPGMA, a partir da matriz de similaridade entre os indivíduos, está representado na Figura 2, observando-se um agrupamento em que indivíduos de diferentes subespécies e cruzamento aparecem misturados, não havendo o agrupamento dos indivíduos por subespécie ou cruzamento. Esse resultado sugere a não-

diferenciação genética entre as subespécies analisadas. Entretanto, os índices de similaridade entre os indivíduos agrupados não são altos, estando a maioria dos valores abaixo de 84% de similaridade genética entre indivíduos. Dentre esses, os indivíduos que mais se distanciaram dos grupos formados pertencem à subespécie African Black (AB2 e AB7), formando dois exogrupos. Nota-se uma tendência de agrupamentos com índices mais altos de similaridade entre indivíduos African Black e Blue Neck, sugerindo uma maior proximidade genética entre essas subespécies.

Wu et al. (2002), analisando variação genética em populações de cativo de Jacaré Chinês com a técnica RAPD, obtiveram resultados em que indivíduos de diferentes subpopulações foram agrupados e, embora tenham aparecido separados em alguns pontos do dendrograma, não revelaram diferenciação genética entre eles. Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho, uma vez que indivíduos de diferentes subespécies também não foram agrupados separadamente. No entanto constatou-se variabilidade genética entre os indivíduos, obtendo-se um maior número de agrupamentos com índices de similaridade abaixo de 84% e uma relação entre esses grupos de, no máximo, 65% de similaridade aproximadamente.

Koh et al. (1999), pesquisando diversidade genética entre variedades selvagens e cultivadas de peixes *Discus* (*Symphysodon* spp.), observaram que os indivíduos de cada uma das variedades cultivadas não foram agrupados firmemente (no dendrograma UPGMA) com outros indivíduos da mesma variedade, indicando a falta de uma base genética para a classificação atual dessas variedades, que está baseada apenas em fenótipos. O mesmo ocorre na classificação comercial de subespécies de avestruzes, em que 5 subespécies estão agrupadas em apenas 2 (Blue Neck e Red Neck) com base na coloração da pele dos animais, ou seja, classificação baseada em características fenotípicas. Esse é um fator que dificulta o desenvolvimento de estudos de diversidade genética em criações de avestruzes, devido à não-especificidade das subespécies adquiridas pelos criatórios. Com isso, o que se analisa é a relação genética entre as raças comerciais e não entre as reais subespécies. Os resultados deste trabalho reforçam essa afirmação, observando-se uma alta diversidade genética entre indivíduos de uma mesma subespécie e uma maior proximidade entre indivíduos de diferentes subespécies e cruzamento analisados. Dessa forma, os resultados obtidos indicam a ocorrência da análise de indivíduos classificados em uma única subespécie, mas pertencentes a diferentes subespécies ou cruzamentos. Por exemplo, indivíduos "Blue Neck" pertencentes à subespécie *S.c. molybdophanes*, e à subespécie *S.c. australis*, ou oriundos de cruzamentos entre essas, o que seria mais provável, pois, segundo

Pigem (2001), das subespécies existentes atualmente, somente se encontram em “pureza” populações mantidas relativamente isoladas durante muito tempo e que tenham sido protegidas da hibridização com outras subespécies para a conservação de sua identidade genética.

Figura 2. Dendrograma obtido pelo método UPGMA, através do coeficiente de Jaccard para avestruzes machos (números ímpares) e fêmeas (números pares) das subespécies Blue Neck (B11 a B110) e African Black (AB1 a AB10) e do cruzamento Red Blue (RB1 a RB10).

Os índices de similaridade entre indivíduos Blue Neck variaram de 0,500 a 0,875 com uma média de 0,694 e um desvio padrão de 0,09. Para indivíduos African Black, os índices de similaridade variaram de 0,423 a 0,857 com média de 0,613 e desvio padrão 0,11. A média de similaridades entre indivíduos Red Blue foi 0,672 (desvio padrão = 0,07) com índices variando de 0,522 a 0,818.

Esses resultados demonstram uma menor similaridade entre indivíduos da subespécie African Black, o que pode estar associado ao fato de que essa subespécie possui, em seu histórico genético, um maior número de subespécies envolvidas em sua origem (cruzamento de três subespécies - *australis*, *camelus* e *syriacus*), ou seja, uma maior variabilidade genética em sua formação.

Em agrupamentos individuais, observou-se que machos e fêmeas não foram agrupados de formas distintas e constatou-se que o indivíduo AB7 (African Black) aparece mais distante dos outros indivíduos tanto entre como dentro de subespécies.

Para se alcançar um resultado de identidade e distância genética entre os grupos, ou seja, o agrupamento dos indivíduos em cada subespécie e cruzamento, utilizou-se o programa computacional POPGENE32 e obteve-se, através do coeficiente de Nei (1978), o dendrograma pelo método UPGMA (Figura 3) com as relações

entre as subespécies, e, índices de diversidade genética dentro de subespécies e dentro de cruzamento.

No dendrograma (Figura 3) obtido pelo coeficiente de Nei (1978) pode-se observar uma alta identidade genética, conseqüentemente, uma baixa distância genética entre as subespécies (Tabela 2), com uma maior correlação genética entre as subespécies (Blue Neck e African Black) e um maior distanciamento do cruzamento (Red Blue). Esse resultado comprova a proximidade genética encontrada entre as subespécies e cruzamento, através do coeficiente de Jaccard, tanto que esses não foram agrupados separadamente e sim misturados (Figura 2), bem como a maior proximidade entre as subespécies Blue Neck e African Black.

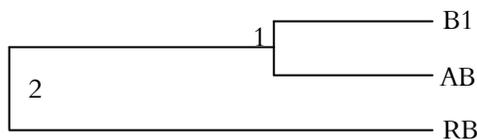


Figura 3. Dendrograma obtido pelo método UPGMA com a utilização do coeficiente de Nei (1978) pelo programa computacional POPGENE32 para as subespécies de avestruzes Blue Neck (B1), African Black (AB) e cruzamento Red Blue (RB).

Spritze *et al.* (2003), estudando caracterização genética de raças bovinas, utilizaram esses dois coeficientes (Jaccard e Nei) e, na comparação, também obtiveram resultados equivalentes.

Tabela 2. Distância (diagonal abaixo) e similaridade genética (diagonal acima) entre as subespécies de avestruzes Blue Neck, African Black e cruzamento Red Blue, obtidas pelo coeficiente de Nei (1978).

Subespécies	Blue Neck	African Black	Red Blue
Blue Neck	*****	0,9701	0,9221
African Black	0,0304	*****	0,9289
Red Blue	0,0811	0,0738	*****

Valores de G_{st} entre as subespécies (Tabela 3) foram obtidos e submetidos ao teste X^2 de significância. Os dados demonstraram que não houve diferença genética significativa entre as subespécies e cruzamento analisados; entretanto, a diferenciação genética entre a subespécie Blue Neck e o cruzamento Red Blue ficou muito próxima da significância, sugerindo uma maior diversidade genética entre elas. De fato, o cruzamento Red Blue aparece mais distante geneticamente da subespécie Blue Neck (Figura 3), e isso pode estar relacionado com uma maior similaridade existente entre este e a outra subespécie envolvida neste cruzamento, a subespécie Red Neck. Estudos comparando-se essas duas subespécies e esse cruzamento devem ser feitos para se comprovar o resultado aqui obtido.

Tabela 3. Resultados de G_{st} (abaixo da diagonal) e teste de χ^2 com 1 gL (acima da diagonal) para avaliar diferenciação genética entre as subespécies de avestruzes Blue Neck, African Black e cruzamento Red Blue, obtidas pelo coeficiente de Nei (1978).

Subespécies	Blue Neck	African Black	Red Blue
Blue Neck	*****	1,63ns*	3,12ns*
African Black	0,0814	*****	2,54ns*
Red Blue	0,1559	0,1268	*****

*Não significativo

Esses resultados encontrados são corroborados por estudos de Zhou *et al.* (2001), que mostraram uma baixa variabilidade genética entre as subespécies de avestruzes Blue Neck, African Black e o cruzamento Australia Grey. Além disso, em análise do gene do citocromo b do músculo de avestruzes, através do método RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), não se conseguiu detectar nenhuma diferença entre avestruzes Blue Neck e African Black nessa região (Abdulmawjood e Bülte, 2002). Ao longo da história da domesticação do avestruz, com a aparição de híbridos comerciais e seleção de animais para produção de plumas, carne e couro, a identidade genética dos animais domesticados se perdeu, por isso existe a necessidade de trabalhos visando a sua recuperação (Pigem, 2001).

No entanto, diferenças significativas entre subespécies de avestruzes são relatadas por Reiner (1995), principalmente na África do Sul, país que possui o maior plantel de avestruzes do mundo.

As médias de diversidade genética, dentro de subespécies, obtidas através do aplicativo POPGENE32, com a utilização do coeficiente de Nei foram: 0,208 (D.P.=0,19) para subespécie Blue Neck; 0,268 (D.P.=0,20) para subespécie African Black; e 0,223 (D.P.=0,21) para cruzamento Red Blue. A abordagem desse coeficiente é contrária ao coeficiente de Jaccard, pois analisa a diversidade existente entre os indivíduos de cada subespécie e não a similaridade, mas os resultados obtidos por ambos são compatíveis, já que a subespécie African Black foi a que obteve menor valor em similaridade e maior valor em diversidade genética dentro de subespécie. Sendo assim, podemos detectar maior divergência genética entre indivíduos da subespécie African Black.

Spritz *et al.* (2003), encontraram através desse coeficiente, valores de diversidade genética de 0,3154 para a raça de bovinos Criolo Lageano, 0,2437 para a raça Nelore e, 0,1204 para a Holandesa, utilizando, para análise, um total de 292 indivíduos, sendo 210 pertencentes à raça que apresentou maior diversidade genética. No presente trabalho, a subespécie que apresentou maior diversidade foi a African Black e, para se alcançar os resultados de diversidade genética, foram analisados 10 indivíduos

de cada subespécie, ou seja, um número bem menor de indivíduos comparado ao trabalho citado e, mesmo assim, alcançaram-se valores próximos de diversidade genética, o que indica uma alta diversidade genética entre os avestruzes analisados dentro de cada subespécie.

Exceto por testes iniciais feitos na África do Sul, muito pouco se sabe sobre o efeito do cruzamento entre as várias subespécies de avestruzes (Huchzermeyer, 2000). Portanto, os resultados deste trabalho reforçam a necessidade de prudência na realização desses cruzamentos, pois os valores obtidos demonstram uma maior diversidade genética dentro de subespécies, mas uma alta similaridade genética entre as subespécies, observando-se maior proximidade genética entre as subespécies African Black e Blue Neck.

A realização de exames de DNA em avestruzes para se estabelecer grau de parentesco ou diversidade genética pode auxiliar a evitar endogamia (Huchzermeyer, 2000), Sharma *et al.* (2000), afirmam que diversos estudos comprovam uma ampla região de aplicações de marcadores RAPD em criações de aves e que ele tem sido utilizado para estimar parentesco genético entre várias espécies de aves e variação genética entre e dentro de populações.

Avaliando a diversidade genética em galinhas, Romanov e Weigend (2001), concluíram que, apesar de certas limitações de aplicações e acurácia, marcadores moleculares RAPD, como ferramentas moleculares simples, possibilitam com bastante rapidez e custo mínimo a caracterização inicial da variação genética dentro e entre raças. Bártfai *et al.* (2003), na análise genética de duas linhagens de carpas comuns, citam que marcadores moleculares microssatélites revelaram informações mais detalhadas sobre diversidade genética do que marcadores RAPD.

Em conclusão, mesmo não sendo tão precisos quanto microssatélites, de acordo com Barmam (2003), marcadores RAPD são de grande utilidade para observações iniciais sobre variação genética em espécies em que pouca informação está disponível.

Conclusão

As bandas monomórficas amplificadas pelo primer C05 (500 pb e 740 pb) foram constatadas em todos os indivíduos, podendo representar um marcador para a espécie avestruz. Isso deve ser investigado, testando-se esse primer em outras espécies de aves e, até mesmo, em outros grupos taxonômicos como mamíferos e peixes.

A diversidade genética dentro de subespécies foi alta, sugerindo alta variabilidade genética entre os avestruzes analisados de cada subespécie.

Estudos com outros marcadores moleculares, como por exemplo microssatélites, ou até mesmo RAPD, utilizando-se um maior número de *primers* e um maior número de amostras, devem ser realizados e então comparados com os resultados obtidos no presente trabalho.

Em avestruzes as informações sobre diversidade genética são mínimas, fato que releva a importância deste trabalho como um importante passo em estudos de genética de avestruzes com a utilização de marcadores moleculares.

Referências

- ABDULMAWJOOD, A.; BÜLTE, M. Identification of ostrich meat by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis of cytochrome b gene. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 67, n. 5, p.1688-1691, 2002.
- AVISE, J.C. *Molecular markers, natural history and evolution*. New York: Chapman & Hall, 1994.
- BARMAN, H.K. *et al.* Genetic variation between for species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. *Aquaculture*, Orissa, v. 217, p.115-123, 2003.
- BÁRTFAI, R. *et al.* Genetic analysis of to common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, Singapore, v. 219, p.157-167, 2003.
- BASSAN, B.J. *et al.* Fast and sensitive silver staining of DNA polyacrylamide gels. *Academic Press*, v. 196, p.80-83, 1991.
- BOUZAT, J.L. The population genetic structure of the Greater Rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape. *Biol. Conserv.*, Bowling Green, v. 99, p. 277-284, 2001.
- CAPRIO, A.; CARRER, C.C. Genética e Melhoramento. In: CARRER, C.C.; KORNFIELD, M.E. (Ed.) *A criação de avestruzes no Brasil*. Pirassununga: Brasil Ostrich, 1999. cap. 1, p. 211-232.
- CHAI, K.M. *et al.* Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprint profiling of domestic and game birds. *Asia-Pacific J. Molec. Biol. Biotechnol.*, Singapore, v. 5, n. 3, p. 173-182, 1997.
- COLOMBO, F. *et al.* Differentiation of the species Ostrich (*Struthio camelus*) and Emu (*Dromaius novaehollandiae*) by polymerase chain reaction using an ostrich-specific primer pair. *Meat Sci.*, Milan, v. 56, p.15-17, 2000.
- COOPER, R.G.; HORBAŃCZUK, J.O. Anatomical and physiological characteristics of ostrich (*Struthio camelus* var. domesticus) meat determine its nutritional importance for man. *Anim. Sci. J.*, Leicester, v. 73, p. 167-173, 2002.
- FARIA, F.J.C., *et al.* Análise de polimorfismo do gene k-caseína em fêmeas da raça nelore e efeito sobre o peso à desmama de suas progênes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 51, n. 4, p. 377-382, 1999.
- FARIA, F.J.C. *et al.* Análise de polimorfismos do gene da β -lactoglobulina em vacas da raça nelore e efeitos sobre o peso à desmama de suas progênes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 52, n. 3, p. 261-265, 2000.
- FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S.C.K. (Ed.) *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: Sandra Milach, 1998. p. 3-15.
- FUNGARO, M.H.P. *Diagnóstico e Análise de Variabilidade*. Londrina, 2002. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/bio/bio14/14_c.htm> Acesso em: 23 jul. 2003.
- HUCHZERMEYER, F.W. *Doenças de avestruzes e outras ratitas*. Jaboticabal: Funep, 2000.
- KOH, T.L. *et al.* Genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of *Discus* (*Symphysodon* spp.) as revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Aquaculture*, Singapore, v.173, p. 485-497, 1999.
- LEDUR, M.C.; SCHMIDT, G.S. *Genética molecular na avicultura*. Embrapa, Concórdia, 1998. Disponível em: <<http://www.bichoonline.com.br/artigos.htm>> Acesso em: 17 ago. 2001.
- MARTINEZ, I.; YMAN, I.M. Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Res. Int.*, Tromso, v. 31, n. 6-7, p. 459-466, 1998.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, Bethesda, v. 89, p. 583-590, 1978.
- NETO, J.F.B.; BERED, F. Marcadores moleculares e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: MILACH, S.C.K. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: Sandra Milach, 1998. p. 29-40.
- PIGEM, N.B. *Desarrollo de marcadores moleculares en el avestruz (Struthio camelus)*. 2001. Tese (Doutorado)–Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, 2001.
- PRIOLI, S.M.A. *et al.* *Variabilidade e estrutura genética de populações naturais*. Componente Biótico Genética, Maringá, 1999. Disponível em: <http://www.peld.uem.br/relat2000/2_2_cmpbioticogenetica.pdf> Acesso em: 17 ago. 2001.
- REINER, G. Breeding and genetics. In: KREIBICH, A.; SOMMER, M. *Ostrich Farm Management*. Johannesburg: TOE-Consult, 1995. cap. 6, p. 71-92.
- ROMANOV, M.N.; WEIGEND, S. Using RAPD markers for assessment of genetic diversity in chickens. *Ach. Geflugelk.*, Stuttgart, v. 65, n. 4, p. 145-148, 2001.
- 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 na agroindústria*. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. cap. 3, p. 71-100.
- SHARMA, D. *et al.* Measurement of within and between population genetic variability in quails. *Br. Poult. Sci.*, London, v. 41, p. 29-32, 2000.

SPRITZE, A. *et al.* Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. *Pesq. Agropecu. Bras.*, Brasília, v. 38, n. 10, p. 1157-1164, 2003.

WU, X.B. *et al.* Genetic variation in captive population of chinese alligator, *Alligator sinensis*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Biol. Conserv.*, Nanjing, v. 106, p. 435-441, 2002.

ZHOU, X. *et al.* The study of molecular genetic markers on ostrich breeding. *Hereditas*, Beijing, v. 23, n. 5, p. 420-422, 2001.

Received on September 01, 2004.

Accepted on June 13, 2005.