

Diversidade genética entre três linhagens de codorna selecionadas para produção de ovos

[Genetic diversity among three lineages of quail, selected for egg production]

R.A. Prioli¹, E. Gasparino^{1*}, M.A.M. Soares², D.S. Marques¹, D.V. Blanck¹, S.M.A. Prioli³

¹Departamento de Zootécnica - UEM

Av. Colombo, 5790

87020-900 – Maringá, PR

²Departamento de Genética - UFRRJ – Seropédica, RJ

³Departamento de Biologia Celular e Genética - UEM – Maringá, PR

RESUMO

A diversidade genética entre três linhagens de codorna (*Coturnix japonica*) foi avaliada utilizando-se a técnica de *random amplified polymorphic DNA* (RAPD). As linhagens selecionadas para produção de ovos foram identificadas como amarela, azul e vermelha por meio de anilhas no pé esquerdo. Seis *primers* de RAPD amplificaram 55 *loci*, os quais geraram padrão de bandas intensa e reproduzível em gel de agarose. Os resultados indicaram polimorfismos dentro e entre as linhagens. A similaridade de Jaccard média e o índice de diversidade Shannon revelaram alta diversidade dentro das linhagens de codornas. O teste de Mantel por meio do algoritmo *unweighted pair-group method using arithmetic average* (UPGMA) e a dispersão de coordenadas principais indicaram diferenciação genética significativa, embora em baixo nível. Os resultados sugerem que a diversidade genética dentro e entre as linhagens de codornas da Universidade Estadual de Maringá são promissoras para uso em programas de melhoramento.

Palavras-chave: codorna, *Coturnix japonica*, diversidade genética, RAPD

ABSTRACT

The genetic diversity among three lineages of quail (*Coturnix japonica*) was evaluated by the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. The lineages were selected for egg production and identified with a yellow, blue, or red ring fasten on their left foot. Six selected RAPD primers amplified 55 loci, which generated intense and reproducible bands on agarose gel. The results indicated polymorphism within and among the lineages. The Jaccard similarity average and the Shannon diversity index revealed high diversity values within the quail lineages. The Mantel test, unweighted pair-group method using arithmetic average (UPGMA) algorithm and dispersion of principal coordinates indicated significant genetic differentiation, although at low levels. Overall, the results suggest that the genetic diversity within and among the quail lineages from the State Universidade Estadual de Maringá are promising for use in breeding programs.

Keywords: quail, *Coturnix japonica*, genetic diversity, RAPD

INTRODUÇÃO

O crescimento da coturnicultura no Brasil vem despertando a atenção de pesquisadores da área, no sentido de desenvolver trabalhos que contribuam para o aprimoramento e a fixação dessa cultura como fonte rentável na produção

avícola (Furlan et al., 1998). A coturnicultura brasileira é voltada principalmente para a produção de ovos, cujo produto é bem aceito pelos consumidores. A carne é considerada exótica, e o seu consumo ainda é pequeno devido ao preço alto para os padrões brasileiros.

Recebido em 4 de setembro de 2009

Aceito em 10 de junho de 2010

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: egasparino@uem.br

Desde a sua implantação como atividade avícola econômica, a coturnicultura tem encontrado barreiras que por vezes inviabilizam a exploração econômica. Uma dessas barreiras é a falta de material genético que garanta o potencial de produção. No Brasil, os programas de melhoramento genético de codorna são ainda incipientes. A prática corrente tem sido a reprodução do material genético disponível que, pela deficiência de controle e de esquema de seleção, sofre problemas de depressão pela consanguinidade, resultando em redução de postura, queda de fertilidade e aumento de mortalidade.

As metodologias moleculares têm auxiliado na compreensão das relações evolutivas e de taxonomia de uma ampla diversidade de animais e plantas, bem como auxiliado no estudo de divergência genética (Milligan et al, 1994; Fritsch e Rieseberg, 1996). Algumas dessas metodologias são utilizadas na busca de marcadores moleculares, que auxiliam no conhecimento dos padrões de variações genéticas inter e intrapopulacionais que podem ser utilizados como marcador de produção/reprodução, contribuindo para elaboração de estratégias em programas de melhoramento (seleção ou cruzamento). Entre as técnicas desenvolvidas estão a *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) e os microssatélites.

A técnica de RAPD baseia-se na amplificação de segmentos de DNA genômico a partir de oligonucleotídeos iniciadores curtos e aleatórios (Williams et al., 1990). A análise de variação de DNA por meio dessa técnica vem sendo aplicada, com sucesso, em diversas espécies, inclusive em codornas. A técnica RAPD tem sido usada para caracterizar *fingerprinting* de espécies de peixes e aves, e para genotipagem individual dentro das espécies, provando a eficiência e a sensibilidade desse método. Pode ainda ser usada para estimar variabilidade genética, parentesco e níveis de consanguinidade, identificar espécies ou linhagens, realizar análise de progênie e estabelecer estratégia econômica em peixes (Dinesh et al., 1993).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética existente entre três linhagens de codornas (*Coturnix japonica*), selecionadas para a produção de ovos.

MATERIAL E MÉTODOS

As codornas (*Coturnix japonica*) utilizadas pertencem ao programa de desenvolvimento de linhagens de codornas da Universidade Estadual de Maringá. Foram avaliadas três linhagens para postura, denominadas amarela, azul e vermelha, de acordo com a anilha de marcação usada para distingui-las. Para as avaliações genéticas, foram utilizados 20 animais de cada linhagem, sendo 10 machos e 10 fêmeas, totalizando 60 animais.

Amostras de DNA foram extraídas de células sanguíneas, utilizando-se o protocolo proposto por Regitano e Coutinho (2001), com modificações. Foi acrescentada uma lavagem com fenol, seguida de precipitação do DNA com sal e lavagem com álcool. O DNA obtido foi ressuspensionado em 50µL em tampão TE diluído (Tris 1mM, EDTA 0,1mM pH 8.0) contendo RNAase (20µg/mL). Alíquotas de DNA foram usadas para quantificação por comparação com quantidades conhecidas de DNA de fago λ, em gel de agarose 0,8%. Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas para 50ng/µL e armazenadas em *freezer* -20°C. O estoque concentrado foi armazenado em *freezer* -20°C para uso posterior.

Foram feitos testes com 15 *primers* RAPD (Operon Technologies Inc. Alameda, CA, USA). Os *primers* OPW-09, OPI-07, OPX-03, OPX-07, OPK-14 e OPE-06 apresentaram os melhores padrões de bandas e foram selecionados. A mistura de reação de amplificação de cada um dos *primers* selecionados consistiu de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20mM pH 8,4 e KCl 50mM), MgCl₂ 2mM, *primer* 0,46µM, dNTP 0,19mM, 1U/reação de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), DNA (10ng) e água suficiente para completar 13µL. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador MJ Research Inc. programado para 1 ciclo de 4min a 92°C, 40 ciclos de 1min a 92°C, 1min. 30s a 40°C e 2min a 72°C. Imediatamente após o último ciclo de amplificação, a mistura de reação foi mantida durante 5min a 72°C e resfriada durante 20min a 20°C. Controles negativos, sem molde de DNA, foram incluídos em cada reação em cadeia pela polimerase (PCR). Após cada amplificação, os produtos de PCR foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,4%. Os perfis eletroforéticos foram fotografados, sob luz ultravioleta (UV), com o sistema Kodak EDAS-

290. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram estimados por comparação com padrão *Ladder* 100pb (Invitrogen Life Technologies™).

O programa *Numerical taxonomy and multivariate analysis system* (NTSYS 1.7) (Rohlf, 1989) foi utilizado para obtenção da matriz de similaridade de Jaccard entre indivíduos, a partir da presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos (mesmos *loci*). O NTSYS também foi utilizado para realização de outros procedimentos, tendo como ponto de partida a matriz de similaridade de Jaccard. O teste de Mantel (1967) foi utilizado para a detecção de diferenciação genética entre as linhagens de codornas. Com este procedimento, foi testada a significância da correlação entre a matriz de complementos de Jaccard entre indivíduos e uma matriz modelo, construída com base nas linhagens dos pares de indivíduos (Rodrigues et al., 2002). O padrão de

divergência genética contido na matriz de similaridade de Jaccard foi representado graficamente, utilizando-se duas modalidades de análises multivariadas. Primeiramente, foi construído um dendrograma com o algoritmo de agrupamento *Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average* (UPGMA). Em uma análise de ordenação, foi construído um gráfico de dispersão em coordenadas principais. O índice de diversidade de Shannon (Zar, 1974) entre as linhagens foi estimado pelo programa computacional PopGene 1.31 (Yeh et al., 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Fig. 1, estão ilustrados os perfis eletroforéticos, obtidos com o *primer* OPE-06, de indivíduos das linhagens de codorna amarela e vermelha. Pode ser constatado o polimorfismo tanto dentro quanto entre as linhagens.

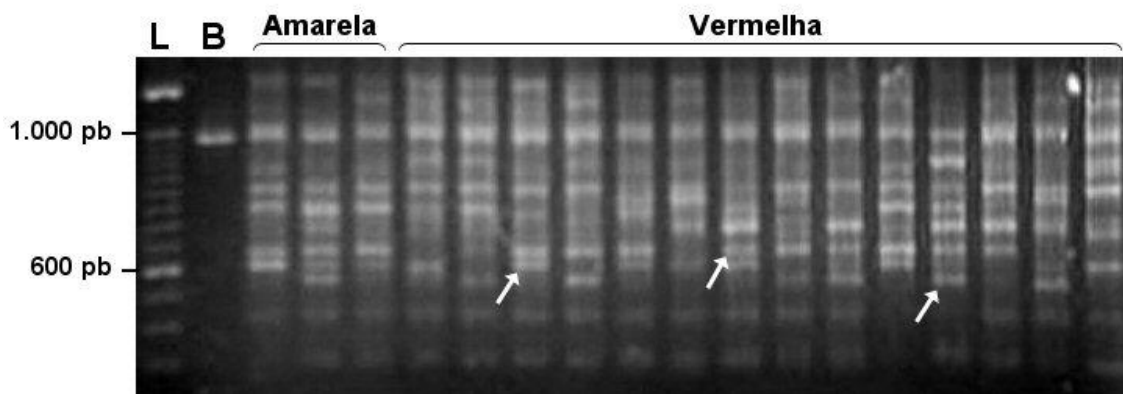


Figura 1. Perfis eletroforéticos, obtidos com o *primer* RAPD OPE-06, das linhagens amarela e vermelha de codornas. As setas indicam algumas bandas polimórficas. L, marcadores de peso molecular (*Ladder* 100bp). B, controle negativo, sem DNA.

Cada um dos *primers* selecionados amplificou de 4 a 16 fragmentos, de 230 a 2100pb. Para as análises, foram escolhidos 55 *loci* RAPD cujos fragmentos formaram bandas intensas (Tab. 1). Quando se consideram as três linhagens simultaneamente, desses 55 *loci* RAPD, 43 (78,2%) foram polimórficos e 12 (21,8%), monomórficos. Todos os *primers* produziram, pelo menos, um fragmento monomórfico quando se consideraram todas as linhagens simultaneamente. Por outro lado, nenhum *primer* produziu banda de DNA encontrada exclusivamente em uma das linhagens. A não ocorrência de bandas exclusivas é um indicativo

de que não há diferenciação acentuada entre as linhagens de codorna estudadas.

A diversidade dentro das linhagens foi quantificada pelo número de *loci* polimórficos, similaridade de Jaccard, e pelo índice de diversidade de Shannon. Na Tab. 1, está indicado que a frequência de *loci* polimórficos na linhagem amarela foi de 63,6%, enquanto as linhagens azul e vermelha apresentaram 70,9%. As menores estimativas do índice de diversidade de Shannon foram 0,36 para a linhagem amarela e 0,38 referente à azul, enquanto que para a linhagem vermelha esse índice foi de 0,41. As médias das estimativas dos coeficientes de

Diversidade genética entre três...

Jaccard dentro das linhagens são mostradas na Tab. 2. Os níveis de similaridade dentro das linhagens foram semelhantes, sendo que a amarela apresentou o maior coeficiente (0,70).

Quanto às similaridades intralinhagens, o menor coeficiente (0,61) foi observado entre as linhagens azul e vermelha, enquanto o maior (0,64).

Tabela 1. Quantidades e porcentagens de *loci* polimórficos e número aproximado de pares de bases dos fragmentos RAPD, amplificados com 11 *primers*, das linhagens amarela (Am), azul (Az) e vermelha (Vm) de codornas

Primer	Sequência (5'-3')	Nº de Loci	Nº Loci polimórficos			Nº Loci monomórficos			Pares de bases		
			Total	Linhagem			Total	Linhagem			
				Am	Az	Vm		Am		Az	Vm
OPI-07	CAGCGACAAG	9	8	6	7	8	1	3	2	1	350a 1500
OPW-09	GTGACCGAGT	8	6	6	6	6	2	2	2	2	230a 2100
OPX-03	TGGCGCCGTG	4	2	0	2	1	2	4	2	3	600a 2000
OPX-07	GAGCGAGGCT	11	10	9	8	10	1	2	3	1	250a 2000
OPK-14	CCCCTACAC	7	4	4	4	2	3	3	3	5	450a 1500
OPE-06	AAGACCCCTC	16	13	10	12	12	3	6	4	4	300a 2100
Total		55	43	35	39	39	12	20	16	16	
Porcentagem			78,2	63,6	70,9	70,9	21,8	36,4	29,1	29,1	

Tabela 2. Estimativas do coeficiente de similaridade de Jaccard dentro (diagonal) e entre (abaixo da diagonal) as linhagens amarela, azul e vermelha de codornas japonesas

Linhagens	Amarela	Azul	Vermelha
Amarela	0,70		
Azul	0,63	0,67	
Vermelha	0,64	0,61	0,66

Os três indicadores, frequência de *loci* polimórficos, índice de diversidade de Shannon e similaridade de Jaccard intralinhagens, são concordantes em revelar a existência de variabilidade genética dentro das linhagens de codorna amarela, azul e vermelha. De acordo com estes resultados, a amarela apresenta diversidade um pouco menor quando comparada com as linhagens azul e vermelha. Portanto, os valores obtidos sugerem que dentro das três linhagens existe variabilidade em níveis que podem ser considerados altos e adequados para exploração em programas de melhoramento.

A diferenciação genética entre as três linhagens foi analisada pelo teste de Mantel, baseado no complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard. Foram encontradas correlações significativas em todas as combinações das linhagens estudadas (Tab. 3). A maior correlação encontrada foi 0,39, entre as linhagens amarela e azul, e a menor, 0,29, entre a amarela e a vermelha. Apesar de significativos, os valores de correlação encontrados foram baixos, conseqüentemente, os dados sugerem que há diferenciação genética entre as linhagens, mas em níveis baixos.

Tabela 3. Correlações (R), erros Tipo I e coeficientes de determinação (R²) pelo teste de Mantel, com 10.000 permutações, comparando a matriz de complementos da similaridade de Jaccard entre pares de indivíduos das linhagens amarela (Am), azul (Az) e vermelha (Vm) de codorna

Linhagem	R	P	R ²
Am x Az	0,39	0,0001	0,1521
Am x Vm	0,29	0,0001	0,0841
Az x Vm	0,33	0,0001	0,1089

Adicionalmente, a matriz de complementos da similaridade de Jaccard, entre indivíduos, foi utilizada para análise da divergência genética por agrupamento UPGMA e ordenação em coordenadas principais. Na Fig. 2, o dendrograma revela que os indivíduos de uma mesma linhagem tendem a se agrupar. Essa configuração sugere que há baixa divergência entre as linhagens. Da mesma forma, o gráfico em coordenadas principais, representado na Fig. 3, indicou que há diferenciação genética entre as linhagens, com essas formando agrupamentos. Porém, pode ser constatado que há sobreposição dos três grupos, sugerindo baixa divergência.

De modo geral, os três métodos de análises são congruentes em apontar que, embora em níveis pouco acentuados, essas três linhagens de codorna preservam divergência genética. As linhagens amarela e azul são as mais diferenciadas e a amarela e a vermelha, as mais semelhantes geneticamente. Essa baixa divergência genética entre as linhagens, detectada em todas as modalidades de análises empregadas, poderia ser explicada por possível origem em uma população base comum. Caso as linhagens tenham origem em populações divergentes geneticamente, outra possibilidade seria o fluxo gênico entre as linhagens, por cruzamentos em gerações ancestrais.

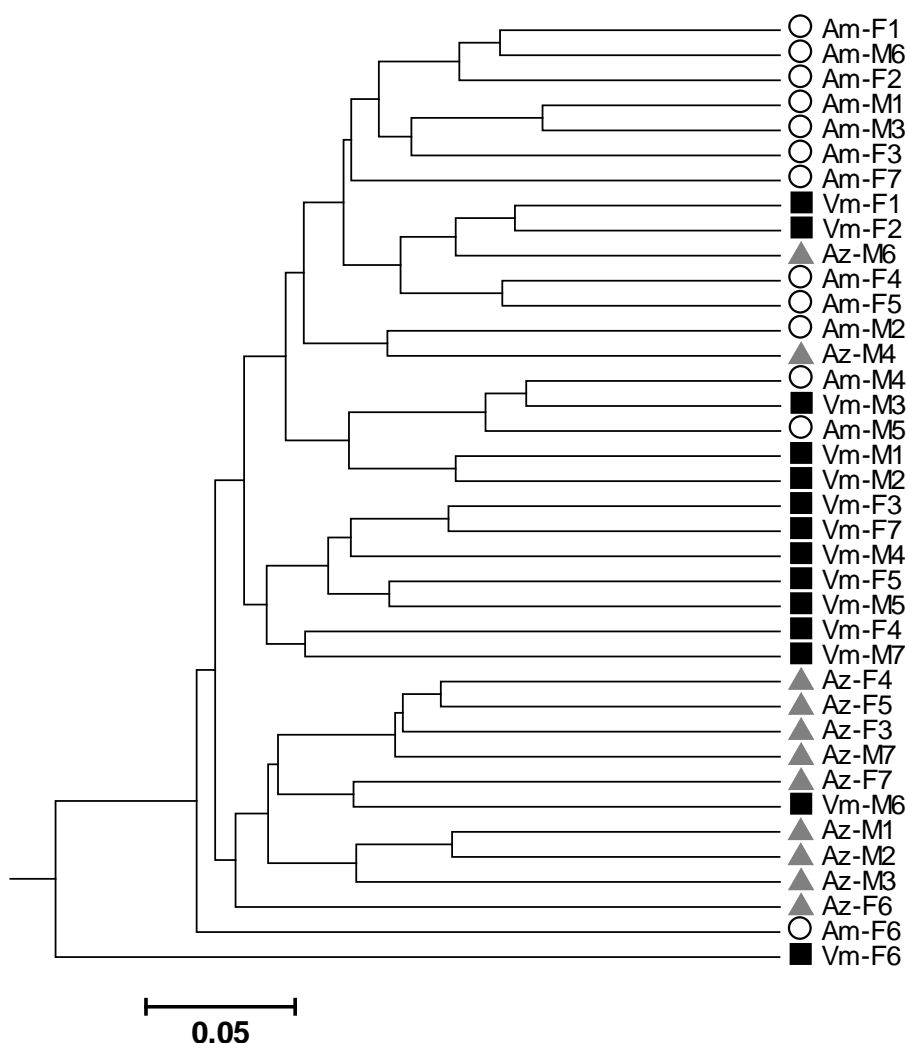


Figura 2. Dendrograma UPGMA obtido a partir da matriz de similaridade de Jaccard, baseado em marcadores moleculares RAPD, entre indivíduos de três linhagens de codorna selecionadas para postura; Am = linhagem amarela; Az = linhagem azul; Vm = linhagem vermelha.

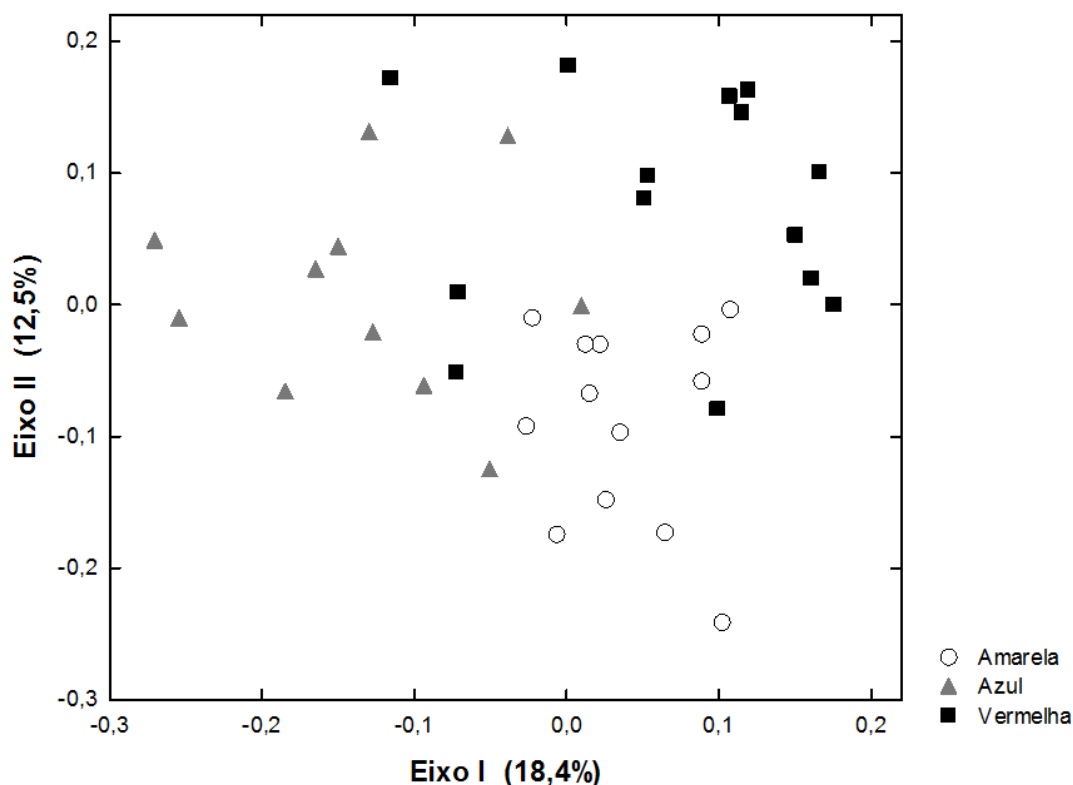


Figura 3. Gráfico de dispersão em coordenadas principais (PCO) obtido da matriz de similaridade de Jaccard, estimada com marcadores moleculares RAPD, entre indivíduos de três linhagens de codorna selecionadas para postura.

Os resultados obtidos são reforçados por análises de outros autores. Sharma et al. (2000) e Ali et al. (2002), ao utilizarem RAPD, encontraram variabilidade genética semelhante dentro e entre linhagens de codorna. Em conjunto, os dados da literatura e os deste trabalho sugerem que a técnica RAPD é consistente para a análise de linhagens de codornas. Além disso, Smith et al. (1996) ao trabalharem com RAPD para estimar variabilidade genética dentro e entre populações de perus e galinhas, mostraram que a tecnologia de RAPD pode ser aplicada com sucesso em diferentes espécies.

Evidentemente, o desenvolvimento de linhagens implica a estimação de parâmetros genéticos de características biológicas que são tradicionalmente utilizadas em programas de melhoramento genético. O conhecimento gerado pela genética molecular, associado aos dados obtidos em avaliações genéticas em testes de desempenho, pode contribuir para orientar as

decisões durante os procedimentos para a seleção para características de interesse para a coturnicultura.

CONCLUSÕES

Existe alta variabilidade genética dentro das linhagens amarela, azul e vermelha de codornas poedeiras do plantel da Universidade Estadual de Maringá. A divergência genética entre as três linhagens é baixa, mas estatisticamente significativa. A quantidade e a distribuição da diversidade genética revelam potencial para exploração por cruzamentos entre linhagens e seleção.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Alberto José Prioli, pelo apoio técnico-científico e ao professor Elias Nunes Martins, pela liberação das aves utilizadas neste experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, B.A.; AHMED, M.M.M.; BAHIE EL-DEEN, M. et al. Genetic variability in the 17th generation of Japanese quail selected for high eggs and meat production. *Egyptian Poult. Sci. J.*, v.22, p.59-71, 2002.
- DINESH, K.R.; LIM, T.M.; CHUA, K.L. et al. RAPD analysis: an efficient of DNA fingerprinting in fisher. *Zool. Sci.*, v.10, p.849-854, 1993.
- FRITSCH, P.; RIESEBERG, L.H. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: SMITH, T.B.; WAYNE, R.K. (Eds). *Molecular genetic approaches in conservation*. New York: Oxford University, 1996. p.54-73.
- FURLAN, A.C.; ANDREOTTI, M.O.; MURAKAMI, A.E. Valores energéticos de alguns alimentos determinados com codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*). *Rev. Bras. Zootec.*, v.27, p.1147-1150, 1998.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.*, v.27, p.209-220, 1967.
- MILLIGAN, B.G.; LEEBENS-MACK, J.; STRAND, A.E. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Mol. Ecol.*, v.3, p.423-435, 1994.
- REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.183-184.
- RODRIGUES, F.M.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; BATAUS, L.A.M. et al. Hypothesis testing of genetic similarity based on RAPD data using Mantel tests and model matrices. *Gen. Mol. Biol.*, v.25, p.435-439, 2002.
- ROHLF, F.J. *NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. New York: Exeter Publishers, 1989.
- SHARMA, D.; APPA RAO, K.B.; TOTEY, S.M. Measurement of within and between population genetic variability in quails. *Poult. Sci.*, v.41, p.29-32, 2000.
- SMITH, E.J.; JONES, C.P.; BARTLETT, J. et al. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and turkeys. *Poult. Sci.*, v.75, p.579-584, 1996.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, v.18, p.6531-6535, 1990.
- YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. *POPGENE Version 1.31: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis*. Alberta: University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 1999.
- ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1974.