

Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Zootecnia
Programa de pós Graduação em Zootecnia

Tese



Identificação de regiões microssatélites potencialmente amplificáveis e desenvolvimento de marcadores para codornas de corte a partir do genoma da codorna japonesa.

Jerusa Martins Germano

Pelotas, 2020

Jerusa Martins Germano

IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES MICROSSATÉLITES POTENCIALMENTE
AMPLIFICÁVEIS E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES PARA
CODORNAS DE CORTE A PARTIR DO GENOMA DA CODORNA
JAPONESA.

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Zootecnia da Faculdade de
Agronomia Eliseu Maciel da Universidade
Federal de Pelotas, como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor em Melhoramento
animal

Orientador: Prof. Dr. Nelson José Laurino Dionello

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G373i Germano, Jerusa Martins

Identificação de regiões microssatélites potencialmente amplificáveis e desenvolvimento de marcadores para codornas de corte a partir do genoma da codorna japonesa / Jerusa Martins Germano ; Nelson José Laurino Dionello, orientador. — Pelotas, 2020.

69 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Loci. 2. Mineração. 3. Primer. 4. SSR. 5. Transferibilidade. I. Dionello, Nelson José Laurino, orient. II. Título.

CDD : 636.59

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Jerusa Martins Germano

Identificação de regiões microssatélites potencialmente amplificáveis e desenvolvimento de marcadores para codornas de corte a partir do genoma da codorna japonesa.

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Melhoramento Animal, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 15 de dezembro de 2020.

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Nelson José Laurino Dionello (orientador)
Doutor em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas.

.....
Dra. Ariane Gonçalves Gotuzzo
Doutora em Melhoramento animal, Universidade Federal de Pelotas.

.....
Dr. Rafael Aldrighi Tavares
Doutor em Genética e Melhoramento animal, Universidade Federal de Pelotas.

.....
Dr. Marcos Antônio Anciuti
Doutor em Produção animal, Universidade Federal de Pelotas.

.....
Dra. Fernanda Medeiros Gonçalves
Doutora em Produção animal pela Universidade Federal de Pelotas.

À minha família, pelo amor, confiança, motivação e incansável apoio na elaboração deste trabalho, dedico.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade de crescimento acadêmico;

Ao meu orientador Prof. Dr. Nelson José Laurino Dionello, pela confiança, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela infinita disponibilidade e por todos os ensinamentos;

Ao Prof. Héden Luiz Marques Moreira, por disponibilizar material e permitir o uso do laboratório de Engenharia Genética Animal, pertencente ao departamento de Ecologia, zoologia e genética;

Ao Prof. Rafael Aldrighi Tavares, por estar sempre com um sorriso no rosto e pronto para ajudar;

Aos meu colegas Suzane e Welinton, por toda ajuda, empenho e dedicação;

Aos meus pais, por me terem dado educação e valores. Ao meu pai (*in memoriam*), que onde quer que esteja nunca deixou de me amar, nem de confiar em mim. Pai, meu amor eterno. À minha mãe, meu amor incondicional, minha fortaleza. Obrigada por me fazerem acreditar que posso mais que imagino;

Ao meu marido Luiz Virgílio, por ser tão importante na minha vida. Obrigada pelo companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

Aos meus filhos, que me inundam de amor todos os dias. Obrigada por me inspirarem a querer ser mais do que fui até hoje!

Obrigada a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização da minha pesquisa.

Resumo

Germano, Jerusa Martins. **IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES MICROSSATÉLITES POTENCIALMENTE AMPLIFICÁVEIS E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES PARA CODORNAS DE CORTE A PARTIR DO GENOMA DA CODORNA JAPONESA.** 2020. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

Os objetivos do presente estudo foram identificar *loci* microssatélites potencialmente amplificáveis (PALs) e desenvolver marcadores para codornas de corte (*Coturnix coturnix*) a partir do genoma completo da codorna japonesa (*Coturnix japonica*), obtido através do banco de dados Ensembl (acesso GCA_001577835.1). Após uma mineração *in silico* no genoma, foram encontrados 1.524 *loci* microssatélites potencialmente amplificáveis (PALs), sendo esses polimórficos e com *primers*. A classe com maior número de PALs foi a dinucleotídeos, seguida de tetra-, penta-, tri- e hexanucleotídeos totalizando 718 (47,11%), 310 (20,34%), 270 (17,71%), 132 (8,66%) e 94 *loci* (6,17%), respectivamente. Foram identificadas 350 *loci* com maior potencial de amplificação (bPALs), tendo como critérios o polimorfismo, ser tetra-, penta- ou hexanucleotídeos e possuir oito repetições. O número de alelos encontrados para tetra-, penta- e hexanucleotídeos foram 1287, 963 e 223, respectivamente. Para o desenvolvimento de marcadores microssatélites, foi utilizado o genoma completo da *Coturnix japonica* depositado no banco de dados Genbank do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (acesso GCA_001577835.2). Após varredura no genoma, foram selecionados os três melhores marcadores tetranucleotídeos e sintetizados para análise. Para validação e avaliação da transferibilidade foram genotipados 90 codornas de uma linhagem de corte, de três gerações, e estimados os valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC), número de alelos por *locus*, heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e coeficiente de endogamia (F_{IS}). Amplificaram 65 indivíduos para Coturnix01, bem como 84 e 42 para CcoUFPel03 e CcoUFPel04. A média de alelos observados foi dez, com tamanhos entre 260 a 300 pares de base (pb) para Coturnix01, 245 a 330pb para CcoUFPel03 e 285 a 385pb para CcoUFPel04. Todos os marcadores foram altamente polimórficos, com PIC variando de 0,72 a 0,84. A H_o média foi baixa em todas as gerações, sendo inferiores as médias da H_e , resultando em valores de coeficiente de endogamia total (F_{IS}) positivos. Os marcadores desenvolvidos apresentaram transferibilidade para a espécie de estudo, no qual a sua validação demonstrou alta capacidade de detecção de polimorfismos, possibilitando a utilização destes em estudos populacionais de codornas de corte. Um grande número de PALs e bPALs foram encontrados com grande potencial para uso nos programas de melhoramento genético.

Palavras-chaves: Loci. Mineração. Primer. SSR. Transferibilidade.

Abstract

Germano, Jerusa Martins. **IDENTIFICATION OF MICROSATELLITE REGIONS POTENTIALLY AMPLIFIABLE AND DEVELOPMENT OF MARKERS FROM MEAT QUAILS FROM JAPANESE QUAIL GENOME**. 2020. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

This work presents a study to identify microsatellites potentially amplifiable loci (PALs) and develop markers from meat quails (*Coturnix coturnix*) using the complete genome from Japanese quail (*Coturnix japonica*) obtained from the collection of the database Ensembl (access GCA_001577835.1). Were match 1,524 matches of PALs, being those polymorphic and with *primers*. The highest classes of PALs were dinucleotides, with sequence of tetra-, penta-, tri- and hexanucleotides, with a total of 718 (47 %), 310 (20 %), 270 (18 %), 132 (9 %) and 94 loci (6 %), respectively. Were identified 350 loci with better potential of amplifiable (bPALs), having as criteria the polymorphism, being tetra-, penta- or hexanucleotides and possessing eight repetitions. The numbers of alleles found for tetra-, penta- and hexanucleotides were 1287, 963 and 223, respectively. The development of the microsatellite markers used the complete genome of *Coturnix japonica*, supplied by the database of Genbank from the National Center of Biotechnology Information (NCBI – accessed GCA 001577835.2). Three markers of tetranucleotides were selected and synthesized. The validation and evaluation of transferability were genotyped 90 meat quails, from three generation and estimated the polymorphic information content values (PIC), the number of alleles per locus, expected heterozygosity (H_e), observed heterozygosity (H_o) and inbreeding coefficient (F_{is}). Were amplified 65 animals for Coturnix01, 84 for CcoUFPel03 and 42 for CcoUFPel04. The observed number of alleles were 10, with sizes between 260 and 300 base pairs (bp) for Coturnix01, between 245 and 330bp for CcoUFPel03 and between 285 and 385bp for CcoUFPel04. All the markers were highly polymorphic, with PIC between 0.72 and 0.84. The average H_o was low in all generations, being lower than H_e average, resulting in positive values of total inbreeding coefficient (F_{is}). The developed markers present transferability from the studied species, as its validation show highly capacity of polymorphisms detection, allowing the use of these in populational studies of meat quails. A large number of PALs and bPALs have been found with great potential for use in breeding programs.

Key word: Loci. Mining. Primer. SSR. Transferability.

Lista de figuras

Relatório de trabalho de campo

Figura 1	Coleta do músculo do peito.....	33
Figura 2	Eletroforese em gel de agarose 1% dos marcadores validados.....	36
Figura 3	Perfil eletroforético do <i>locus</i> Coturnix01 em gel agarose 1%.....	37
Figura 4	Perfil eletroforético do <i>locus</i> CcoUFPel03 em gel agarose 1%.....	37
Figura 5	Perfil eletroforético do <i>locus</i> CcoUFPel04 em gel agarose 1%.....	37
Figura 6	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 8% do <i>locus</i> Coturnix01.....	38
Figura 7	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 8% do <i>locus</i> CcoUFPEL03.....	49

Artigo 1

Figura 1	Número de <i>motifs</i> mais ocorrentes no genoma da codorna.....	52
Figura 2	<i>Loci</i> potencialmente amplificáveis (PALs) e <i>best</i> PALs (bPALs).....	53

Artigo 2

Figura 1	Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% ilustrando a amplificação do <i>locus</i> Coturnix01. M= Marcador de peso molecular, 16 ao 28= amostras amplificada.....	58
----------	---	----

Lista de tabelas

Relatório de trabalho de campo

Tabela 1	Marcadores microssatélites sintetizados proposto por Kayang <i>et al</i> (2002).....	34
Tabela 2	Identificação dos marcadores, sequência de primers, grupo de ligação (LG), localização no genoma, sequência <i>motif</i> , tamanho esperado e temperatura de anelamento dos microssatélites propostos.....	35

Artigo 1

Tabela 1	Número de <i>motifs</i> , número de loci e porcentagem das diferentes classes de microssatélites	52
----------	--	----

Artigo 2

Tabela 1	Identificação do marcador, sequência do primer, grupo de ligação (Lg), tamanho em pares de bases (pb), conteúdo de informação polimórfica (PIC), número de alelos por <i>locus</i> , número de alelos privativos (entre parênteses), número de animais genotipados (sobrescrito) e número de alelos nas gerações analisadas.....	59
Tabela 2	Heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho), coeficiente de endogamia (FIS) das 13°, 14° e 15° gerações de codornas de corte.....	60

Sumário

1	Introdução.....	11
2	Revisão de literatura.....	13
2.1	Aspectos gerais sobre a coturnicultura.....	13
2.2	Marcadores moleculares.....	16
3	Projeto de pesquisa.....	22
4	Relatório de trabalho de campo.....	32
4.1	Desenvolvimento do trabalho.....	32
4.2	Seleção dos animais.....	32
4.3	Abate das aves.....	32
4.4	Coleta do material e extração do DNA.....	32
4.5	Desenho dos <i>primers</i>	34
4.6	Validação dos marcadores.....	35
4.7	Amplificação e genotipagem dos microssatélites.....	36
4.8	Obtenção e análise dos resultados.....	39
5	Artigo 1 – Predição de marcadores microssatélites em codornas.....	40
6	Artigo 2 - Desenvolvimento, transferibilidade e validação de marcadores microssatélite tetranucleotídeo para codornas de corte...	54
7	Considerações finais.....	63
	Referências.....	64

Introdução

Somente nos três primeiros meses de 2019, a avicultura representou uma receita de US\$ 870 milhões na balança comercial brasileira, ficando no ranking como o sétimo produto mais exportado pelo país. Segundo os dados do Censo Agro 2017 e divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017), a produção avícola é a principal atividade agropecuária no país, com mais de 3,2 milhões de estabelecimentos que envolva alguma atividade avícola, estando a coturnicultura em terceiro lugar sendo 16 208 058 de aves dessa espécie em 17,941 estabelecimentos.

Atualmente, a coturnicultura se apresenta como atividade estável, rentável e com boas perspectivas de crescimento para os próximos anos. Essa atividades vem ganhando cada vez mais espaço no cenário avícola tanto para obtenção de carne quanto para ovos (ARAÚJO *et al.*, 2013).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, a coturnicultura vem ocupando o seu espaço no cenário avícola Brasileiro. O avanço ocorrido na última década pelo setor deixa evidente a importância da coturnicultura para economia. Em 2005, o efetivo de cabeças era de 355,619. Em 2010, o efetivo de codornas foi para 12 992 269 cabeças, ou seja, um aumento de 3,553 (42%) em apenas cinco anos. Em 2011 foram 15 567 634 cabeças, apresentando-se como o maior crescimento entre os efetivos de animais. Nos anos seguintes não foi diferente. Em 2012 o efetivo de codornas alcançou 16 436 164 de animais e em 2013, subiu 10,6% em relação ao ano anterior, somando 18,172 milhões de unidades e chegando a mais de 20 milhões em 2014. Entre 2015 e 2017 houve um declínio no número de animais alojados, provavelmente como resultado da crise econômica enfrentado pelo Brasil. Em 2018 o número voltou a subir, alcançando a marca de 16 844 423 animais e 2019 com um aumento de 3,41%, frente a 2018. Ainda assim, o crescimento do setor nos últimos 14 anos é extremamente expressivo, com um aumento de 4,798 (17%) (IBGE, 2010-2019). A maior concentração de aves (96,75 milhões) está localizada na região Sudeste – responsável por 62,5% do efetivo nacional, com destaque para SP que detém 4,40 milhões de animais, ou seja, 28,5% do efetivo nacional.

O melhoramento genético, junto ao manejo, nutrição, ambiência e biossegurança são responsáveis pela grande evolução da avicultura, sendo ele

a principal ferramenta evolutiva utilizada na cadeia produtiva de aves de corte e postura (TEIXEIRA, 2011). No entanto, a exploração da carne de codorna no Brasil ainda não está bem estabelecida. A falta de embasamento técnico nos processos de seleção e a falta de material genético dificultam a exploração e a maximização da produção, pois levam o plantel problemas como a depressão endogâmica, resultando em redução da fertilidade, postura e aumento da mortalidade (PAIVA *et al.*, 2004). Frente a essas barreiras, pesquisadores e instituições de ensino buscam desenvolver técnicas capazes de amenizar os problemas relacionados a produção e manejo visando uma maior representatividade da espécie no mercado brasileiro, e quem sabe alcançando o grande sucesso obtido na exploração de frangos de corte (MORI *et al.*, 2005).

Porém, o melhoramento genético tradicional estima o valor genético do animal através do seu fenótipo ou na estimativa do valor genético aditivo derivado do fenótipo. Essa seleção não leva em consideração o número e o efeito dos genes que agem sobre aquela determinada característica (DEKKERS, 1999). Como consequência, junto as melhorias trazidas pelo melhoramento tradicional, surgiram características correlacionadas indesejáveis (BURT, 2002).

Os marcadores moleculares permitem identificar e selecionar as características de interesse sem prejuízo aos ganhos já adquiridos nos processos de seleção. Através deles é possível identificar e selecionar características de interesse, tornando-se um grande aliado no estudo de populações, pois permitem a localização de determinados pontos nos cromossomos, sendo muito úteis dentro dos programas de melhoramento genético (REGITANO, 2001). Segundo Dekkers e Hospital (2002) os programas de melhoramento seriam mais eficientes ao se utilizar a genética molecular como um complemento aos métodos de melhoramento tradicional, através da seleção assistida por marcadores (MAS). Isso possibilitaria a seleção diretamente pelo genótipo (DNA), resultando em uma seleção mais acurada ou precoce ou ainda de mais baixo custo.

Diante da potencialidade da coturnicultura e de sua importância econômica, objetivou-se, a partir desse trabalho, identificar regiões microssatélites potencialmente amplificáveis e desenvolver marcadores microssatélites para codornas de corte a partir do genoma da codorna japonesa.

1 Revisão de literatura

2.1 Aspectos gerais sobre a coturnicultura

No final da década de 50, atraídos pelo seu canto, imigrantes italianos e japoneses trouxeram as codornas para o Brasil. Esses animais são aves migratórias, originárias do norte da África, Ásia e Europa, pertencem a família dos faisões (*Phasianidae*) e subfamília dos *Perdicionidae*, onde estão incluídas as galinhas e os perdizes e o gênero *Coturnix* (PINTO *et al.*, 2002). A introdução da ave no país teve como principal atividade a produção e comercialização de ovos "in natura" da espécie *Coturnix coturnix japonica* (MURAKAMI e ARIKI, 1998). Durante muito tempo a criação de codorna visou somente à exploração de ovos enquanto a coturnicultura de corte era considerada uma atividade secundária (MÁS *et al.*, 2004).

Em 1989, o primeiro criatório comercial se instalou no Sul do Brasil mas a exportação das carcaças congeladas se deu recentemente (SILVA *et al.*, 2011). Em 1996, o setor teve uma nova perspectiva com a chegada da espécie destinada ao abate: a codorna de corte (*Coturnix coturnix*), ou codorna europeia, (TEIXEIRA, 2011), que atende os requisitos necessários à produção de carne, passou a ser vista como uma atividade promissora para pequenos e grandes criadores (OLIVEIRA *et al.* 2002).

Atualmente, a coturnicultura industrial conta com três espécies disponíveis para a exploração: codorna americana ou a Bobwhite quail (*Colinus virginianus*) e a europeia (*Coturnix coturnix coturnix*), ambas com aptidão para carne, e a japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) com aptidão para ovos (BARRETO *et al.*, 2007). A *Coturnix japonica* é a subespécie de codorna mais encontrada no Brasil. Essa linhagem apresenta baixo peso corporal quando comparada a codorna europeia, sendo principalmente utilizada para a produção de ovos (OLIVEIRA, 2005). O aumento do interesse pela coturnicultura pode ser percebido pelo crescimento de estudos acadêmicos sobre questões de melhoramento genético, nutrição, manejo, equipamentos para a produção das aves e também para a tecnificação na produção de ovos (BERTECHINI, 2010).

Assim como outras atividades avícolas, a coturnicultura visa à produção de proteína de origem animal com o menor custo possível. Sua carne é uma excelente fonte de proteína de origem animal com grande aceitação em todas

as camadas sociais. No entanto, a produção de ovos ainda é mais representativa, mas, em virtude da elevada taxa de crescimento e do reduzido consumo de ração, a produção de codornas de corte pode constituir uma nova alternativa para o setor avícola (OLIVEIRA *et al.*, 2002). A qualidade da sua carne é incontestável, sendo uma excelente fonte de aminoácidos, vitamina (B1, niacina, B2, ácido pantotênico, B6), minerais (ferro, fósforo, zinco e cobre) e ácidos graxos. A quantidade de colesterol encontrada na carne de codorna é de 76 mg, a colocando em posição intermediária quando comparado ao encontrado na carne do peito (64 mg) e da coxa e sobrecoxa (81 mg) do frango. Apesar de ser mais escura que a carne de frango, ela é macia e saborosa, sendo os maiores produtores a China (150,000 t.), Espanha (10,000 t.) e França (8,500 t.) (PASTORE *et al.*, 2012). Embora o Brasil ainda apresente um consumo baixo de carne de codorna per capita ano, ele ocupa o quinto lugar na produção de carne dessas aves no cenário mundial e o segundo na produção de ovos (SILVA *et al.*, 2011). Além de ser criado para a produção de ovos e carne as codornas cada vez mais estão sendo utilizadas como animal de pesquisa experimental, devido a várias características, como seu pequeno tamanho corporal, curto intervalo de geração e alta produção de ovos (PISENTI *et al.*, 1999).

Segundo Silva *et al.* (2007), por um longo período a qualidade da carcaça disponibilizada para o comercialização era pouco aceitável pelo consumidor, pois a carne de codorna utilizada para o consumo era resultante das criações destinadas à produção de ovos através do abate dos machos com 42 a 49 dias de idade, o que tornava essas carcaças pequenas, pesando entre 70 a 110g ou resultante das fêmeas de descarte resultando em uma carne relativamente dura por se tratar de aves de aproximadamente um ano de idade. De acordo com Bonafé (2008) características como aparência da carcaça, dos cortes nobres e características sensoriais são fundamentais para o consumidor. Por outro lado, rendimento, gordura, porcentagem de cortes e defeitos na carcaça são características determinantes para o abatedouro, deixando evidente a importância de uma linhagem destinada para o corte ou duplo propósito. Isso mostra a necessidade de se obter material genético especializado, com maior peso e melhor conformação de carcaça, ideal para o atendimento dos mercados interno e de exportação (GARCIA, 2002). Entretanto, a seleção para desenvolvimento de linhagem para codornas de dupla aptidão deve ser feita de

maneira criteriosa, pois sabe-se que características produtivas e reprodutivas possuem correlação negativa para as variáveis de interesse zootécnico. Ao selecionar-se animais para corte, leva-se em consideração o peso corporal do nascimento e o peso ao longo da vida produtiva, esperando-se resposta correlacionada positiva entre eles. Já a seleção para postura é baseada na qualidade e na produção de ovos, como idade a primeira postura, quantidade de ovos produzidos por semana e pelo ciclo de vida da ave (LINDA, 2018).

De acordo com Pastore *et al.*, (2012) graças ao crescimento elevado na criação dessas aves, o setor teve que se adequar a novas técnicas de produção passando de uma atividade até então vista como de subsistência a uma atividade altamente tecnicizada. Junto a esse progresso, veio o interesse em pesquisas sobre questões de melhoramento genético, manejo e nutrição por parte de diversas empresas e instituições de ensino a fim de se obter maior conhecimento em todas as áreas que envolvem o setor. (BERTECHINI, 2010).

Quando comparada a outras aves, as codornas apresentam características vantajosas que têm contribuído para o aumento da criação de codornas no país, como: rápido crescimento, precocidade na produção e maturidade sexual (35 a 42 dias), alta produtividade (média de 300 ovos/ano), pequenos espaços para grandes populações, grande longevidade em alta produção (14 a 18 meses), baixo investimento e, conseqüentemente, rápido retorno financeiro (PASTORE *et al.*, 2012). O sistema de criação entre as codornas de corte e postura apresenta diferenças mínimas. A codorna japonesa, por ser destinada a produção de ovos, permanece mais tempo nas instalações em comparação a codorna de corte, o que torna o sistema das codornas de corte mais simples (TEIXEIRA, 2008). Vários fatores têm contribuído para o aumento da criação de codornas no país, entre eles se destacam: baixo investimento inicial que utiliza pequenas áreas, baixo gasto com mão-de-obra e rápida reversão de capital investido, além de apresentar crescimento rápido, maturidade sexual precoce, diminuto intervalo entre gerações, e ser pouco exigente em espaço e nutrição (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Contudo, o Brasil ainda não dispõe de material genético próprio para garantir o potencial da produção sendo usada como prática recorrente a reprodução do material genético disponível (PRIOLI *et al.*, 2010) ou importação de matrizes importadas (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Algumas metodologias tem sido estudadas na busca de marcadores moleculares que auxiliem no conhecimento dos padrões de variações genéticas, contribuindo para elaboração de estratégias em programas de melhoramento (seleção ou cruzamento). Entre as técnicas desenvolvidas estão os marcadores microssatélites (PRIOLI, *et al.*, 2010). Graças as novas técnicas tornou-se possível estudos de identificação, caracterização e mapeamento genético, sendo esses realizados com maior segurança, rapidez e eficiência. Eles também possibilitam a avaliação da variabilidade genética existente dentro e entre espécies distintas. Dessa forma, o uso de marcadores em conjunto com os conhecimentos de genética quantitativa permitirão a criação e o desenvolvimento de novos genótipos, onde o potencial genético de cada espécie será maximizado (BERED *et al.*, 1997).

2.2 Marcadores Moleculares

Ferreira e Grattapaglia (1998) definem marcador molecular como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA. Marcadores moleculares são uma poderosa ferramenta que pode ser utilizada no estudo de populações, pois permitem a localização de determinados pontos nos cromossomos, sendo muito útil dentro dos programas de melhoramento genético (REGITANO, 2001). Eles são comumente empregados em diversos estudos genômicos, como identificação de genes de interesse, estimativa de diversidade genética, fluxo gênico e taxas de cruzamentos, construção de mapas genéticos (KARP 1997, BUSO *et al.*, 2003), estudos taxômicos, filogenéticos e evolutivos, programas de conservação genética e identificação de populações únicas (DEKKERS e HOSPITAL, 2002). O avanço das técnicas moleculares só se tornou possível graças ao desenvolvimento nas áreas da bioinformática, da estatística e da genética quantitativa (GUIMARÃES *et al.*, 2009).

Dentre as opções de marcadores disponíveis, os microssatélites são os mais amplamente utilizados nos programas de melhoramento. Também chamados de SSR (sequências simples repetidas), esses marcadores se caracterizam por serem facilmente encontrados em todo genoma, serem altamente polimórficos, reprodutíveis, possuírem herança codominante (ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados) e natureza multialélica

(numa população vários de um loco podem ser detectados e discriminados), necessitam de pequena quantidade de DNA para sua análise (OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA e SILVA, 2008). Além disso, são úteis em análises populacionais, e também adequados para a medição de parâmetros genéticos, como número de alelos eficazes (N_e) e alelos raros (BARTFAI *et al.*, 2003). Ainda podem ser utilizados para a caracterização/identificação de alterações genéticas (POWIERSKA-CZAMY, 2003) e identificação individual (SHURTLIFF, 2005). Atualmente, microssatélites são os marcadores de DNA mais úteis em análises de genotipagem e paternidade (WEBSTER e REICHART, 2005; SHURTLIFF, 2005).

Marcadores são sequencias simples de um a seis nucleotídeos, repetidos em tandem e podem ser encontrados em regiões codificadoras e não codificadoras (LITT e LUTY, 1989), podendo ser classificados em: perfeitos, quando não há interrupção de qualquer base que não pertença ao motivo (ATATATATATATATATATATATAT); imperfeitos, quando entre os motivos existem pares de base (pb) que não correspondem ao microssatélite (ATATATATATCATATATA) e compostos, quando na sequencia existe duas sequencias distintas adjacentes (ATATATATATATGTGTGTGTGT). Ainda podem ser classificados quanto ao número de repetição, sendo mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídeos (WEBER, 1990) e seu elevado grau de polimorfismo é derivado da variação no número de repetições de um alelo para outro (LITT e LUTY, 1989) o que permite uma discriminação precisa de indivíduos intimamente relacionados, podendo serem utilizados para análises de pedigree, diversidade populacional, mapeamento genético e seleção (BRONDANI *et al.*, 1998).

Através do seu uso é possível identificar no animal genótipos de interesse antes mesmo que as características se manifestem, acelerando os processos de seleção. Eles também podem auxiliar na seleção de características que não podem ser feitas no animal vivo, de alto custo de avaliação dependentes de sexo ou até mesmo para as características de baixa herdabilidade (NONES, 2004).

Embora os marcadores microssatélites tenham todas essas vantagens, e aplicabilidades, eles também apresentam limitações, pois necessitam do isolamento e desenvolvimento de primers específicos para cada espécie, ou seja, se a espécie ainda não possui um banco de dados disponível se faz necessário investimento financeiro e mão-de-obra para o desenvolvimento dos

marcadores (OLIVEIRA *et al.*, 2006; FALEIRO *et al.*, 2011). Em contrapartida, depois dos *primers* já estarem desenvolvidos, a técnica se torna mais acessível e eles já podem ser transferidos para outras espécies do mesmo gênero ou filogeneticamente próximas (SOUZA, 2019). Segundo Pereira *et al.* (2005), o emprego de marcadores moleculares é mais eficiente durante o avanço de gerações, pois possibilita analisar detalhadamente o genoma da espécie, avaliando as relações entre indivíduos e populações, possibilitando a identificação da diversidade genética do material estudado, identificando genes de característica quantitativa ou qualitativa ou até mesmo fenômenos de heterose.

Loci microssatélites encontram-se flanqueados por sequências únicas e altamente conservadas, sendo as mesmas utilizadas para o desenho de *primers* específicos e complementares à sequência flanqueadora de cada marcador para amplificação por meio da PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Essa técnica é capaz de amplificar um determinado segmento de DNA milhares ou até mesmo milhões de vezes, fornecendo respostas capazes de direcionar as práticas de produção, pois sabe-se que o fenótipo é influenciado pelo fator genético (LADEIRA *et al.*, 2011). Desta maneira, o polimorfismo é detectado através das diferenças de tamanhos entre os amplicons, sendo estas discrepâncias decorrente do número de repetições da sequência microssatélites (CAMACHO, *et al.*, 2016; OLIVEIRA e HENKES, 2002).

Contudo, diante dos constantes avanços na era genômica, tais como a tecnologia NGS (*Next Generation Sequencing*), tornou-se possível o sequenciamento de DNA de forma eficiente para espécies que não possuem banco de dados disponíveis (CASTOE *et al.*, 2012) através da descoberta de milhares de regiões microssatélites potencialmente amplificáveis (PALs), as que podem ser selecionadas para o desenho de *primers* (CASTOE *et al.*, 2010). Esta pode ser vista como uma abordagem promissora para espécies com informação genômica limitada, pois programas de melhoramento podem se beneficiar muito com o uso dessas ferramentas genômicas (SILVA *et al.*, 2013). Através da transferibilidade de marcadores, é possível utilizar informações de espécies geneticamente relacionadas à espécie alvo (CAMACHO, 2016; REGITANO e COUTINHO, 2001). Microssatélites possuem alta taxa de transferibilidade entre espécies de um mesmo gênero ou mesmo de uma mesma família, uma vez que

sequências que antecedem as regiões microssatélites são em geral altamente conservadas (ELLIS e BURKE 2007).

Embora os marcadores microssatélites sejam marcadores escolhidos para mapeamento de ligação em animais, ocorrem em uma frequência cerca de 5 a 7 vezes menor no genomas de aves do que de mamíferos (PRIMMER *et al.*, 1997), isso limita o desenvolvimento de grandes extensões de mapas genéticos. (KAYANG, 2006). Além disso, a amplificação de microssatélites em aves, ao contrário de mamíferos, tem uma taxa de sucesso relativamente baixa, mesmo entre espécies intimamente relacionadas (PANG *et al.*, 1999; INOUE-MURAYAMA *et al.*, 2001).

Informações acerca de marcadores para codornas eram bem escassas, mas a situação começou a mudar com o desenvolvimento de marcadores microssatélites próprios para codornas (KAYANG *et al.*, 2000, 2002) e com a publicação do primeiro mapa genético de codornas baseado completamente em marcadores de DNA (ROUSSOT *et al.*, 2003). Este mapa contém 258 loci atribuídos a 41 grupos de ligação (incluindo os cromossomos sexuais), mas consiste apenas em marcadores de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP). Esse tipo de marcador fornece um conteúdo de informação inferior quando comparados aos microssatélites, necessitando ser enriquecido com outros marcadores (KAYANG, 2006).

Em um estudo conduzido por Huang *et al.* (2016), onde os autores avaliaram as regiões microssatélites de seis espécies de aves (*Gallus gallus*, *Taeniopygia guttata*, *Meleagris gallopavo*, *Geospiza fortis*, *Melopsittacus undulates* e *Columba livia*) a classe tetranucleotídeos foi a segunda classe mais abundante no genoma de quatro pássaros estudados (exceção do *T. guttata* e *M. undulates* que tiveram a classe dinucleotídeo em maior número). A classe trinucleotídeos foi o terceira mais frequente nos seis genomas analisados. As classes pentanucleotídeos e hexanucleotídeos foram as que menos contribuíram com regiões microssatélites nas aves estudadas. Esses resultados mostram que embora todos os genomas selecionados fossem pertencentes a mesma espécie animal, não há um padrão de distribuição de classes microssatélites para os mesmos. Na categoria dinucleotídeos, para os seis genomas analisados o *motif* (AT)_n foi o mais frequentes para todas as aves, exceto para *G. fortis*, sendo o *motivo* mais frequente (AC)_n. Para trinucleotídeos, o *motif* mais frequente foi AAT

exceto para *C. livia* que teve como *motif* mais frequente AAC. Os *motifs* tetra- e pentanucleotídeos mais abundantes foram uniformes em todas as seis espécies, sendo AAAC e AAACA, respectivamente. O *motif* hexanucleotídeo mais frequente foi AAAGAA em todos os genomas estudados, exceto para *M. undulates*, no qual o mais predominante para a classe foi AACCT.

Castoe *et al.* (2012) ao estudarem regiões microssatélites de dois pássaros (*Centrocercus minimus* e *Nucifraga columbiana*), encontraram diferentes tipos de *motif* de repetição, no entanto motivos tetranucleotídeos foram o que mais ocorreram em ambas as espécies, seguindo de tri-, di-, penta- e hexanucleotídeos para *Centrocercus minimus* e tri-, hexa-, di- e penta- para *Nucifraga columbiana*. O *motif* mais recorrente para ambas espécies de aves foram AAAC, seguido do AAAT.

Um outro estudo envolvendo seis espécies de aves (*Alca torda*, *Ptychoramphus aleuticus*, *Campylorhynchus brunneicapillus*, *Pelecanus occidentalis*, *Sula bassanus* e *Oceanodroma castro*) foi conduzido por Lance *et al.* (2013). O número de sequências microssatélites encontradas, foram de 2.541 a 113.109, variando conforme a espécie. A classe dinucleotídeos foi a mais observada para espécie *O. castro*, seguido de tri-, hexa-, penta e tetranucleotídeos. A classe trinucleotídeos foi a que mais ocorreu para a espécie *P. aleuticus*, seguido de di-, tetra-, penta- e hexanucleotídeos. Pentanucleotídeos foi a classe que mais ocorreu para as espécies *P. occidentalis* e *S. bassanus*, seguindo de tri-, hexa-, di- e tetranucleotídeos para ambas espécies. Por fim, a classe hexanucleotídeos foi a mais frequente para as espécies *A. torda* e *C. brunneicapillus*, seguindo de di-, penta-, tetra- e trinucleotídeos e penta-, tetra-, tri- e dinucleotídeos, respectivamente. O número total de PALs encontrados pelos autores, para as seis espécies estudadas, foi de 16.874 (variando de 418 a 4760). No entanto, ao considerar pPALs, os autores determinaram hexa- e penta- como as classes mais abundantes e tri- e dinucleotídeos em menor quantidade.

Na coturnicultura, algumas tentativas já foram efetuadas para isolar marcadores microssatélites em codorna japonesa (*Coturnix japonica*) através da transferibilidade de marcadores microssatélite desenvolvidos para galinha (*Gallus sp.*), entretanto os mesmos não foram suficientemente informativos para estudo de codornas, mostrando a necessidade do desenvolvimento de

marcadores específicos para a espécie (PANG *et al.*, 1999; INOUE-MURAYAMA *et al.*, 2001).

Os autores Pang *et al.* (1999) testaram 48 microssatélites de frango (*Gallus gallus*) em codornas japonesa, no qual apenas 11 (22,9%) geraram produtos específicos, sendo oito polimórficos e três monomórficos em quatro populações de codornas japonesas, resultando em baixa transferibilidade. Em estudo conduzido por Inoue-Murayama *et al.* (2001) foram testados 120 marcadores de frango (*Gallus gallus*) em codorna japonesa no qual apenas 25 foram polimórficos, mostrando que a maioria dos marcadores de frango testados em codornas não tem apresentado resultados satisfatórios. Entretanto Kayang *et al.* (2002) isolaram 100 marcadores microssatélites de codornas japonesas e avaliaram em uma população de 20 codornas selvagens. Destes, 98 marcadores foram polimórficos com uma média de 3,7 alelos por *locus* e heterozigosidade média de 0,423, demonstrando o compartilhamento de regiões conservadas entre essas espécies.

3 Projeto de pesquisa

PRPPG – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

**Estimação de endogamia em uma linhagem de codornas de corte através
de marcadores microssatélites**

Responsável/Executora: Jerusa Martins Germano

Orientador: Dr. Nelson José Laurino Dionello

1. Identificação da proposta

A coturnicultura tem merecido destaque em razão dos altos índices produtivos alcançados e vem ganhando cada vez mais importância no cenário nacional (DRUMOND *et al.*, 2014). Atualmente, o Brasil encontra-se na quinta posição na produção mundial de carne de codornas e em segundo de ovos (SILVA e COSTA, 2009).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE, o efetivo de codornas no Brasil está sempre em ascensão. Em 2005, o efetivo de cabeças era de 355,619. Apenas 5 anos depois, em 2010, o efetivo de codornas foi para 12 992 269 cabeças. Em 2011 foram 15 567 634 cabeças, registrando um aumento de 19,8% em relação ao ano de 2010, apresentando-se como o maior crescimento entre os efetivos de animais. Nos anos seguintes não foi diferente. Em 2012 o efetivo de codornas alcançou 16 436 164 de animais e em 2013, subiu 10,6% em relação ao ano anterior, somando 18,172 milhões de unidades (IBGE 2010, 2011, 2012, 2013).

O melhoramento genético é a principal ferramenta utilizada na cadeia produtiva de aves de corte. Seu uso é o principal responsável pela grande evolução da avicultura de corte e postura (TEIXEIRA, 2011). Entretanto, quando esses programas não são bem conduzidos, (planejados e bem executados, pode-se ocorrer perdas produtivas e reprodutivas motivadas pela depressão endogâmica, sendo esta ocasionada pela falta de planejamento no período reprodutivo.

Atualmente a endogamia vem preocupando muitos criadores e chamando a atenção de pesquisadores nos programas de melhoramento atuais. É nesse contexto, que várias instituições de ensino superior deram início a programas de melhoramento genético que visam acompanhar as características de importância econômica e seus cruzamentos.

O Departamento de Zootecnia do Programa de Pós Graduação da Universidade Federal de Pelotas desenvolveu uma linhagem de codornas de corte, através da seleção pelo peso corporal aos 21 dias de idade. Dessa linhagem, estimou-se parâmetros genéticos para características de interesse econômico, como peso corporal, produção, peso e massa de ovos, fertilidade e percentagem de eclosão desde a primeira até a décima quinta geração, fazendo

a seleção através de curvas de crescimento e produção de ovos, comparando metodologias como a utilização de modelos de regressão aleatória e análise unicaracterística, ambos pelo REML e o uso da análise bayesiana. Igualmente o seu desenvolvimento foi avaliado pelas características da carcaça através da alometria e análise sensorial, tecidual e bromatológica.

Contudo, ainda não foi possível estimar a variabilidade genética e grau de endogamia através da utilização de marcadores microssatélites, estudo o qual não se tem registros em populações melhoradas de codorna de corte.

Este projeto visa estimar a variabilidade genética e grau de endogamia em codornas de corte através da utilização de marcadores microssatélites desenvolvidos para codornas japonesas.

2. Qualificação dos problemas a serem abordados

A implantação de programas de melhoramento genético de codornas é fundamental para que se tenha um maior desenvolvimento da atividade, em especial as que possuem aptidão para corte, pois possui menor espaço no mercado quando comparadas com as de postura. O desenvolvimento de estratégias para o melhoramento genético destes animais tem como escopo o aumento da eficiência produtiva destas aves, gerando por sua vez, uma excelente fonte de proteína animal (GODINHO, 2014).

As práticas de manejo, em melhoramento, podem levar à diminuição da variabilidade genética presente em reprodutores, seja por falta de planejamento dos programas de seleção genética ou pelo uso de número reduzido de indivíduos como reprodutores, aumentando a probabilidade de endogamia (MARTINS, 2002) e estimar o nível de endogamia em uma população é essencial, visto que a depressão endogâmica nas características sob seleção tem importante efeito sobre a resposta à seleção a médio e a longo prazo além do alto grau de consanguinidade reduzir a fertilidade, a viabilidade e outras características de produção. Para Hill (2000), a manutenção da variabilidade genética é de grande importância em populações naturais e domesticadas para

a resposta a curto e longo prazo para a seleção como bem como para fins de conservação.

Breda *et al.* (2004) descreve a endogamia como um sistema de acasalamento onde os indivíduos que serão utilizados como pais da próxima geração são mais aparentados entre si que a média da população. Esse tipo de acasalamento, intencional ou não, altera a constituição genética da população, pois ocorre um aumento da homozigose, alterando assim a frequência genotípica, mas não as gênicas. Como consequência, a endogamia pode ocasionar problemas reprodutivos e produtivos, através do aparecimento de genes recessivos que, geralmente, provocam alguma alteração na média do mérito individual (SANTANA e JOSAHKIAN, 2011). Ela pode ser calculada indiretamente pelo tamanho efetivo da população ou diretamente por meio de análise de pedigree (HARTL e CLARK, 1997) ou ainda pela heterozigose através de marcadores genéticos (GALEUCHET *et al.*, 2005) e sua medida é dada através do coeficiente de endogamia. Carvalheiro (2004), descreve que o grau de endogamia de um indivíduo se dá pela probabilidade de que dois alelos em um *locus* tomado ao acaso sejam idênticos por descendência.

O aumento da homozigose pode ser desejável ou não. Crispim (2013) explica que o aumento ocasionado pela endogamia é desejável quando os alelos forem somente de efeito favorável, mas como há alelos com efeitos deletérios, que são expressos na maioria das vezes em homozigose recessiva, o aumento da endogamia aumenta as chances de manifestação desses alelos indesejáveis.

Segundo Oliveira *et al.* (1999), quando a seleção é praticada para apenas uma característica em populações fechadas, a endogamia se torna difícil de ser evitada. Além disso, populações pequenas possivelmente possuem maior taxa de endogamia, pois em populações menores a chance de ocorrer acasalamento entre indivíduos aparentados é maior quando comparada a populações maiores (CRISPIM, 2013).

No decorrer das últimas três décadas, a genética molecular vem inovando o campo das ciências biológicas, possibilitando o desenvolvimento de métodos para caracterizar geneticamente indivíduos e populações (FREELAND, 2005; TENEVA, 2009; SILVA, 2012).

Embora o cuidado em evitar o acasalamento entre parentes próximos, especialmente meios irmãos e irmãos completos, muito erros de pedigree podem

acontecer na sequência de gerações que se sucedem durante o período de seleção. Especialmente com esta visão, um ponto fundamental para manutenção de um programa de melhoramento genético é o monitoramento da variabilidade genética e grau de endogamia da população, sendo isto possível atualmente através da utilização de marcadores moleculares microssatélites. A utilização de marcadores moleculares, aliada ao manejo reprodutivo adequado, pode contribuir para a redução da endogamia em programas de melhoramento genético (BENTSEN e OLESEN, 2002). Eles têm sido utilizados para o monitoramento genético em sistema de cruzamento, fluxo gênico e estrutura genética (YUE e ORBAN, 2002). Esses marcadores também podem ser empregados para estimativas dos coeficientes de endocruzamento e parentesco (COLBOURNE *et al.*, 1996). Outra utilização, é na identificação de possíveis relações genéticas entre a geração parental e progênie (FESSEHAYE *et al.*, 2006).

Os microssatélites são pequenas sequências repetidas (um a seis nucleótideos), abundantes, distribuídas ao acaso por todo o genoma. Apresentam grande polimorfismo, são de fácil identificação e têm sido utilizados em mapas de ligação em mamíferos, identificação individual em controle de paternidade e caracterização genética de populações (MENEZES *et al.*, 2006)

Os marcadores moleculares surgiram em decorrência da necessidade de detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA, sendo definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, possuindo capacidade de diferenciar dois ou mais indivíduos geneticamente (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996; MILACH, 1998). Os marcadores microssatélites permitem analisar desde indivíduos até espécies proximamente relacionadas, sendo amplamente usado em genética e melhoramento animal e vegetal (NEFF *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2007; BORÉM & CAIXETA, 2009).

Além disso, esta classe de marcadores apresenta como características comportamento codominante permitindo a detecção de alelos dominantes e recessivos em um dado *locus*, bem como alto grau de informação de polimorfismo por *locus* gênico e distribuição aleatória por todo o genoma, podendo estar associado a regiões expressas, alta conservação entre espécies

relacionadas e dependentes de pouca quantidade de DNA na amostra (FERREIRA e CRATTAPAGLIA, 1996; XU *et al.*, 2001; BUSO *et al.*, 2003).

Em codornas japonesas Pang *et al.* (1999) amplificaram com sucesso marcadores microssatélites desenvolvidos para frangos. Kayang *et al.* (2002) desenvolveram 72 microssatélites específicos para codornas japonesas e Kayang *et al.* (2004) construíram um mapa de ligação genômico, em 433 progênies F2 de 10 famílias de meios-irmãos de um cruzamento entre duas linhas de seleção de codornas de diferentes origens genéticas. A diversidade genética de codorna doméstica (*Coturnix japonica*), codornas selvagens (*Coturnix coturnix*), encontradas na China foi estudada usando marcadores de DNA microssatélites por Chang *et al.* (2007). Farrag *et al.* (2011) analisaram a diversidade genética de três populações codornas japonesas do Cazaquistão e Amirinia *et al.* (2007) analisaram em quatro populações de codornas japonesas do Iram.

Atualmente não se tem registro de utilização de marcadores microssatélites em populações melhoradas de codorna de corte, portanto este projeto tem como objetivo estimar a variabilidade genética e grau de endogamia em uma linhagem de codornas de corte selecionadas por peso corporal de quinze gerações sucessivas, utilizando marcadores microssatélites desenvolvidos para codornas japonesas.

3. Objetivos e metas a serem alcançadas

Estimar a variabilidade genética e grau de endogamia utilizando marcadores microssatélites desenvolvidos para codornas japonesas.

4. Metodologia a ser empregada

O projeto será desenvolvido em parceria entre o Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel e o Laboratório de Engenharia Genética Animal do Centro de Biotecnologia, ambos da

Universidade Federal de Pelotas/RS. Serão analisadas 300 codornas de uma linhagem de corte desenvolvida pela Universidade Federal de Pelotas, divididas em 100 animais por geração, de um total de três gerações consecutivas.

O DNA será extraído de amostras de sangue com o Kit QIAamp (Qiagen, Valencia, CA, USA) e a análise da variabilidade genética e grau de endogamia através de 10 loci de marcadores microssatélites desenvolvidos por KAYANG *et al.* (2002) para codorna japonesa (*Coturnix japonica*). Os marcadores serão amplificados através da técnica de PCR e os fragmentos de DNA produzidos submetidos à eletroforese vertical e visualizados em gel de poliacrilamida a 8%, corados com nitrato de prata.

A matriz de genótipos obtida será utilizada para estimar os parâmetros genéticos como: frequências alélicas, heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada e coeficiente de endogamia, calculados com os softwares Genetic Data Analysis 1.0 e Genepop 4.0. O poder de discriminação individual dos loci será estimados pelas probabilidades de identidade genética (PI) e de exclusão de paternidade (PE), para cada locus e para o conjunto de loci, com o software Identity 1.0.

5. Cronograma do Projeto

ATIVIDADE	1/2016	2/2016	1/2017	2/2017	1/2018	2/2018
Extração DNA		X	X			
PCR				X		
Genotipagem				X		
Análise resultados				X		
Revisão	X	X	X	X	X	
Desenvolvimento tese					X	X
Redação textos publicação					X	X

Referências Bibliográficas

AMIRINIA, C.; EMRANI, H.; ARBABE, M.A. et al. Evaluation of eight microsatellite loci polymorphism in four Japanese quail (*Coturnix japonica*) strain in Iran. **Pakistan Journal Biological Science**. v.10, n.8, p.1195-9, 2007.

BENTSEN, H.B.; OLESEN, I. Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates. **Aquaculture**, v.204, p.349-359, 2002.

BREDA, F. C., EUCLYDES, R. F., PEREIRA, C. S., et al. (2004). Endogamia e limite de seleção em populações selecionadas obtidas por simulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 33(6), 2017-2025.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. 2.ed. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2009. 532p.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.C.; MORETZSOHN, M.C.; et al. Marcadores Microsatélites em espécies vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 46-50, 2003.

CAVALHEIRO, R. Endogamia: possíveis conseqüências e formas de controle em programas de melhoramento de bovinos de corte. **Anais... II Gempec – Workshop em Genética e Melhoramento na Pecuária de Corte**, 2004.

CHANG, G.B.; CHANG, H.; LIU, X.P. et al. Genetic Diversity of Wild Quail in China Ascertained with Microsatellite DNA Markers Asian-Aust. **Journal Animal Science** v.20, n.12, p.1783-1790, 2007

CRISPIM, A. C. (2013). **Estudo da endogamia e da estrutura de populações de codornas de corte sob seleção**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de viçosa.

COLBOURNE, J.K.; NEFF, B.D.; WRIGHT, J.M.; et al. DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)_n microsatellites and its potential for assessment of mating success. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.53, p.342-349, 1996.

FARRAG, S.A.; TANATAROV, A.B.; SOLTAN, M.E. et al. Microsatellite Analysis of Genetic Diversity in Three Populations of Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) from Kazakhstan. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. V.10, n.18, p.2376-2383, 2011.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa. 2.ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN. 220p.1996.

FESSEHAYE, Y.; EL-BIALY, Z.; REZK, M.A.; et al. Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: a microsatellite analysis. **Aquaculture**, v.256, p.148- 158, 2006.

FREELAND, J. R..**Molecular Ecology**. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. PM Cid:548581.2005.

GALEUCHET D.J.; PERRET C.; FISCHER, M.Microsatellite variation and structure of 28 populations of the common wetland plant *Lychnis Flos-cuculi* L., in a fragmented landscape. **Molecular Ecology**, v. 14, n.4, p. 991-1000, 2005.

GODINHO,R.M. **Endogamia e heterose em características de desempenho e reprodutivas de codornas de corte**. 2014.67f.Dissertação (Genética e melhoramento animal).Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte-MG.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. Principles of Population Genetics. 4 th ed.Sinauer Associates, Incorporated, 1997, 545p.

HILL W.G. Maintenance of quantitative genetic variation in animal breeding programmes. **Liv. Prod. Sci.**, 63, 99-109, (2000).

KAYANG, B.B.; INOUE-MURAYAMA, M.; HOSHI, T. et al. Microsatellite loci in Japanese quail and cross-species amplification in chicken and guinea fowl. **Genetics Selection Evolution**, v.34, p.233-253, 2002.

KAYANG, B.B.; VIGNAL, A.; INOUE-MURAYAMA, M. et al. A first-generation microsatellite linkage map of the Japanese quail. **Animal Genetics**. v.35, p.195– 200, 2004.

MARTINS, E.N. Perspectivas do melhoramento genético de codornas no Brasil. In:

SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COTURNICULTURA, 1., 2002, Lavras. **Anais...**

Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. p.204-208.

MENEZES, M. P. C., MARTINEZ, A. M., RIBEIRO, M. N., et al. (2006). Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 35(4), 1336-1341.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998.

MOREIRA, A.A.; HILSDORF, A.W.S.; SILVA, J.V.; et al. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 521-526, 2007.

NEFF, B.D.; FU, P.; GROSS, M.R. Microsatellite Multiplexing in Fish. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 129, p. 585-593, 2000.

- OLIVEIRA P. S. **Estrutura populacional e tendência genética de características de crescimento e adaptação de bovinos da raça Nelore, linhagem Lemgruber.** 1999. 95f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP, Pirassununga.
- PANG, S.W.Y.; RITLAND C.; CARLSON, J.E. et al. Japanese quail microsatellite loci amplified with chicken-specific primers. **Animal Genetics**. v.30, p.195-199, 1999.
- SANTANA, J., & JOSAHKIAN, A. (2011). **Efeitos da endogamia em zebuínos com ênfase na raça nelore.** *Cadernos de Pós-Graduação da FAZU*, 1.
- SILVA, M.B. Molecular genetics and animal systematics: A brief history, contributions and challenges. **Estud. Biol., Ambiente Divers.**, v.34, n.83, p. 157-163. 2012.
- TENEVA, A. Molecular markers in animal genome analysis. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v.25, n.5-6, p.1267-1284. 2009.
- YUE, G.H.; ORBAN, L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p.99-100, 2002.
- XU, Z.; PRIMAVERA, J.H.; DE LA PENA, L.D. et al. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. **Aquaculture**, v. 199, p. 13-40, 2001.

4 Relatório do trabalho de campo

4.1 Desenvolvimento do trabalho

O projeto teve como objetivo estimar a variabilidade genética e grau de endogamia em uma linhagem de codornas de corte, desenvolvida pelo departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas e selecionadas pelo peso corporal de três gerações sucessivas (13°, 14° e 15°), utilizando marcadores microssatélites desenvolvidos para codornas japonesas.

4.2 Seleção dos animais

Para obtenção de cada uma das gerações, os acasalamentos foram realizados ao acaso, evitando-se o acasalamento entre parentes, utilizando-se, após seleção, duas fêmeas para cada macho, num total de 60 machos e 120 fêmeas. Os animais permaneceram alojados em gaiolas individuais, para proporcionar seu controle por *pedigree*, desde o nascimento até o momento da seleção. Os períodos de acasalamento e coleta de ovos foram de 15 dias, incubados em seguida no aviário do Instituto Federal Sul-Riograndense (IF-Sul). As aves destinadas para o abate foram selecionadas aleatoriamente aos 22 dias de idade.

4.3 Abate das aves

O abate das aves foi realizado no abatedouro do campus Visconde da Graça/IFSUL, onde foram submetidas a um jejum de 4 horas, penduradas pelo metatarso em suporte próprio para a espécie e então insensibilizadas através da eletronarcose, por meio de uma corrente elétrica entre 30 e 45 V com frequência de 60 Hz, por 10 segundos. Nos dois segundos seguintes foi realizada a sangria mecânica com lâmina cortante. Foi respeitado o tempo de três minutos para que ocorresse a completa sangria. Após este tempo as aves foram submetidas à coleta de material. (Aprovação comitê de ética - CCEA 2618-2014).

4.4 Coleta do material e extração do DNA

Foram coletados do músculo *Pectoralis major*, fragmentos de aproximadamente 200mg, num total de 300 animais, divididos em 100 animais por geração, de três gerações sucessivas de codornas de corte.



Figura 1. Coleta do músculo do peito

Esses fragmentos foram armazenados em etanol 95% e preservados a -20°C até o momento da extração. A metodologia utilizada para extração do DNA foi a base de cloreto de sódio (NaCl), proposta na literatura por Lopera-Barrero *et al.* (2008) e descrita a seguir:

- I) Primeiramente, visando a ruptura da parede e membranas celulares, foi feita a maceração do tecido muscular promovendo a liberação da molécula de DNA;
- II) Adição de 600 μL de solução tampão TNE1 (5 ml de tris HCl 1 Molar, pH 8,0, 10 ml de EDTA, 1ml de NaCl, 84 ml de água Milli-Q), para promover a lise celular, porém preservando sua estrutura, acidez e osmolaridade;
- III) Adição de 330 μL de TNE2 (5ml tris HCl 1 Molar pH 8,0; 10 ml EDTA, 1ml NaCl; 10 ml SDS 20%), para solubilizar as membranas e auxiliar na inativação das enzimas;
- IV) 4 μL de proteinase K para a desnaturação proteica e incubação imediata à 50°C por 12 horas;
- V) Após a incubação, para precipitação de proteínas e restos celulares foram adicionados 340 μL de NaCl 5M;
- VI) Centrifugação do material a 12,000 rpm e acrescidos 900 μL de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA;
- VII) Lavagem do material com 200 μL de etanol 70%;
- VIII) Desprezo da fase líquida e secagem das amostras em estufa a 40°C ;
- IX) Ressuspensão do DNA com 100 μL de tampão TE buffer (10 mM de Tris pH 8.0 e 1 mM de EDTA)

Após a extração, as amostras foram submetidas a eletroforese horizontal com gel de agarose 1% e tampão TBE1X por 20 minutos a uma voltagem de 80 volts. Utilizou-se 7 µL de DNA sendo o mesmo corado com 3 µL de Blue Green Loading Dye™ (LGC Biotecnologia, São Paulo-BR) e 5 µL de DNA Ladder 100pb (Ludwig Biotec), posteriormente visualizados em transiluminador.

4.5 Desenho de *primers*

Primeiramente, foram utilizados 10 *loci* de marcadores microssatélites desenvolvidos por Kayang *et al.* (2002) para codorna japonesa (*Coturnix japonica*) (Tabela 1). Esses *loci* foram sintetizados pela empresa (Invitrogen,USA).

Para amplificação dos microssatélites via reação em cadeia da polimerase (PCR), inicialmente, foram utilizadas as mesmas condições de temperatura de *melting* (T_m) estabelecidas pelo fabricante, mas não foram obtidos resultados positivos para nenhum dos marcadores. Uma segunda tentativa foi feita utilizando a T_m indicada pelos autores Kayang *et al.*, (2002), ainda sem resposta de amplificação. Em outras tentativas, foram utilizadas novas concentrações de reagentes e novas temperaturas de anelamento ($T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$), além de uma média entre a temperatura estabelecida pelo fabricante e a indicada por Kayang *et al.*, (2002), através do site (OligoAnalyzer; IDT – *Integrated DNA Technologies*), e também através do cálculo da temperatura de *melting* ($T_m = 2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (C+G)$) além de PCR gradiente. A identificação dos *primers* utilizadas podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela.1. Marcadores microssatélites sintetizados proposto por Kayang *et al.*, (2002).

ID <i>Primer</i>	Sequência <i>Motif</i>	<i>Forward primer</i> (5' →3')	<i>Reverse primer</i> (5' →3')
GUJ001F	(CA) ₇ TG(CA) ₁₃	GAAGCGAAAGCCGAGCCA	CAGCACTTCGGAGCACAGGA
GUJ012F	(CA) ₆ TA(CA) ₆	TTTATGTACTGTTTGGGCGC	CTTGGACATAGAGTAAGCCA
GUJ013F	(CA) ₁₀	ACCAAACCCGAGATCCGACA	AGCGTTCGCGTTCCTCTTTC
GUJ019F	(CA) ₂₁	GGGGGCTGTAGGTCTGGATC	ATCGGGCACGCGAGGACCAT
GUJ040F	(CA) ₁₂	GTTGAAGCTCCCATCCCTCC	ACACCCCCACGGTCTTTGCA
GUJ049F	(CA) ₁₁	GAAGCAGTGACAGCAGAATG	CGGTAGCATTCTGACTCCA
GUJ052F	(CA) ₁₂	AAACTACCGATGTAAGTAAG	ATGAGATATATAAGGAACCC
GUJ074F	(CA) ₁₀	GTTGTCCTGGCTGAGATGGC	GGGTTTGAGGGCTTGGGGTT
GUJ090F	(CA) ₁₁ (TA) ₄	GCCTTCAGAGTGGGAAAT	TCTCACAGAAACAGCTCC

GUJ100F	(CA) ₁₂	GCATTTCCATCAGTACAACC	CAGAATATAAGGTCACAGCC
---------	--------------------	----------------------	----------------------

Por fim, foram desenhados três *primers* (Tabela 2) com base no genoma da *Coturnix japonica* contido no GenBank (NCBI - National Center of Biotechnology Information). Posteriormente esses marcadores foram sintetizados, fez-se a eluição dos mesmos para preparo da solução estoque (100 µM) e da solução trabalho (10 µM), conforme instruções do fabricante para posterior análise.

Tabela 2. Identificação dos marcadores, sequência de *primers*, grupo de ligação (LG), localização no genoma, sequência *motif*, tamanho esperado e temperatura de anelamento dos microssatélites propostos.

<i>Locus</i>	Sequência <i>primer</i> (5' → 3')	LG	Localização no genoma	Sequência <i>motif</i>	T.E (pb)	TA (°C)
Coturnix01	F: GGTGCCAGGGAGAATTAGGC R: TGGAAAGCGTCACGTCAAGT	1	164.593.786 164.594.063	(TGAA) ¹³	278	60,4
CcoUFPel03	F: TGTAAGTCGGTATTCATATGTGCAG R: GGTAATCCCTTGCTGGCTCT	1	171.422.775 171.423.018	(ATAG) ¹³	244	58
CcoUFPel04	F: TTGTGTGCATTTCTGGACTC R: TGTGTTTGCGCCATTATCA	1	134.793.949 134.794.236	(CATT) ¹³	327	58

4.6 Validação dos marcadores

A validação dos microssatélites consistiu na amplificação dos mesmos pela técnica de PCR gradiente, com volume final de 25 µL. Esta técnica objetivou a otimização da temperatura de anelamento dos *primers*, pois cada coluna do termociclador possuía uma temperatura de anelamento diferente, e através deste processo foi estipulada a temperatura ideal para o procedimento de PCR convencional.

As temperaturas pré-estabelecidas foram obtidas através da temperatura determinada pelos fabricantes e pela de melting *OligoAnalyzer* (IDT – Integrated DNA Technologies), ferramenta online utilizada para cálculo da temperatura de *melting*.

Para o procedimento do PCR, as seguintes condições foram pré-estabelecidas: desnaturação a 94°C por 5min, seguida por 30-35 ciclos de 94°C

por 30s, temperatura de anelamento de acordo com cada *primer* por 30s, extensão a 72°C por 40s e extensão final a 72°C por 10min.

A fim de verificar a presença de produtos de PCR, foi realizada a eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, onde em uma proveta graduada foi colocado 120 ml de tampão SB 1X (Borato de Sódio pH 8.0) com 1,2g de Agarose. A mistura foi colocada para aquecimento no micro-ondas até completa dissolução da agarose. O gel então foi colocado na moldeira (cuba) até sua polimerização. Em *parafilm* pipetou-se 1,1 µL de buffer de corrida (Azul de Bromofenol, Xileno Cianol, Glicerol), 1,1 µL de GelRed (Biotium, USA) e 4 µL de produto de PCR por amostra. Após, foi realizada corrida de 30 minutos a uma voltagem de 120 volts. A captura da imagem do gel se deu através de transiluminador de luz UV, conforme figura 2.

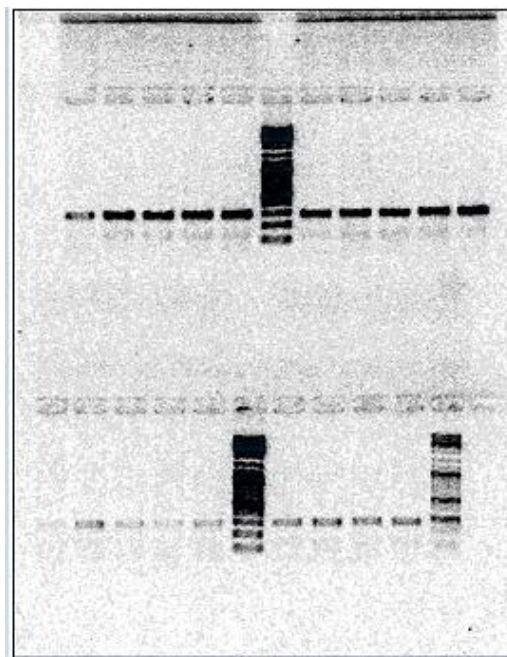


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1% dos marcadores validados.

4.7 Amplificação e genotipagem dos microssatélites

Tendo em vista as dificuldades enfrentadas e todo tempo despendido até alcançar o sucesso na amplificação dos marcadores, obteve-se a necessidade de trabalhar com um número menor de animais quando comparado a proposta inicial. Após a validação dos *loci* e estabelecimento da temperatura de anelamento foram selecionados para a técnica de PCR animais das 3 gerações consecutivas de codornas de corte, sendo 30 indivíduos por geração (15 machos

e 15 fêmeas) totalizando 90 animais, a fim de se aferir a eficácia dos marcadores desenvolvidos para a espécie. As Figuras 2, 3 e 4 ilustram o perfil eletroforético destes marcadores nos animais de estudo.

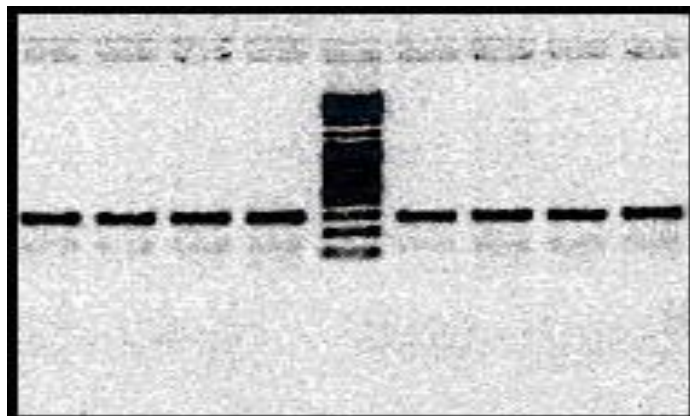


Figura 3. Perfil eletroforético do *locus* Coturnix01 em gel agarose 1%.

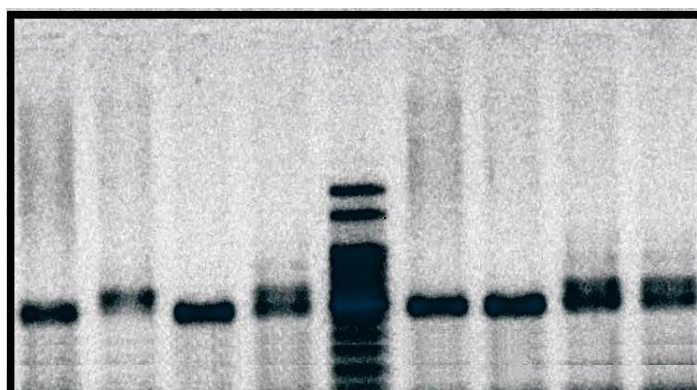


Figura 4. Perfil eletroforético do *locus* CcoUFPel03 em gel agarose 1%.

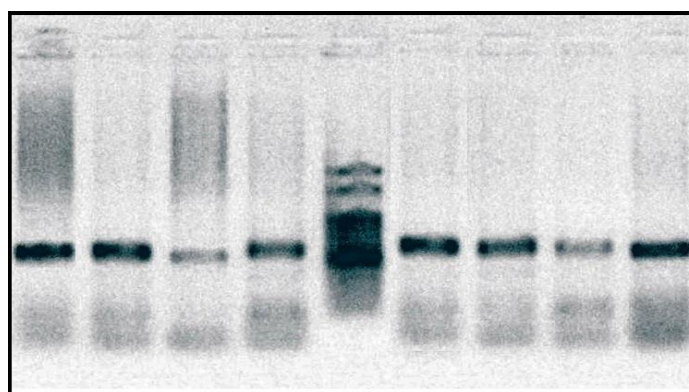


Figura 5. Perfil eletroforético do *locus* CcoUFPel04 em gel agarose 1%.

Para separação dos amplicons e detecção dos polimorfismos foi realizada genotipagem por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, onde em um becker

foram homogeneizados 1,2mL de H₂O ultrapura, 4,8 mL de solução acrilamida 30%, 6 mL de tampão TBE1X, 96 µL de APS 10% 9,6 µL de TEMED. Cada poço do gel foi carregado com 1,1 µL de *buffer* de corrida, 4µL de produto de PCR, e corados com 1,1 µL de GelRed (Biotium, USA) e seus tamanhos estimados com Ladder 50 pb (Ludwig, BR). A corrida foi conduzida a 140 volts por 90 minutos e após os géis foram visualizados e fotografados com transiluminador de Luz UV.

A partir das imagens obtidas fez-se a visualização e interpretação do tamanho dos fragmentos de cada indivíduo dos 3 *loci* amplificados, conforme figuras 5 e 6.

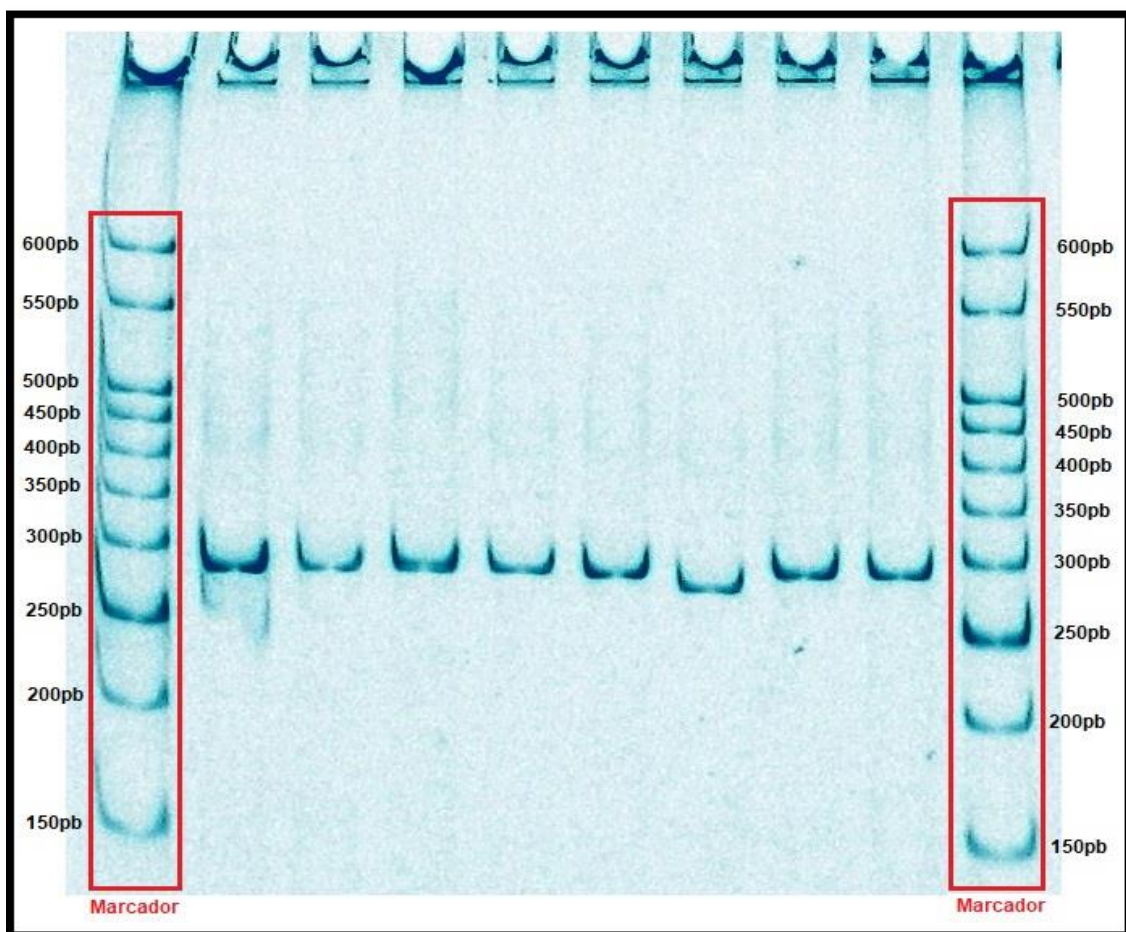


Figura 6. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 8% do *locus* Coturnix01.

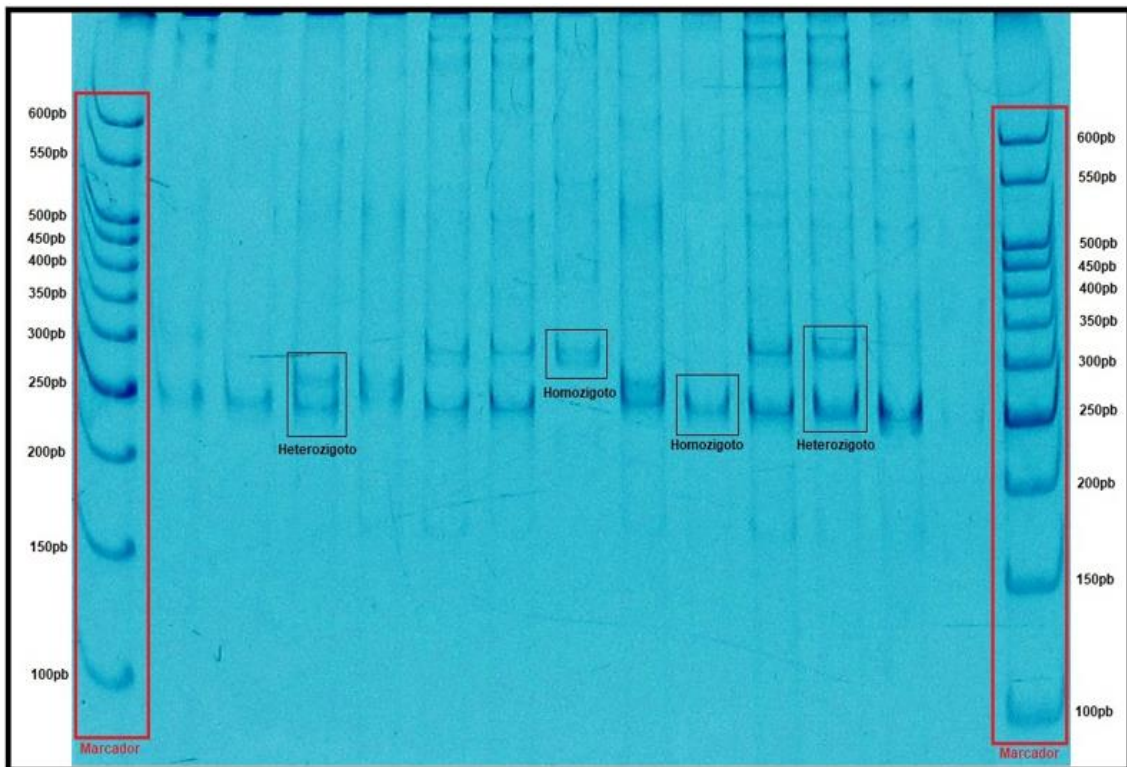


Figura 7. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 8% do *locus* CcoUFPEL03.

4.8 Obtenção e análise dos resultados

A estimação dos tamanhos de alelos para cada marcador foi realizada por observação direta no gel de poliacrilamida, com base nos mesmos foram avaliados estimadores populacionais das gerações estudadas, tais como número de alelos por *locus*, conteúdo de informação polimórfica do marcador (PIC), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e coeficiente de endogamia (F_{IS}) utilizando os programa Genepop e Cervus.

5 Artigo 1

Predição de marcadores microssatélites em codornas¹

¹ Artigo formatado de acordo com as normas da Revista Ciência e Agrotecnologia ISSN 1981-1829

Predição de marcadores microssatélites em Codornas

JERUSA MARTINS GERMANO

SUZANE FONSECA FREITAS

WELINTON SCHRÖDER REINKE

RAFAEL ALDRIGHI TAVARES

NELSON JOSÉ LAURINO DIONELLO

RESUMO: O estudo objetivou identificar regiões microssatélites e *loci* potencialmente amplificáveis no genoma completo da codorna. A partir de mineração *in silico*, encontrou-se 144,241 SSR e 693 *motif*. Os critérios utilizados foram presença de SSR simples, identificação de sequências dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos com 5 repetições, desenho de *primers* com 18 a 24 nucleotídeos e conteúdo GC de 40-60%. O *motif* mais encontrado foi o dinucleotídeos, totalizando 64,36%, seguido do tri- (14,73%), tetra- (13,45%), penta- (5,46%) e hexanucleotídeos (1,25%). Já nas classes di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídeos foram AT/AT (23.404), CCT/AGG (382), AAAT/ATTT (3852), ATTTT/AAAAT (658) e TTTTTC/GAAAAA (115), respectivamente. Foram encontrados 1.524 *loci* microssatélites potencialmente amplificáveis (PALs), sendo esses polimórficos e com *primers*. A classe com maior número de PALs foi a dinucleotídeos, seguida de tetra-, penta-, tri- e hexanucleotídeos totalizando 718 (47,11%), 310, (20,34%), 270 (17,71%), 132 (8,66%) e 94 *loci* (6,17%), respectivamente. Foram identificadas 350 *loci* com maior potencial de amplificação (bPALs), tendo como critérios o polimorfismo, ser tetra-, penta- ou hexanucleotídeos e ter 8 repetições. O número de alelos encontrados para tetra-, penta- e hexanucleotídeos foram 1287, 963 e 223, respectivamente. Os marcadores

26 potencialmente amplificáveis serão aplicáveis para estudos de melhoramento genético de
27 codornas.

28

29 Palavras-chaves: *Coturnix coturnix*, Genoma, *Loci*, SSR

30

31 **INTRODUÇÃO**

32 A coturnicultura é um dos setores avícolas que tem apresentado destaque graças
33 as novas tecnologias empregadas na sua cadeia produtiva, fornecendo ótimos resultados
34 aos produtores a um baixo custo de investimento (Silva *et al.*, 2018). Contudo, algumas
35 barreiras são encontradas dentro do setor dificultando sua melhor exploração.
36 Atualmente, a principal barreira encontrada é a falta de material genético e a falta de
37 embasamento técnico no esquema de seleção, levando a depressão endogâmica, o que
38 resulta na queda da produção, pois diminui a postura e a fertilidade, bem como acarreta
39 no aumento da mortalidade (Leandro *et al.*, 2019).

40 O desenvolvimento de linhagens mais produtivas seria um caminho para o setor
41 alcançar melhores índices produtivos. Para isso, se faz necessário o uso de novas
42 tecnologias que permitam o melhor conhecimento das características de produção desses
43 animais.

44 Em frente aos avanços da biotecnologia, marcadores moleculares vêm
45 incrementando diferentes áreas de pesquisas, pois através deles é possível identificar e
46 selecionar características desejáveis nos processos de seleção assistida.

47 Marcadores moleculares são uma poderosa ferramenta que pode ser utilizada no
48 estudo de populações, pois permitem a localização de determinados pontos nos
49 cromossomos, sendo muito útil dentro dos programas de melhoramento genético
50 (Regitano, 2001). Dentre as opções de marcadores disponíveis, os microssatélites são os

51 mais amplamente utilizados nos programas de melhoramento. Também chamados de
52 sequencias simples repetidas (SSR – *Simple sequence repeat*), esses marcadores se
53 caracterizam por serem facilmente encontrados em todo genoma, serem altamente
54 polimórficos, reprodutíveis, possuírem herança codominante e natureza multialélica,
55 necessitam de pequena quantidade de DNA para sua análise (Oliveira *et al.*, 2006;
56 Oliveira e Silva, 2008). São sequencias simples de um a seis nucleotídeos, repetidos em
57 tandem e podem ser encontrados em regiões codificadoras e não codificadoras (Litt e
58 Luty, 1989), podendo ser classificados quanto ao tipo de repetição, sendo mono-, di-, tri-
59 , tetra-, penta- e hexanucleotídeos (Weber, 1990) e seu elevado grau de polimorfismo é
60 derivado da variação no número de repetições de um alelo para outro (Litt e Luty, 1989).

61 A análise de marcadores microssatélites se dá através da amplificação via PCR
62 (Reação em Cadeia da Polimerase), com uso de *primers* específicos. Essa técnica é capaz
63 de amplificar um determinado segmento de DNA milhares ou até mesmo milhões de
64 vezes, fornecendo respostas capazes de direcionar as práticas de produção, pois sabe-se
65 que o fenótipo é influenciado pelo fator genético (Ladeira *et al.*, 2011).

66 Entretanto, o seu desenvolvimento envolve a necessidade de construção de
67 bibliotecas genômicas, envolvendo alto investimento inicial e grande tempo despendido
68 (Kölliker *et al.*, 2001). Contudo, diante dos constantes avanços na era genômica, tais
69 como a tecnologia NGS (*Next Generation Sequencing*), tornou-se possível o
70 sequenciamento de DNA de forma eficiente para espécies que não possuem banco de
71 dados disponíveis (Castoe *et al.*, 2012) através da descoberta de milhares de regiões
72 microssatélites potencialmente amplificáveis (PALs), podendo essas serem selecionadas
73 para estudos genéticos (Castoe *et al.*, 2010).

74 Esta pode ser vista como uma abordagem promissora para espécies com
75 informação genômica limitada, pois programas de melhoramento podem se beneficiar
76 muito com o uso dessas ferramentas genômicas (Silva *et al.*, 2013).

77 Este estudo tem como objetivo localizar regiões microssatélites no genoma
78 completo da codorna e identificar *loci* potencialmente amplificáveis, visando contribuir
79 para o entendimento das variações genéticas da espécie.

80

81 **METODOLOGIA**

82 Para análise e identificação das regiões microssatélites através do banco de dados
83 Ensembl obteve-se o genoma completo da espécie *Coturnix japonica* como referência
84 (acesso GCA_001577835.1). Através do software GMATA (*Genome-wide Microsatellite*
85 *Analyzing Toward Application*) foi feita a mineração de microssatélites no genoma,
86 utilizando como critérios: presença de SSR simples, identificação de sequências
87 dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos
88 com pelo menos cinco repetições, desenho de primers com 18 a 24 nucleotídeos com
89 conteúdo GC (conteúdo Guanina-citosina) de 40-60%. Após identificação das
90 sequências, as mesmas foram agrupadas em um subdiretório local do software. Para
91 identificação de marcadores potencialmente amplificáveis (PALs) foi realizada e-PCR
92 (*eletronic PCR*) a fim de determinar o padrão alélico dos marcadores minerados. Por fim,
93 foram considerados somente marcadores polimórficos (que apresentaram no mínimo dois
94 alelos) das classes di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídeos. Posteriormente, para
95 obtenção dos melhores marcadores, foram selecionados apenas microssatélites
96 polimórficos, pertencentes as classes tetra-, penta- e hexanucleotideo com no mínimo oito
97 repetições, no qual foram denominados “*best PALs*” (bPALs), de acordo com o proposto
98 por Castoe *et al.*, (2012)

99 RESULTADOS E DISCUSSÃO

100 Foram encontradas 144,241 SSR e 693 diferentes sequências *motif*, nas quais
101 125,466 apresentaram *primers*. Na Tabela 1, pode ser observado número de
102 microssatélites observados por classe, e suas sequências *motif* sendo eles di-, tri-, tetra,
103 penta- e hexanucleotídeos, os quais foram 93,538 (64,36%), 21,412 (14,73%), 19,552
104 (13,45%), 7,928 (5,46%) e 1,811 (1,24%), respectivamente.

105 Huang *et al.* (2016) conduziram um estudo avaliando as regiões microssatélites
106 de seis espécies de aves (*Gallus gallus*, *Taeniopygia guttata*, *Meleagris gallopavo*,
107 *Geospiza fortis*, *Melopsittacus undulates* e *Columba livia*) e os resultados obtidos não
108 corroboram com os encontrados no presente estudo. Tetranucleotídeos foi a segunda
109 classe mais abundante no genoma de quatro pássaros estudados, com exceção do *T.*
110 *guttata* e *M. undulates*, que tiveram a classe dinucleotídeo em maior número.
111 Trinucleotídeo foi o terceiro tipo mais frequente nos seis genomas de aves analisados. As
112 classes penta- e hexanucleotídeo foram as que menos contribuíram com regiões
113 microssatélites nas aves estudadas, esses em concordância com o presente estudo. Esses
114 resultados mostram que embora todos os genomas selecionados fossem pertencentes a
115 mesma espécie animal, não há um padrão de distribuição de classes microssatélites para
116 os mesmos.

117 Tabela 3. Número de *motifs*, número de loci e porcentagem das diferentes classes de
118 microssatélites encontrado no genoma da codorna.

	Nº <i>motif</i>	Nº <i>loci</i>	%
Di	8	93538	64,36
Tri	28	21412	14,73
Tetra	95	19552	13,45
Penta	286	7928	5,46
Hexa	276	1811	1,25

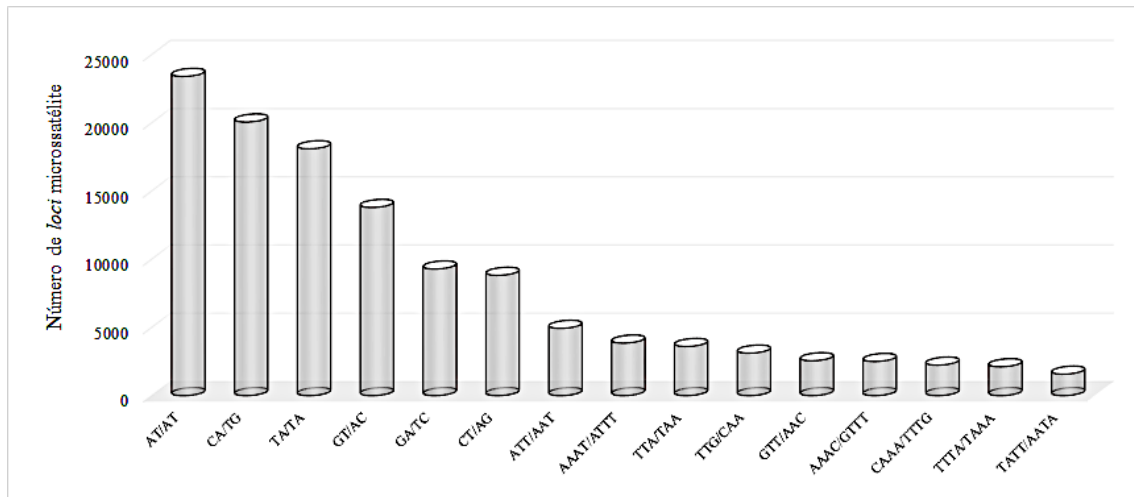
119

120 Um outro estudo envolvendo seis espécies de aves (*Alca torda*, *Ptychoramphus*
121 *aleuticus*, *Campylorhynchus brunneicapillus*, *Pelecanus occidentalis*, *Sula bassanus* e

122 *Oceanodroma castro*) foi conduzido por Lance *et al.*, (2013). O número de sequências
123 microssatélites encontradas, de forma geral, foram baixas e bastante variadas, desde 2,541
124 a 113,109, sendo esse o que mais se aproximou do encontrado nesse estudo. Quanto as
125 classes, também se observaram resultados bem variados, para espécie *A. torda* e *C.*
126 *brunneicapillus* os hexanucleotídeos foram mais frequentes, seguindo de di-, penta-,
127 tetra- e trinucleotídeos e penta-, tetra-, tri- e dinucleotídeos, respectivamente. Para espécie
128 *P. aleuticus*, a classe que ocorreu em maior número foi trinucleotídeos, seguido de di-,
129 tetra-, penta- e hexanucleotídeos. Já as espécies *P. occidentalis* e *S. bassanus*,
130 apresentaram como classe mais frequente os pentanucleotídeos, seguindo de tri-, hexa-,
131 di- e tetranucleotídeos para ambas espécies. Por fim, a classe dinucleotídeos foi a mais
132 observada para espécie *O. castro*, seguido de tri-, hexa-, penta- e tetranucleotídeos.

133 Quanto a distribuição dos *motifs* de repetição, a sequência AT /AT (23,404 ou
134 16,23%) foi a mais abundante no genoma, seguido das sequências CA /TG (20,062 ou
135 13,90%), TA/TA (18,099 ou 12,55%), conforme pode ser observado na Figura 1, na qual
136 mostra as 15 sequências *motif* mais ocorrentes. Ao avaliarmos o número de *motifs* por
137 classe, dinucleotídeo foi a que apresentou maior ocorrência (64,36%), sendo AT/AT a
138 sequência mais abundante (23,404) e CG/CG a menos abundante (23). Dentre as classes
139 analisadas, trinucleotídeos representaram 14,73% sendo o motivo mais frequente
140 CCT/AGG (382) e o menos frequente CGA/TCG (3). Tetranucleotídeos representaram
141 cerca de 13,45% sendo o mais recorrente AAAT/ATTT (3.852) e o menos GTTC/GAAC
142 (1). Pentanucleotídeos somaram 5,46%, sendo o motivo mais presente ATTTT/AAAAT
143 (658) e o dentre os menos recorrentes estão TAAGA/TCTTA, GTGCA/TGCAC,
144 GCAAC/GTTGC, TCTAG/CTAGA, GACTG/CAGTC, GCTCT/AGAGC,
145 CTGAG/CTCAG, ATGGT/ACCAT (1), Hexanucleotídeos corresponderam 1,25%,
146 sendo o motivo mais comum TTTTTC/GAAAAA (115) e dentre os menos estão

147 CACGGA/TCCGTG, GAGACA/TGTCTC, CGAGAC/GTCTCG, TAGAAA/TTTCTA,
 148 GACTTC/GAAGTC, ATGGGA/TCCCAT, TATCAC/GTGATA, ATATAA/TTATAT
 149 (1).



150
 151 Figura 2. Número de *motifs* mais ocorrentes no genoma da codorna.

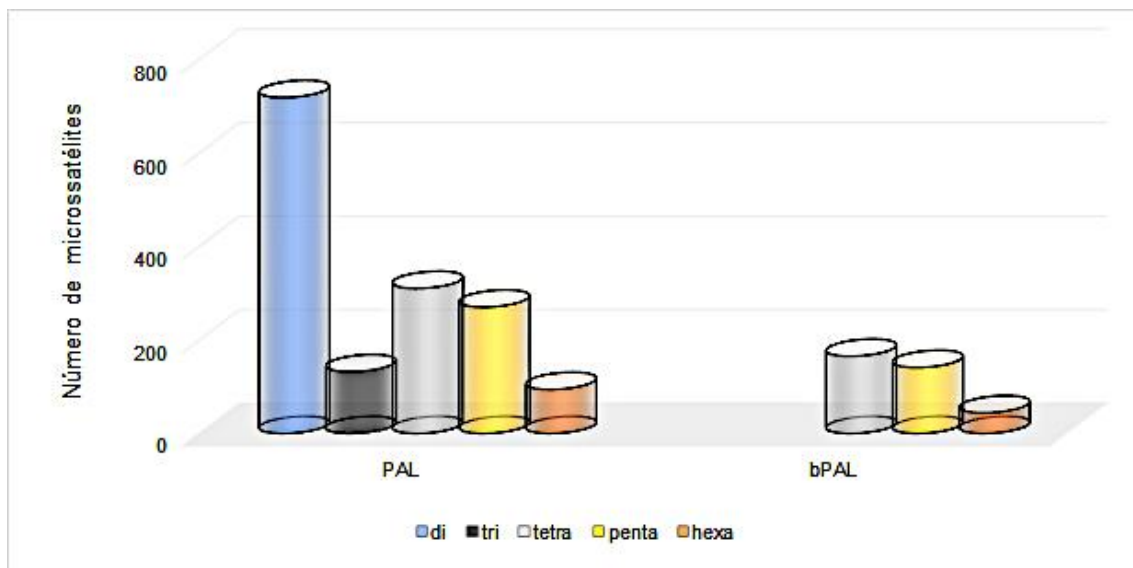
152

153 Na categoria dinucleotídeos, para os seis genomas analisados por Huang *et al.*
 154 (2016), todos tiveram (AT)*n* como motivos mais frequentes, exceto para *G. fortis*, sendo
 155 o motivo mais frequente (AC)*n*. Para trinucleotídeos, todos tiveram motivo mais
 156 frequente AAT exceto *C. livia* que teve como *motif* mais frequente AAC. Os *motifs* tetra-
 157 e pentanucleotídeos mais abundantes foram uniformes em todas as seis espécies, sendo
 158 AAAC e AAACA, respectivamente. O *motif* hexanucleotídeo mais frequente foi
 159 AAAGAA em todos os genomas estudados, exceto para *M. undulates*, no qual o mais
 160 predominante para a classe foi AACCCCT.

161 Castoe *et al.*, (2012) ao estudarem regiões microsatélites da cobra *Python*
 162 *molurus bivittatus* e dois pássaros *Centrocercus minimus* e *Nucifraga columbiana*,
 163 encontraram diferentes tipos de *motif* de repetição, no entanto motivos tetranucleotídeos
 164 foram os que mais ocorreram em ambas as espécies, seguindo de di-, tri-, hexa- e penta-
 165 para *Python molurus bivittatu* e tri-, di-, penta- e hexanucleotídeos para *Centrocercus*

166 *minimus* e tri-, hexa-, di- e penta- para *Nucifraga columbiana*, mostrando diferenças até
167 mesmo entre as duas espécies de pássaros. O *motif* mais recorrente na *P. bivittatus* foi
168 AAAT e para ambas espécies de aves foram AAAC, seguido do AAAT.

169 Do total de leituras obtidas, 1,524 microssatélites foram classificados como *loci*
170 potencialmente amplificáveis (PAL) (Figura 2), onde foram considerados a presença de
171 um conjunto de *primers* para amplificação dos mesmos, bem como caráter polimórfico
172 quanto submetidos a e-PCR. A classe com maior número de PALs foi a dinucleotídeos,
173 seguida de tetra-, penta-, tri- e hexanucleotídeos totalizando 718 (47,11%), 310 (20,34%),
174 270 (17,71%), 132 (8,66%) e 94 *loci* (6,17%), respectivamente.



175
176 Figura 3. *Loci* potencialmente amplificáveis (PALs) e *best* PALs (bPALs) encontrados
177 no genoma da codornas.

178
179 Visando identificar marcadores que tenham maior sucesso para análise *in vitro*,
180 buscou-se identificar *loci* com maior potencial de amplificação, através de uma filtragem
181 nos resultados e os melhores *loci* foram selecionados. Para isso, alguns critérios foram
182 utilizados, permanecendo apenas microssatélites polimórficos, com repetições longas
183 (tetra-, penta- e hexanucleotídeos) e com no mínimo oito repetições observadas, sendo
184 esses considerados os melhores *loci* potencialmente amplificáveis, doravante

185 denominado *best PAL* (bPALs) (Figura 2). Foram identificados um total de 350 bPALs,
186 sendo 165 tetra (41,14%), 141 penta (40,29%) e 44 hexanucleotídeo (12,57%) (Figura 2).

187 O número de alelos encontrados foram 1,287 (\bar{x} 8), sendo o mínimo de dois e o
188 máximo de 34 alelos para tetranucleotídeos, 963 (\bar{x} 7), sendo mínimo de dois e máximo
189 de 29 alelos para pentanucleotídeos e 223 (\bar{x} 6), com mínimo de dois e máximo de 16
190 alelos para hexanucleotídeos.

191 O número total de PALs encontrados por Lance *et al.*, (2013), para as seis
192 espécies de aves estudadas, foi de 16,874 (variando de 418 a 4,760), o que torna a média
193 de *loci* potencialmente amplificáveis superior ao citado nesse trabalho. No entanto, ao
194 considerar pPALs, os autores determinaram hexa- e penta- como as classes mais
195 abundantes e tri- e dinucleotídeos em menor quantidade.

196 Apesar do avanço das pesquisas nas áreas de biologia molecular e genômica, os
197 marcadores microsatélites têm sido muito pouco desenvolvidos para a espécie em
198 questão. Na literatura, foram encontrados poucos trabalhos que tenham buscado a
199 identificação de regiões microsatélites em codornas, assim como o único trabalho
200 encontrado com identificação de *loci* potencialmente amplificáveis no genoma de aves
201 foi o citado nesse estudo, sendo esse um dos trabalhos pioneiros na área.

202

203 **CONCLUSÃO**

204 Com base no exposto, os PALs obtidos no presente trabalho serão aplicáveis
205 para a condução de estudos futuros que visem a elucidação de novas estratégias
206 genômicas para uso nos programas de melhoramento genético de codornas.

207

208 **AGRADECIMENTOS**

209 Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
210 Superior (CAPES) e Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ) pertencente a
211 Universidade Federal de Pelotas (UFPel) pelo fornecimento de recursos para o
212 desenvolvimento desta pesquisa.

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241 **REFERÊNCIAS**

- 242 CASTOE, TA, POOLE, AW, KONING, A P J, DAZA JM, SMITH, EN e POLLOCK
243 DD (2010). Rapid identification of thousands of copperhead snake (*Agkistrodon*
244 *contortrix*) microsatellite loci from modest amounts of 454 shotgun genome sequence.
245 *Molecular Ecology Resources*, v. 10, n. 2, p. 341–7. [https://doi.org/10.1111/j.1755-](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02750)
246 [0998.2009.02750](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02750).
- 247 CASTOE, TA, POOLE, AW, KONING, APJ, JONES, KL, TOMBACK, DF, OYLER-
248 MCCANCE, SJ, FIKE, JA, LANCE, SL, STREICHER, JW, SMITH, E.N e
249 POLLOCK, DD (2012). Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End
250 Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. *PLOS ONE*, v.7, p.1-10.
251 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030953>
- 252 HUANG, J, LI, WJ, JIAN, ZY, YUE, BS e YAN, YF (2016). Genome-wide distribution
253 and organization of microsatellites in six species of birds. *Biochemical Systematics and*
254 *Ecology*, 67, 95– 102. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.05.023>
- 255 KÖLLIKER, R, JONES, ES, DRAYTON, MC, DUPAL MP, e FORSTER, JW (2001).
256 Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for white
257 clover (*Trifolium repens* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.102, n.2-3,
258 p.416-424. doi.org/10.1007/s001220051662
- 259 LADEIRA, PRS, ISAAC, C, FERREIRA, MC (2011). Reação em cadeia da polimerase
260 da transcrição reversa em tempo real. *Revista Medicina*, v. 90, n. 1, p. 47-51.
261 <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v90i1p47-51>
- 262 LANCE, SL, LOVE, CN, NUNZIATA, SO, O'BRYHIM, JR, SCOTT, DE, FLYNN,
263 RW E JONES, KL (2013). 32 species validation of a new Illumina paired-end approach
264 for the development of microsatellites. *PLoS ONE* 8:e81853.
265 <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0081853>

266 LEANDRO, NSM, CAFÉ, MB, STRINGHINI, JH, GOMES, NA, MENDONÇA, RAN
267 e ARAÚJO, ICS (2019). Aspectos reprodutivos e desempenho de diferentes linhagens
268 de matrizes de codornas japonesas. *Ciência Animal Brasileira*, 20, e-44896.
269 <https://doi.org/10.1590/1809-6891v20e-44896>

270 LITT, M e LUTY, LA (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in*
271 *vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin
272 gene. *American Journal of Human Genetics*, Chicago, v.44, n.3, p.398-401.

273 OLIVEIRA, EJ, PÁDUA, JG, ZUCCHI, MI, IMACULADA, ZM, ROLAND, V,
274 CARNEIRO, MLV (2006) Origin, evolution and genome distribution of
275 microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, v.29, n.2, p.294-307.
276 <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000200018>

277 OLIVEIRA, MSP e SILVA, KJD (2008). Diferenciação genética entre procedências de
278 açazeiro por marcadores moleculares RAPD e SSR. *Revista Brasileira de Fruticultura*,
279 v.30, n.2, p.438-3. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452008000200029>

280 REGITANO, LCA e TALHARI, DT (2001). Protocolo de análise de marcadores
281 microssatélites. Embrapa Pecuária Sudeste - Capítulo em livro científico (ALICE).

282 SILVA, PI, MARTINS, AM, GOUVEA EG, PESSOA-FILHO, M, e FERREIRA, ME
283 (2013). Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis*
284 obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. *BMC Genomics*, v.
285 14, n. 1, p. 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-17>

286 SILVA, AF, SGAVIOLI, S, DOMINGUES, CHF e GARCIA, RG (2018).
287 Coturnicultura como alternativa para aumento de renda do pequeno produtor. *Arquivo*
288 *Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 70, n. 3, p. 913-920.
289 <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10065>.

- 290 WEBER, JL (1990). Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms.
291 Genomics, v. 7, p. 524-530. [http://10.1016/0888-7543\(90\)90195-z](http://10.1016/0888-7543(90)90195-z)

6 Artigo 2

Desenvolvimento, transferibilidade e validação de marcadores microssatélite tetranucleotídeo para codornas de corte²

² Comunicação formatada de acordo com as normas da Revista Bragantia ISSN 1678-4499

1 **Desenvolvimento, transferibilidade e validação de marcadores microssatélite**
2 **tetranucleotídeo para codornas de corte**

3
4 **Development, transferability and validation of tetranucleotide microsatellite**
5 **markers for meat quails**

6
7 JERUSA MARTINS GERMANO¹; SUZANE FONSECA FREITAS¹;
8 WELINTON SCHRÖDER REINKE²; RAFAEL ALDRIGHI TAVARES¹;
9 NELSON JOSÉ LAURINO DIONELLO¹; HEDEN LUIZ MARQUES MOREIRA³

10
11 Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - Universidade Federal de Pelotas -
12 Pelotas/RS¹

13 Graduação em Zootecnia - Universidade Federal de Pelotas – Pelotas/RS²

14 Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética – Universidade Federal de
15 Pelotas – Pelotas/RS³

16
17 **RESUMO**

18 O estudo objetivou desenvolver marcadores microssatélites (SSR) a partir do genoma da
19 codorna japonesa e avaliar a transferibilidade dos mesmos em codornas de corte, dado a
20 carência de ferramentas genômicas específicas para a espécie. Após varredura no genoma
21 completo de *Coturnix japonica*, foram selecionados os três melhores marcadores e
22 sintetizados para análise. Para validação e avaliação da transferibilidade foram
23 genotipados 90 codornas de uma linhagem de corte, de três gerações, e estimados os
24 valores de PIC, número de alelos por *locus*, He, Ho e F_{IS} . Amplificaram 65 indivíduos
25 para Coturnix01, bem como 84 e 42 para CcoUFPel03 e CcoUFPel04 respectivamente.
26 O número observado de alelos foi em média 10, com tamanhos entre 260 a 300bp para
27 Coturnix01, 245 a 330pb para CcoUFPel03 e 285 a 385pb para CcoUFPel04. Todos os
28 marcadores foram altamente polimórficos, com PIC variando de 0,72 a 0,84. A Ho média
29 foi baixa em todas as gerações, sendo inferiores as médias da He, resultando em valores
30 de coeficiente de endogamia total (F_{IS}) positivos. Os SSR apresentaram transferibilidade
31 para a espécie de estudo, no qual a sua validação demonstrou alta capacidade de detecção
32 de polimorfismos, possibilitando a utilização destes em estudos populacionais de
33 codornas de corte.

34 Palavras-chaves: Coturnix. Genoma. Genotipagem. SSR.

35

36 A avicultura industrial vive em constante pressão de seleção devido ao uso
37 intensivo de linhagens utilizadas na formação de híbridos para carne e ovos, sendo esse,
38 o principal motivo da diminuição da variabilidade genética no setor (Ledur *et al.* 2007).

39 Com a evolução dos estudos ômicos, surgiram os marcadores moleculares que são
40 comumente empregados para diversos estudos genômicos. Dentre estes, marcadores do
41 tipo microssatélites ou *simple sequence repeat* (SSR), destacam-se por seu caráter
42 codominante, multialélico e altamente polimórfico, o que permite uma discriminação
43 precisa de indivíduos intimamente relacionados, além de serem abundantes e
44 uniformemente dispersos nos genomas, podendo serem utilizados para análises de
45 pedigree, diversidade populacional, mapeamento genético e seleção (Brondani *et al.*,
46 1998).

47 *Loci* microssatélites encontram-se flanqueados por sequências únicas e altamente
48 conservadas, sendo as mesmas utilizadas para o desenho de *primers* específicos e
49 complementares à sequência flanqueadora de cada marcador para amplificação por meio
50 da PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Desta maneira, o polimorfismo é detectado através
51 das diferenças de tamanhos entre os amplicons, sendo estas discrepâncias decorrente do
52 número de repetições da sequência microssatélites (Camacho, *et al.*, 2016; Oliveira e
53 Henkes, 2002). Contudo, apesar da técnica ser de fácil execução, sua maior limitação
54 consiste no conhecimento prévio do genoma a ser estudado, sobretudo para a obtenção
55 de *primers* específicos que flanqueiam microssatélites em espécies não modelo. Por esta
56 razão, frequentemente são utilizadas informações de espécies geneticamente relacionadas
57 à espécie alvo, através da transferibilidade de marcadores (Camacho, 2016; Regitano e
58 Coutinho, 2001). Microssatélites possuem alta taxa de transferibilidade entre espécies de
59 um mesmo gênero ou mesmo de uma mesma família, uma vez que sequências que
60 antecedem as regiões microssatélites são em geral altamente conservadas (Ellis e Burke
61 2007).

62 Na coturnicultura, algumas tentativas já foram efetuadas para isolar marcadores
63 microssatélites em codorna japonesa (*Coturnix japonica*) através da transferibilidade de
64 marcadores microssatélite desenvolvidos para galinha (*Gallus sp.*), entretanto os mesmos
65 não foram suficientemente informativos para estudo de codornas, mostrando a
66 necessidade do desenvolvimento de marcadores específicos para a espécie (Pang *et al.*,
67 1999; Inoue-Murayama *et al.*, 2001). Embora ainda não existam marcadores

68 desenvolvidos para codornas de corte (*Coturnix coturnix*), microssatélites desenvolvidos
69 para codorna japonesa (*Coturnix japonica*) podem ser usados como uma alternativa para
70 o estudo da diversidade genética dessa espécie, uma vez que genoma da espécie *Coturnix*
71 *coturnix* ainda não é conhecido.

72 Diante do exposto, o presente estudo desenvolveu marcadores microssatélites com
73 base no genoma da codorna japonesa e avaliou sua transferibilidade para codorna de
74 corte, a fim de fornecer informações importantes para o entendimento genético da espécie
75 em questão e sua posterior aplicação em programas de melhoramento.

76 O desenvolvimento dos marcadores microssatélite foram realizados por meio de
77 uma varredura no genoma completo da espécie *Coturnix japonica* depositado no banco
78 de dados Genbank do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (acesso
79 assembly: GCA_001577835.2, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Após busca de
80 microssatélites somente da classe tetranucleotídeo, uma vez que os mesmos possuem
81 maior facilidade de genotipagem e menor risco de ampliações inespecíficas, foram
82 desenhados *primers* utilizando o software Primer3 de acordo com os seguintes critérios:
83 temperatura de *melting* entre os *primers forward* e *reverse* inferior a 3°C, conteúdo GC
84 entre 40 e 60%, sequência *motif* contendo de oito a 12 repetições, tamanho do *primer* de
85 20 a 25 nt e presença de *primers* únicos. Por fim, os três marcadores que melhor se
86 adequaram aos critérios estabelecidos foram sintetizados para análise.

87 Para validação de transferibilidade, foram analisadas 90 codornas de uma
88 linhagem de corte desenvolvida pela Universidade Federal de Pelotas, divididas em 30
89 animais por geração, de um total de três gerações consecutivas (13°, 14° e 15°).

90 A extração de DNA genômico foi realizada com fragmentos de tecido muscular
91 (200 mg) de cada animal, utilizando protocolo de separação orgânica e precipitação por
92 NaCl e TNE1 buffers (5 mL Tris HCl pH 8.0, 10 mL EDTA, 1 mL NaCl, 84 mL de H₂O
93 ultrapura), TNE2 (5 mL Tris HCl pH 8.0, 10 mL EDTA, 1 mL NaCl, 10 mL SDS 20%,
94 74 mL de H₂O ultrapura), e Proteinase K (20 mg/mL) para lise celular e proteica. A
95 concentração e qualidade do DNA foi feita por eletroforese horizontal em gel de agarose
96 1% corado com GelRed (Biotium, USA) para visualização em transiluminador com luz
97 UV, onde foram consideradas somente bandas intactas sem indícios de degradação.

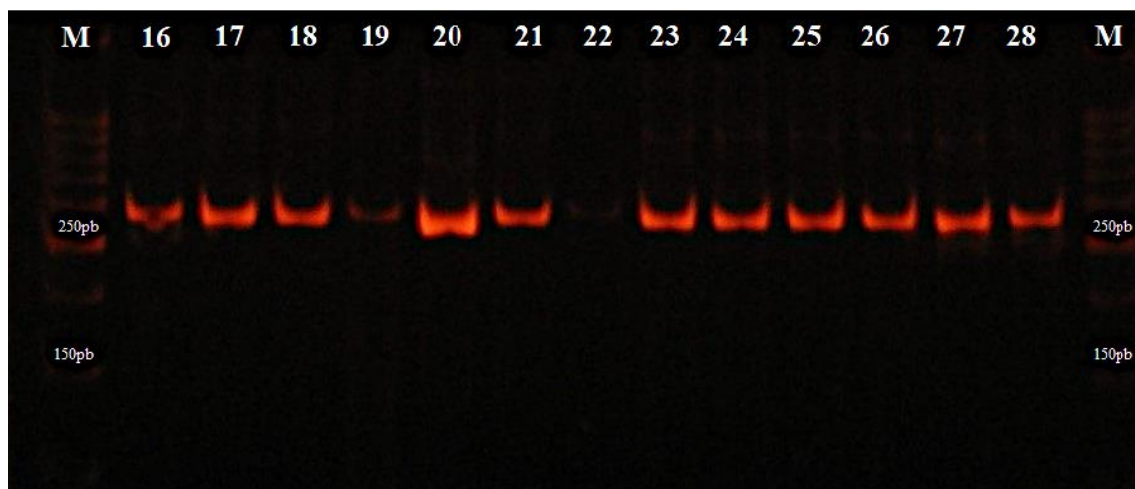
98 A PCR foi realizada com 25 µL de volume final de reação, contendo: 10-50 ng de
99 DNA molde, 0.2 U de Taq DNA Polimerase (Ludwig Biotecnologia, BR), 200 µM de
100 dNTPs (Ludwig Biotecnologia, BR), e 5 pmoles/µL dos *primers forward* e *reverse* (IDT
101 DNA, USA). A amplificação foi conduzida em termociclador GeneTouch (Bioer, China)

102 com as seguintes ciclagens: desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de
103 94°C por 30 segundos anelamento de acordo com a temperatura específica para cada
104 *primer* por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10
105 minutos.

106 Após foi realizada a genotipagem dos animais por eletroforese vertical em gel de
107 poliacrilamida 8%, onde os amplicons foram corados com GelRed (Biotium, USA) e
108 visualizados em transiluminador UV e seus tamanhos estimados com Ladder 50pb
109 (Ludwig Biotecnologia, BR).

110 Por fim, para avaliação de polimorfismo detectado pelos marcadores foram
111 calculados o conteúdo de informação polimórfica (PIC), número de alelos por *locus*, a
112 heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) bem como o índice de endogamia (F_{IS})
113 para cada geração de codornas com os softwares Genepop 4.0 e Cervus 3.0.7.

114 Os marcadores desenvolvidos com base no genoma de *Coturnix japonica*
115 denominados Coturnix01, CcoUFPel03 e CcoUFPel04 apresentaram transferibilidade
116 para codornas de corte, apresentando bandas íntegras, destacando sua promissora
117 aplicação na condução de estudos da espécie em questão (Figura 1.)



118
119 Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% ilustrando a amplificação do *locus*
120 Coturnix01. M= Marcador de peso molecular, 16 ao 28= amostras amplificadas.

121 Pang *et al.* (1999) testaram 48 microssatélites de frango (*Gallus gallus*) em
122 codornas japonesa, no qual apenas 11 (22,9%) geraram produtos específicos, sendo 8
123 polimórficos e 3 monomórficos em quatro populações de codornas japonesas, resultando
124 em baixa tranferibilidade. Em estudo conduzido por Inoue-Murayama *et al.* (2001) foram
125 testados 120 marcadores de frango (*Gallus gallus*) em codorna japonesa no qual apenas
126 25 foram polimórficos, mostrando que a maioria dos marcadores de frango testados em
127 codornas não tem apresentado resultados satisfatórios. Entretanto Kayang *et al.* (2002)

128 isolaram 100 marcadores microssatélites de codornas japonesas e avaliaram em uma
 129 população de 20 codornas selvagens. Destes, 98 marcadores foram polimórficos com uma
 130 média de 3,7 alelos por *locus* e heterozigosidade média de 0,423, demonstrando o
 131 compartilhamento de regiões conservadas entre essas espécies, corroborando com o
 132 presente estudo.

133 O perfil dos marcadores pode ser visualizado na Tabela 1. Foram encontrados um
 134 total de 30 alelos para os três *loci* analisados. O número total de animais genotipados
 135 foram 65 (72,22%) para Coturnix01, 84 (93,33%) para CcoUFPe03 e 42 (46,67%) para
 136 CcoUFPe04. Codornas pertencentes a 14^o geração apresentaram maior número médio de
 137 alelos, 7,33, enquanto que a 13^o e 15^o geração apresentaram valores médios de 6,66 e
 138 5,66, respectivamente. Isso provavelmente se deva ao fato de que os animais utilizados
 139 para o presente estudo sejam provenientes de uma população que estava sob seleção
 140 dirigida, ou seja, os progenitores escolhidos para o acasalamento apresentavam
 141 parentesco inferior ao parentesco médio da população. Esses resultados mostram que o
 142 método de seleção utilizado foi eficiente, caso contrário, a tendência da média dos alelos
 143 entre as gerações seria diminuir. Ademais foram observados alelos privativos nas três
 144 gerações analisadas, sendo 1 alelo para 13^o e 15^o e 2 alelos para 14^o geração. Os tamanhos
 145 de alelos observados variaram de 260 a 300pb para Coturnix01, 245 a 330pb para
 146 CcoUFPe03 e 285 a 385pb para CcoUFPe04.

147

148 Tabela 4. Identificação do marcador, sequência do *primer*, grupo de ligação (Lg),
 149 tamanho em pares de bases (pb), conteúdo de informação polimórfica (PIC), número de
 150 alelos por *locus*, número de alelos privativos (entre parênteses), número de animais
 151 genotipados (sobrescrito) e número de alelos nas gerações analisadas.

<i>Locus</i>	Sequência	Lg	Tamanho (pb)	PIC	13 ^o	14 ^o	15 ^o	N ^o alelos
Coturnix01	F: GGTGCCAGGGAGAATTAGGC R: TGGAAAGCGTCACGTC AAGT	1	260-300	0,72	6(1) ²⁵	6(2) ²¹	4(0) ¹⁹	8
CcoUFPe03	F: TGTAAGTCGGTATTCATATGTGCAG R:GGTAATCCCTTGCTGGCTCT	1	245-330	0,83	9(2) ³⁰	8(1) ²⁶	9(2) ²⁸	13
CcoUFPe04	F: TTGTGTGCATTCTGGACTC R:TGTGTTTGCGCCCATATCA	1	285-385	0,80	5(0) ¹⁸	8(3) ¹⁴	4(1) ¹⁰	9
Média					6,66(1)	7,33(2)	5,66(1)	10

152

153 Esses resultados divergem do encontrado por Pang *et al.* (1999), que ao avaliarem
 154 11 *primers* específicos para frango em codornas de postura, onde foram observados uma
 155 média de 2,45 alelos e tamanho de alelo de 50 a 250pb. Já Resende (2013) e Kayang *et*

156 *al.* (2002) desenvolveram em seus estudos microssatélites com amplicons entre de 116 a
 157 244pb e 87 e 298bp, respectivamente. Essas diferenças encontradas nos tamanhos do
 158 fragmentos, se deve, possivelmente, pelo fato dos autores citados terem trabalhado com
 159 *motifs* dinucleotídeos, enquanto que no referido trabalho, utilizou-se *motifs*
 160 tetranucleotídeos.

161 Das três gerações analisadas, a 13° foi a que apresentou maior número de
 162 ampliações, correspondendo cerca de 81,11% de sucesso frente ao total de animais
 163 analisados, seguido da 14° (67,80%) e da 15° (63,33%).

164 Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) variaram entre 0,72
 165 (Coturnix01) a 0,84 (CcoUFPel03). Segundo Chang *et al.* (2007) o PIC é um importante
 166 índice de polimorfismo, isto é, estima o poder de análise do marcador microssatélite. De
 167 acordo com Botstein *et al.* (1980), marcadores com valores de PIC >0,5 são altamente
 168 polimórficos, 0,5 < PIC > 0,25 mediamente polimórfico e PIC < 0,25 pouco polimórfico,
 169 ou seja, quanto maior for o PIC mais eficiente será o marcador microssatélite. Isto mostra
 170 que os três *loci* utilizados são altamente polimórficos e indicados para o uso.

171 Ao avaliarem 9 marcadores microssatélites desenvolvidos para codornas
 172 japonesas, em 3 populações, Chang *et al.* (2007) observaram um valor de PIC de 0,55,
 173 0,55 e 0,57 para as populações YJQ, WSH e YCQ, respectivamente. Logo, é possível
 174 observar que os marcadores utilizados apresentaram menor detecção de polimorfismos
 175 nas populações analisadas, se comparados ao proposto no presente estudo.

176 A Tabela 2 mostra a heterozigosidade observada (Ho), esperada (He) e coeficiente
 177 de endogamia (F_{IS}) estimados para as 3 gerações. Na mesma, é possível observar que os
 178 os valores de Ho foram baixos nas três gerações analisadas, sendo a maior obtida na 14°
 179 geração (0,509), seguido da 13° (0,436) e 15° (0,107), respectivamente. De igual forma,
 180 o valor médio de Ho foi inferior a He nas três gerações, resultando em F_{IS} positivo. Em
 181 consequência, todas as gerações apresentaram índices altos de F_{IS}, sendo o maior
 182 encontrado na 15° (0,622) e o menor na 14° geração (0,406).

183

184 Tabela 5. Heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho), coeficiente
 185 de endogamia (F_{IS}) das 13°, 14° e 15° gerações de codornas de corte.

Gerações	Coturnix01			CcoUFPel03			CcoUFPel04			Média		
	He	Ho	F _{IS}	He	Ho	F _{IS}	He	Ho	F _{IS}	He	Ho	F _{IS}
13°	0,724	0	1	0,824	0,533	0,357	0,739	0,777	-0,053	0,762	0,436	0,434

14°	0,735	0,095	0,873	0,849	0,576	0,324	0,875	0,857	0,021	0,819	0,509	0,406
15°	0,745	0	1	0,853	0,321	0,6276	0,778	0	0,239	0,792	0,107	0,622

186

187 O valor de coeficiente de endogamia tem relação com a frequência de indivíduos
188 heterozigotos no plantel, sendo que, com um número pequeno de heterozigotos, o F_{IS} é
189 alto (Chang *et al.* 2007). De forma geral, esses valores estão de acordo com os
190 encontrados na literatura (Inoue-Murayama *et al.*, 2001; Kayang *et al.*, 2002; Chang *et*
191 *al.*, 2007) e inferiores aos encontrados por Resende (2013) que analisou 17 *locus*
192 microssatélites desenvolvidos para *Coturnix japonica* e encontrou valores de H_e , H_o de
193 a 0,768, 0,766 respectivamente, indicando uma elevada diversidade genética naquela
194 população e esses valores se mantiveram ao avaliar apenas a progênie ($H_e = 0,760$, H_o
195 $= 0,757$).

196 Por fim, os marcadores microssatélites desenvolvidos apresentaram
197 transferibilidade para a espécie *Coturnix coturnix*. Ainda, a validação dos mesmos
198 revelou alta capacidade de detecção de polimorfismos para as gerações analisadas,
199 atestando sua eficiência e possível utilização em estudos populacionais de codornas de
200 corte.

201

202

AGRADECIMENTOS

203 Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
204 Superior (Capes) e Universidade Federal de Pelotas (UFPel) pelo financiamento da
205 pesquisa.

206

207

REFERÊNCIAS

208 BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, H.; DAVIS, R. W. Construction of a
209 genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American*
210 *Journal of Human Genetics.*, v.32, p.314-331, 1980.

211 BRONDANI, R., BRONDANI, C., TARCHINI, R. *et al.* Development, characterization
212 and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor*
213 *Appl Genet* 97, 816–827 (1998).

214 CAMACHO, L. M. D. Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização
215 da diversidade genética de populações de *Chrysolaena obovata* (Asteraceae). 2016. 128p.
216 il. Tese (Doutorado em Biodiversidade vegetal e meio ambiente). Instituto de Botânica
217 da Secretaria de estado do Ambiente, São Paulo.

218 CHANG, G.B.; LIU, X.P.; ZHAO, W.M.; et al. Genetic Diversity of Wild Quail in China
219 Ascertained with Microsatellite DNA Markers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* v.20, n. 12,
220 p.1783-1790, 2007.

221 ELLIS, J., BURKE, J. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity*
222 99, 125-132 (2007).

223 INOUE_MURAYAMA, M.; KAYANG, B.; KIMURA, K.; et al. Chicken microsatellite
224 primers are not efficient markers for Japanese quail. *Animal Genetics*, v. 32, n. 1, p. 7-
225 11, 2001.

226 KAYANG, B. B.; INOUE-MURAYAMA, M.; HOSHI, T.; et al. Microsatellite *loci* in
227 Japanese quail and cross-species amplification in chicken and guinea fowl. *Genetics*
228 *Selection Evolution*, v. 34, n. 2, p. 233-254, 2002.

229 LEDUR, M. C.; NONES, K.; MOURA, A. S. A. M. T. O uso de marcadores moleculares
230 na produção de aves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA,
231 CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 17; 9, 2007, Londrina. Anais...
232 Londrina: UEL, 2007. 572 p. CD-ROM.

233 OLIVEIRA, J.; HENKES, L. Marcadores moleculares em reprodução animal. In:
234 GONSALVES, P. F., JR; FREITAS, VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.
235 São Paulo: Varela Editora e Livraria, 2002. 261-279 p.

236 PANG, S.W.Y.; RITLAND, C.; CARLSON, J.; CHENG, K. Japanese quail microsatellite
237 *loci* amplified with chicken-specific primers. *Animal Genetics*, v. 30, n. 3, p. 195-199,
238 1999.

239 REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. Biologia molecular aplicada à produção
240 animal. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, 215 p.

241 RESENDE, L.V., Variabilidade genética e endogamia em um plantel comercial de
242 codornas (*Coturnix japonica*). 2013. Tese (Doutorado em Ciência animal) Escola de
243 Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiás.

7 Considerações finais

As novas metodologias de mineração de microssatélites “*in silico*” permitem realizar varredura em todo genoma e identificar marcadores funcionais a partir de um genoma de referência. A identificação de loci microssatélites é capaz de fornecer informações úteis para desenvolvimento de um mapa genético de qualidade para a espécie visto que podem estar ligados a regiões genômicas que controlam característica de produção. Os PALs podem ser vistos como uma excelente ferramenta nos programas de melhoramento a um menor custos de investimento e mão de obra e com aumento expressivo no sucesso e eficiência de amplificação pois são capazes de identificar regiões no genoma com alto polimorfismo, evitando estruturas secundárias e de baixa complexidade.

Os marcadores microssatélites desenvolvidos a partir do genoma da *Coturnix japonica* (codornas de postura) foram polimórficos, informativos e eficientes, revelando grande potencial de transferibilidade para *Coturnix coturnix* (codornas de corte).

Referências

ARAÚJO, V. V.; ALMEIDA, T.J.O.; SILVA, A.V. et al. Evolução da produção de codornas para abate e postura no Brasil. **In: XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**, 2013, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, Recife, Brasil.

BARRETO S. L. T.; ARAUJO, M.S.; UMIGI, R. T.; et al. Níveis de sódio em dietas para codorna japonesa em pico de postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2007.

BARTFAI, R.; EGEDI, S.; YUE G.H.; KOVACS B; et al. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. **Aquaculture** 2003;219:157-167.

BERED, F.; BARBOSA NETO, JOSÉ. F.; CARVALHO, F.I.F. (1997). Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, 27(3), 513-520.

BERTECHINI, A.G. Situação atual e perspectivas para a coturnicultura no Brasil. **In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL, 4., / CONGRESSO BRASILEIRO DE COTURNICULTURA, 3., 2010. Lavras. Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2010.

BONAFÉ, C.M. **Avaliação do crescimento de codornas de corte utilizando modelos de regressão aleatória**. 2008. 58f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

BRONDANI, R., BRONDANI, C., TARCHINI, R. et al. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theor Appl Genet** 97, 816–827 (1998).

BURT D.W. (2002) Applications of biotechnology in the poultry industry. **World's Poultry Science Journal** 58, 5– 13.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.C.; MORETZSOHN, M.C.; et al. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.29, p.46-50, 2003.

CAMACHO, L. M. D. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização da diversidade genética de populações de *Chrysolaena obovata* (Asteraceae)**. 2016. 128p. il. Tese (Doutorado em Biodiversidade vegetal e meio ambiente). Instituto de Botânica da Secretaria de estado do Ambiente, São Paulo.

CASTOE, T. A.; POOLE, A. W.; KONING, A. P. J.; et al. Rapid identification of thousands of copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*) microsatellite loci from modest amounts of 454 shotgun genome sequence. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 2, p. 341–7, 2010.

CASTOE, T.A.; POOLE, A.W.; KONING, A.P.J.; et al. Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. **PLoS ONE**, v.7, p.1-10, 2012.

DEKKERS, J.C.M. 1999. Breeding in the 21th century: application of molecular technology. **Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet.**, v. 13, p. 1-16.

DEKKERS J.C.M, Hospital F. 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nat. Rev. Genet.** 3, 22–32.

ELLIS, J.; Burke, J. **EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. Heredity** 99, 125-132 (2007).

FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; PIO VIANA, A.; BRUCKER, C.; LARANJEIRA, F.F.; DAMASCENO, F.; MELETTI, L.M.M.; CONSOLI, L.; SOUSA, M.A.F.; SILVA, M.S.; PEREIRA, M.G.; STENZEL, N.; SHARMA, R.D. **Demandas para as pesquisas relacionadas ao melhoramento genético**. In: FALEIRO, F.G; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds). Maracujá: demandas para a pesquisa. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 25-34, 2006.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

GARCIA, E.A. Codornas para produção de carne. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COTURNICULTURA, 1., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. 97p.

GUIMARÃES, CT.; PRIOLI, R.A., GASPARINO, E., SOARES, M.A.M., et al. Diversidade genética entre três linhagens de codorna selecionadas para produção de ovos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 62(3), 725-731, 2010.

MAGALHÃES, J.V.; LANZA, M.A.; SCHUSTER, I. (2009). Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropec.** 30: 24-33.

HUANG, J.; Li, W.J.; Jian, Z.Y.; et al. Genome-wide distribution and organization of microsatellites in six species of birds. **Biochemical Systematics and Ecology**, 67, 95– 102, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA- **IBGE**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab21.pdf>Acessado em 20/10/2020

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA- **IBGE**. Disponível em <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/tabelas_pdf/tab01.pdf>Acessado em 20/10/2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA- **IBGE**. Disponível em <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/tabelas_pdf/tab05.pdf>Acessado em 20/10/2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA- **IBGE**. Disponível em <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/tabelas_pdf/tab05.pdf>Acessado em 20/10/2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **IBGE**. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2019>>Acessado em 20/10/2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **IBGE**. Disponível em <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf>Acessado em 20/10/2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **IBGE**. Disponível em <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2019_v47_br_informativo.pdf>Acessado em 20/10/2020.

INOUE_MURAYAMA, M.; KAYANG, B.; KIMURA, K.; et al. Chicken microsatellite primers are not efficient markers for Japanese quail. **Animal Genetics**, v. 32, n. 1, p. 7-11, 2001.

KAYANG, B.B.; INOUE-MURAYAMA, M.; NOMURA, A. et al. Fifty microsatellite markers for Japanese quail. **Journal of Heredity** 2000;91:502-505.

KAYANG, B. B.; INOUE-MURAYAMA, M.; HOSHI, T.; et al. Microsatellite loci in Japanese quail and cross-species amplification in chicken and guinea fowl. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, n. 2, p. 233-254, 2002.

KAYANG, B.; FILLON, V.; INOUE-MURAYAMA, M.; MIWA, M.; LEROUX, S.; FÈVE, K.; MONVOISIN, J. L.; PITEL, F.; VIGNOLES, M.; MOUILHAYRAT, C. Integrated maps in quail (*Coturnix japonica*) confirm the high degree of synteny conservation with chicken (*Gallus gallus*) despite 35 million years of divergence. **BMC genomics**, v. 7, n. 1, p. 101, 2006.

KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K. V.; AYAD, W. G.; HODGKIN, T. **Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies**. Roma: IPGRI, 1997, 47.

KÖLLIKER, R.; Jones E.S.; Drayton, M.C. et al. Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for white clover

(*Trifolium repens* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, n.2-3, p.416-24, 2001.

LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C.; FERREIRA, M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Revista Medicina**, v. 90, n. 1, p. 47-51, 2011.

LANCE, S. L.; Love, C. N.; Nunziata, S. O.; et al. 32 species validation of a new Illumina paired-end approach for the development of microsatellites. **PLoS ONE** 8:e81853, 2013.

LITT, M.; LUTY, L.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.44, n.3, p.398-401, 1989.

MÁS, H.A.R.; FASSANI, E.J.J.; BRITO, J.A.G. et al. Rendimento de carcaça de codornas de corte submetidas a diferentes níveis protéicos e idades de abate. In: SIMPÓSIO DE COTURNICULTURA, 2, 2004, Lavras. **Anais...Lavras: Universidade Federal de Lavras**, 2004.

MORI, C.; GARCIA, E. A.; PAVAN, A. C.; et al. Desempenho e rendimento de carcaça de quatro grupos genéticos de codornas para produção de carne. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.870-876, 2005.

MURAKAMI, A.E.; ARIKI, J. Produção de codornas japonesas. Jaboticabal. **Funep**, 1998.

NONES, C. **Mapeamento de QTLs no cromossomo 1 de Gallus gallus que influenciam características de desempenho e carcaça**. Tese. Escola superior de agricultura Luis de Queiroz. Universidade de São Paulo, área ciência animal e pastagens. Piracicaba, São Paulo. 2004

OLIVEIRA, N.T.E. SILVA, M. A. SOARES, R. T. R. N.; et al. Exigências de proteína bruta e energia metabolizável para codornas japonesas machos criadas para a produção de carne. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p.196-203, 2002.

OLIVEIRA, J.; HENKES, L. Marcadores moleculares em reprodução animal. In: GONSALVES, P. F., JR; FREITAS, VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Varela Editora e Livraria, 2002. 261-279 p.

OLIVEIRA, E. G.; ALMEIDA, M. I. M.; MENDES, A. A.; VEIGA, N.; DIAS, K. Desempenho produtivo de quatro grupos genéticos de codornas (*coturnix* sp.) para corte. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.3, p.33-37, 2005.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; et al. Origin evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p.294-307, 2006.

OLIVEIRA, M.S.P.; SILVA, K.J.D. Diferenciação genética entre procedências de açaizeiro por marcadores moleculares RAPD e SSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p.438-3, 2008.

PASTORE, S.M.; OLIVEIRA, W.P. DE; MUNIZ, J.C.L. Panorama da coturnicultura no Brasil. Artigo 180. **Revista eletrônica nutritime**. Volume 9 - Número 06 – p. 2041 – 2049 - Novembro/ Dezembro 2012

PAIVA, E., GEORG, P., C., RESENDE, R., O., et al. Genetic And Phenotypic Parameters For Body Weight at 28 days of Age at First Egg, in Laying Quails. **Anais... XXII World's Poultry Congress, 2004, Turkish Branch. Book of Abstracts. Turkish Branch: Istanbul Convention and Exhibition Center, p. 140, 2004.**

PANG, S.W.Y.; RITLAND, C.; CARLSON, J.; CHENG, K. Japanese quail microsatellite loci amplified with chicken-specific primers. **Animal Genetics**, v. 30, n. 3, p. 195-199, 1999.

PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S.; VIANA, A. P. **Marcadores moleculares aplicados ao melhoramento genético do maracujazeiro**. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 277-292.

PINTO, R.; FERREIRA, A.S.; ALBINO, L.F.T.; GOMES, P.C.; VARGAS JÚNIOR, J.G.DE. Níveis de Proteína e Energia para Codornas Japonesas em Postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.31, n.4, p.1761-1770, 2002.

PISENTI JM, DELANY ME, TAYLOR RL, ABBOTT UK. **Avian genetic diversity: domesticated species**. Davis: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Genetic Resources Conservation Program; 1999.

POWIERSKA-CZARNY, J.; MISCICKA-SLIWAKA, D.; CZARNY, J.; GRZYBOWSKI T, WOZNIAK M, DREWA G, CZECHOWICZ W, SIR J. Analysis of microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer with the use of a well characterized multiplex system. **Acta Biochimica Polonica** 2003;50:1195-1203.

PRIOLI, R.A., GASPARINO, E., SOARES, M.A.M., et al. Diversidade genética entre três linhagens de codorna selecionadas para produção de ovos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 62(3), 725-731, 2010.

REGITANO, L. C. de A.; TALHARI, D. T. **Protocolo de análise de marcadores microssatélites**. Embrapa Pecuária Sudeste - Capítulo em livro científico (ALICE), 2001.

REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.205

ROUSSOT, O.; FEVE, K.; PLISSON-PETIT, F.; PITEL, F.; FAURE, J. M.; BEAUMONT, C.; VIGNAL, A. AFP linkage map of the Japanese quail *Coturnix japonica*. **Genetics Selection Evolution**, v. 35, n. 5, p. 559-572, 2003.

SILVA, E. L.; SILVA, J. H. V.; FILHO, J. J.; et al. Efeito do plano nutricional sobre o rendimento de carcaça de codorna tipo carne. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.2, p.514-522, 2007.

SILVA, J.H.V.; JORDÃO FILHO, J.; COSTA, F.G.P.; et al. Exigências nutricionais de codornas. In: XXI Congresso Brasileiro de Zootecnia- ZOOTEC, 21, 2011, Maceió. **Anais...** Maceió: UFAL, 2011.

SILVA, P. I.; MARTINS, A. M.; GOUVEA, E. G.; et al. Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 17, 2013.

SHURTLIFF, Q.R.; PEARSE DE, ROGERS D.S. Parentage analysis of the canyon mouse (*Peromyscus crinitus*): evidence for multiple paternity. **Journal of Mammalogy** 2005;86:531-540.

SOUSA, R.C.B. **Caracterização de microssatélites e desenvolvimento de marcadores ssr em *Khaya grandifoliola* C. DC.** (Dissertação). Universidade Federal de Goiás - Escola de Agronomia. Goiânia-GO. Brasil, 2019.

TEIXEIRA, R.B. **Avaliação e estimação de componentes genéticos de características produtivas e da qualidade de ovos de linhagens de codorna de corte.** 2008. 63p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

TEIXEIRA, B.B. **Estudo genético da produção de ovos em codornas de corte por meio de análises multicaracterísticas e regressão aleatória.** 2011. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa.

TEIXEIRA B.B, TEIXEIRA R.B, SILVA L.P, et al. Estimação dos componentes de variância para as características de produção e de qualidade de ovos em matrizes de codorna de corte. **Ciência Rural** 2012;42:713-717.

WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v. 7, p. 524-530, 1990.

WEBSTER MS, REICHARD L. Use of microsatellites for parentage and kinship analyses in animals. **Molecular Evolution: Biochemistry Data, Part B, Methods in Enzymology** 2005;395:222-238.