



PCR como técnica para sexagem molecular em aves

PCR as technique for molecular sexing in birds

J.N. Vieira¹, E.G.A. Coelho, C.S. Teixeira, D.A.A. Oliveira

Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

¹Correspondência: nobrevieira.j@gmail.com

Resumo

O presente estudo avaliou a PCR como técnica para sexagem molecular em aves, a qual empregou os primers P₂/P₈, relacionados com os cromossomos sexuais (Z/W) das aves. Os produtos da PCR foram submetidos à corrida eletroforética, e esta revelou que o tamanho dos pares de base (pb) variou entre as espécies: de 246 a 396 pb para o alelo Z e de 254 a 412 pb para o W. Os resultados mostraram 76 machos (49,31%) e 78 fêmeas (50,69%), totalizando 154 aves. Esta situação propõe desvios meramente casuais ao teste χ^2 ($P > 0,05$), pois sendo a variável estudada dicotômica, a relação 1:1 está dentro de um universo amostral. Tais dados mostram que esta técnica, utilizando DNA extraído tanto de penas quanto de sangue, é segura e eficaz para a determinação sexual das aves.

Palavras-chave: aves, cromossomos sexuais Z e W, PCR, sexagem molecular.

Abstract

This study evaluated PCR as a technique for molecular sexing in birds using the primers P₂/P₈, related to the sex chromosomes (Z/W) of birds. The PCR products under electrophoresis showing the size of the base pairs (bp) varying between species: 246 to 396 bp for the allele Z and 254 to 412 for W. The results identified 76 males (49,31%) and 78 females (50,69%), totalizing 154 birds. This situation proposes casual deviations, Test χ^2 ($p > 0.05$), as being the dicotomic variable studied the 1:1 ratio is within a sampling universe. The data show that the technique is accurate and effective for sex determination of birds, both using DNA extracted from feathers and blood.

Keywords: birds, molecular sexing, PCR, sex chromosomes Z and W.

Introdução

Em aves, o sexo é determinado por cromossomos sexuais Z e W (Griffiths et al., 2002). O gene CHD (*chromo-helicase-DNA-binding*, helicase dependente de cromo) está localizado nos cromossomos sexuais de todas as aves. O gene CHD-W localiza-se no cromossomo W, somente nas fêmeas, e o gene CHD-Z é encontrado no cromossomo Z, em ambos os sexos (Griffiths et al., 1998). Portanto, em aves, as fêmeas são heterogaméticas (ZW) e os machos são homogaméticos (ZZ; Griffiths et al., 1996; Arnold et al., 2008; Namekawa e Lee, 2009).

Existem vários métodos de sexagem, cada qual com suas vantagens e limitações. Em alguns casos, a identificação sexual não é efetiva, sendo necessário repetir a análise ou recorrer a outros testes para a confirmação do resultado (Grando, 2002). Os métodos cirúrgicos, a laparoscopia, a endoscopia e a TRMN (tomografia por ressonância magnética nuclear) podem causar sérios problemas. Entre estes estão a administração do anestésico e a relação da dose e do peso da ave. Outro fator é o tempo de absorção do anestésico, que pode variar de indivíduo a indivíduo, e, ainda, o ponto da incisão pode causar ruptura do saco aéreo. Estes fatos podem acarretar em óbito dos animais (Griffiths, 2000; Grando, 2002). Em granjas, a sexagem é feita pelo exame das penas, ou seja, pelo empenamento delas, bem como pela cloaca (Guia..., 2008).

As técnicas utilizadas nos processos laboratoriais, na citogenética e na análise de DNA são as mais modernas que existem na área da biologia molecular. O processo de sexagem por meio do DNA é uma alternativa segura quando comparado à sexagem cirúrgica. Tem sido utilizado desde o seu desenvolvimento, com precisão superior a 99%, e por ser simples, de baixo custo, seguro, além de causar estresse mínimo à ave (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Griffiths, 2000). A vantagem da sexagem é a redução de custos nas eventuais reposições de casais que os fornecedores precisam fazer, se ocasionalmente algum erro for cometido nas determinações de sexo pelos métodos tradicionais.

Este trabalho teve como objetivo sexar aves molecularmente, visando padronizá-las para que, posteriormente, sejam utilizadas em programas de melhoramento, criação e conservação.



Material e Métodos

Para o presente estudo, foram colhidas amostras de sangue e de penas de 16 diferentes espécies de aves de criatórios comerciais. Foram coletadas 10 amostras de cada espécie estudada: estrelinha-de-poupa (*Regulus regulus* (Linnaeus, 1758)), azulão (*Cyanoloxia brissonii* (Lichtenstein, 1823)), trinca-ferro-verdadeiro (*Saltator similis* d'Orbigny & Lafresnaye, 1837), bicudo (*Sporophila maximiliani* (Cabanis, 1851), canário-da-terra-verdadeiro (*Sicalis flaveola* (Linnaeus, 1766)), tico-tico (*Zonotrichia capensis* (Statius Muller, 1776)), pintassilgo (*Sporagra magellanica* (Vieillot, 1805)), canário belga (*Lentinus canaria* Linnaeus, 1758), graúna, também conhecido por pássaro-preto (*Gnorimopsar chopi* (Vieillot, 1819)), pixoxó, também conhecido como catatau, chanchão e estalador (*Sporophila frontalis* (Verreaux, 1869)), sabiá (*Turdus* sp.), tucanuçu ou tucano (*Ramphastos toco* Statius Muller, 1776), papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva* (Linnaeus, 1758)), periquito/maritaca (*Aratinga* sp.) e pombo-correio ou doméstico (*Columba livia* Gmelin, 1789, com exceção de uma, cardeal-do-nordeste (*Paroaria dominicana* (Linnaeus, 1758), cujas amostras foram colhidas de apenas quatro indivíduos.

As amostras de sangue foram obtidas por meio do corte da unha coletado em papel filtro (marca *Whatman*, 55 mm) e penas que continham ou não sangue no bulbo. Todas as amostras foram armazenadas individualmente em envelope, devidamente identificadas, em temperatura ambiente.

Foram feitas extrações de DNA da pena, do sangue e pela tecnologia (modificada) de cartões FTA da *Whatman* utilizando-se os protocolos de Rudbek e Dissing (1998), Sambrook et al. (1989) e www.bioamericana-inc.com, respectivamente.

Foi utilizado um par de *primers* P₂ e P₈, por amplificarem especificamente os alelos relacionados com os cromossomos sexuais, por serem robustos e universais (Griffiths et al., 1998, 1996).

O sistema de amplificação da PCR bem como o programa de amplificação foram realizados conforme os protocolos adaptados de Griffiths et al. (1998). Os produtos da PCR foram separados por corrida eletroforética, em gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata.

Foi analisado se o par de *primers* utilizado e os diferentes métodos de extração de DNA tiveram resultados significativos às espécies estudadas.

Foi feito estudo de dispersão de frequência utilizando-se o teste do qui-quadrado (χ^2) para avaliação da proporção de machos e fêmeas no universo amostral (Sampaio, 2007).

Todos os testes foram realizados no Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG.

Resultados e Discussão

A PCR foi realizada com o estudo do material genético de um casal de cada espécie com o sexo já determinado, sem que houvesse dúvida quanto a essa questão. Portanto, foi necessário conhecer os marcadores sexuais de cada espécie a ser sexada, ou seja, definir o padrão de macho e fêmea (Miyaki et al., 1998).

Diferentemente do relatado por Griffiths et al. (1998), foi utilizada a mesma temperatura de anelamento em todas as espécies estudadas.

O método de sexagem usando os *primers* P₂ e P₈ obteve resultado positivo em todas as 16 espécies estudadas. Isto confirma o descrito por Griffiths et al. (1996, 1998), os quais afirmaram que este par de *primers* é o único que reduz a possibilidade de contaminação entre os alelos, sendo, portanto, um modo eficaz de distinguir o sexo das aves.

Griffiths et al. (1996, 1998), Miyaki et al. (1998) e Anciães e Del Lama Nassif (2002) testaram dois métodos moleculares de identificação sexual; o primeiro deles, pela extensão dos *introns* dos genes CHD-Z e CHD-W, sendo este o método utilizado neste trabalho, e o segundo, em que os produtos da PCR são discriminados pelo uso de enzima de restrição, método não empregado no presente estudo por apresentar a mesma eficiência do primeiro.

Miyaki et al. (1998), Cortés et al. (1999) Anciães e Del Lama Nassif (2002), Ito et al. (2003), Sacchi et al. (2004) e Faria et al. (2007), entre outros autores, obtiveram resultados eficazes para a determinação do sexo em várias espécies de aves, utilizando a metodologia (modificada) de Griffiths et al. (1998). Entretanto, não foram encontrados relatos sobre sexagem molecular de aves descritas neste trabalho, como estrelinha-de-poupa (*Regulus regulus* (Linnaeus, 1758)), azulão (*Cyanoloxia brissonii* (Lichtenstein, 1823)), trinca-ferro-verdadeiro (*Saltator similis* d'Orbigny & Lafresnaye, 1837), bicudo (*Sporophila maximiliani* (Cabanis, 1851), canário-da-terra-verdadeiro (*Sicalis flaveola* (Linnaeus, 1766)), cardeal-do-nordeste (*Paroaria dominicana* (Linnaeus, 1758)), tico-tico (*Zonotrichia capensis* (Statius Muller, 1776)), pintassilgo (*Sporagra magellanica* (Vieillot, 1805)), canário belga (*Lentinus canaria* Linnaeus, 1758), graúna (*Gnorimopsar chopi* (Vieillot, 1819)), pixoxó (*Sporophila frontalis* (Verreaux, 1869)), sabiá (*Turdus* sp.).

Foram testadas 154 aves, sendo esperados 77 indivíduos de cada sexo, o que ocorreu, pois foram observados 78 fêmeas (50,69%) e 76 machos (49,31%). Esta situação propõe desvios meramente casuais, teste χ^2 ($P > 0,05$). A variável estudada, dicotômica, está na relação 1:1 dentro de um universo amostral (Sampaio,



2007).

Há diferença no tamanho dos pares de base (pb) entre as espécies, o que demonstra a relação espécie-específica do tamanho dos pb dos cromossomos sexuais das aves. O tamanho dos pb variou de 246 a 396 para o alelo Z e de 254 a 412 para o W.

Conclusão

A determinação do sexo de aves pelo método da PCR empregando *primers* do gene CHD e DNA extraídos de pena e sangue mostrou-se acurada, segura e de baixo custo para as 16 espécies analisadas.

Não foram encontrados relatos científicos relacionados com a sexagem molecular de 12 espécies estudadas no presente estudo.

Agradecimentos

Aos criatórios e ao IBAMA, por possibilitarem a coleta dos materiais das aves; à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Referências

- Anciães M, Del Lama Nassif S.** Sex identification in pin-tailed manakins (*Ilicura militaris*: Pipridae) using the polymerase chain reaction and its application to behavioral studies. *Ornitol Neotrop*, v.13, p.159-165, 2002.
- Arnold AP, Itoh Y, Melamed E.** A bird's-eye view of sex chromosome dosage compensation. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, v.9, p.109-127, 2008.
- Cortés O, Barroso A, Dunner S.** Avian sexing: an optimized protocol using polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism. *J Vet Diagn Invest*, v.11, p.297-299, 1999.
- Faria LP, Carrara LA, Rodrigues M.** Dimorfismo sexual de tamanho no fura-barreira *Hylocryptus rectirostris* (Wied) (Aves, Furnariidae). Sexual size dimorphism in henna-capped foliage-gleaner *Hylocryptus rectirostris* (Wied) (Aves, Furnariidae). *Rev Bras Zool*, v.24, n°1, p.207-212, 2007.
- Ferreira ME, Grattapaglia D.** Introdução ao uso de marcadores moleculares em genética. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220p.
- Grando AP.** Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual. 2002. 107f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2002.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM.** Introdução a genética. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 794p.
- Griffiths R.** Sex identification in birds. *Semin Avian Exotic Pet Med*, v.9, p.14-26, 2000.
- Griffiths R, Daan S, Dukstra C.** Sex identification in birds using two genes. *Proc R Soc Lond Ser B*, v.263, p.1251-1256, 1996.
- Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJ.** A DNA test to sex most birds: short communication. *Mol Ecol*, v.7, p.1071-1075, 1998.
- Guia de manejo e incubação.** 2008. Disponível em: <http://www.cobb-vantress.com>. Acesso em: 28 maio 2012.
- Ito H, Sudo-Yamaji A, Abe M, Murase T, Tsubota T.** Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in Falconiformes. *Zool Sci*, v.20, p.339-344, 2003.
- Miyaki CY, Griffiths R, Orr K, Nahum LA, Pereira SL, Wajntal A.** Sex identification of parrots, toucans, and curassows by PCR: Perspectives for wild and captive population studies. *Zoo Biol*, v.17, p.415-423, 1998.
- Namekawa SH, Lee JT.** XY and ZW: Is meiotic sex chromosome inactivation the rule in evolution? *PLoS Genet*, v.5, p.e1000493, 2009.
- Rudbek L, Dissing J.** Rapid simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *Biotechniques*, v.25, p.588-592, 1998.
- Sacchi P, Soglia D, Maione S, Meneguz G, Campora M, Rasero R.** A non-invasive test for sex determination in Short-toed Eagle (*Circaetus gallicus*). *Mol Cell Probes*, v.18, p.193-196, 2004.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning: a laboratory manual. New York: CSHL Press, 1989.
- Sampaio IBM.** Estatística aplicada à experimentação animal. 3ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. 264p. Site: www.bioamerica-inc.com.