PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Determinação sexual em aves via PCR

Juliana Nobre Vieira[1*], Eduardo Geraldo Alves Coelho[2] e Denise Aparecida Andrade de Oliveira[3]

[1]Doutoranda, Departamento de Zootecnia, [2]Co-orientador, [3]Professora Associada da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.
*Artigo referente à Dissertação de Mestrado, e-mail para correspondência: nobrevieira.j@gmail.com

Resumo

Este estudo avaliou a PCR como técnica molecular para determinar o sexo das aves empregando o par de *primers* alelo-específico, P_2/P_8, para o gene CHD, localizado nos cromossomos sexuais (Z/W) das aves. O resultado eletroforético demonstrou dois alelos para as fêmeas (ZW) e um nos machos (ZZ), sendo heterogaméticos e homogaméticos, respectivamente. Foi observado que há variação entre os tamanhos dos pares de base (pb) entre as espécies. Estes dados mostram que esta técnica é acurada e segura para a determinação sexual das aves, pois demonstram que o gene GHD está conservado nas aves.

Palavras-chave: determinação sexual em aves, PCR, CHD-Z/W.

Sex determination in birds by PCR

Abstract

This study evaluated PCR as molecular technique to sex determination in birds using pair of primers allele-specific, P_2/P_8, for CHD gene, located in avian sex chromosomes (Z/W). Electrophoretic result showed two alleles for females (ZW) and one in males (ZZ), being heterogametics and homogametics, respectively. It was observed that there is variation between the sizes of base pairs (bp) between species. These data show that this technique is accurate and secure for sexual determination in birds, therefore demonstrate that gene CHD is conserved in birds.

Keywords: sex determination in birds, PCR, CHD-Z/W.

Introdução

Nos últimos anos, o uso do material genético passou do nível citológico para o molecular (Griffiths, 2000). As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados "marcadores moleculares" (Borba, 2002).

Ensaios de sexagem molecular em aves são geralmente baseados no gene CHD, localizado no cromossomo W, único para fêmeas. Seu homólogo, CHD-Z, é encontrado no cromossomo Z e ocorre em ambos os sexos (ZW em fêmeas e ZZ em machos). A identificação do gênero baseada na PCR emprega um único *set* de *primers* P_2/P_8 (CHD-universal) que amplifica fragmentos homólogos de ambos os genes e incorpora *introns* que geralmente variam de tamanho entre as espécies (Namekawa & Lee, 2009; Ramos *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2008; Anciães & Nassif Del Lama, 2002; Griffiths, 2000; Fridolfsson & Ellegren, 2000; Griffiths *et al.,* 1998; 1996).

Este trabalho teve como objetivo determinar o sexo das aves via PCR, utilizando o par de *primers* P_2/P_8 que é relacionado com os cromossomos sexuais (ZW) das aves.

Material e Métodos

Para o presente estudo, foram colhidas amostras, de maneira aleatória, de sangue e de penas de criatórios comerciais - Criatório JC e Criatório Lua de Mel, do criatório conservacionista - ZooAmbiental e do CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres) do IBAMA todos localizados no estado de Minas Gerais, Tabela 01.

Tabela 01: Relação entre nomes científico e popular das 15 espécies de aves utilizadas neste estudo, advindos de Criatórios e do CETAS/IBAMA, do Estado de Minas Gerais

Espécie	**Nome Popular**
Regulus regulus	Estrelinha
Passerina brissonii	Azulão
Saltator similis	Trinca-ferro-verdadeiro
Sporophila maximiliani	Bicudo
Sicalis flaveola	Canário-da-terra
Paroaria dominicana	Galo-da-campina
Zonotrichia capensis	Tico-tico
Sporagra magellanica	Pintassilgo
Leninus canaria	Canário-belga
Gnorimopsar chopi	Pássaro-preto
Sporophila frontalis	Catatau
Turdus sp.	Sabiá
Ramphastos toco	Tucano
Amazona aestiva	Papagaio-verdadeiro
Aratinga sp.	Periquito/Maritaca

As coletas das amostras de sangue e pena foram realizadas em aves de todas as idades (entre um mês de vida à idade senil), por todo o ano, no período da manhã até, no máximo, às 15 horas. Desta forma não houve mudança nas condições de temperatura do ambiente dos criatórios, não causando agressão ao bem estar dos animais.

As amostras foram obtidas por meio do corte da unha obtendo-se o sangue que foi coletado em papel filtro (Marca *Whatman,* 55mm), bem como penas que ainda continham ou não sangue no bulbo, novas ou velhas que foram

armazenadas em envelope. Todas as amostras foram armazenadas individualmente e devidamente identificadas.

Foram feitas extrações de DNA utilizando-se três diferentes técnicas, uma através do sangue pelo método fenol/clorofórmio com digestão pela enzima proteinase K (Sambrook *et al.*, 1989), outra utilizando o bulbo de pena pelo método de extração alcalina simples rápida (Rudbek & Dissing, 1998) e uma terceira pela tecnologia (modificada) de cartões FTA da *Whatman* (www.biomerica-inc.com), sendo aqui utilizado papel filtro estéril (Marca *Whatman,* 55mm).

Cada amostra extraída pelos dois primeiros métodos foi armazenada em microtubo e aliquotada em geladeira, 4 ºC, enquanto que pelo terceiro, as amostras foram armazenadas em microtubos em temperatura ambiente.

Foi utilizado um par de *primers* alelo-específicos, P_2 e $P_{8,}$ por amplificarem especificamente os alelos relacionados com os cromossomos sexuais e por serem universais. O *primer* P_2 amplifica o gene CHD-W enquanto o P_8 o CHD-Z (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 sofreram corrida eletroforética, em gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata.

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

Resultados e Discussão

Diferentemente do concluído por Griffiths *et al.* (1998), a temperatura de anelamento não variou entre as espécies, pois foi constante, a 49 ºC.

O método de sexagem usando o par de *primers* P_2/P_8 obteve resultado positivo em todas as 15 espécies analisadas. Isto confirma o descrito por Griffiths *et al.* (1998; 1996) que afirmaram que este par de *primers* é único, robusto e universal. Sendo, portanto, uma maneira eficaz de distinguir o sexo das aves.

A interpretação das amostras amplificadas foi feita de acordo com o genótipo de fêmeas que são heterogaméticas (ZW), apresentando dois alelos no gel, ou seja, heterozigotas e dos machos que são homogaméticos (ZZ), apresentando apenas um alelo, sendo, portanto, homozigotos (Figura 01). Estes resultados concordam com os obtidos por outros autores, como por Vieira *et al.* (2009), Anciães & Nassif Del Lama (2002), Griffiths *et al.* (1998), Miyaki *et al.* (1998), dentre outros.

Como é demonstrado tanto na Tabela 02, como na Figura 01, há diferença no tamanho dos pares de base (pb) entre as espécies, de 246 a 396 para o alelo Z e de 254 a 412 para o W. A Tabela 02 mostra os valores aproximados dos diferentes tamanhos de pb demonstrando a relação espécie-específica dos cromossomos sexuais das aves estudadas.

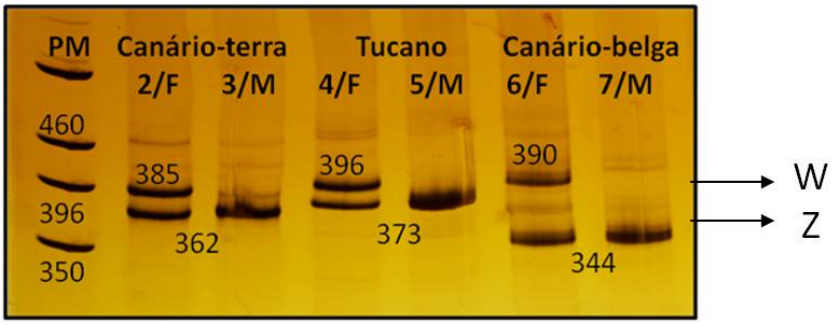

Figura 01: Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata. PM: padrão de peso molecular *pGEM®.* Canaletas: 2/F-3/M – Canário-da-terra, 4/F-5/M – Tucano, 6/F-7/M – Canário-belga. Os valores dos tamanhos de pares de base são valores aproximados.

Tabela 02: Diferentes tamanhos de pb dos cromossomos sexuais (Z e W) das espécies, em ensaio realizado na EV/UFMG, em 2007 e 2008.

Espécie	**pb - Z***	**pb - W***
Estrelinha	246	254
Pintassilgo	354	396
Catatau	396	390
Tucano	373	396
Papagaio	396	412
Maritaca	396	412
Azulão	378	396
Trinca-ferro-verdadeiro	392	412
Bicudo	385	390
Canário-da-terra	362	385
Galo-da-campina	373	385
Tico-tico	373	396
Canário belga	344	390
Pássaro-preto	385	390
Sabiá	390	404
* Valores aproximados	246-396	254-412

Conclusão

A determinação do sexo das aves via PCR, utilizando o par de *primers* P_2/P_8, que é relacionado com o gene CHD mostrou-se acurada e segura.

Tanto o sangue como a pena são amostras viáveis para a extração de DNA, podendo a pena ser nova ou velha, com o bulbo vascularizado ou não.

Agradecimentos

Aos Criatórios e ao IBAMA por possibilitarem a coleta dos materiais das aves.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Referências Bibliográficas

ANCIÃES, M. e DEL LAMA NASSIF, S. Sex identification in pin-tailed manakins (*Ilicura militaris*: Pipridae) using the polymerase chain reaction and its application to behavioral studies. **Ornitolog. Neotrop.**, 13: 159-165, 2002.

BORBA, V.S. Marcadores moleculares: Classificação e Aplicações, 2002, extraído de http://www.ufv.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL005.htm, em 24/agosto/2006.

CHANG, H.W; CHOU, T. C.; GU, D. L. *et al.* An improved PCR method for gender identification of eagles **Mol. And Cel. Probes.,** v.22, p.184-188, 2008.

VIEIRA, J.N., COELHO, E.G.A. e OLIVEIRA, D.A.A. Determinação sexual em aves via PCR. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 3, Ed. 150, Art. 1011, 2011.

FRIDOSFSSON, A.K & ELLEGREN, H. Molecular evolution of the avian *CDH1* genes on the Z and W Sex chromosomes. **Genetics** 155: 1903-1912, 2000.

GRIFFITHS, R. Sex Identification in Birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medic.**, vol 9, nº1 (January), pp. 14-26, 2000.

GRIFFITHS, R. *et al.* A DNA test to sex most birds – Short communication. Blackwell Science Ltd, **Molec. Ecol.**, 7, 1071-1075, 1998.

GRIFFITHS, R.; DAAN, S.; DUKSTRA, C. Sex identification in birds using two genes. **Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.** 263: 1251-1256, 1996.

MIYAKI *et al.* Sex identification of parrots, toucans, and currassows by PCR: Perspectives for wild and captive population studies. **Zoo. Biology,** 17:415-423, 1998.

NAMEKAWA, S.H., LEE, J.T. XY and ZW: Is Meiotic Sex Chromosome Inactivation the Rule in Evolution? **PLoS Genet.** 5(5): e1000493. doi:10.1371/journal.pgen.1000493, 2009.

RAMOS, P. S.; BASTOS, E.; MANNAN, R. W. *et al.* Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism applied to sex identification of *Accipiter cooperii.* **Mol. and Cel. Probes.,** *doi:101016/jmcp.2008.12.02;* p.1-4., 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**. Biotechn.**, 25:588-592, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: **CSHL Press**, 1989.

SUZUKI, D.T. *et al.* Introdução à Genética. 7ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 633p., 2002.

VIEIRA, J.N.; COELHO, E.G.A.; OLIVEIRA, D.A.A. Sexagem Molecular em aves silvestres [*Molecular sexing in wild birds*]. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.66-70, abr./jun. 2009. Disponível em www.cbra.org.br

***Site**:* www.bioamerica-inc.com