

IDENTIFICAÇÃO SEXUAL PARA FORMAÇÃO DE CASAIS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Amazona* (*Psittacidae*, *Aves*) PERTENCENTES AO CRIADOURO CONSERVACIONISTA UNIVAP

Karina F. Turci; Francisco G. Nóbrega; Francisco A. F. Moral

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D, Universidade do Vale do Paraíba
Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova – 12244-000 – São José dos Campos – SP,
e-mail: katurci@yahoo.com.br

Palavras-chave: Identificação sexual, formação de casais, PCR, *Amazona sp.*
Área de Conhecimento : Ciências Biológicas

Resumo - O Criadouro Conservacionista da UNIVAP possui 33 exemplares de *Amazona aestiva* e 03 exemplares de *Amazona vinacea*, duas espécies pertencentes à família *Psittacidae*, que não apresentam dimorfismo sexual externo. O presente trabalho utilizou a técnica molecular de “PCR (Reação em cadeia da DNA polimerase)” para a realização da determinação sexual destes exemplares, em especial de *A. vinacea* que se encontra em vias de extinção, visando a formação de casais a fim de que haja um aumento significativo nas chances de reprodução em cativeiro, além de atender as atribuições referentes às normas vigentes para criação previstas pelo IBAMA. Como resultado obteve-se 21 exemplares machos e 15 fêmeas, permitindo ao Criadouro iniciar a adequação de setores na formação de até 15 casais para reprodução, sendo destes, 1 casal da espécie em extinção *Amazona vinacea*.

Introdução

A família *Psittacidae* inclui os papagaios, araras, periquitos, maracanãs e afins. No mundo existem cerca de 344 espécies desta família, das quais na América do Sul encontram-se mais de 100 espécies e o Brasil se destaca com suas 72 espécies, sendo considerado o país mais rico do mundo neste grupo de aves (SICK, 1997).

Os psitacídeos, assim como muitas outras populações de aves, que no passado tiveram uma ampla distribuição ficaram reduzidos a pequenos locais devido a inúmeros fatores, tais como a fragmentação do habitat natural, poluição ambiental, tráfico ilegal, dentre outras causas relativas à expansão do ambiente do homem. Estas contínuas interferências em populações silvestres de tamanho reduzido podem acarretar em uma distorção da proporção entre os sexos destes animais, sendo este um dos fatores agravantes para a reprodução, colaborando assim, com a extinção dos mesmos (WAJNTAL, 1996).

Estima-se que cerca de 26% das espécies de papagaios estejam ameaçadas ou próximas da extinção, encontrando-se

entre os grupos mais ameaçados do mundo. Tal fato se justifica principalmente por sua retirada indiscriminada da natureza, para comercialização ilegal como “pets”, devido tanto a sua habilidade de comunicação, quanto a sua inteligência (MIYAKI *et al.*, 1998).

Programas de conservação e proteção ao ambiente, com reforço legal e educação ambiental associados, além de programas de reprodução em cativeiro demonstraram ser uma medida viável para a conservação destas espécies, para eventuais reintroduções (MIYAKI *et al.*, 1998).

Os Criadouros Conservacionistas são áreas especialmente delimitadas e preparadas, dotadas de instalações capazes de possibilitar a criação racional de espécies da fauna silvestre brasileira (Portaria IBAMA nº 139-N/93).

O papagaio-verdadeiro, *Amazona aestiva* (Linnaeus, 1758) e papagaio-de-peito-roxo, *Amazona vinacea* (Kuhl, 1831) esta última em via de extinção, são duas espécies de psitacídeos cujo dimorfismo sexual externo não é evidente, o que dificulta sua identificação sexual, contribuindo assim para o declínio de sua população.

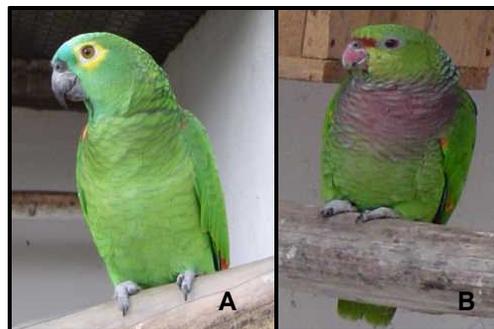
Atualmente existem algumas técnicas de sexagem como a cariotipagem, análise do conteúdo fecal, laparoscopia, laparotomia e a análise de DNA, devido a cada um destes métodos apresentarem suas vantagens e desvantagens (MIYAKI *et al.*, 1997), optou-se pela utilização da análise de DNA por se tratar de uma técnica bem estabelecida (GRIFFITHS *et al.*, 1993), rápida e precisa, que requer pequenas quantidades de amostras que podem ser coletadas em campo e preservadas em condições ambientais.

Esta técnica baseia-se na utilização de um gene, pois, ele conserva regiões codificadoras podendo ser aplicado há um maior número de espécies. O primeiro gene descoberto foi o "Chromobox-Helicase-DNA binding" (CHD) um gene bastante conservado, que com a utilização de apenas um par de "primers" pode ser utilizado por toda classe de aves, com a exceção das ratitas. Os "primers" utilizados amplificam simultaneamente partes homólogas do CHD-W e do gene CHD-Z correlacionado (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

O gene CHD-W localiza-se no cromossomo W, sendo único nas fêmeas, enquanto que o CHD-Z encontra-se no cromossomo Z, ocorrendo nos dois sexos. Através da aplicação da técnica de PCR ("reação em cadeia da DNA polimerase") amplificam-se seções homólogas dos dois genes e incorporam-se íntrons, os quais variam de tamanho. O resultado é examinado em géis de agarose, onde o macho apresenta uma banda, enquanto que as fêmeas apresentam duas (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

O presente trabalho propõe a aplicação desta técnica molecular no plantel de *Amazona aestiva* e *Amazona vinacea*, no intuito de realizar a identificação sexual dos mesmos, possibilitando um aumento significativo na formação de casais para a reprodução em cativeiro, condizente com as estruturas existentes, além de atender as atribuições referentes as normas vigentes para criação em Criadouros Conservacionistas previstas pelo IBAMA.

Figura 1: (A) Exemplar de *Amazona aestiva*; **(B)** Exemplar de *Amazona vinacea* pertencentes ao Criadouro Conservacionista Univap.



O plantel estudado corresponde a um total de 36 aves, sendo, 33 exemplares de *Amazona aestiva* e de 03 exemplares de *Amazona vinacea*, pertencentes ao Criadouro Conservacionista UNIVAP, sob Registro do IBAMA nº1/35/2000/001399-1, parte integrante do Centro de Estudos da Natureza (CEN), localizado na Universidade do Vale do Paraíba, campus Urbanova - São José dos Campos/SP. As amostras coletadas foram analisadas no Laboratório de Genética Molecular e Genomas, localizado no Instituto de Pesquisas e Desenvolvimento (IP&D), na UNIVAP. O presente trabalho recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da referida faculdade, sob registro nº L069/2003/CEP.

Foram obtidas amostras de sangue de todos os exemplares citados anteriormente, através de coletas realizadas por veterinário, com o auxílio de uma seringa estéril de insulina puncionada na veia braquial da ave, após prévia assepsia local, retirando-se cerca de 0,2 ml de sangue. O material coletado foi transferido a um tubo de microcentrífuga, devidamente identificado, com três partes de etanol absoluto (3:1), selado com "parafilm" a temperatura ambiente e posteriormente armazenado a -20° C até o seu processamento.

Para a extração do DNA, adicionou-se em 0,1 ml de sangue de cada amostra, 40 µl de NaOH 50 mM. Levou-se esta solução ao banho maria a 90° C por 10 minutos. Após este aquecimento realizou-se uma centrifugação de 12.000 rpm por 30 segundos e neutralização com 50 µl de Tris-HCl 1M (pH 8,0), acrescentando-se 300 µl de água destilada e deionizada (MilliQ). Esta solução era armazenada por dois dias em geladeira.

Para a reação de PCR foram adaptadas algumas concentrações baseadas em protocolos padrão (Tabela 1).

Tabela 1: Concentrações aplicadas as reações de PCR

Reagentes e concentrações	quantidade
DNA - amostra	2 µl

Metodologia

VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e

IV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba

120

Tampão de reação (200 mM Tris – HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) – Invitrogen	5 µl
Cloreto de magnésio 50mM - Invitrogen	3 µl
Dinucleotídeos trifosfato (dNTP's) 0,2 mM	1µl
Primer 10pmol (P2: 5'- TCTG CA T CGCTAAATCCTTT –3'	1µl
Primer 10pmol (P8: 5'- CTC CCAAGGATGAGRAAYTG–3')	1µl
Taq DNA polimerase (5U/µl) - Invitrogen	0,2 µl
Água destilada e deionizada (milliQ)	36,8 µl
TOTAL :	50 µl

As condições de amplificação por PCR foram realizadas em termocicladores Perkin Elmer - 2400 ou PTC-200 (MJ Research). O protocolo utilizado constitui-se de uma etapa de desnaturação inicial de 5 minutos a 95° C, seguida de 36 ciclos de: 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 41°C para o anelamento e 30 segundos a 72°C, finalizando com a etapa de extensão a 72°C por 7 minutos.

Para a visualização das bandas amplificadas, as reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 3% em tampão de corrida TBE (54 g/l, 27,5 g/l ácido bórico, 4,7 g/l EDTA em água pH 8,0) e como corante utilizou-se o Brometo de Etídio (EtBr₂).

Os fragmentos amplificados foram separados a 100 V por 10 minutos, para haver melhor penetração no gel e a 80 V por cerca de 90min, para haver separação das bandas. Visualizou-se em transluminador de luz U.V. e foram fotografados com a utilização do programa Kodak 1D 3.5.

Resultados e discussão

Os produtos de PCR obtidos foram visualizados em géis de agarose 3%, mais espesso do que o utilizado normalmente por se tratar de uma diferença muito pequena entre os tamanhos dos fragmentos, onde as fêmeas apresentam duas bandas (por se tratar dos genes CHD-W e CHD-Z) enquanto que os machos apresentam apenas uma banda (resultante do CHD-Z), como pode-se observar no exemplo abaixo:

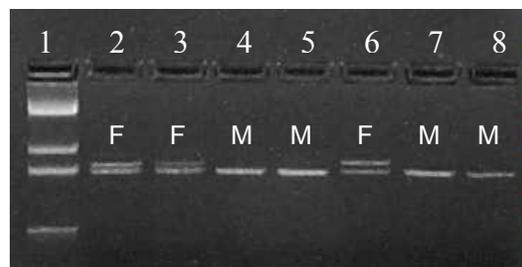


Figura 2: Amostras de amplificação por PCR; F: fêmeas; M: machos. 1- padrão; 2, 3, 4 e 5- *A. aestiva* ; 6, 7 e 8: *Amazona vinacea*.

Para a amplificação destes fragmentos de interesse foram definidos os parâmetros mais relevantes para o sucesso e especificidade das reações, a partir de um amplo espectro de testes, no sentido de padronizar as condições de PCR para as espécies analisadas, descritas anteriormente na metodologia.

Outra variante analisada foi a temperatura de anelamento dos iniciadores de reação. Por se tratar da utilização de apenas um par de "primers" para toda a classe de aves e levando-se em consideração os polimorfismos existentes nas diferentes espécies abrangidas verificou-se na literatura a temperatura mais adequada para a otimização das reações.

Segundo Griffiths e colaboradores (1998), a temperatura sugerida é de 48°C, sendo os problemas de amplificação resolvidos pelo aumento ou diminuição de 3 graus Celsius. Já Miyaki e colaboradores sugerem a utilização de 41°C para os psitacídeos, sendo este o protocolo adotado para a realização da pesquisa por se demonstrar bastante eficiente.

Através da aplicação da técnica molecular de "PCR", obteve-se como resultado a identificação sexual do plantel de interesse (Gráfico 1).

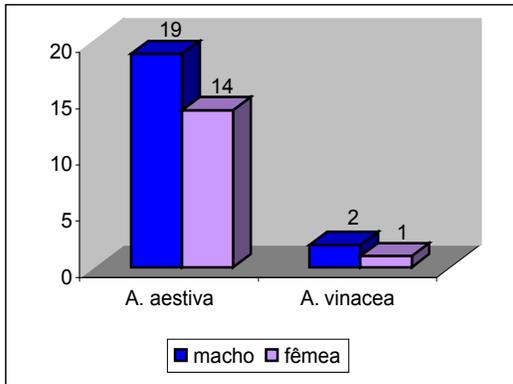


Gráfico 1: Identificação sexual dos exemplares de *Amazona aestiva* e *Amazona vinacea* pertencentes ao Criadouro Conservacionista UNIVAP

É possível observar também, a maior proporção de *Amazona aestiva* do que de *Amazona vinacea*, existentes no Criadouro Conservacionista UNIVAP, fato justificado principalmente pela grande procura e facilidade de obtenção do papagaio-verdadeiro, ao contrário da drástica diminuição que população do papagaio-de-peito-roxo vem sofrendo durante anos, o que levou esta espécie a se encontrar em vias de extinção.

Pode-se perceber ainda no Gráfico 1 a proporção entre os sexo das duas espécies analisadas, o que possibilitará a formação de até 14 casais de *A. aestiva* e de 01 casal de *A. vinacea*, facilitando e contribuindo para o aumento nas chances de reprodução destas espécies.

Segundo a Instrução Normativa 001/89-P- 89 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis -IBAMA, que estabelece os requisitos recomendáveis para ocupação de alojamentos em jardins zoológicos, e resolve para a família *Psittacidae*: o número máximo de indivíduos à área da base do alojamento de 01 ave por 2,5 m², sendo que em caso de alojamentos coletivos o número total de aves deve corresponder a somatória do que comportam as áreas individuais.

O Criadouro Conservacionista UNIVAP apresenta atualmente 08 recintos destinados a *A. aestiva*, sendo que 04 estão em fase de adaptação e reforma afim de melhor atender as recomendações supracitadas anteriormente, e 01 recinto destinado a *A. vinacea*.

De acordo com os recintos disponíveis para a criação destas duas espécies, sugere-se o manejo adequado dos indivíduos que apresentam maior afinidade para a formação de 06 casais de *A. aestiva* e de 01 casal de *A. vinacea* a fim de que realmente todas as condições possam ser oferecidas a estes casais, disponibilizando o espaço necessário, além de outros fatores importantes como alimentação balanceada e adequada para que efetivamente haja a reprodução destas aves.

Conclusão

Foi realizada com sucesso a identificação sexual de 100% do plantel de *A. aestiva* e *A. vinacea* existente no Criadouro Conservacionista UNIVAP, através da aplicação da técnica molecular de "PCR", demonstrando ser bastante eficiente.

Os resultados obtidos possibilitarão a formação de até 14 casais de *A. aestiva* e de 01 casal de *A. vinacea*, contribuindo assim para um aumento nas chances de reprodução em cativeiro destas espécies e atendendo as especificações legais delimitadas pelo IBAMA.

Referências bibliográficas

Brasil: Portaria IBAMA nº 139-N, de 29 de dezembro de 1993 – Normatiza criadouros conservacionistas.

GRAJAL, A., The Neotropics (Americas). **Status Survey and Conservation Action Plan 2000 - 2004**. IUCN - The World Conservation Union, Information Press, Oxford, UK.

GRIFFITHS, R., TIWARI, B. The isolation of molecular genetics markers for the identification of sex. **Genetics**, 90: 324-326, 1993.

GRIFFITHS, R., Double M., Orr, K., Dawson R. A DNA test to sex most birds, **Mol. Ecology**, 7:1071, 1998.

GRIFFITHS, R. Sex identification in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, 9:14, 2000.

MIYAKI, C. Y. Um estudo filogenético de psitacídeos (Psittaciformes, Aves) baseado

em seqüências de genes mitocôndrias. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1996.

MIYAKI, C. Y., DUARTE, M. B., CAPARROZ, R., NUNES, A. L. V., WAJNTAL, A. Sex Identification of South American Parrots (Psittacidae, Aves) Using the Human Minisatellite Probe 33.15. **The Auk**. 114(3):516-520, 1997.

MIYAKI, C. Y., GRIFFITHS, R., ORR, K., NAHUM, L. A., PEREIRA, S.L., WAJNTAL, A. Sex Identification of Parrots, Toucans, and Curassows by PCR: Perspectives for Wild and Captive Population Studies. **Zoo Biology** 17:415-423, 1998.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Edição Revista e Ampliada, Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 827 p.

WAJNTAL, A. **Genética e conservação de aves**. In: ANAIS V CONGRESSO BRASILEIRO DE ORNITOLOGIA. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 5, 1996, Campinas, SP. Anais...Campinas: UNICAMP, 1996. P. 191-201.