

Polimorfismo de *Amazona aestiva* do Criadouro Conservacionista da Universidade do Vale do Paraíba – Um estudo piloto

Marcolino, L. M., Mittmann, J.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Endereço e-mail
lumaria.cortez@hotmail.com e mittmann@univap.br

Resumo- As várias ameaças sofridas pelos animais silvestres implicam, muitas vezes, na perda da variabilidade genética, em especial da espécie *Amazona aestiva*, em suas regiões geográficas. Para possível programa de reintrodução de aves apreendidas pela Polícia Ambiental, é importante entre outras características, conhecer os seus níveis de polimorfismos. Para tanto foram utilizados métodos de observação da morfologia e análise de padrões genéticos. Foram realizados procedimentos de extração de DNA do sangue e esfregaço bucal, reação de amplificação. Porém em nenhuma das amostras de DNA obtidas foram amplificados os fragmentos esperados de 506pb. Já o agrupamento dos indivíduos de acordo com características fenotípicas, isto é a coloração da plumagem, permitiu o agrupamento dos animais possivelmente provenientes de três regiões – PI., BA/GO/TO, MS/Argentina. Como perspectivas futuras espera-se realizar novos ensaios para a amplificação do gene alvo, seqüenciamento dos amplicons e comparação das seqüências obtidas com as depositadas no GeneBank a fim de validar os dados fenotípicos, com a origem geográfica dos papagaios, que permitirá um manejo e reintrodução adequada dos animais em seus locais de origem, mantendo sua diversidade.

Palavras-chave: Diversidade, Amazona, Programa de Reintrodução

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

No Brasil a diversidade da avifauna reúne inúmeros representantes, cerca de 1700 espécies (SANTOS, 2006).

Dentre eles destacamos a família Psittacidae com ampla distribuição geográfica com cerca de 72 espécies no Brasil (SICK, 1997). Por conta de suas características marcantes, valor decorativo e cotação internacional é uma das famílias mais procuradas pelo comércio ilegal de animais silvestres (RENTAS, 2007). Associados ao comércio ilegal temos a diminuição do habitat levando a perda da variabilidade genética, essa família contém muitas espécies em vias de extinção e/ou vulneráveis a ela (CAPARROZ, 1998).

Na tentativa de aumentar a probabilidade de sucesso em planos de conservação das espécies, através da reintrodução dos indivíduos em seu local de ocorrência, para que não haja riscos para a população selvagem (NUNES, 2004), amenizando assim os impactos, vários trabalhos são desenvolvidos por pesquisadores, na chamada Biologia da Conservação que possui ferramentas importantes nos estudos com genética molecular a fim de determinar estratégias adequadas de conservação biológica das espécies (EIZIRIK, 1996).

A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), que permite a amplificação *in vitro* de ácidos nucléicos a partir de amostras pequenas de

DNA, como encontrado em bulbos de penas, por exemplo, permite que análises genéticas possam ser realizadas mesmo quando a quantidade de DNA é escassa. Essa técnica permite a utilização de micro e mini-satélite, que são seqüências repetitivas do DNA e possui elevado conteúdo de informação de polimorfismo.

Através dessa técnica podem, também, ser analisados genes do DNA mitocondrial, e estes genes apresentam sucesso em estudos filogenéticos (PEREIRA, 2000), especialmente através de amplificação do gene citocromo oxidase subunidade I (COI), que permite estudo de revisão taxonômica das aves (RIBAS et al, 2007).

O objetivo inicial do trabalho foi o de identificar com base em características fenotípicas, como coloração da plumagem e moleculares através do gene COI as possíveis origens geográficas das espécies de *Amazona aestiva* presentes no criadouro conservacionista. A determinação de polimorfismos genéticos pode ser utilizada em programas de soltura, reintroduzindo os indivíduos seu habitat de ocorrência natural

Metodologia

Os indivíduos utilizados no presente trabalho; provenientes de apreensões realizadas por agentes da Polícia Ambiental de São José dos Campos, SP; pertencem ao Criadouro Conservacionista sob Registro no IBAMA vn^o

1/35/2000/001399 -1, sendo integrante do Centro de Estudos da Natureza (CEN), localizado na UNIVAP - no Campus Urbanova – São José dos Campos - SP (autorização de pesquisa CEN/UNIVAP). O presente trabalho foi autorizado pelo Comitê de Ética sob nº. A022/CEP/2009 e pelo IBAMA-SISBIO 20439-1.

Para a análise fenotípica (coloração da plumagem), foram utilizados os critérios da literatura (SICK, 1997; CAPARROZ, 2009; LEITE, 2007), que se baseiam na coloração do encontro da asa (local de inserção da asa com o corpo). e as diferenças na coloração da plumagem da cabeça. Os indivíduos característicos provenientes do Piauí apresentam coloração amarela desde a cabeça até o peito (chamado babador amarelo) (Figura 1a), indivíduos do Brasil ocidental apresentam coloração do encontro da asa amarelo (Figura 1b) e os que possuem do encontro da asa de coloração vermelha são provenientes da região oriental do Brasil (Figura 1c). Com base na observação das características descritas acima as aves foram agrupadas e os dados organizados de acordo com o número das anilhas em tabela.

O material biológico, para obtenção do DNA mitocondrial, foi coletado pelo veterinário Dr. João Francisco de Azevedo Mattos. Para obtenção do esfregaço bucal (Swab), utilizou-se um cotonete estéril, introduzido na mucosa bucal da ave. Os swabs foram acondicionados na própria embalagem devidamente fechadas para evitar contaminação e mantidos em freezer -80 °C até extração do DNA. Cerca de 100 a 300µL de sangue foram coletados puncionando a veia braquial da asa, com a utilização de uma seringa estéril de insulina de 1mL, após prévia assepsia do local. O sangue coletado foi armazenado em tubos de centrifuga de 1500µL e acondicionados em freezer -80 °C até a extração do DNA.

Para a extração de DNA a partir do sangue foram utilizadas duas metodologias **A**- Utilização do Kit QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook da QIAGEN; segundo o procedimento, descrito pelo fabricante; e **B**- Através do método de TENS conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989).

Para extração de DNA genômico e mitocondrial das amostras, a partir do swab (esfregaço bucal), utilizou-se protocolo de Abrão (2005). Para a amplificação do fragmento do gene para COI foram utilizados os iniciadores COIa (5'AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC3') e COIb (5'CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC3'), adquiridos da empresa Invitrogen. Foram utilizados três diferentes protocolos para a amplificação do gene conforme descrito na tabela 1.

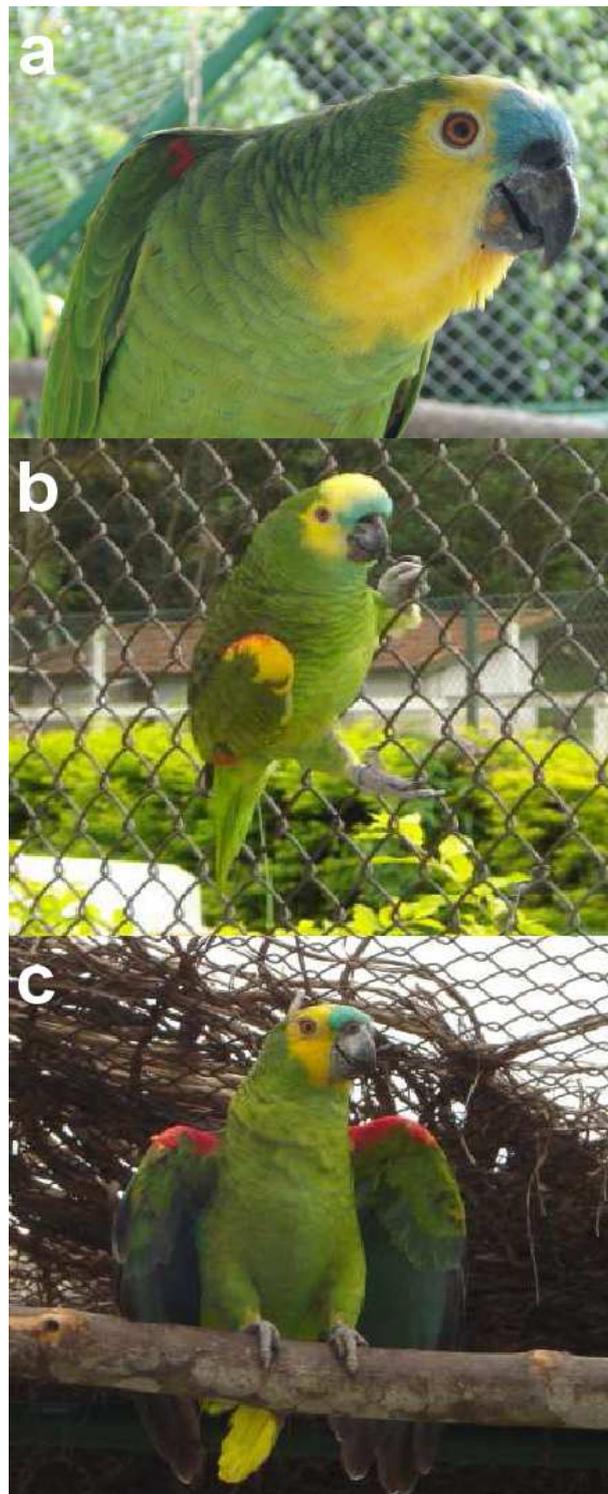


Figura. 1 Em (a) Papagaio-aa – variação de características na plumagem (babador) típica da região do Piauí. *A. aestiva*. (b) *A. a. xanthopteryx* - - encontro asa amarelo – possível ocorrência na região ocidental do Brasil, como o Mato Grosso do Sul. (c) *A. a. aestiva* – encontro asa vermelha – variação encontrada na região da Bahia e Tocantins

Tabela 1. Condições testada para amplificação do gene COI

Teste	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95°C	60 seg.	1
	95°C	60 seg.	35
	53°C	40 seg.	
	72°C	40 seg.	
2	72°C	1000 seg.	1
	95°C	420 seg.	1
	95°C	60 seg.	30
	50°C	40 seg.	
	72°C	40 seg.	
72°C	100 seg.	1	
3	94°C	300 seg.	1
	94°C	60 seg.	35
	48°C	60 seg.	
	72°C	60 seg.	
	72°C	1000 seg.	1

O produto da amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose na concentração 1% contendo TEB 1X e 2,5µL de brometo de etideo. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA Lambda digerida por Hind III – 100pb. O gel foi visualizado por exposição à radiação ultra-violeta no transluminador (Transluminador UV 302nm – T26M, BioAgency).

Resultados

Os dados das características fenotípicas permitiram, utilizando dados comparativos da literatura, o agrupamento dos animais de acordo com a distribuição da raça geográfica, até então, aceita (Tabela 2). Observamos que no Criadouro existem animais com as três variações de plumagens descritas na literatura, sendo em maior proporção animais com encontro da asa vermelha, característicos das regiões da Bahia, Goiás e Tocantins (Brasil Oriental).

Tabela 2. Agrupamento dos indivíduos de *A. aestiva* do Criadouro Conservacionista em prováveis regiões geográficas.

Característica	Babado amarelo <i>A. aestiva</i>	Encontro da asa vermelho <i>A. a. aestiva</i>	Encontro da asa amarelo <i>A. a. Xanthopteryx</i>
Reg Provável	PI.	BA/GO/TO.	MS/Argentina
Numero das anilhas	091	092 025	022
	034	084 086	023
	027	077 073	082
	009	006 031	083
	020	095 090	085
	019	089 094	
	021	044 072	
	008	032 080	
	013	087 026	
	016	040 001	
	018	007 047	
	015	036 096	
	010	097 078	
	024		
	042		
	014		
	041		
Total	17	26	5

Em relação aos dados moleculares esperava-se um resultado de um amplicom de 506 pb, porém em nenhuma das amostras de DNA obtidas foram amplificados os fragmentos esperados, em nenhuma das temperaturas de anelamento testadas e também em nenhuma das concentrações de DNA ou iniciadores (primer) (Tabela 3).

Tabela 3. Tabela de diferentes temperaturas de anelamento para diferentes concentrações de DNA e primer (COIa, COIf)

T	Con de DNA	Con de primer	Resultados
53°C	5 µL	1µL	-
48°C	10 µL	5µL	-
50°C	10 µL	2µL	-

Discussão

Após as análises realizadas foi possível a separação dos grupos de acordo com a coloração da plumagem em relação à possível área de ocorrência, o que condiz com estudos realizados por diversos autores sobre a origem das aves, principalmente a distinção da característica do encontro da asa amarelo ou vermelho. Caparroz (2009) cita que o nível polifilético das espécies da América do Sul podem ser explicadas por três fatores: **1-** as duas espécies representam variantes geográficas de uma única espécie e que continua a troca de genes; **2-** linhagem incompleta; **3-** hibridização por questão de introgressão de genes.

Ainda, segundo Caparroz (2009), a divergência fenotípica observada entre os indivíduos podem ter sido induzidas pelo ambiente, já que ocorrem em diferentes habitats, ou ter base genética mantida pela seleção. Já o baixo fluxo gênico entre o nordeste e o sul, podem ter contribuído para as diferenças morfológicas entre as duas cores do encontro da asa. O estudo dos padrões de diversidade e distribuição tem muito a contribuir para a compreensão da história biogeográfica de papagaios neotropicais.

As diferenças na coloração da plumagem observadas nesse trabalho e a confirmação pelos dados genéticos a serem realizados futuramente trará importantes ferramentas no programa de soltura das espécies em seu local de origem, evitando assim intervenção nos padrões das interações ecológicas e sociais existentes na área de soltura, e de impactos na estrutura gênica das populações selvagens, contribuindo com o que diz Nunes (2004) e Wanjtal (2000), a respeito da reintrodução de animais cativos à natureza.

No que se refere à distribuição geográfica do Brasil oriental e ocidental, Leite (2007), comprova em seus estudos de variabilidade de *A. aestiva*, onde observou maior significância nos padrões genéticos entre os indivíduos nas duas regiões extremas do Brasil, Tocantins, onde encontra-se papagaios com encontro da asa vermelho e divisa com a Argentina, onde encontra-se papagaios com o encontro da asa amarelo.

Segundo ainda Caparroz (2006), os estudos envolvendo técnica de pesquisa de DNA são importantes para estimar a variabilidade genética dentro de grupos da mesma espécie em localidades diferentes. Dados fenotípicos aliados aos de polimorfismo genético permitem um manejo e reintrodução adequada dos animais em seus locais de origem, o que permite a manutenção tanto da diversidade genotípica quanto fenotípica.

Conclusão

A provável origem das aves do Criadouro Conservacionista da UNIVAP foi de animais capturados em diferentes estados brasileiros. A análise das características de coloração das penas do encontro da asa dos indivíduos de *A. aestiva* permite sugerir a origem geográfica distinta destes animais. A captura para o abastecimento do comércio ilegal teve como origem provável os estados da Bahia, Goiás e Tocantins em maior número, Piauí em segundo e em menor número animais oriundos do Mato Grosso do Sul.

As possíveis causas da não amplificação podem ser a baixa qualidade do DNAm obtida pelos métodos de extração utilizados, a temperatura de anelamento não estar adequada, neste caso pode-se sugerir realizar diminuição gradativa da temperatura de anelamento de 60 °C em um grau por ciclo (touchdown) conforme proposto por Graf (2001).

Outra hipótese que não deve ser descartada é a de problemas na síntese dos oligonucleotídeos, uma vez que fontes de DNA de outros pesquisadores foram utilizadas como controle e não houve amplificação em nenhum dos casos.

São necessários testes de novos protocolos de extração de DNA mitocondrial e de amplificação a fim de se obter amplicons para o seqüenciamento a fim de correlacionar os dados fenotípicos com os dados genéticos.

Considerando que não foi possível obter os dados de PCR, como perspectivas futuras espera-se realizar novos ensaios para a amplificação do gene alvo, seqüenciamento dos amplicons e comparação das seqüências obtidas com as depositadas no GeneBank a fim de validar os dados fenotípicos e de origem geográfica dos papagaios do Criadouro Conservacionista.

Referências

ABRÃO, M. G.; BILLERBECK, A. E. C.; NISHI, M. Y.; MARUI, S.; MENDONÇA, B. E. B. de. Padronização da Técnica de Extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: Aplicação no estudo do gene PROP1. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. Vol 49. N. 6. Dez. 2005.

CAPARROZ, R. Estudos de populações naturais de psitacídeos neotropicais (Psittaciformes, Aves) por técnica de identificação individual pelo DNA ("DNA fingerprint"): enfoque em conservação. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Biologia do Instituto de

Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo. 1998.

CAPARROZ, R.; MARTUSCELLI, P.; SCHERER-NETO, P.; MIYAKI, C. Y.; WAJNTAL, A. Genetic variability in the Red-tailed Amazon (*Amazona brasiliensis*, Psittaciformes) assessed by DNA fingerprinting. *Revista Brasileira de Ornitologia* 14 (1) 15-19. Mar. 2006.

CAPARROZ, R. SEIXAS, G. H. F.; BERKUNSKY, I.; COLLEVATTI, R. G. The role of demography climatic event in shaping the phylogeography of *Amazona aestiva* (Psittaciformes, Aves) and definition of management units for conservation. *Biodiversity Research*. 15, 459-468. 2009.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. *Revista Brasileira de Genética*. 19 (4) 23-29. 1996.

GRAF, D.L. A phylogenetic perspective on the evolution of the unionoida (Mollusca Bivalvia Palafoheterodonta): using pattern to test hypotheses of macroevolutionary process. A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy (Biology) in The University of Michigan.. 241p 2001.

LEITE, K. C. E. Análise da Estrutura Genética e Biologia Reprodutiva do Papagaioverdadeiro (*Amazona aestiva*). 63 p. 2007. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília. 2007.

NUNES, M. F. C. Plano de soltura monitorada de araras-azuis-de-lear - *Anodorhynchus leari*. Núcleo de Pesquisa e Manejo do CEMAVE/IBAMA . Ago. 2004.

PEREIRA, S. L. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. Review Article. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4, 745-752. 2000.

RENTAS (Rede Nacional Contra o Tráfico de Animais Silvestres). 1º Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre. Brasília, 2001. Disponível em: <http://www.rentas.org.br/pt/trafico/default.asp>. acesso em: 11 Set. 2007.

RIBAS, C. C. et al Phylogeny and biogeography of Yellow-headed and Blue-fronted Parrots (*Amazona ochrocephala* and *Amazona aestiva*) with special reference to the South American taxa. *IBIS* 149, 564–574. 2007.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, vol. 3, pp. 198. New York: Cold Spring Harbor.

SANTOS, L. P.; GUNSKI, R. J. Revisão de dados citogenéticos sobre a avifauna brasileira. *Revista Brasileira de Ornitologia* 14 (1). p. 35-45. Mar. 2006.

SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. In: SICK, H. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

WANJAL, A.; SILVEIRA, L. F. A soltura de aves contribui para sua conservação? *Atualidades Ornitológicas*. n. 98. Nov./Dez. 2000.