

Identificando o sistema de acasalamento em aves*

Carolina da Silva Carvalho^{1,2}; Maria Augusta Carvalho^{1,2}; Rosane Garcia Collevatti^{1,2}

¹ Laboratório de Genética & Biodiversidade, ICB, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

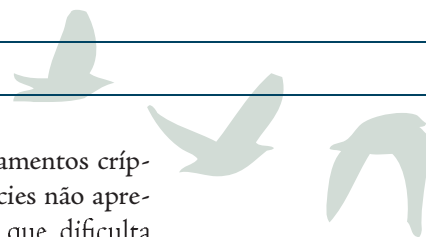
² Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, ICB, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

Autor para correspondência: rosanegc68@hotmail.com.

*Material didático desenvolvido na disciplina Ecologia Molecular, coordenado pela Professora Rosane Garcia Collevatti, do curso de graduação em Ecologia e Análise Ambiental do Departamento de Ecologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, como uma atividade do Estágio Docência (bolsistas CAPES) das discentes do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução.

A atividade, apropriada para estudantes de ensino superior, tem por objetivo estudar um caso de ecologia molecular, simulando a análise de dados moleculares referentes à sexagem de aves e análise de paternidade de filhotes provenientes de ninhos de diferentes casais. A metodologia possibilita a inferência do comportamento da espécie em questão. A atividade auxilia a compreensão de conceitos básicos de Genética, Ecologia e Comportamento Animal.





FUNÇÃO PEDAGÓGICA

A principal função da atividade proposta é trabalhar conceitos básicos de Genética para a solução de um problema hipotético de comportamento sexual de uma espécie de ave. A atividade simula a determinação molecular do sexo dos indivíduos e a paternidade de filhotes oriundos de ninhos de diferentes casais possibilitando que os estudantes de ensino superior relacionem e apliquem conceitos básicos de genética como genótipo, segregação de alelos, caracterização de espécies, manipulação e caracterização de ácidos nucleicos.

OBJETIVO

O objetivo da atividade é entender que, devido à segregação de alelos na formação dos gametas pelos parentais, para lócus que segregam independentemente, a prole deverá apresentar um alelo de cada genitor, ou seja, um alelo proveniente do gameta materno e um alelo do gameta paterno. Dessa forma, conhecendo o genótipo da mãe, e dos filhotes, o estudante poderá determinar se o pai é o parceiro social da fêmea presente no ninho ou não, identificando deste modo se há acasalamento extrapar.

PROBLEMA PROPOSTO

Os sistemas de acasalamento em aves podem ser resumidos em três principais tipos, de acordo com (ALCOCK, 2005):

- a. **monogâmico:** nas relações monogâmicas, casais de sexos opostos são formados por toda a estação reprodutiva, em alguns casos, por toda a vida.
- b. **poligâmico:** no sistema reprodutivo poligâmico, o acasalamento pode ocorrer entre um macho e várias fêmeas – denominado poliginia; ou uma fêmea ter acesso a vários machos, - denominado poliandria.
- c. **promíscuo:** no sistema de acasalamento promíscuo, fêmeas e machos podem acasalar com vários indivíduos durante uma mesma estação reprodutiva.

No entanto, a identificação em campo do tipo de sistema de acasalamento requer um esforço muito grande por parte de biólogos e ecólogos devido, em grande parte, à difi-

culdade em observar comportamentos crípticos. Além disso, muitas espécies não apresentam dimorfismo sexual, o que dificulta ainda mais este tipo de estudo. Neste sentido, a Ecologia Molecular pode auxiliar a entender o comportamento sexual em diversas espécies quando são usados, por exemplo, marcadores moleculares codominantes e os princípios de segregação mendeliana.

Um pesquisador estudou o sistema de acasalamento de uma determinada espécie de ave do Cerrado brasileiro. A partir de observações em campo, ele identificou a formação de casais durante a estação reprodutiva e concluiu que a espécie possui sistema de acasalamento monogâmico. No entanto, ele observou a presença de outros indivíduos próximos aos ninhos destes casais, principalmente durante o período em que o macho do par monogâmico voava para se alimentar. Desta forma, a simples observação não possibilitou determinar se a espécie estudada era monogâmica ou monogâmica social com ocorrência de acasalamento extrapar, ou seja, acasalamento com parceiro(s) diferente(s) do parceiro social. Para poder decidir entre as duas possibilidades acima referidas, o pesquisador decidiu usar uma estratégia de análise molecular de paternidade entre os casais e os filhotes. O procedimento está abaixo descrito:

1. Três diferentes ninhos recém-construídos e que eram cuidados por três casais diferentes foram marcados.
2. Penas dos pais e dos filhotes dos ninhos selecionados foram coletadas para extração de DNA e caracterização genética por meio de **marcadores moleculares**.
3. No laboratório, amostras de DNA foram extraídas das penas coletadas. Como a espécie não tem dimorfismo sexual, foi necessário fazer a identificação sexual com o uso de marcadores moleculares de genes ligados aos cromossomos sexuais. Nas aves, isto é possível porque o sistema de determinação sexual é do tipo ZW, sendo a fêmea heterogamética, com cromossomos Z e W, e o macho homogamético, com dois cromossomos Z. Dois genes, CHD-W e CHD-Z, localizados nos cromossomos sexuais das aves, foram utiliza-

Marcador molecular

é um fragmento de DNA, oriundo de um segmento específico do genoma, expresso ou não, utilizado para identificar uma região particular do genoma (FERREIRA, GRATTAPAGLIA, 1996).

A reação da polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*) denominada **PCR** é uma reação enzimática na qual uma região específica de DNA, um **lôcus**, é amplificada muitas vezes, permitindo assim a identificação de diferenças no DNA dos indivíduos.

Eletroforese

é uma técnica de separação de moléculas com base na migração das moléculas ou de fragmentos ionizados em um campo elétrico. No caso da separação de fragmentos de DNA, a mistura é aplicada em uma matriz ou gel (geralmente agarose ou acrilamida, dependendo do tamanho dos fragmentos a serem separados) na presença de uma solução iônica tamponada.

Genótipo

é a constituição genética (alelos) de um indivíduo para um ou mais **lôcus**.

Alelos

são formas alternativas de um mesmo gene ou de um marcador molecular.

Microssatélites

são unidades de repetição de pares de bases do DNA, dispersas no genoma. Por exemplo, $(CA)_{10}$ é uma sequência dos nucleotídeos contendo as bases nitrogenadas citosina (C) e adenina (A), repetida 10 vezes em tandem. As regiões de microssatélites têm taxa de mutação muito alta e são altamente polimórficas, por isso os microssatélites são considerados bons marcadores moleculares para discriminar indivíduos (FREELAND, 2005).

Marcadores moleculares codominantes

são marcadores que permitem identificar os alelos presentes nos **lôcus** estudados, ou seja, permitem distinguir indivíduos homocigotos e heterocigotos (FREELAND, 2005).

Lôcus

é uma região específica do cromossomo, onde se localiza um gene ou um marcador molecular.

dos. CHD-W localiza-se no cromossomo W, presente portanto apenas em fêmeas; e CHD-Z no cromossomo Z, presente em ambos os sexos (GRIFFITHS et al, 1998). Segmentos dos referidos genes foram amplificados pelo pesquisador por meio da técnica da **PCR**. Em seguida, os fragmentos obtidos após amplificação foram fracionados por **eletroforese**. O gel de agarose utilizado na eletroforese foi corado para possibilitar a visualização dos fragmentos gerados pela PCR.

O perfil de bandas obtidas após separação eletroforética em gel de agarose, para cada conjunto de adultos dos três ninhinhos, está esquematizado no Painel 1.

- Em seguida, para determinar o sistema de acasalamento o pesquisador utilizou o método de paternidade por exclusão, que consiste na comparação do **genótipo** da prole com o da mãe e dos candidatos a pais. Como em um filhote, metade dos cromossomos foi herdado da mãe e, a outra metade, do pai, o candidato a pai que não tiver metade dos seus cromossomos igual à metade dos cromossomos da prole é excluído de ser o pai. Para determinar os genótipos de todos os envolvidos, o pesquisador escolheu marcadores moleculares do tipo **microssatélites**. Como os marcadores microssatélites são **codominantes** e têm uma taxa de mutação relativamente alta, é possível utilizá-los para identificação individual, sendo assim, apropriados para resolver problemas de paternidade. O pesquisador determinou o genótipo, de todos os adultos e filhotes coletados, para dois **lôcus** de microssatélites, como descrito a seguir:

- Amostras de DNA dos diferentes indivíduos foram submetidas à técnica de PCR, com o objetivo de amplificar segmentos de dois **lôcus** de microssatélites. Os fragmentos gerados pela PCR são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e, as bandas, evidenciadas por coloração com nitrato de prata. Para cada conjunto dos três ninhinhos amostrados (Adulto A, Adulto B, Prole 1 a 5), foi obtido o perfil eletroforético para dois **lôcus**, os de regiões microssatélites do

genoma (Painel 3). Como o marcador molecular microssatélites é codominante, indivíduos que possuem somente uma banda no gel de poliacrilamida são homocigotos, ou seja, possuem o mesmo **alelo** em ambos os cromossomos; indivíduos que possuem duas bandas são heterocigotos, ou seja, possuem diferentes alelos nos cromossomos.

INSTRUÇÕES PARA O PROFESSOR

- Esta atividade poderá ser realizada individualmente ou em grupos de alunos de, no máximo, três pessoas.
- Cada grupo deverá receber o problema proposto, uma cópia do procedimento para realizar a atividade, uma cópia dos painéis onde estão esquematizados os géis de agarose. Após a análise dos painéis, o professor deverá entregar para cada grupo uma série de questões para ser discutida.
- É recomendável que o professor aplique esta atividade em turmas que já tiveram contato prévio com os conceitos de estrutura e organização do material genético, marcadores moleculares e segregação mendeliana.

PROCEDIMENTO PARA OS ESTUDANTES

- Ler com atenção o problema proposto.
- Analisar o painel 1: representação esquemática do gel de agarose com os genótipos dos adultos dos ninhinhos 1, 2 e 3 para os **lôcus** dos genes CHD-W e CHD-Z.
- A partir da leitura dos genótipos, transcrever o sexo dos indivíduos dos três ninhinhos para o Painel 2.

Questão 1. Quantos e quais indivíduos são machos e quantos e quais indivíduos são fêmeas? Como foi possível chegar a esta conclusão?

Questão 2. Como é possível fazer a identificação sexual utilizando padrões de bandas em gel de agarose?

- Analisar os Painéis 3.1, 3.2 e 3.3; representação esquemática dos géis de poliacri-

MATERIAIS DIDÁTICOS

lamida, corados com nitrato de prata, para dois lócus microssatélites.

5. Interpretar os resultados genotípicos e transcrevê-los para os Painéis 4.1, 4.2 e 4.3.

Questão 3. Qual foi o sistema de acasalamento da espécie estudada? Como você chegou a esta conclusão?

Questão 4. Justifique a utilização de marcadores microssatélites para realizar a análise de paternidade.

RESPOSTAS

Questão 1.

Ninho	Ind A	Ind B	Ninho	Ind A	Ind B	Ninho	Ind A	Ind B
1	Fêmea	Macho	2	Macho	Fêmea	3	Macho	Fêmea

Questão 2. É possível fazer a identificação sexual utilizando padrões de banda em gel de agarose, pois os cromossomos sexuais são distintos entre machos e fêmeas. Em aves, por exemplo, o sistema de determinação sexual é do tipo ZW, com fêmeas heterogaméticas (ZW) e machos homogaméticos (ZZ). Assim, utilizando marcadores moleculares de genes localizados nos cromossomos sexuais é possível identificar o sexo dos indivíduos. No caso das aves, as fêmeas apresentarão duas bandas no gel de agarose, pois os dois genes (CHD-W e CHD-Z) serão amplificados. Os machos apresentarão apenas uma banda, pois só o gene CHD-Z é amplificado.

Questão 3.

Ninho 1	Ind A	Ind B	Prole 1	Prole 2	Prole 3	Prole 4	Prole 5
Lócus 1	BB	CC	BC	BB	BC	BD	BC
Lócus 2	EG	GG	EG	EE	GG	GG	EG

Ninho 2	Ind A	Ind B	Prole 1	Prole 2	Prole 3	Prole 4	Prole 5
Lócus 1	CD	AA	AC	AC	AD	AB	AC
Lócus 2	EH	FG	FH	FG	EG	GH	GH

Ninho 3	Ind A	Ind B	Prole 1	Prole 2	Prole 3	Prole 4	Prole 5
Lócus 1	CC	AB	AC	AC	AC	BC	BC
Lócus 2	FH	GG	GH	FG	EG	FG	GH

O sistema de acasalamento encontrado foi o monogâmico social, mas com ocorrência de acasalamento extrapar. Nos três ninhos estudados foram encontrados indivíduos da prole que tinham alelos oriundos apenas da mãe e, portanto, não poderiam ser filhos do parceiro social. Não possuem os alelos do pai: no ninho 1, os indivíduos da prole 2 e 4; no ninho 2, os indivíduos da prole 2 e 4; no ninho 3, o indivíduo da prole 3.

Questão 4. O pesquisador optou por utilizar o marcador microssatélite para análise de paternidade pois este marcador é multialélico, ou seja, possui muitos alelos, o que permite a discriminação dos indivíduos e identificação dos parentais.

REFERÊNCIAS

ALCOCK, J. *Animal Behavior: An Evolutionary Approach*. Sunderland, Massachusetts 8th ed. Sinauer Associates Inc. 564 p. 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Embrapa CENARGEN, Brasília, 220 p. 1996.

FREELAND, J. *Molecular Ecology*. Chichester, John Wiley & Sons, 388 p. 2005.

GRIFFITHS, R.; DOUBLE, M.C.; ORR, K.; DAWSON, R.J.G. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, v. 7, p. 1071-1075, 1998.

WEIR, B.S. *Genetic Data Analysis II*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates Inc., 445 p. 1996.

Painel 1.

Esquema dos géis de agarose para os genes CHD-W e CHD-Z utilizados na sexagem dos parentais de cada ninho.

	CHD	Ind A	Ind B		Ind A	Ind B		Ind A	Ind B	
Ninho 1	Z			Ninho 2			Ninho 3			
	W									

Painel 2.

Tabela dos genótipos para os genes CHD-W e CHD-Z, para determinação do sexo.

Ninho 1	Ind A	Ind B	Ninho 2	Ind A	Ind B	Ninho 3	Ind A	Ind B



MATERIAIS DIDÁTICOS

Painéis 3.

Esquemas de géis de poliacrilamida para dois loci microssatélites, Locus 1 e Locus 2, para os adultos, A e B, e sua prole, (Prole 1 a Prole 5), para os três ninhos amostrados.

Painel 3.1.

Esquema de géis dos indivíduos adultos e filhotes do Ninho 1 para os loci 1 e 2.

Ninho 1		Ind A	Ind B	Prole 1	Prole 2	Prole 3	Prole 4	Prole 5
Locus 1	Alelo A							
	Alelo B							
	Alelo C							
	Alelo D							
Locus 2	Alelo E							
	Alelo F							
	Alelo G							
	Alelo H							

Painel 3.2.

Esquema de géis dos indivíduos adultos e filhotes do Ninho 2 para os loci 1 e 2.

Ninho 2		Ind A	Ind B	Prole 1	Prole 2	Prole 3	Prole 4	Prole 5
Locus 1	Alelo A							
	Alelo B							
	Alelo C							
	Alelo D							
Locus 2	Alelo E							
	Alelo F							
	Alelo G							
	Alelo H							

Painel 3.3.

Esquema de géis dos indivíduos adultos e filhotes do Ninho 3 para os loci 1 e 2.

Ninho 3		Ind A	Ind B	Prole 1	Prole 2	Prole 3	Prole 4	Prole 5
Locus 1	Alelo A							
	Alelo B							
	Alelo C							
	Alelo D							
Locus 2	Alelo E							
	Alelo F							
	Alelo G							
	Alelo H							

Painéis 4.

Tabelas dos genótipos para os dois loci microssatélites, Locus 1 e Locus 2, para os adultos, Ind A e Ind B, e sua proles (Prole 1 a Prole 5), para os três ninhos amostrados.

Painel 4.1.

Genótipos dos indivíduos adultos e filhotes do Ninho 1 para os Locus 1 e 2.

Ninho 1	Ind A	Ind B	Prole 1	Prole 2	Prole 3	Prole 4	Prole 5
Locus 1							
Locus 2							

Painel 4.2.

Genótipos dos indivíduos adultos e filhotes do Ninho 2 para os Locus 1 e 2.

Ninho 2	Ind A	Ind B	Prole 1	Prole 2	Prole 3	Prole 4	Prole 5
Locus 1							
Locus 2							

Painel 4.3.

Genótipos dos indivíduos adultos e filhotes do Ninho 3 para os Locus 1 e 2.

Ninho 3	Ind A	Ind B	Prole 1	Prole 2	Prole 3	Prole 4	Prole 5
Locus 1							
Locus 2							

