

# Caracterização citogenética e molecular de *Mimus gilvus* na restinga da Marambaia

Mayara Bernardino Wienskosi <sup>1</sup>; Joana de Moura Gama <sup>2</sup>; Ana Carolina Guerreiro Gonçalves Dias Maciel <sup>3</sup> & Denise Monnerat Nogueira <sup>4</sup>

1. Bolsista PIBIC, Discente do Curso de Ciências Biológicas, IB/UFRRJ; 2. Bolsista de Iniciação Científica FAPERJ, Discente do Curso de Ciências Biológicas, IB/UFRRJ; 3. Discente do Curso de Ciências Biológicas, IB/UFRRJ; 4. Professora do DGen/IB/UFRRJ.

Palavras-chave: Cromossomos; microssatélites; primers heterólogos; sabiá-da-praia; aves; Passeriformes.

## Introdução

*Mimus gilvus* (Vieillot, 1808), o sabiá-da-praia, pertencente à família Mimidae, tem uma ampla distribuição nas restingas da costa litorânea brasileira, sendo o limite ao sul da sua distribuição a Restinga da Marambaia (Araújo e Maciel, 1998 apud Zanon, 2010, p. 23). A Marambaia está localizada na baía de Sepetiba e possui uma restinga com aproximadamente 40km de extensão, distribuindo-se por três municípios: Rio de Janeiro, Itaguaí e Mangaratiba (Pereira et al. 2008). Recentemente, Zanon et al. (2015) realizaram uma estimativa do tamanho populacional da espécie nas principais restingas do estado do Rio de Janeiro e detectaram a sua presença em apenas 4, com a redução do tamanho em algumas populações de 61 a 92% nos últimos 20 anos. Esse fato justifica a inclusão da espécie como “em perigo” no estado do Rio de Janeiro (Alves et al., 2000). No entanto, estudos genéticos populacionais ainda não foram realizados, além do desconhecimento a respeito do seu cariótipo. Deste modo, a avaliação do grau de variabilidade genética desta população através do uso de marcadores moleculares do DNA nuclear, como os microssatélites, pode prover dados que auxiliem na elaboração de planos de manejo voltados para a conservação da espécie. Portanto, os objetivos do presente projeto são: testar dois conjuntos de *primers* heterólogos desenvolvidos para a espécie congênere *Mimus polyglotos* para a avaliação do grau de polimorfismo em *M. gilvus* e padronizar as condições de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) (Mullis & Faloona 1987, Saiki et al. 1988), além de descrever o cariótipo da espécie.

## Metodologia

As amostras biológicas para extração de DNA foram obtidas através da captura dos indivíduos na Restinga da Marambaia, município de Mangaratiba, RJ (23°01'56.90”S; 43°53'37.89”O), As aves foram capturadas com redes de neblina (1,2 x 2,0m e malha de 36mm) e anilhadas com anilhas metálicas fornecidas pelo CEMAVE/ICMBio (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres/Instituto Chico Mendes/Ministério do Meio Ambiente). Foram extraídos 50 a 100 µL de sangue por punção da veia braquial, após assepsia local com álcool 70% utilizando agulha calibre 13x4,5mm (26G1/2). O sangue foi coletado, com capilar heparinizado e transferido para um tubo plástico de 1,5mL contendo etanol absoluto. Os tubos foram identificados e, no laboratório, foram armazenados em geladeira à 4°C.

A extração do DNA foi realizada pelas técnicas de lise celular (Khatib & Gruenbaum, 1986), fenol/clorofórmio (Sambrook et al. 1989) e precipitação por acetato de amônio (Nicholls et al. 2000). Foram usados os *primers* P2 e P8 (Griffiths et al. 1998) para amplificação por PCR dos genes CHDZ/CHDW que possibilitam a confirmação do sexo, pois a espécie não apresenta dimorfismo sexual externo. Essa informação é importante para que possamos avaliar a qualidade do DNA para posterior amplificação dos locos de microssatélites. O produto amplificado por PCR foi analisado em gel de poliacrilamida a 12% corado com solução de nitrato de prata 0,2%, incluindo o DNA *ladder* de 100pb e um controle negativo da reação.

A análise citogenética foi realizada em um indivíduo do Centro de Triagem de Animais Silvestres do estado do Rio de Janeiro/CETAS/RJ utilizando a técnica de cultivo de curta duração de polpa de penas jovens (Sandnes, 1954).

## Resultados e Discussão

O DNA foi extraído de seis indivíduos de *Mimus gilvus*. E a confirmação do sexo da maioria dos indivíduos foi possível apenas pela extração por lise celular. Analisando os fragmentos amplificados em gel de poliacrilamida foram detectados, três machos e três fêmeas. A

determinação cromossômica do sexo nas aves é ZW, para fêmeas, que apresentam duas bandas no gel, e machos, por serem ZZ, apresentam apenas uma banda. O tamanho do fragmento CHDZ para essa espécie é de 480pb e do fragmento CHDW é de 400pb.

Ao empregarmos a extração de DNA pela técnica de fenol/clorofórmio apenas duas amostras amplificaram e a técnica de precipitação por acetato de amônio não apresentou resultado para nenhum indivíduo, mesmo sendo executada duas vezes.

As amostras extraídas por lise celular não podem ser usadas para a amplificação com *primers* de microssatélites por exigir um DNA com alto grau de pureza. Caso contrário, um grande número de fragmentos inespecíficos é observado podendo até mesmo inibir a amplificação pela presença de impurezas. O sucesso na amplificação por lise celular indica que não há problema com o estoque de amostra biológica e sim com algum reagente ou etapa nas duas técnicas de extração. Estamos realizando testes para a detecção do problema, como: preparo de novos reagentes, uso de termocicladores diferentes, aumento da concentração de DNA na PCR, e aumento do volume do produto da PCR no gel de poliacrilamida.

Foram analisadas seis lâminas de *M. gilvus* e embora tenha sido verificada a presença de núcleos celulares, não foram observadas metáfases para análise dos cromossomos.

## Conclusão

Esse projeto teve início há três meses e ainda estamos na fase de adequação das amostras às análises propostas. Desse modo, conclusões a respeito dos marcadores de microssatélites ainda não podem ser tiradas.

Com relação a identificação do sexo, a técnica de lise celular mostrou-se eficiente para confirmar o sexo em *Mimus gilvus*, revelando o padrão inédito na literatura para o tamanho dos fragmentos do gene CHD para a espécie. Embora o número amostral ainda seja pequeno, a razão sexual obtida foi de 1:1 de acordo com o esperado para as aves em uma mesma população.

A coleta de bulbo de penas jovens será repetida para a obtenção de metáfases e o insucesso na primeira tentativa está relacionado, provavelmente, ao pequeno número de células em mitose.

## Referências Bibliográficas

- ALVES, M.A.S., PACHECO J.F., GONZAGA, L.A.P., CAVALCANTI, B.C., YAMASHITA, C., MACIEL, N.C., CASTANHEIRA, M. Capítulo 9: Aves. In: A Fauna Ameaçada de Extinção do Estado do Rio de Janeiro. BERGALLO, H.G., ROCHA, C.F.D., ALVES, M.A.S., VAN SLUYS, M. Rio de Janeiro: edUERJ, 2000.
- GRIFFITHS, R., DOUBLE, M.C., ORR, K., DAWSON, R.J.G. Short Communication. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075, 1998.
- KHATIB, H. & GRUENBAUM, Y. Chicken red blood cells as a substrate for direct polymerase chain reaction. *Animal Genetics*, 27: 53-54, 1996.
- HUGHES, C.R & DELOACH, D.M. Developing microsatellites when they are rare: trinucleotide repeat loci in the northern mockingbird *Mimus polyglottos*. *Molecular Ecology*.6: 1099-1102, 1997.
- MULLIS K.B. & FALOONA F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* 55: 335-350, 1987.
- NICHOLLS, J.A., DOUBLE M.C., ROWELL D.M., MAGRATH D. The evolution of cooperative and pair breeding in thornbills *Acanthiza* (Pardalotidae). *Journal of Avian Biology* 31: 165-176, 2000.
- PEREIRA, M.G., MENEZES, L.F.T., SCHULTZ, N. Aporte e decomposição de serapilheira na Floresta Atlântica, Ilha da Marambaia, Mangaratiba, RJ. *Ciência Florestal*, 18(4): 443-454, 2008.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-135, 1985.
- SAMBROOK J., FRITSCHI E.F., MANIATIS T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 1989.
- SANDNES, G.C. A new technique for the study of avian chromosomes. *Science*.119: 508-509, 1954.
- ZANON, M.S. Distribuição, tamanho populacional e conservação de *Mimus gilvus* (Aves: Mimidae) no estado do Rio de Janeiro, 2010. In: ARAÚJO, D. S. D., MACIEL, N. C.. Restingas fluminenses: biodiversidade e preservação. *Boletim FBCN*, v. 25, p.25-51, 1998.
- ZANON, M.S., VALE, M.M., ALVES, M.A. Missing for the last twenty years: the case of the southernmost populations of the Tropical Mockingbird *Mimus gilvus* (Passeriformes: Mimidae). *Zoologia*, 32(1): 1-8, 2015.