

Locus microssatélite para *Rhamdia quelen* (jundiá)

DUARTE, Rodrigo T.¹; DODE, Maria Eduarda Bicca¹; OLIVEIRA, Gabriella Borba¹; MUNDSTOCK, Cristina P¹; GARCIA, Verônica H¹; FRÓES, Cristian B.¹; PONTE, Letiane N. ²; CERQUEIRA, Natália M.²; TRESBACH, Rafael H.²; MOREIRA, Heden Luiz M³.

¹Universidade Federal de Pelotas - UFPEL; ² Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA;

³Universidade Federal de Pelotas – UFPEL, zoologia e genética, rodrigotduarte@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura é um ramo que tem crescido gradativamente no Brasil, e uma das espécies que tem se destacado é o *Rhamdia quelen*, mais conhecido como jundiá, principalmente na região sul do Brasil, porém possui grande influência no mundo todo.

O *Rhamdia quelen* é um peixe nativo da região sul do Brasil e está sendo considerado promissor para a produção intensiva no Estado, devido as características como a fácil adaptação em diferentes ambientes, condições climáticas e dietas artificiais, além disso, possui um fácil manejo e uma boa aceitação comercial (Baltisserotto 2004; Pouey et al 2008).

No Rio Grande do Sul, a prática de obtenção de alevinos e reprodutores de pisciculturas de outras regiões do Brasil é comum (Baltisserotto, 2009). Esta prática a médio e longo prazo poderá proporcionar maus resultados, pois além dos exemplares não estarem adaptados às baixas temperaturas do inverno do estado, há sempre possibilidade de ocorrer cruzamentos entre reprodutores trazidos de outras regiões do país com exemplares obtidos de bacias hidrográficas gaúchas, o que poderia levar a perda das características genéticas e fenotípicas das espécies nativas aqui encontradas (Baltisserotto, 2009).

A identificação de espécies é crucial para programas de conservação. É também um pré-requisito essencial para estudos de populações. Frequentemente, muitas espécies são identificadas com base em morfologia, mas este método é muito problemático. Marcadores moleculares têm permitido identificar espécies, independente do estágio de vida do animal (Ferguson et al., 1995).

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (Matioli, 2001). Milach (1998) descreve que marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente de acordo com as leis básicas de herança descritas por Mendel e servem para identificar um local ou uma região de um cromossomo. Um marcador genético ideal deve apresentar os seguintes atributos: a) alto nível de polimorfismo, b) estabilidade em diferentes ambientes, c) detectar grande número de locos não ligados e d) ser de herança simples (Milach, 1998; Matioli, 2001).

Os microssatélites, também conhecidos como STR – (Repetições curtas em tandem “Short Tandem Repeats”), são elementos repetitivos, formados por arranjos de repetições em tandem, de dois a seis nucleotídeos de comprimento e estão entre os locos mais polimórficos dos genomas (Ferguson et al., 1995; Milach, 1998; Matioli, 2001). O polimorfismo desses marcadores baseia-se na variação do

número dos elementos repetidos, provavelmente devido aos erros da DNA polimerase durante o processo de replicação e reparo da molécula de DNA (Studart, 2001).

O objetivo deste trabalho é analisar se o locus microssatélite selecionado pode ser utilizado como um marcador, uma vez que não se tem conhecimento genético sobre os animais que são produzindo no Rio Grande do Sul, e diante dos dados extraídos, poderá ter um entendimento melhor sobre a região e as possíveis espécies estudadas, revelando seu desenvolvimento, comportamento e habitat.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para a realização deste trabalho, foram utilizadas 2 (duas) pisciculturas, das quais foram selecionadas aleatoriamente 20 (vinte) amostras gerando um total de 40 amostras diferentes.

Estas amostras foram coletadas a campo, onde foi extraído um fragmento de (3 cm) da nadadeira caudal do animal e acondicionadas individualmente em álcool 70% e mantida a 4°C evitando a degradação do tecido. No laboratório, as amostras foram submetidas à extração de DNA através do protocolo de sal (NaCl), descrito por Basdakci e Skibinski (1994), modificado por Almeida et al (2008). A qualidade da extração foi checada em gel de agarose 1% e corado com Gelgreen (Biotium, USA) e visualizado em transluminador de luz branca (Clare chemical, USA).

A técnica PCR foi realizada em um volume final de 25 µl, contendo 50 ng de DNA genômico, 2 pmoles de cada *primer*, 1X buffer de PCR [10 mM Tris Hcl (pH 9.0), 1,5 mM MgCl e 50 mM KCl], 200 mM de cada dNTP e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Fermentas, USA). A reação sem a presença de DNA (negativo) foi utilizada para confirmar a ausência de contaminação dos reagentes.

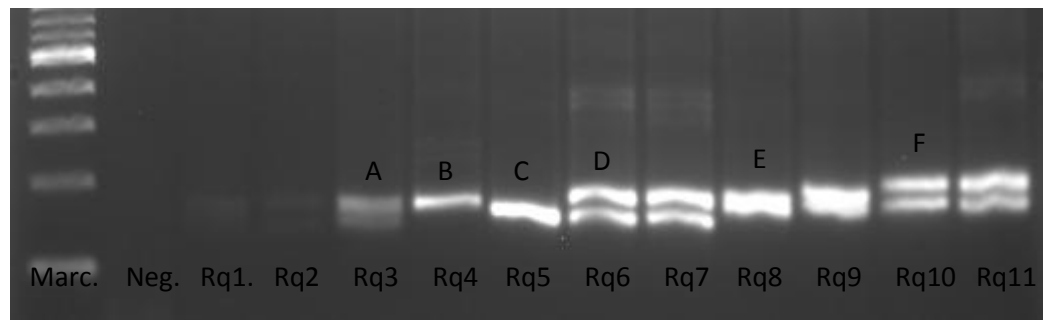
Os primers utilizados foram desenhados no programa Vector NTI, sendo eles: forward 5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCT GCA CTG TGC CAG AAG G 3' e reverse 5' ATC CAT GCG TTT GTC CAT GC 3', referentes ao locus 158947.

Em seguida, as amostras do PCR foram submetidas ao gel de agarose 1% para a confirmação de amplificação, sendo corado com Gelgreen (Biotium, USA) e visualizado em transluminador de luz branca (Clare chemical, USA).

Para se ter uma melhor resolução das bandas, foi utilizado o gel de poliacrilamida 10%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as fotos realizadas dos géis de poliacrilamida 10%, pode-se observar que há polimorfismo no locus que esta sendo testado, tendo uma variação do número de pares de base entre 100pb e 200pb.



O gel acima, apresenta 6 tipos diferentes de alelos, possuindo homozigotos (B, C) e heterozigotos (A, D, E, F), o que apresenta um alto índice de polimorfismo neste locus. Este polimorfismo é muito evidente, com isso pode-se realizar Programas de melhoramento genético, além disso fazer um estudo de população, tendo um melhor entendimento do desenvolvimento, habitat, e comportamento dos animais em estudo.

A importância de se identificar microssatélites, esta relacionado ao fato de que através deles, pode-se fazer a diferenciação das espécies e com isso fazer uma identificação do híbridos, podendo-se estimar o tamanho da população.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que o locus estudado pode ser usado como marcador microssatélite uma vez que foi encontrado polimorfismo na região estudada. Além disso, pode-se concluir que os primers que foram desenhados tiveram um ótimo desempenho. Através destes dados, pode-se: fazer uma seleção de novos cruzamentos em uma mesma geração, aumentando a eficiência de um programa de melhoramento genético; usado em diferentes estudos de populações de peixes e em aquacultura para estimativas do tamanho efetivo de populações; identificação de híbridos e espécies; determinação genética do impacto de introdução de populações e peixes cultivados em determinada área, estabelecimento de relações filogenéticas, identificação de populações-chave para conservação de recursos genéticos; construção de mapas genéticos e definição de estratégias de melhoramento genético ; Comportamento social e reprodutivo das espécies e padrões de acasalamento podem ser estudados com o auxílio de marcadores moleculares .

5 REFERÊNCIAS

VOLPATO, G.L., FERNANDES, M.O. Social control of growth in fish. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27 p. 797-810, 1994.

EMATER/ASCAR. **Diagnóstico da piscicultura (regional Ijuí)**. Ijuí, 2006. 10p. (Boletim técnico).

BALDISSEROTTO, B. Freshwater fish culture in Rio Grande do Sul State: actual situation, problems and future perspectives. **Ciência Rural**, v.39, n.1, jan-fev, 2009

BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. **Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification.** *Heredity*, Oxford, v.73, p. 117-123, 1994.

IBAMA. **Estatística da pesca 2004. Brasil. Grandes regiões e unidades da federação.** Brasília, 2005.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Produção Pesqueira e Aquícola – Estatística 2008 e 2009.** 2010.

OLIVEIRA, D. de P. R. **Planejamento estratégico: conceitos, metodologia e práticas.** São Paulo: Atlas, 2006. 303p.

PERALES-FLORES, L.E.; SIFUENTES-RINCÓN, A.M.; LEÓN, F.J.G. **Microsatellite variability analysis in farmed catfish (*Ictalurus punctatus*) from Tamaulipas, Mexico.** *Genetics and Molecular Biology*, vol. 30, n.3, p.570-574, 2007.

SILVA, J. C.; MOREIRA, H. L. M.; VAZ, B. S.; ALMEIDA, D. B.; COSTA, M. A. P., MOREIRA, C. G. A., MANZKE, V. H. B. **Identificação de polimorfismos no primeiro íntron do hormônio de crescimento do jundiá (*Rhamdia quelen*).** *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura III.* Jaboticabal, SP: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática - AQUABIO, 2010.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Santa Maria: UFSM, 2005. 470p.

BARCELLOS, L.J.G. **Policultivo de jundiás, tilápias e carpas. Uma alternativa de produção para a piscicultura rio-grandense.** Passo Fundo: UPF, 2006. 127p