



ESTIMATIVA DO POLIMORFISMO GENÉTICO NO LOCUS DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

SILVA, Janaína Camacho da¹; VAZ, Bernardo dos Santos¹; CERQUEIRA, Gustavo Maia¹; ALMEIDA, Diones Bender¹; COSTA, Marco André Paldes da¹; MOREIRA, Carla G. Alves¹; TAVARES, Rafael Aldrighi¹; BASSINI, Liane Ney¹; OLIVEIRA, Plínio Aguiar¹; MOREIRA, Heden Luiz Marques^{1,2}

¹ Laboratório de Engenharia Genética Animal. Centro de Biotecnologia – UFPel
Campus Universitário, s/nº. 96010-900 - Pelotas, RS.

² Professor adjunto do Departamento de Genética e Morfologia/UFPel, chefe do laboratório e orientador.

jana.ufpel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A aqüicultura brasileira em 2005 foi responsável por 25,6% da produção total nacional de pescado (257.780 ton.), sendo as principais regiões produtoras o Centro-Oeste, Sul e Nordeste. Na aqüicultura continental, a piscicultura é responsável por 99,4% ou 178.746,5 ton. do total produzido e as espécies cultivadas variam de acordo com a região (IBAMA, 2007). Segundo Godinho (2007) existem diversas espécies nativas potencialmente utilizáveis na aqüicultura e prioritárias para o desenvolvimento de pesquisas nas diferentes regiões do Brasil como o Dourado, Pintado, Surubim, Tambaqui, Jundiá, e outras. Apesar dessa grande variedade, as principais espécies cultivadas no país são exóticas (tilápias e carpas) (Diegues, 2006). Provavelmente, o estímulo ao cultivo dessas espécies deve-se ao amplo conhecimento sobre sua produção e manejo além da introdução de linhagens melhoradas, como na tilapicultura. O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe nativo do Sul do Brasil que vem despertando o interesse de diversos produtores por possuir várias características zootécnicas desejáveis ao cultivo como rusticidade, rápido crescimento, fácil adaptação a rações comerciais e facilmente induzíveis a reprodução, possuindo ainda uma carne saborosa, com baixo teor de gordura e poucos espinhos (Esquivel, 2005), o que faz dele um peixe tradicionalmente muito consumido. Na última estatística de pesca do IBAMA (2007) em 2005, o jundiá foi o segundo peixe mais pescado artesanalmente (395,0 ton./ano) e o terceiro mais produzido pela aqüicultura continental de água doce (358,0 ton./ano), mas ainda bem abaixo da carpa (20.982,0 ton./ano) que está em primeiro lugar. Apesar do extremo potencial do *R. quelen* para a piscicultura no Sul do país, ainda faltam muitas informações para a implantação de um processo de cultivo, principalmente na área de genética molecular. Como na aqüicultura o foco principal do melhoramento tem sido o aumento das taxas de crescimento, hormônios que aumentem a síntese de proteínas são candidatos naturais a um teste para verificar seus efeitos sobre o crescimento de peixes (Kang et al., 2002). Um dos hormônios testados é o hormônio do crescimento (*growth hormone*, GH), produzido pela adeno-hipófise. Já se sabe que o gene do *gh* possui um papel fundamental no crescimento

e desenvolvimento de peixes e que suas regiões não codificantes são polimórficas (Almuly et al., 2000, Chen et al., 2004). Sugere-se que por efeitos de ligação, essa variação genética do gene do *gh* possa afetar taxa de crescimento (Kang et al., 2002). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de polimorfismos no primeiro intron do gene do *gh* de jundiá (*R. quelen*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de tecidos muscular de exemplares coletados na Estação de Piscicultura da Barragem do Arroio Chasqueiro (Arroio Grande-RS), provenientes de uma única desova e cultivados em sistema intensivo durante 30 dias. Juntamente destas, foram utilizadas mais duas amostras de jundiás provenientes da Colômbia na Análise do Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP), para observar se havia alguma diferença nos padrões de polimorfismos entre duas populações distintas. Na extração do DNA foi utilizado um protocolo rápido para obtenção DNA segundo metodologia proposta por Meeker et. al. (2007). A eficiência da extração foi verificada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Após, o DNA foi utilizado na reação de PCR para amplificação do fragmento desejado. A reação de PCR foi realizada em um volume de 25 µl contendo os seguintes componentes: 2,5 µl de 10x Taq Buffer com (NH₄)₂SO₄, 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 5U/µl, 0,5 µL dNTPs 10 mM, 1,0 µL de *primer Forward* (5'CTGCAGAAATGGCTAGAGGTAA3') e 1,0µL de *primer reverse* (5'GGTAGATTAGATTCACAATCG TTAG3') 10 pmol, 13,3 µL H₂O Milli-Q e 5 µL da solução de DNA. A amplificação do DNA foi executada utilizando-se uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 52 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 3 minutos, terminando com uma extensão final por 7 minutos a 72 °C em um termociclador Mastercycler (Eppendorf, Alemanha). A eficiência da amplificação foi verificada pela eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Uma vez verificada a presença de bandas com o peso molecular esperado, 198 pb, os produtos da PCR foram analisados através do SSCP segundo Sunnucks et al. (2000), com modificações: a eletroforese vertical foi desenvolvida em gel de poli(acrilamida) nativo utilizando-se amostras desnaturadas: 5µL do produto final da PCR foram diluídos com 15µL de uma solução desnaturante contendo 10 mM de NaOH, 95% de formamida, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol. Esta mistura foi desnaturada à 99 °C por 10 minutos, colocada em gelo por 5 minutos e imediatamente carregada no gel de poli(acrilamida) 12% (39:1 acrilamida:bisacrilamida). A corrida foi realizada em buffer TBE 1,0x a 4°C com 50 V por 16 h. A revelação do padrão de bandas foi realizada por tingimento com hidróxido de sódio, e as de interesse nominadas como A, B e C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do primeiro íntron do gene do *gh* foi feita baseada em diversos estudos que sugerem que elementos regulatórios da transcrição podem estar nessa região (Min et al., 1996).

Semelhante a trabalhos anteriores com teleósteos (Almuly et al.,2000) e outras espécies animais, foi possível observar diferentes padrões de bandas na região analisada, indicando a presença de polimorfismos no primeiro intron do gene do *gh* de *R. quelen*. O padrão A (Fig. 1), de banda de menor tamanho, foi observado nas

amostras provenientes da Colômbia. As amostras brasileiras possuem pelo menos dois alelos (B e C) (Fig. 2) que diferem na conformação, mas não no tamanho. O alelo A não foi observado nas amostras do Brasil e as freqüências observadas para B e C foram 22,5% e 77,5% respectivamente.

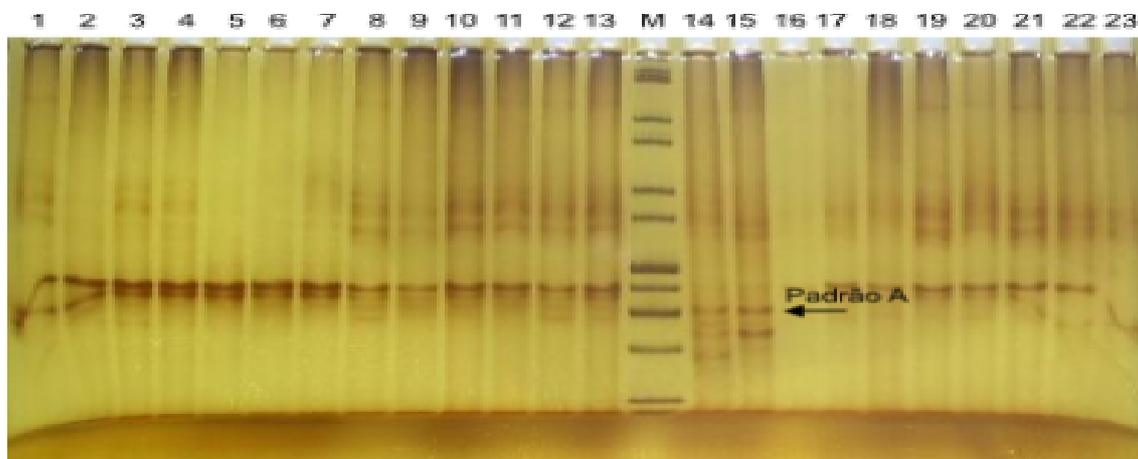


Figura 1 – Eletroforese vertical (SSCP): Canaletas 14 e 15: amostras de fragmentos amplificados de animais provenientes da Colômbia (Padrão A) indicado pela seta; Demais canaletas fragmentos amplificados de diversos animais do Brasil. M: marcador de peso molecular (*GeneRuler DNA Ladder Mix* - Fermentas, USA).

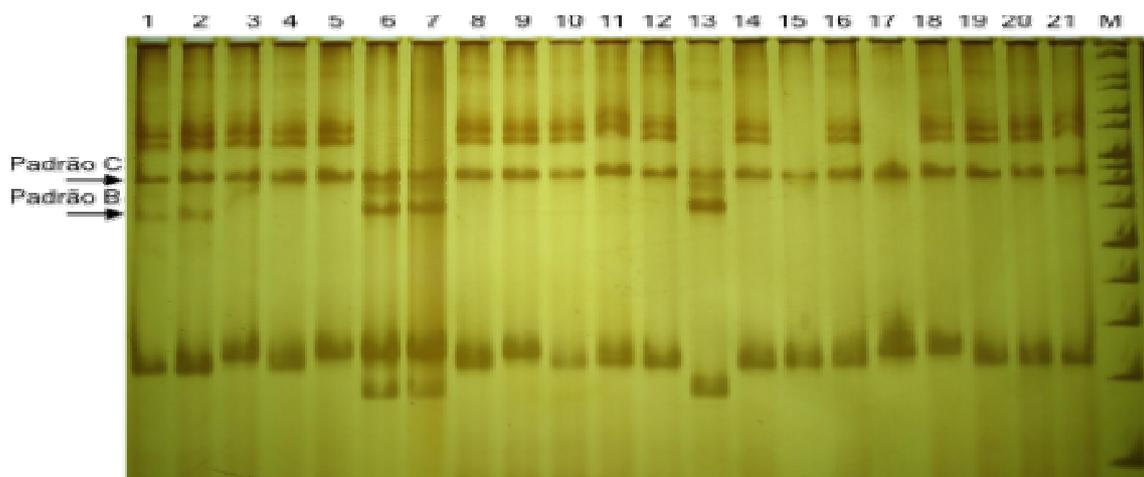


Figura 2 –Eletroforese vertical (SSCP): Canaletas de 1 à 21: diversas amostras de fragmentos amplificados de diferentes animais com padrões B e C indicados pelas setas ; M: marcador de peso molecular (*GeneRuler 100pb DNA Ladder Plus* - Fermentas, USA).

Os fragmentos amplificados dos animais que apresentaram essas diferenças estão sendo isolados e submetidos ao seqüenciamento para a identificação do padrão de mutação neste *locus*. A análise molecular da variabilidade do DNA permitirá determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados “marcadores moleculares”, os quais podem estar associados a caracteres comercialmente importantes, similarmente aos resultados recentes encontrados em animais domesticados (Almuly et al., 2000, Kang et al., 2002). A variação alélica do gene do *gh* pode fornecer sinais genéticos úteis para a seleção dos peixes com taxas desejáveis de crescimento (Almuly et al., 2000).

4. CONCLUSÕES

Há diferenças nos padrões eletroforéticos dos fragmentos amplificados com *primers* específicos no primeiro íntron do gene do *gh* de jundiá (*Rhamdia quelen*), indicando a presença de polimorfismos genéticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMULY, R.; CAVARI, B.; FERSTMAN, H.; KOLODNY, O.; FUNKENSTEIN, B. Structure and sequence of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding gene: identification of minisatellite polymorphism in intron I. **Genome**, v.43, p.836-845, 2000.
- CHEN, Y.; WANG, Y.; HE, S.; ZHU, Z. Cloning significance and Sequencing of the Growth Hormone Gene of Large Yellow Croaker and Its Phylogenetic Significance. **Biochemical Genetics**, v.42, n.9-10, p.287-390, 2004.
- DIEGUES, Antonio Carlos. Para uma aquicultura sustentável do Brasil. São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.usp.br/nupaub/aquicultura.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2008.
- ESQUIVEL, Betina Muelbert. **Produção do jundiá (*Rhamdia quelen*) em áreas de entorno do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro em Paulo Lopes – SC**. 2005, 102f. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Federal de Santa Catarina - Santa Catarina.
- GODINHO, Hugo Pereira. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.351-360, 2007.
- GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; GOMES, A.R.C.; BALDISSEROTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.30, n.1, 2000.
- IBAMA. **Estatísticas da pesca 2005** – Brasil, grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, 147 p. 2007.
- KANG, J.H.; LEE, S.J.; PARK, S.R.; RYU, H.Y. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fisheries Science**, v.68, n.3, p.494-498, 2002.
- LIDANI, K.C.F., LIMA, J.R., TORRES, R.A., GABRIEL, J.E., MADEIRA, H.M.F., CARNEIRO, P.C.F. Variabilidade genética de um estoque cativo de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Revista Acadêmica de Curitiba**, v.4, n.3, p.47-53, 2006.
- MEEKER, N.D., HUTCHINSON, S.A., HO, L., TREDE, N.S. Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. **BioTechniques**, v.43, p.610-614, 2007.
- MIN, B.H., KIN, C.S., KANG, S.W., BAE, I.H., CHUN, B.G. Identification of an Enhancer in the First Intron Involved in the Regulation of Mouse Vascular Smooth Muscle – Actin Gene. **Molecular Cells**, v.6, n.5, p.597-601, 1996.
- SUNNUCKS, P., WILSON, A.C.C., BEHEREGARAY, L.B., ZENGER, K., FRENCH, J., TAYLOR, A.C. SSCP is not difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. **Molecular Ecology**, v.9, n.11, p.1699-1710, 2000.