

VARIABILIDADE GENÉTICA DE UM ESTOQUE CATIVO DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

Genetic Variability of Jundia (Rhamdia quelen) in Captivity

Kárita Cláudia Freitas Lidani¹

Janaina R. Lima²

Rodrigo A. Torres³

Jane Eyre Gabriel⁴

Humberto Maciel França Madeira⁵

Paulo C. F. Carneiro⁵

Resumo

A caracterização da variabilidade genética em populações de peixes é de fundamental importância para o entendimento de como tal variação se encontra distribuída em uma espécie. O objetivo do presente estudo foi estimar a variabilidade genética de jundiás *Rhamdia quelen*, criados em cativeiros, por análises de PCR-RAPD. DNA genômico de quinze exemplares adultos, que foi amplificado na presença de 8 *primers*, selecionados com base na quantidade e na nitidez das bandas amplificadas. O número de fragmentos gerados por *primer* variou de 12 (*primer* OPX04) a 38 (*primer* A20) e seus tamanhos estavam compreendidos entre 500 pb (*primer* A20, ERIC II e OPW5) e 4.300 pb (*primer* A20). O número total de fragmentos obtidos a partir dessas reações de amplificação compreendeu 165 caracteres, sendo 155 (93,9%) bandas polimórficas e 10 (6,1%) monomórficas. O fenograma gerado permitiu a separação dos acessos em um agrupamento maior, ordenando 14 indivíduos com coeficiente de similaridade variando de 37 a 56% (C2 e C4), sendo observado apenas um indivíduo isolado (C11) com distanciamento genético em relação aos demais. O elevado grau de polimorfismo indica a alta ocorrência de bandas polimórficas de baixa repetição nos indivíduos investigados, evidenciando uma alta variabilidade genética dos indivíduos dessa população de cativeiro. Além disso, tais descobertas confirmam o potencial da técnica de PCR-RAPD na estimativa da variabilidade genética em populações *Rhamdia quelen*, sendo uma importante ferramenta para direcionar programas de repovoamento da ictiofauna, bem como reconhecer a origem e as relações genéticas do estoque fundador de uma população cativa.

Palavras-chave: PCR-RAPD; Peixe; Biologia molecular.

¹ Bolsista SETI/UGF, Projeto Repovoamento de Peixes como um Indutor de Processos de Recuperação Ambiental do alto Rio Iguaçú.

² Acadêmica do Curso de Zootecnia, CCAA, PUCPR.

³ Professor Adjunto Universidade Federal de Pernambuco UFPE, Departamento de Zoologia.

⁴ Bolsista DTI CNPq, Projeto Genoma Funcional da *Chromobacterium violaceum*, PUCPR.

⁵ Professores Doutores do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais CCAA, PUCPR, Rodovia BR 376, km 14. São José dos Pinhais, PR, Brasil. CEP: 83010-000. E-mail: paulo.carneiro@pucpr.br

Abstract

The characterization of the genetic variability in fish populations is a fundamental procedure to elucidate how this diversity is distributed within a species. The objective of the present study was to estimate the genetic variability of jundias *Rhamdia quelen* in captivity by RAPD analysis. Genomic DNA samples of fifteen adult jundias were amplified in the presence of 8 primers and 1 unit of *Taq* DNA polymerase. Based on the clearness of the amplified products, the number of fragments generated from PCR ranged of 12 (primer OPX04) to 38 (primer A20) and the size of the amplified fragments varied of 500 pb (primer A20, ERIC II and OPW5) to 4,300 pb (primer A20). The analysis of electrophoretic profile showed the presence of 155 (93.9%) polymorphic and 10 (6.1%) monomorphic bands, in a total of 165 characters. The phenogram showed the separation of animals in a group including 14 elements, with coefficient of similarity ranging from 37 to 56% (C2 and C4). Nevertheless, only one individual (C11) presented a genetic distance in comparison to others. The degree of polymorphism observed in the present study indicates the high occurrence of polymorphic bands of low repetition in these individuals, evidencing the high genetic variability in these fish population. Additionally, such findings confirm the potential of the RAPD technique as a crucial tool for characterization of the genetic variability in *Rhamdia quelen* populations, as well as for restocking programs and to recognize the nature and the genetic relationships of the founder stock of the captive population.

Keywords: PCR-RAPD; Fish; Molecular biology.

Introdução

O jundiá (*Rhamdia quelen*), peixe pertencente à família *Heptapteridae*, apresenta vasta distribuição, sendo encontrado do sudoeste do México ao centro da Argentina. Tal espécie está adaptada a diferentes ambientes, especialmente em viveiros de piscicultura nas regiões mais frias (CARNEIRO et al., 2002). Tendo em vista suas excelentes características para fins de produção, trata-se de um peixe de grande importância econômica, com ótima aceitação no mercado consumidor, tanto para a pesca esportiva quanto para a alimentação direta (BALDISEROTTO, NETO, 2004).

O repovoamento com alevinos criados em cativeiro tem sido uma alternativa para a recuperação da ictiofauna. Todavia, essa prática na maioria das vezes não é realizada com o devido planejamento, podendo resultar em problemas maiores, como a introdução de doenças e parasitas, que antes não existiam no meio natural, além de poder provocar a queda da variabilidade genética das populações presentes no ambiente natural, por conta da introdução de variações genéticas exógenas. Tal evento se confirma, tendo em vista que geralmente os alevinos provêm de poucos casais procedentes e, muitas vezes, de locais diferentes aos da soltura (RESENDE, 2001). Isso mostra que a simples soltura de peixes nos rios, também conhecida como peixamento, não é uma prática suficientemente eficaz, podendo até mesmo ser pre-

judicial ao ecossistema. Sob esse aspecto, um ponto fundamental a ser considerado é a identificação e caracterização genética das populações presentes no ambiente natural (HILSDORF et al., 2006). Esse conhecimento, além de ser de fundamental importância para um manejo correto dessas espécies, segundo Oliveira et al. (2003), também contribui para a manutenção a longo prazo dos estoques naturais. Essa é uma técnica também muito útil para programas de melhoramento de exemplares em cativeiro (HILSDORF; KRIEGER, 2001).

As análises genéticas, via marcadores moleculares de DNA, são amplamente utilizadas em estudos com enfoque de repovoamento e os marcadores de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso ("*Random Amplified Polymorphic DNA*" - RAPD) fornecem subsídios fundamentais para a detecção de variações no DNA genômico entre subespécies ou populações de várias espécies de peixes (POVH et al., 2005; PRIOLI, et al., 2002; ALMEIDA et al., 2003; LEUZZI et al., 2004; PERES et al., 2005). Tal procedimento reforça sua aplicação na identificação de linhagens distintas e na determinação do impacto genético da introdução de peixes cultivados em populações naturais (HILSDORF; KRIEGER, 2001). O objetivo do presente estudo foi estimar a variabilidade genética de uma população de jundiá *Rhamdia quelen* criada em cativeiro, utilizando marcadores de polimorfismo de DNA amplificados ao acaso – PCR-RAPD.

Material e Métodos

- Animais

Foram analisados quinze exemplares adultos de jundiá *Rhamdia quelen* criados em viveiros do Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (LAPEP-PUCPR) (25°34'55''S/49°13'19''W), situados no município de São José dos Pinhais (Estado do Paraná, Brasil). Fragmentos de nadadeira dorsal adiposa foram colhidos com auxílio de material cirúrgico, armazenados em etanol 95% e estocados a -20°C para posterior extração de DNA.

- Extração de DNA

DNA genômico foi isolado a partir de 50 mg de nadadeira dorsal adiposa, sem a necessidade de sacrifício do animal, empregando o protocolo descrito por Wasko et al. (2003). Tais tecidos foram incubados em 4 ml de tampão de digestão TNES (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 125 mM NaCl; 10 mM EDTA pH 8,0; 0,5% SDS; 4 M uréia) na presença de 100 µl de protease de *Streptomyces griseus* 20 mg/ml (Sigma). Após agitação por aproximadamente 10 minutos em incubadora (Marconi, modelo MA420), a mistura foi mantida em "banho-maria" (Cientec, modelo GFRAN 400) a 37°C, por 12 horas para assegurar a total lise dos tecidos. Posteriormente, foram adicionados 4 ml de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) em cada tubo, seguido por vigorosa agitação por 15 minutos. Após centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos (Beckman, modelo 21R), aproximadamente 2 ml de fase aquosa foram precipitados com 0,1 volume de NaCl 1 M e 0,6 volume de isopropanol absoluto. O precipitado de DNA foi obtido por centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos, seguido por lavagem em 1 ml de etanol 70%. As amostras de DNA genômico foram secas à temperatura ambiente por 30 minutos e ressuscitadas em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) na presença de 1 µl de RNase 10 mg/ml (Invitrogen). Após incubação em "banho Maria" a 37°C por 30 minutos, as amostras de DNA genômico foram estocadas a -20°C para posterior análise. A concentração das amostras de DNA foi estimada por leitura ao espectrofotômetro (BECKMAN, BU530), sen-

do sua integridade verificada em géis de agarose 1,0% preparados com tampão TBE 1X concentrado (9 mM Tris; 9 mM ácido bórico; 1 mM EDTA pH8,0), corados com brometo de etídeo 0,5 µg/ml e fotografados com sistema digital KODAK EDAS 290.

- Reações de PCR-RAPDs

O polimorfismo molecular observado nas populações de jundiá foi investigado por análises de PCR-RAPD, baseando-se na amplificação de segmentos de DNA genômico a partir de vários *primers* curtos (10-11 bases) de seqüências nucleotídicas arbitrárias. Cada *primer* é capaz de se anelar ao DNA em uma ou mais localidades, de acordo com seu grau de homologia. Essa técnica permite investigar variações no genoma, baseando-se no número e tamanho dos fragmentos amplificados (fragmentos RAPD) (PRIOLI et al., 2002).

Distintas reações de amplificação foram realizadas na presença dos *primers* OPW5 (5'-GGCGGATAAG-3'), OPX4 (5'-CCGCTACCGA-3'), A20 (5'-GTTGCGATCC-3'), AM07 (5'-AACCGCGGA-3'), AM13 (5'-CACGGCACAA3-3'), OPA02 (5'-TGCCGAGCTG-3'), OPA05 (5'-AGGGGTCTTG-3') e ERIC II (5'-AAGTAAGTGACTGGGGT-GAGCG-3'). Dez ng de DNA genômico foram amplificados em tampão de PCR 1X concentrado (20 mM Tris-Hcl, pH8,4, 50 mM KCl), 4 mM de MgCl₂, 0,7 mM de mistura de dNTPs, 0,3 µM *primers* e 1 unidade da enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). As condições de amplificação compreenderam: desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 50°C por 1 min, extensão a 72°C por 5 min, totalizando 40 ciclos. Os fragmentos amplificados foram visualizados em géis de agarose 1,5% preparados em tampão TAE 1X concentrado (40 mM Tris, ácido acético 100%, 1mM EDTA pH 8,0), corados com brometo de etídeo e fotografados com sistema digital KODAK EDAS 290 para identificação e comparação das bandas amplificadas.

- Análise dos resultados

A variabilidade genética foi inferida pela proporção de locos polimórficos na população,

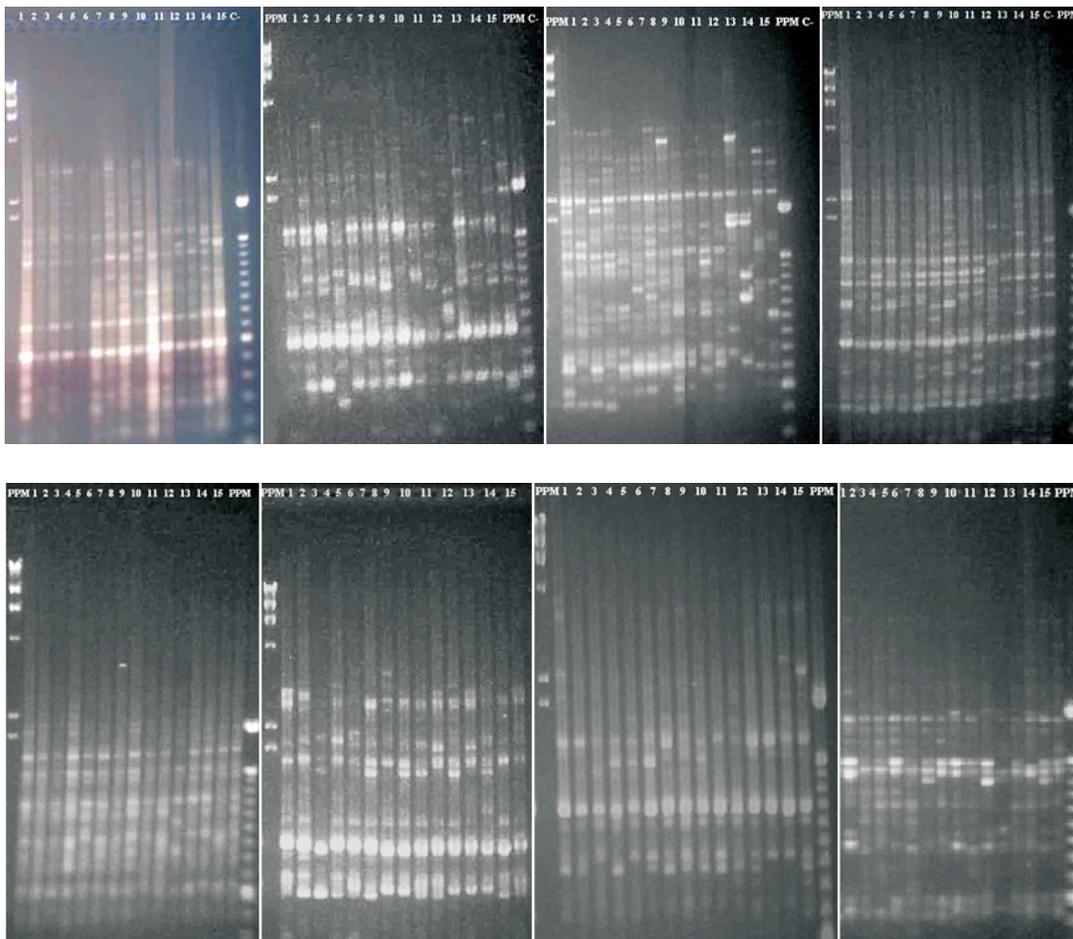
utilizando código binário para a presença (1) ou ausência (0) de fragmentos RAPD para cada indivíduo. Tais análises possibilitaram a construção de uma matriz de similaridade com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard. A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética com a matriz de similaridade, foi construído um fenograma com o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average*) do programa NTSYS, versão 2.02 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (ROHLF, 1989).

Resultados

Como observado na Figura 1, os oito *primers* empregados nas reações de amplificação geraram padrões distintos de RAPD, totalizando 165 caracteres, sendo 155 polimórficos (93,9%) e 10 monomórficos (6,1%). É importante ressaltar que a maioria dos *primers* empregados nas RAPD-PCRs resultou um padrão eletroforético altamente polimórfico com sinais de amplificação bem definidos para a população estudada (FIGURA 1).

FIGURA 1 - PCR-RAPD de *Rhamdia quelen* utilizando os primers: ERIC II (A), OPW5 (B), A20 (C), OPA05 (D), OPA02 (E), AM07 (F), AM13 (G) e OPX4 (H).

Figure 1 - PCR-RAPD profiles from *Rhamdia quelen* DNA using the primers: ERIC II (A), OPW5 (B), A20 (C), OPA05 (D), OPA02 (E), AM07 (F), AM13 (G) e OPX4 (H).



Baseado na nitidez dos produtos amplificados foi possível estabelecer o número de fragmentos gerados a partir de cada *primer*, sendo observado que o número de bandas amplificadas variou de 12 (*primer* OPX04) a 38 (*primer* A20)

conforme apresentado na Tabela 1. Os fragmentos gerados nas análises de RAPD-PCR apresentaram tamanhos variando entre 500 pb (*primer* A20, ERIC II e OPW5) e 4.300 pb (*primer* A20) (TABELA 1).

TABELA 1 - Tamanho dos fragmentos amplificados e número de caracteres monomórficos e polimórficos gerados para cada primer.

Table 1 - Size of the amplified fragments and number of monomorphical and polymorphical characters generated from each primer.

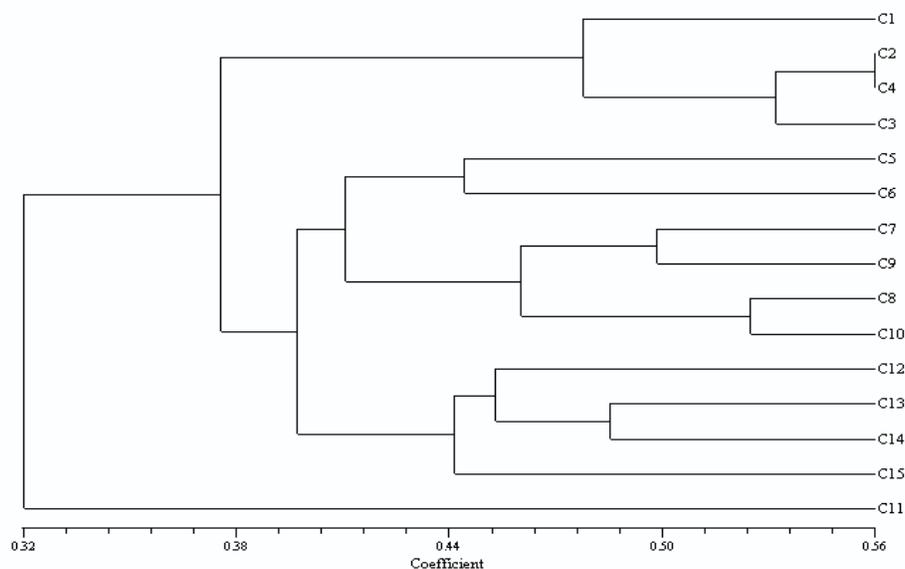
Primers	N.º de caracteres monomórficos	N.º de caracteres polimórficos	N.º total de caracteres	Tamanho dos fragmentos (pb)
OPW05	1	22	23	500-3.262
OPA02	1	14	15	600-3.800
OPA05	4	20	24	480-2.300
ERIC II	0	18	18	500-3.300
OPX04	0	12	12	800-2.070
A20	1	37	38	500-4.300
AM07	1	20	21	600-3.500
AM13	2	12	14	550-4.000

Tais resultados produziram um fenograma que demonstra a separação dos acessos em um agrupamento maior, ordenando 14 indivíduos com um coeficiente de similaridade variando de

37 a 56% (C2 e C4) (FIGURA 2). Entretanto, apenas um indivíduo (C11) apresentou distanciamento genético em relação aos demais, conforme observado na Figura 2.

FIGURA 2 - Fenograma de similaridade genética de uma população de jundiá *Rhamdia quelen* mantida em cativeiro.

Figure 2- Phenogram representing the genetic similarity in adult jundia *Rhamdia quelen*.



Resultados e discussão

Os programas de repovoamento devem preservar a variabilidade genética local (HILSDORF; KRIEGER, 2001). Essa variabilidade é o componente biológico mais importante para a adaptação e, portanto, para a sobrevivência de uma espécie a médio e longo prazo (MORITZ, 2002; HILSDORF et al., 2006). O conhecimento da distribuição da variação genética entre populações e/ou estoques genéticos oferece suporte adicional para a reprodução dirigida, seja para os fins de melhoramento genético ou para repovoamento. Tal abordagem se baseia em dados de compartilhamento de caracteres entre os espécimes, em que é importante avaliar se o grau de variabilidade genética entre o estoque cultivado é similar ao das populações naturais, assim como estimar o potencial nível de endocruzamento nos plantéis cultivados. Nesse sentido, os resultados aqui demonstrados corroboram tal consideração, uma vez que indicam não somente o patamar de variação genética de um estoque cativo, mas também sugerem as relações genéticas entre os indivíduos amostrados.

Uma das preocupações do cultivo de espécies em cativeiro está relacionada com a viabilidade genética dos plantéis, e uma das condições para que o empreendimento tenha sucesso é que o número de matrizes selecionadas para produção de alevinos represente a variabilidade genética da população de origem. Isso pode ser mensurado por meio de análises de variabilidade genética de ambos os estoques. Dessa forma, o entendimento da estrutura genética de uma espécie é uma etapa importante para a conservação da variabilidade genética (MELO et al., 2006).

Os exemplares de *Rhamdia quelen* criados em cativeiro no LAPEP demonstraram um alto grau de polimorfismo genético, correspondente a 93,9%, estando relacionado com a alta ocorrência de bandas polimórficas de baixa repetição nessa população. Tais resultados sugerem que esse estoque pode apresentar maiores facilidades de adaptação a diferentes ambientes, especialmente em viveiros de piscicultura. Esse alto polimorfismo ainda pode ser explicado pelo fato de que o manejo reprodutivo dos animais amostrados se baseia na mistura de ovócitos coletados de uma fêmea com o sêmen de vários machos, o que elevaria a variabilidade genética.

O distanciamento genético de um indivíduo (C11) em relação aos demais é um padrão altamente diferenciado de bandas amplificadas. Tendo em vista os perfis eletroforéticos produzidos por cada *primer* em cada indivíduo, há indicações preliminares de que tal indivíduo possa representar uma espécie críptica, ou seja, extremamente difícil de distingui-las apenas por critérios morfológicos. Porém, é importante ressaltar a necessidade de análises complementares que possibilitariam sustentar esta hipótese.

Em ambientes marinhos, casos deste tipo têm sido evidenciados com o auxílio de marcadores moleculares. Gusmão et al. (2000) sugeriram que populações de camarão *Penaeus subtilis*, comercialmente importantes para a pesca na costa brasileira, são compostas de pelo menos duas espécies diferentes. Segundo Santos et al. (2003), existem fortes evidências de que populações de *Macrodon ancylodon* possam ser duas espécies que estão sendo exploradas como um recurso único. Nesse contexto, vale ressaltar que o conhecimento da estrutura genética de uma população de cativeiro é muito importante para a escolha dos reprodutores que irão compor o plantel de uma piscicultura, pois ela determinará o conjunto gênico total disponível para a produção dos alevinos com melhores características genéticas.

Conclusões

A caracterização do perfil genético altamente polimórfico da população de jundiá mantida em cativeiro é de grande importância para uma piscicultura voltada à produção de alevinos. Tal abordagem determinará condutas de manejo mais adequadas para a homogeneização genética, objetivando reunir um bom potencial zootécnico do estoque cativo ou formar um estoque fundador para os fins de repovoamento de variação genética na natureza. Frente a esse cenário, a presente pesquisa encontra-se na vanguarda acerca da caracterização genética de estoques piscícolas, visando estimar o quanto de contribuição genética um estoque cativo pode disponibilizar na produção de proteína animal, bem como na mitigação de alterações ambientais, fruto do desenvolvimento humano desordenado.

Referências

- ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K.; CONTEL, E. P. B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 301-305, mar. 2003.
- BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R. **Criação de jundiá**. Santa Maria: UFSM, 2004.
- CARNEIRO, P. C. F., et al. Jundiá: um grande peixe para a Região Sul. **Panorama da Aqüicultura**, v. 12, n. 69, p. 42-46, 2002.
- GUSMÃO, J.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A. M. A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. **Marine Biology**, v. 137, p. 3, 2000.
- HILSDORF, A; KRIEGER, J. E. Biologia molecular na conservação de peixes: ferramentas moleculares e conservação genética. **Biociência**, v. 1, p. 10-12. Disponível em: <www.biotecnologia.com.br/bio/5_j.htm>. Acesso em: 13 nov 2005.
- HILSDORF, A. W. S.; RESENDE, E. K.; MARQUES D. K. S. **Genética e conservação de estoques pesqueiros de águas continentais no Brasil**: situação atual e perspectivas. Embrapa Pantanal. disponível em: <<http://www.embrapa.br/publicacoes/online/doc82>>. Acesso em: 16 Jun 2006.
- LEUZZI, M. S. P. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 355-362, mar. 2004.
- MELO, D. C., et al. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 58, n. 1, p. 87-93, 2006.
- OLIVEIRA, C., et al. **Análise genética de populações selvagens de curimatá (*Prochilodus lineatus*) e lambari (*Astyanax altiparanae*) do rio Paranapanema, utilizando marcadores de RAPD**. Disponível em: <<http://citel.aneel.gov.br/historico%5Ccitel%5Ctrabalhos%5C19.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2005.
- PERES, M. D.; VASCONCELOS, M. S.; RENESTO, E. Genetic variability in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the Upper paraná River Basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 717-724, abr. 2005.
- POVH, J. A., et al. Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Animal Sciences**, v. 27, p. 1-10, jan./mar. 2005.
- PRIOLI, S., et al. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 421-430, abr. 2002.
- RESENDE, E. K. **A utopia do repovoamento**. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM008>>. Acesso em: 25 jan. 2006.
- SANTOS, S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. **Genet. Mol. Biol.** v. 26, n. 2, p. 151-161, 2003
- WASKO, A. P., et al. **Non-destructive genetic in fish. An improved method for DNA extraction from fish and scales**. *Hereditas*, v. 138, p. 161-165, abr. 2003.

Recebido: 26/08/2005

Aprovado: 20/12/2005