

EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO E AMPLIFICAÇÃO DE LOCI MICROSSATÉLITES EM DUAS POPULAÇÕES SELVAGENS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

**SUZANE FONSECA FREITAS¹; HEDEN LUIS MARQUES MOREIRA²; DAIANE
MACHADO SOUZA¹; CARLA GIOVANE ÁVILA MOREIRA²; SÉRGIO RENATO
NOGUEZ PIEDRAS¹;
NELSON JOSÉ LAURINO DIONELLO³**

¹Programa de Pós Graduação em Zootecnia (UFPel) – Laboratório de Ictiologia –
suzane.ff@hotmail.com, dsdaianesouza@gmail.com; sergiopiedras@hotmail.com

² Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética (UFPel) - Laboratório de Engenharia Genética
Animal - heden.luiz@gmail.com; carlafarma@gmail.com

³Programa de Pós Graduação em Zootecnia – dionello.nelson@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura consiste em uma atividade em franca expansão, sendo a mesma uma promissora alternativa para suprir a crescente demanda por alimentos no mundo, reflexo este do exponencial crescimento populacional nos últimos 50 anos. Segundo o recente relatório publicado pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2016), o *The State of World Fisheries and Aquaculture*, o Brasil especificamente deve registrar um crescimento de 104% na produção pesqueira e aquicultura até o ano 2025, possibilitando a geração de empregos no setor, e consequentemente aumentando a participação do país no agronegócio mundial.

Em consonância com esta previsão, se faz necessário maior competitividade e produtividade no setor aquícola, sendo o melhoramento genético estratégia primordial para o fortalecimento da cadeia produtiva (TAVARES et al., 2014).

Com o avanço da genética molecular no decorrer das últimas 3 décadas, diversas técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para fins práticos em programas de melhoramento genético, dentre eles, os marcadores moleculares do tipo microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) destacam-se como uma importante ferramenta na avaliação de composição genética de populações, sendo a mesma amplamente utilizada em sistemas de monitoramento genético em peixes (SILVA, 2012). Da mesma forma, estudos que visem a utilização de métodos eficientes e de baixo custo para a obtenção de DNA podem ser considerados de grande relevância científica, visto que possibilita a inclusão de espécies não modelo para seleção genética em virtude do baixo investimento inicial para a obtenção do material genético (PARPINELLI & RIBEIRO 2009).

Dentre as espécies candidatas para inserção futura em programas de melhoramento genético, destaca-se o jundiá (*Rhamdia quelen*), peixe endêmico da América do Sul e de grande importância econômica para a região sul do Brasil, sendo conhecido por suas características zootécnicas favoráveis tais como: rusticidade, hábito alimentar onívoro e facilidade de manejo, além de possuir boa aceitação pelo mercado.

O objetivo deste estudo foi realizar o isolamento de DNA genômico de jundiás oriundos de duas populações selvagens através da utilização de um protocolo de extração de baixo custo, e posteriormente testar a amplificação de loci microssatélites tetranucléotídeo específicos para espécie, tendo por escopo contribuir para o conhecimento genético destes plantéis.

2. METODOLOGIA

Os animais utilizados para o estudo foram oriundos de duas populações selvagens de jundiás, residentes nas Lagoas Mangueira ($33^{\circ}05'27.02''S$ e $52^{\circ}46'03.01''O$) e Mirim ($31^{\circ}30'$ a $34^{\circ}35' S$ e $53^{\circ}31'$ a $55^{\circ}15' O$), onde a coleta dos peixes foi conduzida por pescadores artesanais atuantes nas duas lagoas e licenciados pelo IBAMA e MAP, obtendo-se um total de 80 exemplares de jundiás, sendo 40 animais oriundos de cada população.

Como fonte de material biológico para posterior isolamento de DNA genômico, retirou-se fragmentos de tecido muscular e nadadeira caudal de cada indivíduo coletado (200- 300mg), totalizando 160 amostras a fim de estabelecer quais das duas fontes seria mais eficiente para utilização no protocolo de extração de DNA.

Para extração do DNA utilizou-se um protocolo de separação orgânica por Cloreto de Sódio (BARRERO et al., 2008) com modificações, que consistiu em três etapas: lise, limpeza e precipitação. Primeiramente realizou-se a maceração da amostra, adição das soluções tampão TNE1 e TNE2, onde posteriormente as amostras foram incubadas *overnight* a $55^{\circ}C$ com proteinase K para a desnaturação proteica. Após incubação, para precipitação de proteínas e restos celulares adicionou-se NaCl 5M, onde foram acrescidos etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA e armazenados por 1 hora a $-20^{\circ}C$. Após, realizou-se a lavagem do material com etanol 70% gelado, descartando-se a fase líquida e secando-as em estufa a $40^{\circ}C$. Por fim, o DNA foi ressuspêndido com água milli-q.

A integridade do DNA obtido foi checada por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 1% imerso em tampão SB 1X durante 30 minutos a 120 volts.

A amplificação dos marcadores microssatélites realizou-se por meio do uso da técnica de reação de PCR (*polymerase chain reaction*), cujo o volume final foi de $25\mu L$, contendo $1\mu L$ de DNA genômico, $1,0\ \mu L$ de cada *primer* (*forward* e *reverse*), $2,5\mu L$ de 10X PCR buffer (*Sigma Aldrich*), $0,5\mu L$ de dNTP ($100\mu M$), $1,0\ \mu L$ de JumpStartTM Red taq[®] DNA Polymerase (*Sigma Aldrich*) e $18,0\ \mu L$ de água livre de nuclease.

As reações foram realizadas em um termociclador *Genetouch[®]* (*Bioer Technology*), onde a amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de $94^{\circ}C$ por 30 segundos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a $94^{\circ}C$ por 45 segundos, anelamento conforme a temperatura específica de cada *primer* por 30 segundos e extensão a $72^{\circ}C$ por 30 segundos, terminando com uma extensão final de 10 minutos a $72^{\circ}C$, sendo a checagem da amplificação realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo de extração de DNA genômico por NaCl mostrou-se eficiente configurando em amostras de boa qualidade para as duas fontes de material biológico utilizadas (Figura 1). Resultados semelhantes podem ser observados em trabalhos abordando diferentes espécies de peixes, como pacu, peixe-rei, tilápia e carpas no qual o protocolo NaCl é apontado como uma metodologia não-tóxica e de baixo custo para a obtenção de DNA genômico de alta qualidade e quantidade, sendo a mesma apta para utilização em estudos baseados em PCR (TAVARES et al, 2014).



Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo extrações de DNA genômico a partir de tecido muscular (A) e nadadeira caudal (B) de jundiás oriundos da Lagoa Mangueira e tecido muscular (C) e nadadeira caudal (D) de jundiás oriundos da Lagoa Mangueira

Os 6 *loci* microssatélites utilizados neste estudo amplificaram em todos os indivíduos das duas populações abordadas (Figuras 2, 3 e 4) semelhante ao encontrado por RODRIGUES *et al.* (2015) ao estimar a variabilidade genética de diferentes populações de *Rhamdia* sp., no qual foram utilizados 6 *loci* microssatélites sendo 2 dinucleotídeo e 4 tetranucleotídeos dentre eles Rq158947, Rq164109, Rq137981 e Rq51373, os mesmos utilizados no presente estudo, porém avaliando populações em cativeiro.

Da mesma forma, ao conduzir um estudo no qual avaliavam a contribuição individual de machos de *Rhamdia quelen* em fertilização com *pool* de sêmen RIBOLLI E ZANIBONI- FILHO (2009) amplificaram 5 *loci*, todos dinucleotídeo, para populações cativas.

Evidenciando-se assim a escassez de estudos que abordem a amplificação de marcadores microssatélites aplicadas a populações naturais e/ ou a carência de um painel microssatélite unicamente tetranucleotídeo para jundiás, visto que o padrão de qualidade recomendado pelo *International Society for Forensic Genetics* (ISFG) aponta o motivo tetranucleotídeo o mais confiável para investigações genéticas, permitindo uma interpretação mais robusta dos genótipos em comparação aos dinucleotídeos. Além disso, BACHER *et al.* (1999) relata que a utilização de microssatélites dinucleotídeos podem acarretar em uma maior incidência de artefatos de amplificação, tais como bandas tipo *stutters* durante a reação de PCR, dificultando sua interpretação e posterior genotipagem.

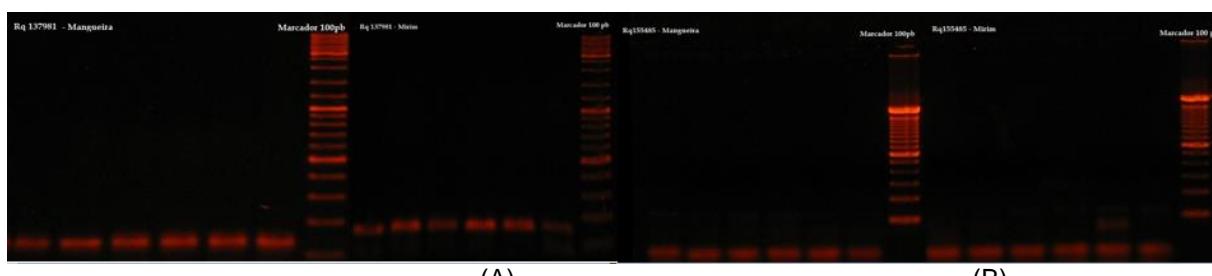


Figura 2. Amplificação do *locus* Rq137981 (A) e *locus* Rq155485 (B) nas duas populações de estudo.

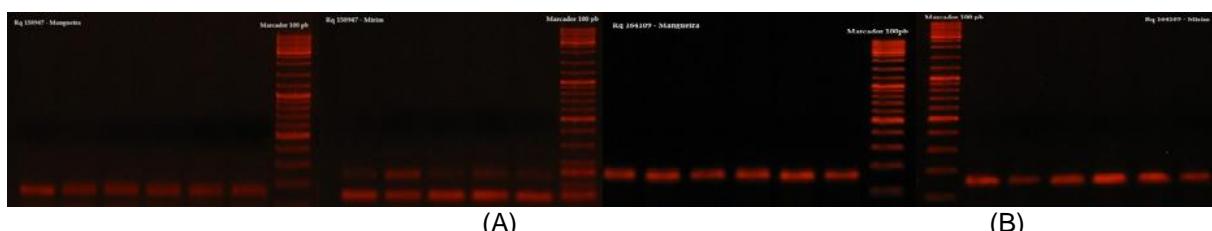


Figura 3. Amplificação do *locus* Rq158947 (A) e *locus* Rq164109 (B) nas duas populações de estudo



Figura 4. Amplificação do locus Rq193810 (A) e locus Rq 51373 (B) nas duas populações de estudo

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados expostos, o protocolo de extração empregado mostrou-se eficaz para isolamento de DNA genômico em jundiás, não havendo alteração na qualidade do mesmo com o uso de diferentes fontes biológicas.

De igual forma, a amplificação dos *loci* microssatélites tetranucleotídeo foram satisfatórias nas duas populações abordadas, sendo de vital importância como embasamento para que mais estudos abordando a caracterização genética de jundiá sejam realizados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRERO, N.M.L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; LOPES T.S. 2008 Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples:modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**, 35: 65-74.

FAO Food and Agriculture Organization. 2016. Fisheries and Aquaculture Department. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO. 530p.

PARPINELLI, R.S.e RIBEIRO RP. 2009. Estudo comparativo de protocolos de extração de DNA em diferentes tecidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Global Science Technology**, 2: 22-33.

RIBOLLI, J. E ZANIBINI-FILHO, E. 2009. Individual contributions to pooled-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Neotropical Ichthyology**, 7: 629-634. RODRIGUES,M.D.N.; MOREIRA, C.G.A.; GUTIERREZ,H.J.P.; ALMEIDA,D.B.; STREIT JR.,D.; MOREIRA,H.L.M. 2015. Development of microsatellite for use in breeding catfish, *Rhamdia* sp. **African Journal of Biotechnology**, 14: 400-411.

SILVA,M.B. 2012 Molecular genetics and animal systematics: A brief history, contributions and challenges. **Estudos de Biologia: Ambiente e Diversidade**, 34: 157: 163.

TAVARES, R.A.; PIEDRAS, S.R.N.; NUNES, M.D.; ALMEIDA, D.B.; MOREIRA,C.G.A.; FERNANDES, J.M. ; FREITAS, S.F. ; MOREIRA, H.L.M. ; POUHEY,J .L. .F.; DIONELLO, N.J.L. 2014 Identification of microsatellite loci with amplification potential in "pejerrey" (*Odontesthes humensis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 66: 1941-1945.