

DETERMINAÇÃO DO SEXO DE *Rhamdia quelen* APARTIR DE PRIMERS DE *Ictalurus punctatus*

FRANCINE BASTOS MAAGH¹; NATALIA OSSA²; JUAN DAVID BOTERO²;
 HAROLD JULIÁN PERES²; GABRIELLA BORBA DE OLIVEIRA²; HEDEN
 LUIZMOREIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – franbmaagh@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – heden.luiz@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os marcadores moleculares são utilizados na biologia molecular para detectar sequências específicas dentro do genoma de uma espécie, diferenciando-se dois ou mais indivíduos para uma característica específica (GELAPE, 2007). Os marcadores sexuais têm sido pesquisados na aquicultura com o objetivo de diminuir os custos da criação dos reprodutores (DURNA, 2009). As metodologias já existentes para identificação sexual possuem algumas limitações como, na identificação sexual direta, a qual é feita pela observação dos genitais, é uma técnica bastante demorada (Ghiraldelli *et al.* 2007; GOMES *et al.* 2000). Outra metodologia é da reversão sexual, a qual pode ser direta, implementando hormônio na ração (efeitos secundários ainda não comprovados) ou indireta, que age nos processos genéticos ou variáveis ambientais, influenciando indiretamente nos processos fisiológicos que determinam o sexo- fenótipo (VIDAL, 2008).

Dessa forma, diversas investigações vem sendo realizadas em diferentes espécies de peixes de água doce, no sentido de identificar marcadores para sexagem de formas juvenis que ainda não apresentam um dimorfismo sexual evidente. O salmão e o catfish (*Ictalurus punctatus*), estão entre as espécies que possuem marcadores moleculares para sexagem (NINWICHIAN *et al.* 2011). O *I. punctatus* é uma espécie que pertence a família siluriforme, com isso, uma espécie utilizada atualmente na aquicultura brasileira e que pertence a mesma família do catfish é o jundiá (*Rhamdia quelen*) (PEREIRA *et al.* 2006). O jundiá é considerado uma espécie importante para o cultivo devido a sua adaptabilidade, rusticidade, facilidade para técnicas de reprodução induzida e aprovação no mercado consumidor (CARNEIRO *et al.* 2002; GOMES *et al.* 2000). Sendo, a determinação do sexo fundamental para os produtores de jundiá, porque, as fêmeas de *Rhamdia quelen* tem uma melhor taxa de crescimento (até 30% a mais com relação aos machos) (GRAEFF *et al.* 2008).

Diferentemente do catfish o jundiá ainda não possui um marcador molecular que permita a identificação precoce do sexo. O desenvolvimento deste marcador poderá contribuir para o programa de melhoramento genético desta espécie, uma vez que permitirá a separação precoce de machos e fêmeas em experimentos de avaliação do desempenho. Com base no exposto acima, este trabalho tem por objetivo desenvolver marcadores de sexo para jundiá baseado em primers heterólogos desenvolvidos para catfish.

2. METODOLOGIA

As amostras utilizadas foram obtidas de diferentes pisciculturas do estado de Rio Grande do Sul, os peixes foram capturados e colocados em um recipiente com água contendo anestésico para insensibilização do animal, a fim de obter 1cm nadadeira caudal, que foi conservada em um eppendorfi com álcool 70%, e armazenada a -20°C no laboratório. O material genômico foi obtido após a extração do DNA da nadadeira caudal (1cm) armazenada. A extração do DNA foi realizada utilizando o protocolo de cloreto de sódio (NaCl 5M). A qualidade e a quantidade do DNA extraído foi checada em gel de agarose 1%, corado com *GelRed* (Biotium, USA) e visualizado em foto documentador L-Pix (Loccus Biotecnologia, Brasil).

Após a checagem da integridade do material genômico, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers Forward 5'GTGAATGTGAGAC TAACAGGAGG3' e reverse 5'ACATCGCTTTGAGAAGCTGC3' propostos por Ninwichian et al. 2011. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 50 ng de DNA genômico, 0,25 µl de *Taq DNA Polymerase*, 2,5 µl de 10x PCR Buffer, 1,5 µl de 25 mM MgCl₂ e 1 µl de *primers*. Em seguida da preparação do mix o PCR foi realizado em termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* com temperatura de anelamento de 52,5 °C. O produto foi finalmente checado em gel de agarose 1%, corado com *GelRed* (Biotium, USA) e visualizado em foto documentador.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados padrões de bandas diferentes entre fêmea e macho apresentando duas bandas para fêmea e três bandas para macho, sendo repetitivo em todos os indivíduos amplificados (Figura 1). Em alguns exemplares a amplificação não funcionou corretamente o que pode ser explicado por conter impurezas no DNA como proteínas, assim como, presença de RNA, os quais podem mascarar o resultado. Além disso, bandas inespecíficas foram observadas indicando que apesar da funcionalidade dos primers utilizados carecem de especificidade.

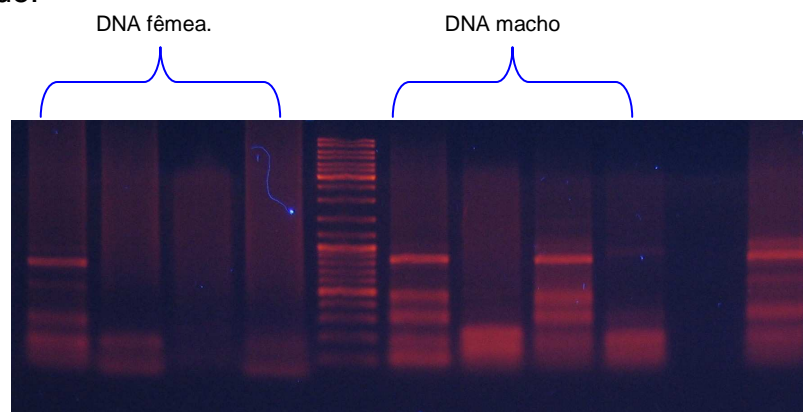


Figura 1. Amplificação do PCR em gel de agarose.

As diferentes bandas observadas para cada sexo na imagem (fêmea antes do marcador e macho depois do marcador) foram cortadas do gel e purificadas para sequenciamento, de forma a desenhar primers mais específicos para jundiá no sentido de aumentar a especificidade do teste genético.

4. CONCLUSÕES

A estratégia de utilização de primers heterólogos para sexagem precoce do sexo em jundiá foi efetiva, embora alguns ajustes necessitem ser feitos para torna-lá 100% efetiva.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARNEIRO, P.C.F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J.D.; SCHORER, M.; OLIVEIRA FILHO, P.; BALDISSEROTTO, B.; GOLOMBIESKI, J.I. Jundiá: um grande peixe para a região do sul. **Panorama da Aqüicultura**. v.12, n.69, p.41-46, 2002.

DURNA, S. The Determination of Sex-Linked Molecular Markers with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Technique in *Aphanius danfordii* (Cyprinodontidae) Species. **Fen Bilimleri Dergisi**, p, 27-37. 2009.

GELAPE, F. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, D.F. 2007. 1V.

GRAEFF, A.; SEGALIN, C.A.; PRUNER, E.N.; AMARAL JUNIOR, H. Produção de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen*. Florianópolis: Epagri, 2008.

GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; GOMES, A.R.C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, v. 30, p. 179 -185, 2000.

GHIRALDELLI, L.; MACHADO, C.; FRACALOSI, D.M, FILHO, E.Z. Desenvolvimento gonadal do Jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região sul do Brasil. **Biological Science**. v. 29, n. 4, p. 349-356, 2007.

NINWICHIAN, P.; PEATMAN, E.; PERERA, E.; LIU,S.; KUCUKTAS, H.; DUNHAM, R.; LIU, Z. Identification of a sex-linked marker for channel catfish. **Animal genetic**. p, 1-2, 2011.

PEREIRA, C.R.; BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; RITTER, F.; SILVA, L.B. Embryonic and larval development of Jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei) a South American Catfish. **Braz J Bio**. p. 1057-1063, 2006.

VIDAL, J.M.L.; CONTRERAS, W.M.S.; ALVAREZ, C.A.G.; HERNANDEZ, A.A.F.;
HERNANDEZ, U.V. Técnicas de reversión sexual aplicadas en acuicultura.
Publicaciones universitarias Kuxulkab de la universidad Juárez autónoma de
Tabasco. v. XV, n. 27, oct-dic, 2008.