



Marcadores genéticos e sua aplicação na piscicultura

Ilustrações cedidas pelos autores

Marcadores genéticos na piscicultura

César Martins, Dr.

Professor Assistente do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", cmartins@ibb.unesp.br

Fábio Porto-Foresti, Dr.

Pós-doutorando do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", fabio@ibb.unesp.br

Adriane Pinto Wasko, Dra.

Pós-doutoranda do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", awasko@ibb.unesp.br

Geisa Ribeiro Leitão, Dra.

Professor Adjunto do Departamento de Genética, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, grleitao@ufrj.br

Cláudio Oliveira, Dr.

Professor Adjunto do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", claudio@ibb.unesp.br

Fausto Foresti, Dr.

Professor Titular do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", fforesti@ibb.unesp.br

Tecnologias de DNA e suas aplicações

A última década do século XX representou um período particularmente excitante para a biologia. Novos métodos de análises de proteínas, DNA e RNA levaram a uma explosão de informações que permitiram aos cientistas estudar as células e suas moléculas de forma mais detalhada. Essas novas tecnologias têm permitido não somente decifrar as informações, mas também a maneira como os componentes moleculares interagem formando células e organismos complexos e funcionais.

Até o início dos anos 70, o DNA era uma molécula difícil de ser analisada bioquimicamente. Hoje, graças à evolução das tecnologias de manipulação do DNA, ela é uma das moléculas mais fáceis de ser estudadas. Regiões específicas do genoma podem ser facilmente isoladas, propagadas em número inimaginável de vezes e sua se-

quência nucleotídica pode ser conhecida em questão de horas. O desenvolvimento de duas tecnologias em particular, a restrição enzimática e a reação em cadeia da polimerase (PCR, do Inglês *Polymerase Chain Reaction*) possibilitou avanços significativos na manipulação do material genético.

Em 1962, W. Arber forneceu as primeiras evidências da existência das nucleases de restrição, enzimas bacterianas de clivagem de DNA que reconhecem seqüências curtas de bases e fazem um corte na dupla hélice do DNA. Sua função na célula bacteriana é destruir DNAs estranhos que possam ter entrado na célula. A tecnologia das enzimas de restrição possibilitou o isolamento de fragmentos específicos de DNA e sua posterior propagação em vetores de clonagem, facilitando seus estudos. Em 1985, K. B. Mullis e colaboradores inventaram a PCR, tecnologia que permite uma rápida e eficiente amplificação de regiões específicas do genoma. Mais precisamente, essa reação possibilita que uma região selecionada do genoma seja amplificada milhões de vezes, permitindo seu isolamento do resto do genoma. Particularmente, a tecnologia de PCR tem sido amplamente aplicada na identificação de marcadores de DNA úteis na aqüicultura e na conservação de estoques naturais de espécies de peixes.

Marcadores genéticos aplicados à produção de peixes em cultivo

Marcadores morfogenéticos, geralmente associados a caracteres fenotípicos, e marcadores enzimáticos ou bioquímicos, associados a múltiplas formas moleculares de proteínas, representaram as abordagens iniciais que foram usadas para analisar característi-

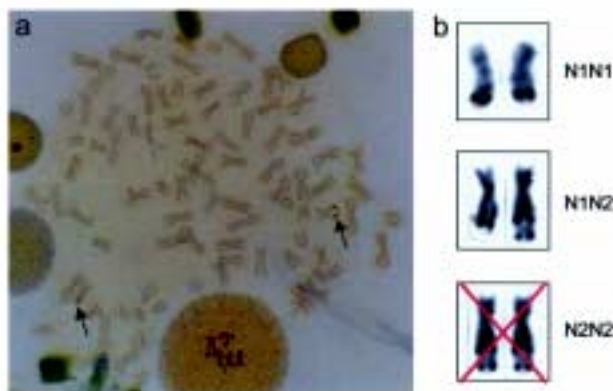


Figura 1. Regiões organizadoras de nucléolos (RONs) detectadas com nitrato de Prata (setas em *a*) e diferentes fenótipos cromossômicos para RON encontrados em truta arco-íris (*b*). N1N1 - homocigoto normal; N1N2 - heterocigoto para a inversão; N2N2 - homocigoto para a inversão. Não foram encontrados exemplares com o fenótipo cromossômico N2N2 no estoque estudado e nos cruzamentos realizados

cas que refletem a composição genética de estoques de peixes. A simplicidade e o baixo custo da análise de eletroforese fizeram com que essa ferramenta fosse amplamente utilizada para a caracterização genética de espécies, populações e/ou estoques de peixes (May & Krueger, 1990). Da mesma forma, marcadores cromossômicos têm sido também utilizados com grande sucesso em estudos de populações naturais, assim como no manejo de estoques em cultivo.

Os progressos no melhoramento genético de peixes cultivados têm sido foco de discussões e revisões durante a última década (Hulata, 2001). Os objetivos têm visado a aumentar a produção de novas linhagens, o desenvolvimento de tecnologias modernas, incluindo manipulação sexual e cromossômica, a criopreservação de gametas, a obtenção de indivíduos transgênicos e o mapeamento genômico. Os conhecimentos sobre marcadores de DNA evoluíram do seu estado experimental e estão sendo atualmente incorporados à aquicultura de forma prática e eficiente.

Marcadores Cromossômicos

Marcadores cromossômicos vêm sendo utilizados e aplicados em projetos de Piscicultura, envolvendo principalmente o controle dos cruzamentos. Os dados citogenéticos são úteis na caracterização de espécies crípticas e raças cromossômicas, a fim de prevenir possíveis insucessos nos cruzamentos, devido a incompatibilidades genéticas que possam surgir. Por outro lado, a citogenética também pode auxiliar na identificação de *bancos genéticos* de espécies utilizadas em piscicultura e ainda em projetos de hibridação, nos quais é importante a identificação dos ní-

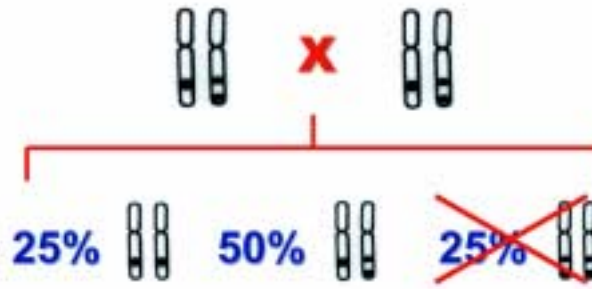


Figura 2. Cruzamento induzido envolvendo matrizes heterozigotas (N1N2), que deveria resultar em 25% de indivíduos N2N2 no lote da geração F₁. Não foram encontrados exemplares com o fenótipo cromossômico N2N2 nas amostras estudadas

veis de ploidia dos produtos dos cruzamentos interespecíficos que, em princípio, poderiam resultar em indivíduos ginogenéticos, androgenéticos, triploídes, tetraploídes e híbridos diplóides.

Até recentemente, os estudos citogenéticos de peixes eram considerados como sendo de grande interesse básico e as novas tecnologias desenvolvidas na área confirmam um papel de grande significância para a citogenética atualmente. Desses estudos, destaca-se o programa de monitoramento citogenético em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), através da aplicação da metodologia de identificação das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) com coloração com nitrato de Prata (Fig. 1a).

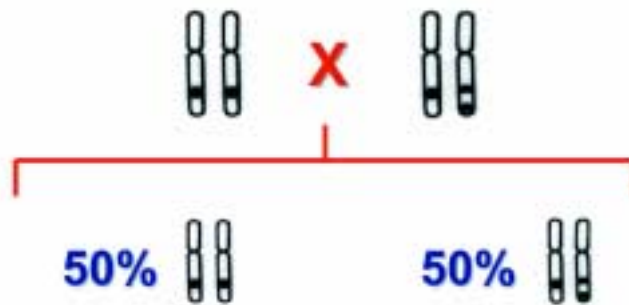


Figura 3. Cruzamento induzido envolvendo matrizes homozigotas (N1N1) e matrizes heterozigotas (N1N2), demonstraram uma maior taxa de sobrevivência na geração F₁, pelo fato de não levarem à formação de indivíduos N2N2

Através desse monitoramento, foi possível identificar a existência de exemplares com distintos fenótipos cromossômicos - N1N1 (homozigotos) e N1N2 (heterozigotos), referentes a indivíduos com cromossomos com a NOR normal (N1) e portadores de inversão (N2), não tendo sido encontrados exemplares com o fenótipo cromossômico N2N2 (Fig. 1b), a condição homozigota para a inversão (Porto-Foresti et al., *in press*). Segundo os autores, entende-se

que os cruzamentos envolvendo matrizes heterozigotas para o caráter estudado deveriam resultar em 25% de indivíduos N2N2 no lote da geração F₁ (Fig. 2). Sendo letal, essa condição provocaria, conseqüentemente, a perda de 25% do total de indivíduos neste tipo de cruzamento, que é considerada expressiva em nível de produção nessa espécie de peixe, pelo seu valor econômico.

Por outro lado, cruzamentos envolvendo matrizes N1N1 e N1N2, dos quais resultam lotes de trutas 50% N1N1 e 50% N1N2 (Fig. 3), demonstraram uma maior taxa de sobrevivência na geração F₁, pelo fato de não levarem à formação de indivíduos N2N2, o que seria interessante do ponto de vista da produção. Assim, os indivíduos N1N2 do atual estoque não deveriam ser necessariamente descartados e, sim, uma vez identificados e marcados, poderiam ser utilizados normalmente como matrizes, desde que fossem cruzados apenas com parceiros homozigotos (N1N1).

A utilização de marcadores citogenéticos como o número e a fórmula cariotípica, de marcadores das RONs e de outras metodologias de bandamentos cromossômicos, podem ter grande importância em trabalhos de melhoramento genético, ma-

nipulação cromossômica ou como simples marcadores aplicados em programas de piscicultura.

Marcadores de DNA

Recentemente, marcadores moleculares do genoma nuclear (nDNA), junto com padrões de DNA mitocondrial (mtDNA), têm sido considerados ferramentas importantes e potenciais em estudos relacionados com a estrutura de populações de peixes, uma vez que esses tipos de análises são úteis na detecção de polimorfismos e fornecem informações seguras sobre os níveis de variabilidade e similaridade entre distintas populações ou estoques. A detecção de variabilidade através do genoma nuclear começou com o uso da restrição enzimática, por meio de análises de polimorfismo de fragmentos de DNA gerados por restrição enzimática (RFLP, do Inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Grodzicker et al., 1974). Posteriormente, com o advento da PCR (Mullis & Faloona, 1987), diversos outros marcadores moleculares tornaram-se disponíveis, incluindo seqüências repetitivas de DNA como minissatélites (Jeffreys et al., 1985) e microsatélites ou repetições de seqüência simples (SSR, do Inglês *Simple Sequence Repeats*) (Litt & Luty, 1989), e amplificação ao acaso de polimorfismo de DNA (RAPD, do Inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990). Os marcadores de microsatélites e RAPD, por apresentarem altos níveis de polimorfismo, têm sido rotineiramente utilizados em estudos genéticos que envolvem diferentes espécies de peixes.

Marcadores RAPD e Microsatélites

Com o desenvolvimento de novas metodologias que empregam marcadores de DNA aliadas às técnicas de clonagem e seqüenciamento, vários estudos vêm sendo desenvolvidos vol-



Figura 4: Gel de agarose mostrando padrões de RAPD para indivíduos pertencentes a um estoque cultivado e indivíduos provenientes de um estoque da natureza de *Brycon cephalus*. Em destaque, bandas/alelos que se apresentam monomórficas no estoque de cultivo e polimórficas no estoque da natureza

tados à aqüicultura e ao cultivo de peixes, buscando a caracterização e a identificação de espécies, populações e híbridos, determinação de estruturas populacionais, identificação de linhagens, determinação da variação genética em populações selvagens e cultivadas, avaliação do impacto genético da introdução de peixes cultivados em populações naturais, determinação de estratégias para fins de criação e repovoamento e localização de marcadores ligados a genes envolvidos com caracteres de interesse econômico (Carvalho & Hauser, 1998).

Marcadores RAPD e microsatélites têm sido rotineiramente utilizados em diversas espécies de peixes, por possuírem atributos que os tornam favoráveis para estudos de conservação e diversidade genética - são abundantes e apresentam altos níveis de polimorfismo. Além disso, análises comparativas envolvendo esses marcadores em conjunto, vêm se tornando cada vez mais comuns nesses organismos, o que permite não somente a obtenção de

dados mais informativos, como também a avaliação do potencial de cada técnica individualmente (Ward, 2000).

Apesar da potencialidade das análises de RAPD e de microsatélites, ainda existem poucos estudos envolvendo esses marcadores moleculares em peixes Neotropicais. A estimativa da magnitude e de distribuição da variação genética é crítica em estudos de estrutura populacional, conservação e cultivo e as aplicações de marcadores RAPD e de microsatélites em piscicultura podem também incluir o monitoramento de alterações na variabilidade genética, como consequência de estratégias diferentes de cruzamento, e estimativas de parentesco entre potenciais reprodutores.

Nos últimos anos, programas de aquicultura têm dado elevada importância às avaliações genéticas, com vistas não somente a ampliar a produção como também a manter a diversidade genética dos estoques. Estudos genéticos envolvendo marcadores RAPD vêm sendo

utilizados com sucesso na avaliação dos níveis de diversidade genética de diferentes estoques naturais e cultivados de *Brycon cephalus* (Fig. 4), espécie de peixe popularmente conhecida como matrinhã da Amazônia e de grande importância econômica no Brasil. Como esperado, tem sido verificada uma considerável redução na variabilidade genética de estoques cultivados da espécie. Os resultados obtidos parecem refletir uma prática comum em diversos programas de cultivo de peixes, em que um pequeno número de exemplares é utilizado como reprodutores, obtendo-se sucesso reprodutivo com apenas alguns casais geralmente não identificados geneticamente e aplicando-se estratégias reprodutivas não padronizadas. Esse manejo inadequado leva ao empobrecimento genético dos estoques, podendo comprometer o sucesso no cultivo. Os dados levantados são de extrema importância para a elaboração de melhores estratégias de manejo da reprodução e para a conservação da biodiver-

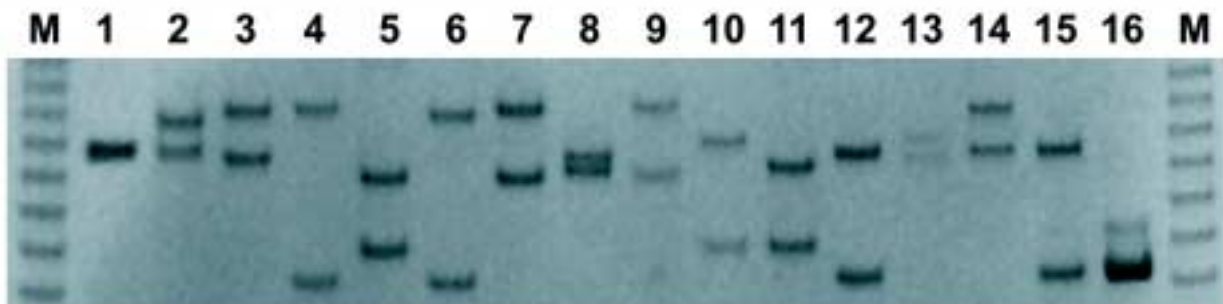


Figura 5: Gel de poliácridamida mostrando a distribuição de alelos de um microssatélite em truta arco-íris. Excetuando o indivíduo 1, que é homocigoto, todos os indivíduos restantes são heterocigotos. M, marcador de peso molecular de 10 pares de bases; 1-16, indivíduos analisados

sidade da espécie.

Com relação aos microssatélites, foram realizadas análises envolvendo exemplares de quatro estoques cultivados de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e de um estoque capturado na natureza (resultado de um programa de propagação da espécie em rios brasileiros desenvolvido na década de 60), utilizando seis locos de microssatélites. Destes, apenas um se mostrou monomórfico, sendo que, para os outros cinco, o número médio de alelos por loco polimórfico foi de 8,6, variando de 6 a 26 alelos (Fig. 5). A heterocigosidade estimada variou de 0,47 a 0,96, com um valor médio de 0,74. Verifica-se, pois, que, pelas análises realizadas, as estimativas de diversidade genética revelam uma maior variação dentro dos estoques (93%), enquanto que entre estes foi baixa (7%). Esses resultados coincidem com valores relatados por Hershberger (1992), para a mesma espécie. Do mesmo modo, Carlsson et al. (1999) estudando truta marrom, relataram que 96,1% da diversidade total (H_T) foi devida à diversidade dentro das populações e apenas 3,9% da diversidade entre populações.

Todas as estimativas relativas à diferenciação genética (F_{ST}) entre os pares de estoques foram significativas ($P < 0,01$). Essas observações são bastante importantes, pois permitirão o desenvolvimento de estudos futuros envolvendo o cruzamento de indivíduos dos diferentes estoques, visando ao incremento da heterocigosidade da espécie e possibilitando a formação de estoques sensíveis à aplicação

de técnicas de melhoramento genético.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelos auxílios financeiros concedidos.

Referências

- Carlsson, J., Olsén, K.H., Nilsson, J., Overli, O. & Stabell, O.B. Microsatellites reveal fine-scale genetic structure in stream-living brown trout. **Journal of Fish Biology**, **55**: 1290-1303, 1999.
- Carvalho, G.R. & Hauser, L. Advances in the molecular analysis of fish population structure. **Italian Journal of Zoology** **65**: 21-33, 1998.
- Grodzicker, T., Williams, J., Sharp, P. & Sambrook, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology** **39**: 439-446, 1974.
- Hershberger, W.K. Genetic variability in rainbow trout populations. **Aquaculture** **100**: 51-71, 1992.
- Hulata, G. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. **Genetica** **111**: 155-173, 2001.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. & Thein, S.L. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. **Nature** **316**: 67-73, 1985.

- Litt, M. & Luty, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics** **44**: 398-401, 1989.

- May, B. & Krueger, C.C. Use of allozyme for population analysis. In: *Electrophoretic and isoelectric focusing techniques in fisheries management*. Whitmore DH ed. pp. 157-171, 1990.

- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** **155**: 335-350, 1987.

- Porto-Foresti, F., Oliveira, C., Gomes, E.A., Tabata, Y.A., Rigolino, M.G. & Foresti, F. Investigation of a lethal effect associated with a polymorphism involving the NOR-bearing chromosomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of the World Aquaculture Society** (no prelo).

- Ward, R.D. Genetics in fisheries management. **Hydrobiologia** **420**: 191-201, 2000.

- Welsh, J. & McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research** **18**: 7213-7218, 1990.

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** **18**: 6531-6535, 1990.