

VARIABILIDADE GENÉTICA DA RÃ-TOURO GIGANTE (*Rana catesbeiana*)  
PROVENIENTE DE POPULAÇÕES DOS ESTADOS DE GOIÁS, PARÁ E  
PARANÁ, CRIADAS EM SISTEMA INTENSIVO DE CULTIVO

ELENICE CRISTINA PIRES PRIM<sup>1</sup>, JOÃO TEODORO PADUA<sup>1</sup>, LUIZ ARTUR MENDES BATAUS<sup>2</sup>

1. Departamento de Produção Animal. Escola de Veterinária. E-mail: teodoro@vet.ufg.br

2. Departamento de Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, Goiás – Brasil. www.ufg.br

RESUMO

Durante os meses de julho a outubro de 2001 foi realizado um experimento a fim de verificar a variabilidade genética entre os animais *Rana catesbeiana* de ranários dos estados de Goiás, Pará e Paraná. A diversidade genética foi avaliada utilizando-se marcador molecular tipo RAPD. Ensaio tipo RAPD resultaram em 105 marcadores (bandas), os quais foram todos polimórficos. Procedendo-se à análise de divergência genética calculada pelo *software* WINAMOVA, a variação genética intrapopulacional (65,15%) foi maior que a variação entre populações (34,85%).

Utilizou-se a soma dos quadrados internos para estimar a variabilidade interna de cada população, e os dados mostraram que os animais do estado de Goiás apresentaram a maior diversidade interna (148,4167). A análise das distâncias genéticas entre populações (pelo teste PhiST) mostrou que os animais provenientes dos estados de Goiás e Paraná formaram um grupo (distância genética de 0,2002) e os do estado do Pará formaram um grupo à parte (distância Pará e Goiás 0,3783, Pará e Paraná 0,4283).

PALAVRAS-CHAVE: Divergência genética, marcador molecular, populações, *Rana catesbeiana*.

SUMMARY

GENETIC VARIABILITY OF COMMERCIAL FROG (*RANA CATESBEIANA*) FROM POPULATIONS RAISED IN THE STATES OF GOIÁS, PARÁ AND PARANÁ IN INTENSIVE SYSTEMS

During the months of July to October of 2001 the experiment was conducted to verify if genetic variability exists among the animals (*Rana catesbeiana*) of frogs culture of the Goiás, Pará and Paraná state. In order to evaluate the genetic diversity molecular markers type RAPD were used. The genetics exams were accomplished in the Laboratory of Biochemistry and Genetic Engineering, Department of Physiologic Sciences of the Institute of Biological Sciences of the Federal University of Goiás. Rehearsals of RAPD resulted in 105 markers (bands), which were all polymorphics. Using the analysis of genetic divergence calculated by the

software Winamova, the genetic variation intra population (65,15%) was larger than the variation among populations (34,85%). The sum of the internal squares was used to verify the internal variability of the populations, the data showed that the animals of the state of Goiás presented the largest internal diversity (148,4167). The analysis of the genetic distances among populations (test PhiST), showed that the animals of the state of Goiás and Paraná formed a group (genetic distance of 0, 2002) and of the state of Pará formed other group (distance Pará and Goiás 0,3783, Pará and Paraná 0,4283).

KEY-WORDS: Genetic divergence, molecular marker, populations, *Rana catesbeiana*.

INTRODUÇÃO

A ricultura se tornou uma das atividades em ascensão no Brasil e no mundo, com o aumento do

poder consumidor da classe média alta, que expressou o desejo de consumir outras fontes de proteína animal que não as convencionais. Ressalte-se que o Brasil detém a melhor tecnologia de produção de

*Rana catesbeiana* em cativeiro e é também um dos maiores produtores mundiais (SILVA, 2000).

Em regiões de clima frio ocorre uma entressafra reprodutiva mais acentuada, se comparada às regiões tropicais e têm-se observado diferenças produtivas muito acentuadas nas rãs produzidas em cativeiro. Algumas delas apresentam sinais de serem menos estressadas, outras são mais dóceis e se desenvolvem mais rapidamente, pois se alimentam melhor, conseqüentemente, com índices muito bons de conversão alimentar. Com relação à resistência a doenças e taxas de sobrevivência em todas as etapas de desenvolvimento, tem-se constatado também a mesma diversidade, até mesmo dentro de uma mesma população.

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction – PCR) foi descrita por Kary Mullis em meados da década de 80 (SAIKI et al., 1985, MULLIS & FALLONA, 1987). Desde sua concepção, esta tecnologia causou uma verdadeira revolução na biologia, tanto na pesquisa visando ao entendimento de processos biológicos fundamentais como nas áreas aplicadas envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais domésticos.

Esta técnica (PCR) envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que flanqueiam a região-alvo (MULLIS & FALLONA, 1987).

Diante dessas observações, verificou-se a necessidade de realizar estudos de variabilidade genética e produtiva nesta espécie, para que programas de melhoramento genético sejam realizados, com vistas a um melhor desempenho e condições zootécnicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

As análises laboratoriais foram realizadas no laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética do Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de

Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal de Goiás.

Foram selecionados aleatoriamente 12 animais provenientes dos ranários dos estados do Pará (Ramazon), Paraná (Ranaluz) e Goiás (Nasoli). A extração do DNA total foi feita utilizando o *kit* GFX™ Genomic Blood DNA Purification (Amershan Pharmacia Biotechnology). Para amplificação de DNA pela técnica RAPD, utilizaram-se conforme *primers* Tabela 1:

**TABELA 1.** *Primers* utilizados para amplificação de DNA pela técnica RAPD

Código do <i>primer</i>	Seqüência do <i>primer</i> 5' 3'
AM 4	AGGGGICTTG
AM 7	AGGTGACCGT
AM 14	CCCCGATGGT
OPC 01	TTCGAGCCAG
OPC 07	GTCCCCGACGA
OPC 08	TGGACCGGTG
OPC 13	AAGCCTCGTC
OPC 14	TGCTTGCTTG
OPC 19	GTTGCCAGCC
OPH 01	GGTCGGAGAA
OPH 04	GGAAGTCGCC
OPH 07	CTGCATCGTG
OPH 08	GAAACACCCC
OPH 12	ACGCGCATGT
OPH 16	TCTCAGCTGG
OPH 17	CACTCTCCTC
OPH 19	CTGACCAGCC
OPH 20	GGGAGACATC

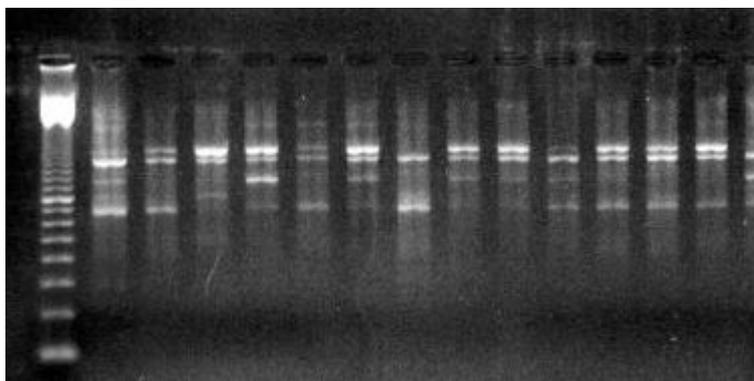
Os *primers* OPC e OPH foram obtidos da Operon Biotechnology; os *primers* AM foram obtidos do Centro de Biotecnologia da Amazônia.

Os produtos da reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (SAMBROOK et al., 1989). Os produtos de amplificação de RAPD foram analisados e convertidos em presença ou ausência de bandas (presença 1 ou ausência 0).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância molecular (AMOVA) proposta originalmente por Excoffier et al. (1992) e utilizada para marcadores RAPD por HUFF et al. (1993). Essa metodologia permite a decomposição da

variância genética total em seus componentes inter e intrapopulacionais. Partindo-se da matriz de distâncias genéticas, definidas como sendo o complemento do coeficiente de similaridade entre os indivíduos, e utilizando uma estrutura similar à análise de variância, são estimados os componentes de variância ao nível populacional ( $s^2_p$ ) e ao nível de indivíduos dentro da população ( $d^2_v$ ). Com base nesses componentes obtém-se uma estatística análoga à estatística *Fst* de WRIGHT, designada de PhiST, dada por  $\text{PhiST} = s^2_p / (s^2_p + s^2_v)$ , que representa a proporção da variância genética total que está entre as populações.

O teste de significância neste caso é realizado através do procedimento de Monte Carlo utilizando-se permutações (MANLY, 1997). Valores de PhiST obtidos para cada uma das amostras oriundas do procedimento de Monte Carlo são comparados com o valor inicialmente observado. O nível de significância do valor observado (p-valor) é então definido como sendo a proporção das amostras obtidas por permutação (sob hipótese de nulidade, ou seja,  $\text{PhiST} = 0$ ), que forneceram valores de PhiST maiores ou iguais ao valor observado. Considerou-se neste trabalho, como comumente utilizado na literatura, um limite crítico de significância de 0,05 para o p-valor.



**FIGURA 1.** Análise por eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação obtidos com o *primer* OPH 20 nos pocinhos 1 e 20 marcadores de peso molecular 100 pb (pares de base) (Amershan Pharmacia). Pocinhos de 2 a 13 amostras provenientes de Goiás, de 14 a 19, 21 e 22 provenientes do Paraná.

A partir dos dados de matriz de similaridade de Jaccard para pares de indivíduos, realizou-se a análise de agrupamento utilizando-se o critério UPGMA (Unweighted paired-group method using arithmetic averages).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise dos *primers* utilizados

Todos os *primers* testados neste trabalho resultaram na amplificação de fragmentos de DNA, totalizando 105 marcadores polimórficos (bandas). Na Figura 1 pode-se observar a diversidade genética presente nas populações analisadas, através da amplificação diferencial de bandas nos diferentes animais, quando utilizado mesmo *primer*, em que os

animais 12, 13 e 14 apresentam o mesmo padrão de amplificação de DNA. Já os animais 15 e 16 apresentam duas bandas comuns e outra diferente, quando comparados aos animais 12, 13 e 14. Cada banda amplificada foi classificada como presente ou ausente em cada um dos animais analisados, e os resultados obtidos foram transformados em uma matriz e analisados com a utilização do programa WINAMOVA (EXCOFFIER et al., 1992).

RODRIGUES (2000) e BATISTA (2001), em estudos sobre a variabilidade genética de anfíbios utilizando a técnica de RAPD, encontraram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho, em que a maioria das bandas foi polimórfica. Eles observaram, também, que alguns *primers* fornecem melhores amplificações por apresentarem um bom número de fragmentos amplificados de boa intensidade no gel.

Os dados apresentados na Tabela 2 mostram que a variabilidade genética é maior dentro das populações estudadas do que entre as populações. Os indivíduos provenientes do Paraná foram os que apresentaram menor diversidade genética interna e o pior desempenho zootécnico (dados não apresentados). Utilizando o programa WINAMOVA obteve-se um valor de PhiST de 0,349, sendo 34,85% resultante de uma variação entre as populações e 65,15% intrapopulacional.

**TABELA 2.** Resumo das análises estatísticas de variância molecular para as populações de *Rana catesbeiana*.

Fonte de variação	Varição	GL
Entre populações	34,85%	2
Intrapopulações	65,15%	11
TOTAL	100%	

BATISTA (2001), em estudo sobre a estrutura genética populacional de *Physalaemus cuvieri*, obteve resultados semelhantes aos encontrados, em que a maior parte da variação genética foi devida ao componente intrapopulacional, com 84,96%, enquanto entre as populações a variação observada foi de 2,60%.

Os dados apresentados na Tabela 3 podem ser utilizados para estimar a variabilidade interna de cada população, em que se observa que a diversidade interna nas três populações estudadas foi bastante alta. Pode-se inferir que a maior variabilidade encontrada foi em indivíduos provenientes do estado de Goiás e a menor em indivíduos provenientes do Paraná (SILVA, 2000; LENARTOWICZ, 2001).

De acordo com os dados da Tabela 4 a menor variação genética é encontrada quando se comparam animais provenientes dos estados de Goiás e Paraná; já a maior distância genética foi encontrada entre indivíduos provenientes do Paraná e Pará.

**TABELA 3.** Variabilidade genética interna das populações de Goiás, Paraná e Pará pela soma de quadrados internos obtidos pela análise do WINAMOVA.

População	Soma dos quadrados
Goiás	148,4167
Paraná	122,2500
Pará	138,9167

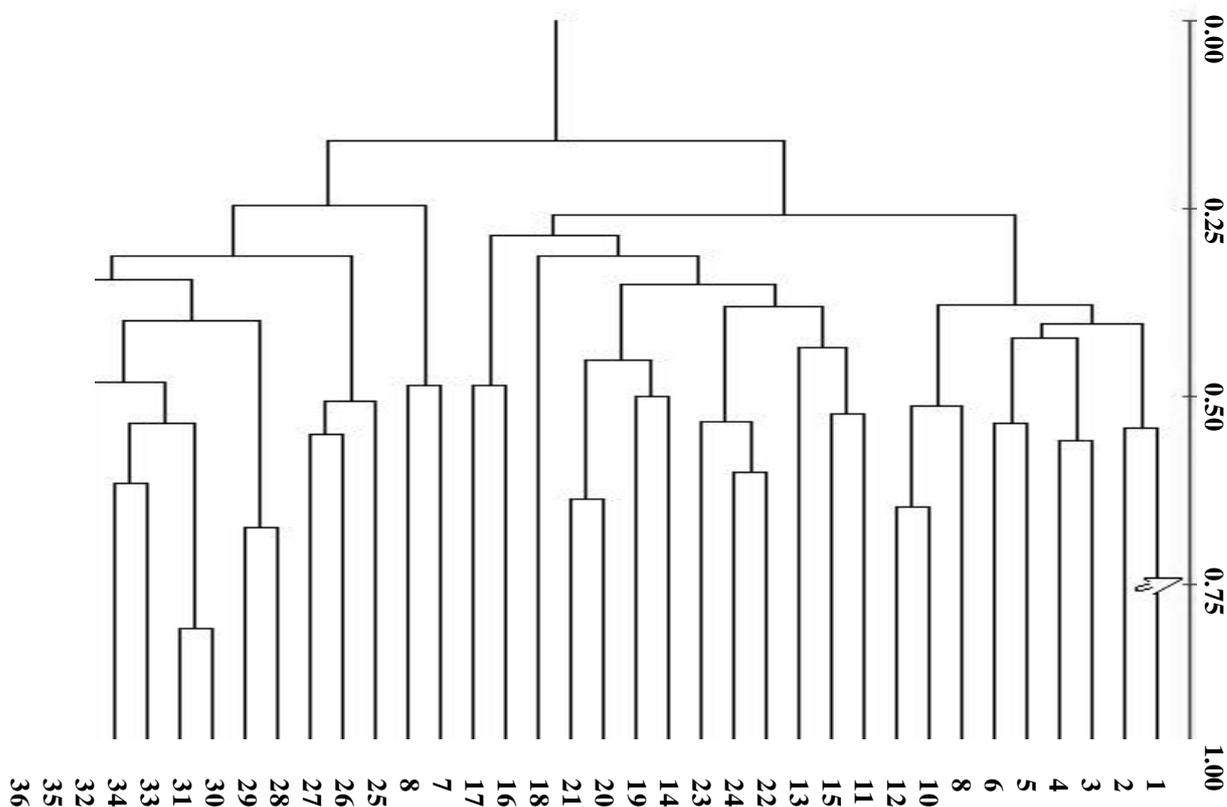
**TABELA 4.** Distâncias genéticas (PhiST) entre as populações dos estados de Goiás, Paraná e Pará, utilizando 1000 permutações ( $p < 0,001$ )

População	Distância genética
Goiás – Paraná	0,2002
Goiás – Pará	0,3783
Paraná – Pará	0,4283

As matrizes utilizadas para formação de plantel do ranário paraense foram obtidas de ranários diferentes. Os machos foram trazidos de um ranário de Fortaleza, CE, enquanto as fêmeas de um ranário potiguar (VIANA, 2001); já os animais do Paraná não tinham nenhum controle de matrizes – o que pode ter promovido uma alta consangüinidade – enquanto os pais dos animais de Goiás foram selecionados de acordo com o tamanho e características sexuais secundárias, para evitar que houvesse acasalamento entre indivíduos de parentesco próximo (irmãos, pais). Registre-se que os dados de seleção das matrizes foram relatados pelos responsáveis técnicos de cada ranário.

#### **Análise de divergência genética pelo método de agrupamento**

A observação do dendograma (Figura 2) indica que os animais do estado do Pará formaram um grupo separado dos demais, demonstrando que



**FIGURA 2.** Dendrograma construído pelo método UPGMA a partir de matriz de similaridade obtida pelo índice de Jaccard, dos dados dos animais da população de Goiás, Paraná e Pará (1 a 12 indivíduos provenientes de Goiás, 13 a 24 do Paraná e 25 a 36 do Pará).

estão mais distantes geneticamente das outras populações estudadas, corroborando com os dados da Tabela 4. A maioria dos indivíduos da população de Goiás formou um grupo juntamente com os indivíduos da população do Paraná. Dois indivíduos provenientes de Goiás (7 e 8) agruparam-se melhor com os indivíduos provenientes do Pará. O agrupamento dos indivíduos de Goiás reforça a maior diversidade genética interna quando comparada com a diversidade dos demais, confirmando os dados obtidos na Tabela.

### CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho mostram que existe uma grande diversidade genética nos animais analisados, e que essa diversidade se deve, na maior parte, ao componente intrapopulacional, que representou 65,15% da diversidade encontrada (Tabela 2). Vale destacar que, para a realização de um estudo de melhoramento genético desses animais, poderia ser mais produtivo desenvolver um trabalho

com um maior número de animais de uma mesma população.

Ademais, salienta-se que a população proveniente do ranário de Goiás é a mais indicada para a realização desse tipo de estudos, visto que é a população que apresenta maior diversidade interna (Tabela 3).

Os animais provenientes do ranário do Paraná apresentaram o pior desempenho zootécnico e a menor diversidade interna, o que poderia ser explicado pela falta de critérios de seleção das matrizes. Uma forma de melhorar o plantel do ranário paranaense poderia ser cruzar matrizes desse ranário com animais provenientes do ranário paraense, uma vez que esta população apresentou o melhor desempenho zootécnico e a maior distância genética da população paranaense (HLENARTOWICZ, 2001).

### REFERÊNCIAS

BATISTA, C. G. **Estrutura genética populacional de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826**

**(Lissamphibia: Leptodactylidae) em fragmentos antrópicos e naturais de cerrado.** 2001.31p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2001.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

LENARTOWICZ, L. **Proveniência da rã-touro do Paraná.** São José dos Pinhais, Paraná: Ranário Ranaluz, 2001. Informação verbal.

MULLIS, K.; FALIONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.

OLIVEIRA, E. **Proveniência da rã-touro de Goiás.** Vianópolis, GO: Ranário Nasoli, 2001.

RODRIGUES, F. M. **Divergência genética entre espécies de anuros do cerrado utilizando**

**marcadores RAPD.** 2000. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.

SAIKI, R. K.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; MULLIS, K. B.; FALOONA, F.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restrictions site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2ed. Cold. Spring Harbor Lab. Press, 1989.

SILVA, D. L. **Mercado e condições da atividade ranícola em Goiás.** Hidrolândia, GO: Ranário Fujioka, 2000. Informação verbal.

VIANA, S. C. **Proveniência da rã-touro no Pará.** Belém, PA: Ranário Ramazon, 2001. Informação verbal.

