



REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DE DNA POLIMÓRFICO A PARTIR DE AMOSTRAS DE ROBALO PEVA *Centropomus parallelus*

Random amplification polymorphic DNA from tissues of Fat Snook Centropomus parallelus

**Kárita Cláudia Freitas¹, Fabiano Bendhack², Sylvio Péllico Netto³,
Humberto Maciel França Madeira⁴, Jane Eyre Gabriel⁵**

¹ Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Agropecuária, Centro de Ciências Ambientais e Agrárias, Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUCPR. São José dos Pinhais, PR - Brasil.

² Centro de Propagação e Produção de Organismos Marinhos CPPOM, Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUCPR. Guaratuba, PR - Brasil.

³ Centro de Ciências Ambientais e Agrárias, Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUCPR, São José dos Pinhais, PR - Brasil.

⁴ Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Agropecuária, Centro de Ciências Ambientais e Agrárias, Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUCPR São José dos Pinhais, PR - Brasil.

⁵ Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas CCEA, Universidade Estadual da Paraíba UEPB. Patos, PB - Brasil, e-mail: eyre.gabriel@gmail.com

Resumo

O marcador molecular RAPD vem sendo amplamente empregado em análises moleculares, proporcionando grandes avanços aos estudos de avaliação da estrutura genética entre populações de uma grande variedade de organismos. Entretanto, determinadas limitações diretamente associadas à extração de DNA genômico e às condições de amplificação costumam restringir seu emprego. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo estabelecer protocolos de otimização de reações de amplificação aleatória de DNA polimórfico a partir de amostras de tecidos isoladas de *Centropomus parallelus* a fim de assegurar maior reprodutibilidade e alto poder discriminatório dessa técnica. Um perfil eletroforético altamente variável foi detectado nas reações de amplificação aleatória do DNA genômico de robalo peva, sendo observados produtos amplificados com alta nitidez e tamanhos variando entre 100 a 3.000 pb. Os produtos de RAPD-PCR produziram um padrão de bandas altamente monomórfico, quando os *primers* AM13, OPW5 e OPA20 foram testados. Entretanto, consideráveis variações no tamanho e número de bandas amplificadas foram observadas apenas nas reações realizadas na presença do *primer* OPX4. As descobertas apresentadas no presente estudo descrevem o estabelecimento de determinados procedimentos experimentais a fim de viabilizar os ensaios de amplificação arbitrária a partir de amostras de DNA genômico de robalo peva *C. parallelus* por análises de RAPD. Tais descobertas criam reais possibilidades para o uso da técnica de RAPD-PCR como ferramenta auxiliar nas análises de variabilidade e diversidade genética entre populações de robalo peva *C. parallelus*, possibilitando futuramente o desenvolvimento de diferentes trabalhos genético-moleculares empregando tal procedimento experimental.

Palavras-chave: RAPD-PCR; *Centropomus parallelus*; Robalo peva; Otimização.

Abstract

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers are DNA fragments from PCR amplification of random segments of genomic DNA with single primer of arbitrary nucleotide sequence. Although this technique has some limitations, RAPD does not require any specific knowledge of the DNA sequence of the target organism unlike traditional PCR analysis. Within this context, the aim of the present study was to establish experimental procedure for the normalization of arbitrary amplification reactions from tissues isolated by fat snook Centropomus parallelus. Under these experimental conditions, a variable electrophoretic profile was revealed in RAPD-PCR from genomic DNA samples of fat snook, whose amplified products had great clearness with molecular sizes ranging from 100 to 3,000 bp. RAPD-PCR products generated monomorphic DNA fragments, when the primers AM13, OPW5 and OPA20 were tested. Nevertheless, considerable variations in the size and number of amplified products were detected exclusively in reactions performed in the presence of primer OPX4. The results presented in this study describe the optimization of experimental procedure in order to normalize the steps involved in arbitrary amplification reactions from genomic DNA samples of fat snook. These findings create real possibilities for the use of RAPD-PCR as powerful tool in genetic variability and diversity between populations of fat snook C. parallelus, leading to further development of distinct molecular genetic analysis by using such experimental approach.

Keywords: RAPD-PCR; Centropomus parallelus; Fat snook; Optimization.

INTRODUÇÃO

Com o advento das técnicas empregando segmentos de DNA como marcadores moleculares, grandes avanços têm sido registrados nas últimas décadas no que se refere à identificação de espécies e híbridos; estabelecimento da filogenia da espécie e da população; determinação da estrutura populacional de uma espécie; identificação de linhagens; contribuição individual de uma população em um estoque que está sendo explorado; variação genética em populações selvagens e cultivadas; determinação do impacto genético da introdução de espécies cultivadas em populações naturais; determinação de estratégias de cruzamento para fins de criação e repovoamento; localização de marcadores associados a genes envolvidos com caracteres de interesse econômico (1).

Particularmente, os marcadores de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD, *Random Amplified Polymorphic DNA*) são altamente eficazes na identificação de variações no DNA genômico entre subespécies ou populações de várias espécies; identificar linhagens distintas e determinar o impacto genético da introdução de espécies cultivadas em populações naturais (1). Segundo Hilsdorf et al. (2), análises de RAPD representam o

segundo marcador mais empregado nos estudos anteriormente citados. Tal técnica consiste basicamente em uma variação do protocolo da reação em cadeia da polimerase, utilizando uma única pequena sequência de oligonucleotídeos (*primers*), capazes de amplificar regiões arbitrárias do genoma (3, 4). Devido a seu fácil manuseio e reduzido número de etapas, é capaz de gerar resultados com certa rapidez em um curto período de tempo, a um baixo custo, comparado a outros marcadores. Além disso, não requer o conhecimento prévio do genoma em questão, emprega poucos nanogramas de DNA na presença de um número bem reduzido de reagentes e não exige instalações laboratoriais tão sofisticadas (3). Soma-se a todas essas vantagens, o fato que os marcadores RAPD asseguram a avaliação de um número elevado de genótipos em um curto prazo de tempo, além de sofrerem pouca influência ambiental (5).

Frente a esse cenário, o objetivo principal do presente estudo foi estabelecer ensaios experimentais para a otimização das etapas envolvidas na extração de DNA genômico e nas reações de amplificação a partir de amostras de tecidos isoladas de robalo peva *Centropomus parallelus* por análises de RAPD, a fim de garantir maior reprodutibilidade e alto poder discriminatório dessa técnica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e colheita dos animais

Vinte alevinos de robalo peva *Centropomus parallelus*, obtidos por reprodução induzida a partir de um *pool* de gametas sexuais oriundos de um único casal de reprodutores, foram empregados no presente estudo. Tais exemplares mantidos sob condições de cativeiro foram aleatoriamente colhidos de um mesmo reservatório instalado no Centro de Propagação e Produção de Organismos Marinhos CPPOM (25°51'50.72"S /48°33'52.99"W), localizado na cidade de Guaratuba (Estado do Paraná, Brasil). Imediatamente após a colheita, os animais foram estocados em etanol 95% e armazenados a - 20°C para posterior análise.

Extração de DNA genômico

Amostras de DNA genômico foram isoladas a partir de 50 mg de tecido muscular dorsal, como descrito por Wasko et al. (6). 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 ureia) na presença de 30 µL de proteinase K 10 mg/mL (Invitrogen). 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 promover a total lise dos tecidos. Posteriormente, 4mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foram adicionados em cada tubo, seguida 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 em 0,1 volume de NaCl 1 M e 0,6 volume de isopropanol absoluto. O precipitado de DNA genômico foi obtido por centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos, seguida por lavagem em 1 mL de etanol 70%. As amostras de DNA foram secas à temperatura ambiente por 30 minutos e ressuscitadas em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) na presença de 1 µL de RNase 10 mg/mL (Invitrogen). Após incubação a 37°C por 30 minutos, tais amostras foram estocadas a - 20°C. A concentração das amostras de DNA foi estimada por leitura ao espectrofotômetro (BECKMAN, BU530), sendo sua integridade verificada em géis de agarose 1,0%

preparados com tampão TAE 1X concentrado (9 mM Tris-HCl pH 7,5; 9 mM ácido bórico; 1 mM EDTA pH8,0), corados em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL e fotografados com sistema digital KODAK EDAS 290.

Reações de PCR-RAPD

O padrão de polimorfismo molecular observado nos exemplares de robalo peva foi investigado por análises de RAPD-PCR, baseando-se na amplificação de segmentos de DNA genômico a partir de quatro sequências oligonucleotídicas (OPW5 5'GGCGGATAAG3', OPX4 5'CCGCTACCGA3', OPA20 5'GTTGCGATCC3', AM13 5'CACGGCACAA3'). 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 e extensão a 72°C por 5 min, totalizando 40 ciclos. Controles negativos foram incluídos em cada experimento, onde alíquotas da mistura de reação de PCR foram amplificadas na ausência de DNA genômico.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% fundidas em tampão TAE 1X concentrado (40 mM Tris-HCl pH7,5, ácido acético 100%, 1mM EDTA pH 8,0), corados em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL e fotografados com sistema digital KODAK EDAS 290 para identificação e comparação das bandas amplificadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, ensaios experimentais foram conduzidos a fim de otimizar as diferentes etapas envolvidas nos processos de extração de DNA genômico e de amplificação por análises de RAPD a partir de amostras de tecidos isoladas de robalo peva *C. parallelus*.

Como observado na Figura 1, um perfil eletroforético altamente variável foi detectado nas reações de amplificação aleatória do DNA genômico de robalo peva, sendo observados produtos amplificados com alta nitidez e tamanhos variando entre 100 a 3.000 pb. Os produtos de

RAPD-PCR produziram um padrão de bandas altamente monomórfico, quando os *primers* AM13, OPW5 e OPA20 foram testados (Figuras 1A, B e C). Entretanto, consideráveis variações no

tamanho e número de bandas amplificadas foram observadas exclusivamente nas reações realizadas na presença do *primer* OPX4 (Figura 1D).

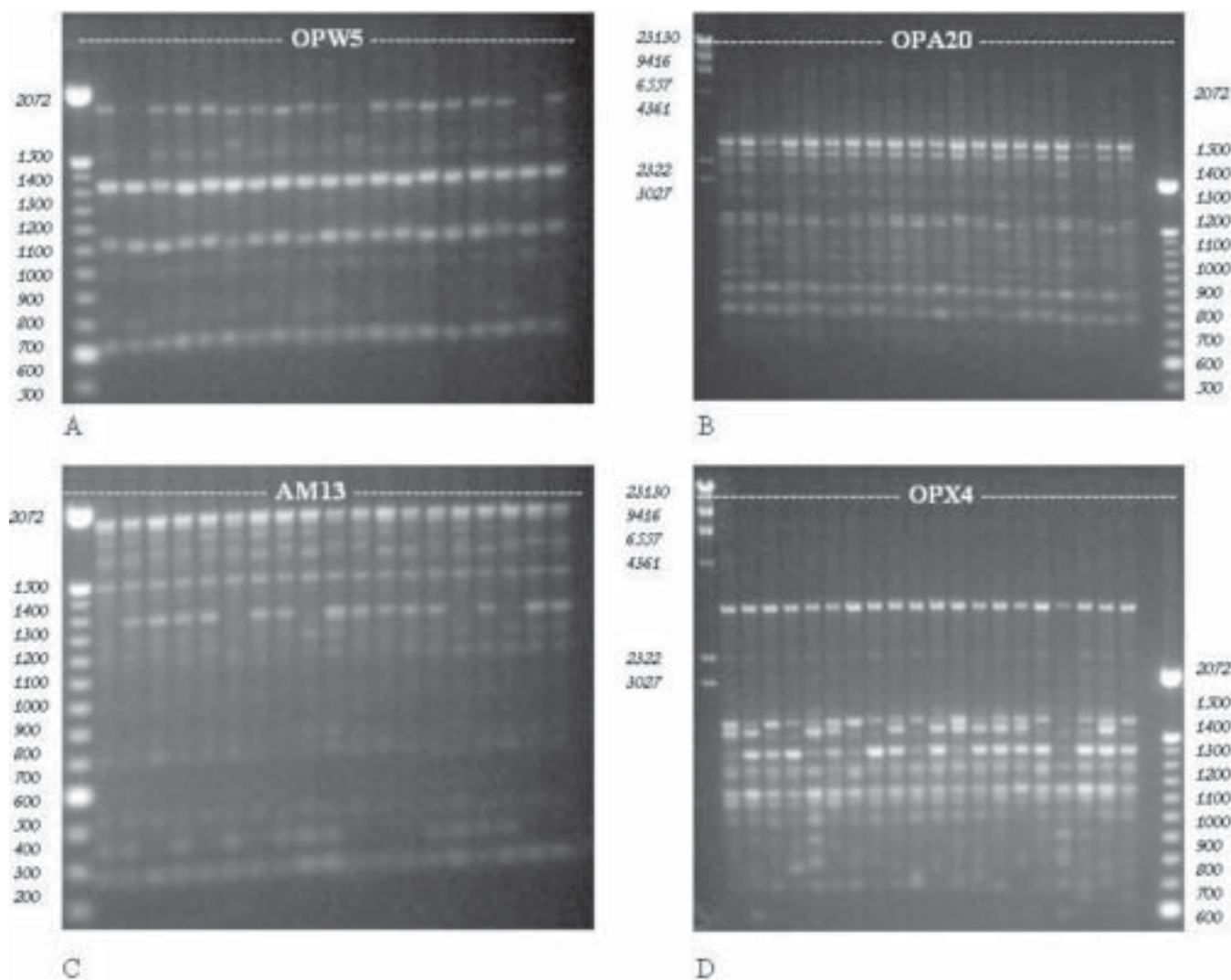


FIGURA 1 - Produtos de RSPD-PCR a partir de 10 ng de DNA genômico isolado de tecidos de robalo peva *Centropomus parallelus* na presença de distintas seqüências oligonucleotídicas. Primers OPW5 (A), OPA20 (B), AM 13 (C) e OPX4 (D). Marcadores de peso molecular (Amersham Biosciences e Invitrogen)

É preciso ressaltar que, em tais condições, foi detectada a presença de distintas bandas específicas altamente definidas quanto ao tamanho e intensidade em todos os exemplares de robalo peva nas reações de amplificação empregando os diferentes *primers* testados (Figura 1). Esses resultados caracterizam a amplificação de fragmentos de DNA que poderiam ser considerados “bandas marcadoras” para tal espécie. Em futuras etapas, novas estratégias experimentais poderão vir a empregar tais produtos de RAPD como instrumentos

complementares nos estudos de identificação e discriminação molecular entre espécimes de robalo peva *C. parallelus* e demais organismos.

Embora sejam marcadas por certas limitações, as RAPD-PCRs não exigem o conhecimento prévio da sequência de DNA, uma vez que as variações genômicas detectadas por tal método baseiam-se na diferença entre indivíduos da distribuição dos sítios complementares a um *primer* curto (10 bases) de sequência aleatória (7). A

partir de um único *primer* por reação, é possível verificar a geração de numerosos segmentos amplificados, cujas sequências são desconhecidas com tamanhos variáveis. Assim, assume-se que diferentes indivíduos produzem distintos padrões de fragmentos amplificados com base nas diferentes localizações dos sítios de hibridização dos *primers* ao longo da fita de DNA. Finalmente, as análises estatísticas são efetuadas baseando-se na distribuição, presença e ausência das bandas geradas pela reação de amplificação.

As descobertas apresentadas no presente estudo descrevem a otimização de determinados procedimentos experimentais a fim de viabilizar as reações de amplificação arbitrárias a partir de amostras de DNA genômico de robalo peva *Centropomus parallelus* por análises de RAPD. Vários relatos na literatura têm discorrido sobre as vantagens da técnica de RAPD-PCR como uma ferramenta poderosa nos estudos de caracterização da estrutura genética em uma grande variedade de populações de peixes (8, 9, 10, 11, 12, 13). Assim, novos *primers* deverão ser testados em ensaios adicionais de amplificação para a efetiva normalização de protocolos experimentais, favorecendo a detecção de perfis de amplificação altamente polimórficos. Particularmente, as análises de RAPD empregando amostras de robalo peva *C. parallelus* são de extrema importância aos programas de repovoamento da ictiofauna brasileira, uma vez que tal espécie é altamente atrativa devido à qualidade de sua carne, ao seu elevado valor comercial e sua grande importância para a subsistência de comunidades litorâneas. Futuramente, tais análises poderão fornecer novos subsídios para a utilização do marcador RAPD na diferenciação entre populações de *C. parallelus*, permitindo a avaliação da estrutura genética de populações cativas e selvagens de peixes. Nessas condições experimentais, a detecção de fragmentos de DNA em amostras de robalo peva reforça o uso potencial da técnica de RAPD-PCR na produção de dados de apoio, servindo de embasamento teórico-prático para as análises conduzidas em programas de repovoamento.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior/Unidade Gestora de Fundo Paraná SETI/UGF e da Prefeitura Municipal de Guaratuba (Estado do Paraná).

REFERÊNCIAS

1. Hilsdorf AWS, Krieger JE. Biologia molecular na conservação de peixes – ferramentas moleculares e conservação genética. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. [Online] 2005 [Acesso 2006 dez 12]. Disponível em: URL: http://www.biotecnologia.com.br/bio/5_j.htm
2. Hilsdorf AWS, Resende EK, Marques DKS. Genética e conservação de estoques pesqueiros de águas continentais no Brasil: situação atual e perspectivas. Embrapa Pantanal. [Online] 2006 [Acesso 2006 dez 12]. Disponível em: URL : <http://www.embrapa.br/publicacoes/online/doc82>
3. Ferreira ME, Grattapaglia D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: Embrapa-Cenargen; 1998.
4. Leuzzi MSP, Pereira AC, Galhardo E, Foresti F, Moreira JA. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. Genetics Molecular Biol. 2004; 27:355-62.
5. Costa MR, Cardoso ER, Ohaze MMM. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. Ciênc Agrotec. 2003;1:158-64.
6. Wasko AP, Martins C, Oliveira C, Foresti F. Non-destructive genetic in fish. an improved method for DNA extraction from fish and scales. Hereditas. 2003; 138:161-5.
7. Marques DKS. Caracterização genética do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da Bacia Tocantins-Araguaia, Estado do Mato Grosso. [Tese] São Carlos: Universidade Federal de São Carlos UFSCar; 2003.
8. Callejas C, Ochando MD. Phylogenetic relationships among Spanish *Barbus* species (Pisces, Cyprinidae) show by RAPD markers. Hereditas. 2002;89:36-43.
9. Dergam JA, Paiva SR, Schaeffer CE, Godinho AL, Vieira F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. Genetics Molecular Biol. 2002;25:379-87.

10. Prioli SMAP, Prioli AJ, Pavanelli CS, Júlio Jr HF, Carraro DM, Carrer H et al. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics Molecular Biol.* 2002;25:421-30.
11. Oliveira C, Pereira AC, Galhardo E, Foresti F, Moreira JA. Análise genética de populações selvagens de curimatá (*Prochilodus lineatus*) e lambari (*Astyanax altiparanae*) do rio Paranapanema, utilizando marcadores de RAPD. [Online] 2005 [Acesso 2006 dez 12]. Disponível em: URL: <http://citenel.aneel.gov.br/historico%5Citenel%5Ctrabalhos%5C19.pdf>
12. Povh JA, Moreira HLM, Ribeiro RP, Prioli AJ, Vargas L, Blanck DV, et al. Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Animal Sci.* 2005;27:1-10.
13. Lidani KCF, Lima JR, Torres RA, Gabriel JE, Madeira HMF, Carneiro PCF. Variabilidade genética de um estoque cativo de jundiá (*Rhamdia quelen*). *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais.* 2006;4:47-56.

Recebido: 02/01/2007

Received: 01/02/2007

Aceito: 13/02/2007

Accepted: 02/13/2007