

### Variabilidade genética de estoques de *Colossoma macropomum*, utilizando RAPD<sup>1</sup>

Annaiza Braga Bignardi<sup>2</sup>, Nelson Mauricio Lopera-Barrero<sup>3</sup>, Ricardo Pereira Ribeiro<sup>4</sup>, Gleice Kellen Bassi<sup>5</sup>, Mariana Stucki Alves<sup>5</sup>, Mário Luiz Santana Júnior<sup>6</sup>, Jayme Aparecido Povh<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Projeto financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso – FAPEMAT.

<sup>2</sup>Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional do CNPq - Nível C do curso de Zootecnia, UFMT/CUR/ICAT, Rondonópolis-MT.

<sup>3</sup>Docente do curso de Zootecnia UEL Londrina-PR.

<sup>4</sup>Docente do curso de Zootecnia UEM Maringá-PR.

<sup>5</sup>Discente do curso de Zootecnia UFMT/CUR/ICAT, Rondonópolis-MT.

<sup>6</sup>Docente do curso de Zootecnia UFMT/CUR/ICAT, Rondonópolis-MT, jayme.peixegen@gmail.com.

**Resumo:** O objetivo no presente estudo foi analisar a diversidade genética de três estoques de reprodutores de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) utilizados na composição da população base do programa de melhoramento genético em desenvolvimento no estado de Mato Grosso. Para a estimação do valor de variabilidade genética foi utilizado o marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Foram selecionados seis primers que apresentaram as melhores características de amplificação e reprodutibilidade. Os seis primers produziram 83 fragmentos polimórficos. A variabilidade genética dentro de cada estoque de Tambaqui foi de moderada a alta, sugerindo que as condições de manejo têm garantido a manutenção da variabilidade genética. Existe diferenciação genética entre os estoques A, B e C.

**Palavras-chave:** peixe, tambaqui, variabilidade genética

### Genetic variability *Colossoma macropomum* broodstocks, using RAPD

**Abstract:** The aim this study was to analyze the diversity of three Tambaqui (*Colossoma macropomum*) broodstocks used in the composition of the population base of the breeding program in developing the state of Mato Grosso. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used to estimate the value of genetic variability. Six primers that showed the best characteristics and reproducibility of amplification were selected. The six primers produced 83 polymorphic fragments. The genetic variability each stock Tambaqui was moderate to high, suggesting that management conditions have ensured the maintenance of genetic variability. There is genetic differentiation among stocks A, B and C.

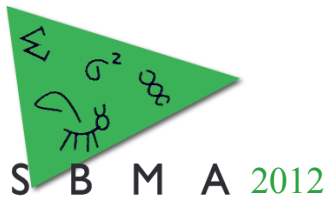
**Keywords:** fish, genetic variability, tambaqui

### Introdução

A produção aquícola brasileira tem apresentado um grande avanço na última década. Dentre as espécies nativas cultivadas no Brasil, o tambaqui é o primeiro organismo aquático mais produzido. A espécie tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe que pertence à ordem Characiforme e família Characidae e sub-família Myleinae, é nativo da bacia Amazônica. Tendo como base a importância econômica da espécie *C. macropomum* é imprescindível identificar a variabilidade genética nos estoques de reprodutores para iniciar um programa de melhoramento genético. Um tipo de marcador que vem sendo bastante utilizado para a estimação do valor de variabilidade genética em populações, espécies e linhagens de peixes é o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). O objetivo no presente estudo foi analisar a diversidade genética de três estoques de reprodutores de Tambaqui (*C. macropomum*) utilizados na composição da população base do programa de melhoramento genético em desenvolvimento no estado de Mato Grosso.

### Material e Métodos

Foram utilizadas 24 amostras do estoque A, 14 amostras do estoque B e 14 amostras do estoque C. Para extração de DNA foi utilizada a metodologia descrita Lopera-Barrero et al. (2008). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Shimadzu com absorvância de 260nm. As amostras foram diluídas



## IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

para uma concentração de 10ng/μL. O DNA foi amplificado em um volume de reação de 15μL, no qual se utilizou tampão 1X Tris-KCl, 2,0mM MgCl<sub>2</sub>, 0,46μM primer, 0,2mM de cada dNTP, uma unidade de Platinun Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, EUA), e 10ng de DNA alvo. O DNA foi desnaturado a 94°C por quatro minutos e em seguida foram realizados 40 ciclos, cada um consistindo de: um minuto de desnaturação a 94°C, um, minutos e 30 segundos de anelamento do primer a 40°C e dois minutos para extensão a 72°C. Em seguida realizou-se uma extensão final a 72°C por sete min. As reações de RAPD foram amplificadas em um termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (EUA). Foram escolhidos oito diferentes primers de 10 bases dos Kits OPA, OPX e OPW (Operon Technologies Ltd., EUA) que apresentaram melhor definição e reprodutibilidade. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5%. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 0,5X (45mM Tris-Borato e 1mM EDTA) por quatro horas a 70 volts. Os géis de quantificação e amplificação foram visualizados sob radiação UV, depois da sua exposição com brometo de etídio (0,5μg/ mL) por uma hora. A imagem foi fotografada utilizando o programa Kodak EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5, EUA). O tamanho dos fragmentos obtidos com as amplificações foi estimado por comparação com o padrão ladder 100 pb (Invitrogen®, EUA). A presença ou ausência de fragmentos de tamanhos moleculares idênticos foi usada para a construção de uma matriz de similaridade com base no cálculo no coeficiente de similaridade de Jaccard, codificando 1 como presença de fragmento e 0 como sua ausência. O índice de diversidade genética de Shannon, a percentagem de fragmentos polimórficos e a diversidade genética foram obtidos com o programa PopGene 1.31 (Yeh et al., 1999).

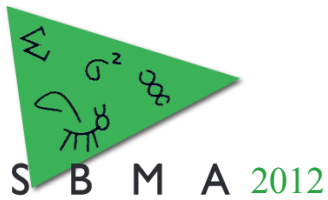
### Resultados e Discussão

Foram selecionados seis primers que apresentaram as melhores características de amplificação e reprodutibilidade. Os seis primers produziram 83 fragmentos polimórficos. O número de fragmentos nítidos e reproduzíveis geradas por primer variaram de 11 até 18, com tamanho entre 160 e 1500 pb (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências de nucleotídeos dos *primers*, porcentagem de bases pirimidínicas G + C, número de fragmentos, número de fragmentos polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados para os estoques de Tambaqui (*C. macropomum*).

Primers	Seqüência de nucleotídeos (3' → 5')	% (G+C)	Nº de fragmentos	Tamanho dos fragmentos (pb)
OPA02	5'-TGCCGAGCTG-3'	70	18	160-1150
OPW04	5'-CAGAAGCGGA-3'	60	11	250-1500
OPW05	5'-GGCGGATAAG-3'	60	12	120-1400
OPW06	5'-AGGCCCGATG-3'	70	14	210-1500
OPX02	5'-TTCCGCCACC-3'	70	13	360-1450
OPX04	5'-CCGCTACCGA-3'	70	15	310-1500
Total	-	-	83	160-1500

A porcentagem de fragmentos polimórficos e o índice de Shannon encontrados foram, respectivamente, 87,9% e 0,468 para o estoque A, 67,5% e 0,355 para o estoque B e 78,3%, 0,401 para o estoque C. Os valores observados para os estoques A e C indicam uma alta variabilidade, sugerindo uma alta variabilidade genética intrapopulacional. Já o valor encontrado para o estoque B, indica uma menor variabilidade em relação aos estoques A e C. A diversidade genética entre populações, parâmetro que mede o grau de diferenciação entre populações e que segundo Wright (1978) pode ser classificada baixa diferenciação genética (0,00 a 0,05), média (0,05 a 0,15) e alta (0,15 a 0,25), foi muito alta (0,288) entre os estoques A e B, moderada (0,106) entre estoques A e C e alta entre os estoques B e C. Desta forma, os



## IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

valores obtidos indicam que houve uma diferenciação genética de moderada a alta entre os estoques, portanto, existe heterogeneidade entre os estoques estudados.

### **Conclusões**

A variabilidade genética dentro de cada estoque de Tambaqui foi de moderada a alta, sugerindo que as condições de manejo têm garantido a manutenção da variabilidade genética. Existe diferenciação genética entre os estoques A, B e C.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso – FAPEMAT pelo apoio financeiro.

### **Literatura citada**

LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P. et al. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). **Ciencia e Investigación Agraria**, v.35, n.1, p.77-86, 2008.

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations**. 1.ed. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 511p.

YEH, F. C.; BOYLE, T. Y. Z.; XIYAN, J. M. **PopGene Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. University of Alberta and Center for International Forestry Research, Alberta, 1999. 29 p.