

Comparação de protocolos para extração do DNA de *Lernaea* sp. (Copepoda: Cyclopoida)

Marivone Valentim^{1*}, Lauro Vargas², Héden Marques Moreira² e Ricardo Pereira Ribeiro²

¹Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina, Rua Pioneiro, 2153, 85950-000, Palotina, Paraná, Brasil. ²Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: marvalentim@yahoo.com.br

RESUMO. Neste estudo, 30 amostras de fêmeas adultas de *Lernaea* sp. foram obtidas de peixes naturalmente infestados, em 2 pisciculturas na região norte do estado do Paraná, Brasil. Testaram-se 2 protocolos de extração do DNA para os tecidos do parasito. Os resultados obtidos revelaram o protocolo, utilizando o “Kit Puregene DNA Isolation” (GENTRA) para tecidos sólidos, como adequado para extração do DNA genômico de *Lernaea*. O método, utilizando protocolo CTAB, descrito por Black IV *et al.* (1996), modificado para a extração do DNA de *Lernaea* sp., foi tido como não-adequado, pois não houve extração do DNA.

Palavras-chave: Crustacea, *Lernaea*, DNA, protocolos de extração.

ABSTRACT. Comparison of DNA extraction protocols in *Lernaea* sp. (Copepoda: Cyclopoida). In this study thirty samples of adult females of *Lernaea* sp. were collected from naturally infested fishes at two fisheries in northern Paraná, Brazil. Two protocols of DNA extraction were tested for parasites tissues. The results have shown that the protocol using Kit Puregene DNA Isolation (GENTRA) was adequate for genomic DNA extraction in *Lernaea*. The methodology using CTAB protocol, described by Black IV *et al.* (1996), modified for DNA extraction in *Lernaea* sp., did not work properly.

Key words: Crustacea, *Lernaea*, DNA, extraction protocols.

Introdução

Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção da variabilidade genética ao nível de sequência do DNA, como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), minisatélites e microsátélites, na detecção de polimorfismo genético. Essas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares, cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética, quanto na prática de melhoramento de plantas e de animais (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

As técnicas, anteriormente citadas, requerem uma quantidade suficiente de DNA de boa qualidade, o que é particularmente problemático com pequenos animais. Nesses casos, mostram-se extremamente necessárias metodologias específicas, que possam otimizar a extração do DNA de boa qualidade de uma amostra (Waldschmidt *et al.*, 1997).

Os crustáceos são importantes parasitos de peixes, frequentemente encontrados em hospedeiros de águas marinhas e dulciaquícolas. O número de parasitos é

bastante elevado e, somente nos copépodes, contam-se mais de 1.900 espécies. Sob o ponto de vista econômico, a parasitose é relevante, pois pode ser causa direta da mortalidade elevada de alevinos e de adultos nas pisciculturas, além de poder atuar como vetor de outras doenças, de etiologia vírica e, presumivelmente, de hemoparasitoses (Eiras, 1994).

Dentro dos copépodes, pertencentes à família Lernaeidae, parasitos do gênero *Lernaea* são considerados bastante patogênicos para peixes de água doce, sob o ponto de vista da pesca e da piscicultura. Na Ásia, Europa, América do Norte e Oceania, esse copépode tem causado danos significativos e intensivos. Introduzido no Brasil por volta de 1986-87, provavelmente em lotes de carpas importadas, *Lernaea* é encontrada na maioria dos estados onde a piscicultura é mais intensamente desenvolvida (Boeger e Santos Neto, 1993).

São poucos os métodos avaliados para a extração do DNA de crustáceos na literatura, especialmente para *Lernaea*. O presente estudo, o primeiro no Brasil, foi realizado com o objetivo testar diferentes protocolos para a extração do DNA de tecidos de *Lernaea* sp., visando à utilização do mesmo em análises genéticas para estudos de sistemática.

Material e métodos

Coleta e acondicionamento do material

Os espécimes de *Lernaea* (fêmeas adultas) foram coletados de piraputangas (*Brycon* sp.) e cultivados no município de Cornélio Procopio, no Estado do Paraná, os quais se apresentavam naturalmente infestados.

O material foi acondicionado em tubos de microcentrifuga, contendo álcool 70% e transportado em temperatura ambiente até o laboratório, para ser armazenado sob temperatura de -20°C, para posterior extração do DNA.

Preparação das amostras teciduais

As fêmeas adultas de *Lernaea* foram seccionadas para a retirada de tecidos exógenos e dos sacos ovíferos, sendo então, processadas individualmente. O tecido restante foi macerado em nitrogênio líquido, para sua utilização em ambos os protocolos testados. A maceração foi realizada com auxílio de cadinho e pistilo. Amostras sem a etapa de maceração, apenas seccionadas, foram utilizadas somente no protocolo II.

Extração de DNA dos tecidos

Dois métodos diferentes foram testados:

I) Protocolo utilizando hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), descrito por Black IV *et al.* (1996), com algumas modificações;

II) Protocolo com “Kit Puregene DNA Isolation” (GENTRA), para extração de DNA de tecidos sólidos, modificando apenas a quantidade de proteinase K.

Protocolo I

A amostra tecidual, a ser extraído o DNA, foi suspensa em 500µL de tampão de extração (100mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4M NaCl; 0,02M EDTA; 2% CTAB 0,2%; 2-mercaptoetanol e 100µg/mL proteinase K); incubada a 65°C durante 60 minutos; desproteinizada, em seguida, uma vez, com fenol: clorofórmio (1:1); e após, centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos. Retirado o sobrenadante, realizou-se a precipitação do material com um volume de etanol a 95,5%, depois, centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. Após, desprezado o sobrenadante, o sedimento (podendo não ser visível) foi lavado uma vez com etanol 70%, centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos e seco ao ar, durante 30 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 50µL TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA), incubado com RNase A (100mg/mL), durante 30 minutos a 37°C, e armazenado sob temperatura de -20°C, para posterior quantificação.

Protocolo II

A amostra tecidual, a ser extraído o DNA, foi suspensa em 300µL solução de lise, adicionado 7µL da solução de Proteinase K (20mg/mL), invertida 10 vezes e incubada à 55°C durante 14 à 16 horas. Subseqüentemente, 1,5µL da solução de RNase A Solution foi adicionada ao lisado que permaneceu incubado à 37°C, durante 15 minutos. Procedeu-se, então, à precipitação de proteínas, utilizando-se 100µL da solução para tal processo, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi removido para um novo tubo de microcentrifuga, contendo 300µL de Isopropanol 100% (2-propanol), invertendo-se, gentilmente, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto.

O sedimento formado foi lavado com etanol 70%, centrifugado a 10.000 rpm por um minuto e depois seco ao ar, durante 30 minutos. Finalmente, foram adicionados 50µL da solução de hidratação e estocados sob temperatura de -20°C, para posterior quantificação.

Análise e quantificação do DNA total

As amostras de DNA extraído foram analisadas através da eletroforese em gel de agarose 0,7%, em tampão TAE (400mM Tris-acetato; 10mM EDTA), e corados com brometo de etídio, com a finalidade de verificar a integridade e a quantidade de DNA.

A quantificação do DNA foi realizada por meio da comparação entre a intensidade das bandas visualizadas nas amostras extraídas, com aquela observada nos padrões de DNA lambda, que apresentam as concentrações de 5, 10 e 20ng/mL.

Resultados e discussão

Coleta e preparação do material

Ao examinar as fêmeas adultas de *Lernaea* coletadas, no microscópio estereoscópico, observou-se que a maioria apresentava tecido exógeno ao redor do pescoço dos parasitos, os quais foram identificados como fungos com auxílio do microscópio ótico. Preso ao órgão de fixação (âncoras) dos copépodes, encontramos, em alguns casos, tecidos do hospedeiro. Para que a extração do DNA seja adequada, é importante a obtenção de tecidos bem preservados e livres de tecidos exógenos, sendo que, no caso de parasitos, de preferência que os mesmos estejam vivos no momento da coleta. Ferreira e Grattapaglia (1996), trabalhando com plantas, ressaltam que uma das considerações mais importantes em qualquer procedimento de extração de DNA de plantas é a maneira utilizada para coletar e preservar os tecidos e que, embora o DNA tenha sido isolado com sucesso de amostras herbarizadas, ou mesmo de fósseis, a quantidade e a qualidade de DNA em geral são afetadas, significativamente, pela condição do tecido antes da extração.

Protocolos de extração de DNA

Foram observadas diferenças nos protocolos testados para fêmeas adultas de *Lernaea*. Na Figura 1, podemos observar que o protocolo I, descrito por Black IV *et al.* (1996) com algumas modificações, não foi adequado para a extração do DNA de tecidos de *Lernaea* sp., pois não houve detecção de DNA no gel de eletroforese.

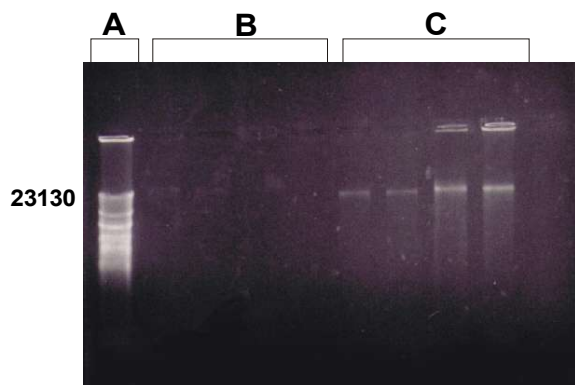


Figura 1. Análises eletroforéticas de DNA genômico extraído de *Lernaea* (fêmea adulta). A) λ HindIII; B) Quatro amostras submetidas ao método CTAB descrito por Black-IV (1996) modificado; C) Quatro amostras utilizando o Kit Puregene DNA Isolation (GENTRA)

Os protocolos utilizando CTAB são amplamente usados para extração de DNA de plantas, fungos, artrópodes e, segundo Waldschmidt *et al.* (1997), ao testarem os protocolos CTAB para *Melipona quadrifasciata*, observaram que mesmo pequenas modificações nas concentrações dos componentes poderiam alterar, significativamente, o resultado final das extrações.

Porém, o protocolo II “Kit Puregene DNA isolation” (Gentra) para tecidos sólidos mostrou-se adequado para a extração do DNA de *Lernaea* (Figura 1), tanto para parasitos seccionados e macerados em nitrogênio líquido, quanto para os somente seccionados, sem a etapa trabalhosa de maceração no nitrogênio líquido, obtendo-se uma extração de DNA satisfatória, em torno de 5ng/mL.

Essa metodologia tem sido empregada com êxito em experimentos para extração do DNA de tecidos animais como, por exemplo, de *Drosophila*, de invertebrados, de invertebrados marinhos, de cauda de camundongo e de alguns nematódeos (Lis *et al.*, 1983; Bubbboni, 1985).

Assim, os resultados acima denotam que devem ser tomados cuidados para que não haja contaminação das amostras de *Lernaea* com DNA exógeno, principalmente do tecido do hospedeiro e de outros organismos que possam prender-se ao corpo das fêmeas parasitas.

O protocolo CTAB testado não foi adequado para a extração do DNA de *Lernaea*, porém alterações na concentração dos componentes específicos utilizados no mesmo podem ser realizadas na busca de um resultado positivo.

O protocolo, utilizando o “Kit Puregene DNA isolation” (Gentra), mostrou-se adequado para a extração do DNA de *Lernaea*, sendo sua utilização bastante prática e eficiente, sem que houvesse a necessidade de maceração dos tecidos do copépode. Como vantagens, temos, ainda, uma extração de DNA satisfatória, em torno de 5ng/mL e a baixa toxicidade da metodologia, mostrando-se bastante segura para o manipulador.

Agradecimentos

Os autores são gratos à Biosystems/Brasil pela doação do “Kit Puregene DNA isolation” (Gentra) utilizado neste estudo.

Referências

- BLACK IV, W. C. *et al.* Phylogenetic Relationships among Tick Subfamilies (Ixodida: Ixodidae: Argasidae) Based on the 18 S Nuclear rDNA Gene. *Mol. Phylogenet. Evol.*, Orlando, v.7, n.1, p.129-144, 1996.
- BOEGER, W. A.; SANTOS-NETO, M. *Lernaea cyprinacea* melhor prevenir. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, v.3, n.17, p.12-13, 1993.
- BUBBONE, G. J. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin. Chem.*, Washington, DC, v.31, p.164-165, 1985.
- EIRAS, J. C. *Elementos de ictioparasitologia*. Porto: Fundação Eng. Antônio de Almeida, 1994.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1996.
- LIS, J. T. *et al.* New heat shock puffs and β -galactosidase activity resulting from transformation of *Drosophila* with the hsp70-lacZ hybrid gene. *Cell*, Cambridge, v.35, p.403-410, 1983.
- WALDSCHMIDT, A. M. *et al.* Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Braz. J. Genet.*, Ribeirão Preto, v.20, n.3, p.421-423, 1997.

Received on October 10, 2001.

Accepted on October 10, 2003.

