

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Brachyplatystoma* (SILURIFORMES: PIMELODIDAE) COM BASE EM PCR-RFLP DA REGIÃO CONTROLE DO DNA MITOCONDRIAL

Rute Gomes MACEDO¹; Jacqueline da Silva BATISTA²; Adriel Lira CORDEIRO³

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Orientador LTBM/CBIO/INPA; ³Colaborador Biólogo/INPA

1. Introdução

Os bagres amazônicos (Siluriformes), também conhecidos como peixes “lisos” ou de “couro”, representam cerca de 55% da captura total de peixes na região amazônica, Batista e Alves-Gomes (2006). A dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) destaca-se por ser a espécie mais pescada entre as espécies de bagres migradores mais exploradas na Amazônia, possuindo ampla distribuição na bacia amazônica, ultrapassa corredeiras e é encontrada em cabeceiras de muitos tributários (Barthem e Goulding 1997). A piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*) é um bague da Família Pimelodidae e Possui uma ampla distribuição na Bacia Amazônica, presente entre os canais dos rios principais, incluindo os tributários de águas brancas, preta e clara, nos lagos de várzeas e na parte de água doce da foz amazônica (Barthem e Goulding 1997).

Por possuir duas espécies conhecidas (*B. filamentosum* e *B. capapretum*), as piraíbas são diferenciadas através da dentição da pré-maxila e formato da nadadeira caudal, o que é dificultado pelo fato de muitos exemplares de piraíba chegarem descabeçados aos portos de desembarque pesqueiro (Lundberg e Akama 2005; Petrere Jr *et al.* 2005). Huergo *et al.* (2011) conseguiram a diferenciação molecular destas duas espécies de piraíba com base no sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial de amostras coletadas ao longo da Amazônia Brasileira. Estes autores estipularam, com base na identificação molecular que a frequência média de captura das espécies pela pesca comercial e verificaram que 670 toneladas de *B. capapretum* podem ter sido capturadas como *B. filamentosum* nos anos de 2001 e 2004 em nove regiões da Amazônia brasileira.

Em estudos de populações A região controle do genoma mitocondrial é freqüentemente usada devido à alta variabilidade em suas sequências de nucleotídeos (Pereira, 2000). Com isso, em decorrência da dificuldade de identificação desses peixes nas feiras, frigoríficos e portos, além do fato desses peixes chegarem descabeçados, este projeto propôs discriminar geneticamente indivíduos de piraíba (*B. filamentosum*), piraíba preta (*B. capapretum*) e dourada (*B. rousseauxii*) de cinco localidades da Amazônia Brasileira (Belém, Tabatinga, Rio Madeira, Rio Branco e Tefé).

2. Material e Métodos

Foram utilizados 76 exemplares (entre 11 a 20/por localidade) de “piraíba” (*Brachyplatystoma filamentosum* ou *Brachyplatystoma capapretum*) para correta discriminação além de 6 a 20 indivíduos distribuídos entre outras três espécies de *Brachyplatystoma*. Os exemplares foram amostrados entre os anos de 2005 a 2012, provenientes de cinco regiões da bacia amazônica (Belém, Tefé, Tabatinga, rio Madeira e rio Branco).

Uma sequência de DNA consenso completa da região controle do DNA mitocondrial foi obtida para três espécies de *Brachyplatystoma* a partir de sequências disponíveis em bancos públicos (*GenBank*) e no banco de dados do projeto PIRADA (Huergo 2009; Batista 2010; Formiga-Aquino 2004; Rodrigues 2009). Para a seleção das enzimas e construção dos mapas de restrição enzimática foi utilizado o programa NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.* 2003) através das sequências consenso obtidas. Foi observado o sítio de corte de cada enzima, com o intuito de se checar sítios conservados para cada espécie, permitindo assim a correta identificação.

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas e previamente sequenciadas do banco tecidos de pesquisa do projeto PIRADA/INPA (Manejo e Conservação dos Grandes Bagres Migradores) referente a cinco espécies de bagres amazônicos para teste das enzimas de restrição. O teste para validação das enzimas foi realizado em quatro indivíduos por espécie, para comparação com os padrões de bandas do mapa de restrição gerado pelo programa NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.* 2003). Posteriormente foi utilizado cerca de 50 indivíduos de piraíba extraídas com o método que utiliza Fenol-Clorofórmio com modificações (Sambrook *et al.* 1989).

Para amplificação da região controle foram utilizados os *primers* de PCR FTTP (Batista, 2010) e F12R (Sivasundar *et al.* 2001). O protocolo para a reação de PCR seguido foi conforme descrito em Batista e Alves-Gomes (2006). As digestões foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante totalizando um volume final de reação de 10µL. Os produtos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% submetidos a 80 V por 1h e 30 minutos e corados por GelRed (*Biotium*). O tamanho dos fragmentos foi comparado com marcador de bandas conhecidas *Ladder 1kb plus* (Sinapse Biotecnologia).

3. Resultados e Discussão

Foram testadas cinco enzimas de restrição de corte e temperatura de reação específica (*Eco RV*, *Hae III*, *Alu I*, *Bfa I* e *Pci I*), com base no mapa virtual de restrição gerado pelo do programa NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.* 2003). Foi comparado o perfil de clivagem de cada enzima selecionada, mantendo apenas estas com corte em sítios conservados para cada espécie. A partir do perfil de clivagem da enzima *Alu I*, foi possível discriminar *Brachyplatystoma capapretum* das demais espécies. Com o perfil gerado para *Hae III*, foi possível discriminar indivíduos de *B. rousseauxii* das demais duas espécies. A enzima *Pci I* diferenciou indivíduos de *B. capapretum* das demais duas espécies *B. rousseauxii* e *B. filamentosum*. As diferenças dos fragmentos gerados pela enzima *Bfa I* permitiu discriminar *B. filamentosum*, *B. capapretum* e *B. rousseauxii*. O perfil gerado para *Eco RV* permite uma diferenciação de *B. capapretum* das demais espécies.

O número de amostras com região controle amplificadas em cada uma das cinco espécies de *Brachyplatystoma* testadas e dessas a quantidade que foi clivada com cada uma das cinco enzimas de restrição testadas estão apresentadas na tabela 1. Das 76 amostras de “piraíba” foi possível identificar 46 exemplares referentes às duas espécies, sendo 09 como *B. capapretum* e 37 como *B. filamentosum* (Tabela 02). O maior número de *B. capapretum* foi encontrado em Tabatinga e de *B. filamentosum* em Rio Branco.

Tabela 01. Panorama geral de cinco enzimas de restrição selecionadas, para realização do teste por digestão enzimática com as espécies *Brachyplatystoma capapretum*, *B. filamentosum* e *B. rousseauxii*, mostrando quantidade de amostras clivadas por cada enzima.

Espécies	N°. PCR amplificado	<i>Alu I</i>	<i>Hae III</i>	<i>Bfa I</i>	<i>EcoRV</i>	<i>Pci I</i>
<i>B. filamentosum</i>	15	12	14	3	3	4
<i>B. capapretum</i>	19	18	18	4	4	4
<i>B. rousseauxii</i>	20	12	13	4	4	3
Total	54	42	45	11	11	11

Tabela 02. Panorama de discriminação molecular por digestão enzimática entre *Brachyplatystoma capapretum* e *B. filamentosum*, oriundas de cinco localidades estudadas.

Local	N°. PCR	N°. PCR amplificado	<i>Alu I</i>	<i>Bfa I</i>	<i>Eco RV</i>	<i>Pci I</i>	<i>Bc*</i>	<i>Bf*</i>
Belém	20	07	06	0	01	0	2	5
Tefé	14	04	04	0	0	0	2	2
Rio Madeira	11	11	-	06	07	07	2	9
Rio Branco	15	12	-	10	11	12	-	12
Tabatinga	16	12	12	-	-	-	3	9
Total	76	46	22	16	19	19	9	37

* Número de indivíduos identificados como *Bc* (*Brachyplatystoma capapretum*) e *Bf* (*B. filamentosum*).

Os n°s nas colunas se referem às amostras que foram digeridas por enzima e localidade.

0 amostras que não foram digeridas

- não possuem amostras dessas localidades nessas enzimas

Usando essa abordagem de enzima de restrição como método rápido para identificação de espécies Cocolin *et al.* (2000) usaram seis espécies de peixes marinhos afim de evitar a fraude através da substituição de espécies comercializadas. As espécies *Umbrina Cirrhosa* e *Dentex* são peixes de menor valor e seriam substituídos por robalo e dourada. Dessa forma utilizaram a técnica com enzima de restrição em que foi possível encontrar duas enzimas (*Hae III* e *Nla III*) que tiveram padrões de bandas discriminantes para todas as cinco espécies estudadas. No presente estudo em que espécies de bagres são comercializadas como uma única espécie foi possível obter pelo menos cinco endonucleases discriminantes entre três espécies de *Brachyplatystoma*: *B. rousseauxii*, *B. capapretum* e *B. filamentosum*. Em que quatro delas foram discriminantes para as espécies de piraíba em foram possíveis identificar 09 *B. capapretum* e 37 *B. filamentosum* entre os 40 indivíduos amostrados e comercializados como uma única espécie de piraíba em cinco pontos de desembarque pesqueiro na Amazônia brasileira.

4. Conclusão

Os marcadores moleculares obtidos neste trabalho, através das técnicas de PCR-RFLP mostraram-se eficientes para uma identificação rápida e confiável das espécies de “piraíba” e dourada já que as Cinco enzimas utilizadas apresentaram-se discriminantes entre as três espécies: uma para *Brachyplatystoma rousseauxii* (*HAE III*), uma para *B. filamentosum* (*Bfa I*), e três para *Brachyplatystoma capapretum* (*Pci I*, *Eco RV* e *Alu I*). Dessa forma, pode-se

dizer que foi obtido um kit de identificação molecular para as três espécies de *Brachyplatystoma*, contendo cinco endonucleases, como produto biotecnológico no presente estudo.

5. Referências Bibliográficas

- Barthem, R.B.; Goulding, M.G.; 1997. *Os Bagres Balizadores Ecologia, Migração e conservação de peixes amazônicos*. Instituto de Proteção Ambiental do Estado do Amazonas. Tefé, 140 pp.
- Batista, J.S. 2010. *Caracterização genética da dourada - Brachyplatystoma rousseauxii, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo*. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. Amazonas. 148 pp.
- Batista, J.S.; Alves-Gomes, J.A. 2006. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetics and Molecular Research*, 5: 723-740.
- Cocolin, I.; D'agaro, E.; Manzano, M.; Lanari, d.; Comi, G. 2000. rapid pcr-rflp method for the identification of marine fish fillets (seabass, seabream, umbrine, and dentex). *Journal of Food Science*.
- Formiga-Aquino, K. 2004. *Variabilidade genética da piramutaba - Brachyplatystoma vaillantii (Velenciennes, 1840) (Siluriformes - Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões*. Dissertação de Mestrado, CPBA, INPA/UA, Manaus, Amazonas 75p.
- Huergo, G.P.C.M. 2009. *Estimativa da diversidade genética da piraíba (Brachyplatystoma filamentosum, Lichtenstein 1819) e da piraíba negra (Brachyplatystoma capapretum, Lundberg e Akama 2005), na Amazônia Brasileira, inferidas através do DNA mitocondrial: Subsídios para Manejo e Conservação*. Tese de Doutorado. INPA- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. Amazonas. 114 pp.
- Huergo, G.P.C.M.; Figueiras-Souza, R.J.; Batista, J.S.; Formiga-Aquino, K.F.; Alves-Gomes, J.A. 2011. Molecular genetics as a tool for fisheries management in the Brazilian Amazon: Piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* and *Brachyplatystoma capapretum*) (Siluriformes: Pimelodidae) in white-water rivers. *Panamjas*, 6(4): 280-289.
- Lundberg JG, Akama A., (2005) *Brachyplatystoma capapretum*: a New Species of Goliath Catfish from the Amazon Basin, with a Reclassification of Allied Catfishes (Siluriformes: Pimelodidae). *Copeia*, 3: 492-516.
- Pereira, S. L. 2000. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. Artigo de revisão. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4): 745-752.
- Petere Jr, M ; Barthem, R.B ; Córdoba, E.A ; Gómez, B.C. 2005. Review of the large fisheries in the upper Amazon and de stock depletion of piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. Brasil, 404-414.
- Rodrigues, F. C; Farias I.P; Batista, J.S; Alves-Gomes, J.A. 2009. *Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (Brachyplatystoma vaillantii) por meio de marcadores moleculares microssatélites e D-loop de quatro localidades da Amazônia: diferenças entre calha e tributários*. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus. Amazonas. 96 pp.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2 nd edn. Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY.
- Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Orti. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus : Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10: 407–417.
- Vincze, T.; Posfai, J.; Roberts, R.J. 2003 NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res*, 31: 3688-3691.