

VER-04

**CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL DE DUAS ESPÉCIES DE BAGRES (ORDEM SILURIFORMES) DA AMAZÔNIA BRASILEIRA ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES DE RAPD.**

Paulo Itaciomar Teles Bastos - bolsista CNPq/PIBIC  
José Antônio Alves Gomes - Pesquisador INPA/CPBA

A pesquisa de marcadores moleculares baseados em PCR teve um grande avanço com a utilização da nova metodologia RAPD. Esta tecnologia é basicamente uma variação do protocolo de PCR, com duas características distintas: utiliza um primer único ao invés de um par de primers, e o primer tem seqüência arbitrária e, portanto, o segmento alvo no genoma estudado é desconhecido. Os marcadores de RAPD para análise genotípica de um indivíduo apresenta as seguintes vantagens: (1) permite a utilização de uma quantidade mínima de DNA; (2) aumenta a probabilidade de detecção de uma grande quantidade de polimorfismo em segmentos de DNA, distribuídos por todo genoma do organismo; (3) permite a visualização direta dos marcadores com técnicas simples. Algumas desvantagens desta tecnologia é que apresenta um baixo conteúdo de informações genética por locus e somente um alelo é detectado no segmento que é amplificado (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

As técnicas moleculares vêm sendo usadas intensivamente em vários campos da biologia e poderão auxiliar bastante no estudo de população de bagres de valor comercial.

Barthem (1997) mostra fortes evidências de que os bagres balizam os rios da planície amazônica e o estuário, regiões interligadas ecologicamente. Além disso, os bagres são excelente fonte de proteínas; têm grande potencial para a pesca esportiva, ainda não explorado; além inquestionável valor acadêmico em diversas áreas de pesquisa, por exemplo, ecologia, migração, estrutura de ictiofaunística de habitats aquáticos neotropicais, entre outros. Assim, percebe-se a valiosa contribuição dos estudos moleculares para o entendimento destes vários aspectos relacionados à biologia evolutiva desta espécie ainda pouco explorada.

Este projeto teve o objetivo de desenvolver a metodologia de RAPD no laboratório de biologia molecular do INPA, para o estudo de padrões populacionais e biogeográficos em duas espécies de bagres (*Brachyplatystoma filamentosum* e *B. flavicans*) de valor comercial (exportações) na Amazônia. Como também, comparar os padrões moleculares de populações amostradas ao longo dos principais rios amazônicos e verificar se existe alguma descontinuidade no padrão genético que possa implicar em estoques distintos.

Tecido e espécimens de *Brachyplatystoma filamentosum* e *B. flavicans* analisadas no projeto foram coletadas em Belém (PA) e no Careiro (AM) junto à frota de pesca artesanal destes dois locais. Os tecidos foram preservados em álcool 70% até a extração do DNA e alguns espécimens foram usados como testemunho. O material coletado foi identificado com auxílio de chaves taxonômicas, comparações com exemplares da coleção do INPA e com o auxílio de especialistas. Após a identificação e extração do DNA, os espécimens foram depositados na coleção de peixes do INPA.

O DNA dos foi extraído através de técnicas padronizadas descritas em Alves-Gomes et al 1995. O DNA total (mitocondrial + genômico) foi extraído com tampão a base de SDS na presença de proteinase K e purificado através de duas extrações com fenol equilibrado, duas com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e duas com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A qualidade e quantidade do DNA foi estimada através de comparações com marcadores moleculares de pesos conhecidos em eletroforese de géis de agarose a 0,8% com 0,5 µg/ml de brometo de etídio. Posteriormente os DNAs foram diluídos a uma concentração final entre 10 a 100ng/µl. Uma vez extraído e checada a qualidade e concentração, o DNA das espécies em questão foi rotulados e mantidos em freezers -20° C até uso posterior. O DNA extraído foi utilizado como substrato para o estudo através de RAPDs.

No projeto foram testados Kits comerciais de primers com seqüência arbitrárias. Primers disponíveis em Kits comerciais, da série A da operon e outros com a mesma seqüência fabricados pela empresa DNA Geney, foram utilizados no DNA purificado das espécies estudadas. Foram feitos testes com 13 primers em indivíduos coletados em Belém (PA) e no Careiro (AM). Os primers testados foram: A1, A2, A3, A4, A5, A6, A8, A9, A10, A11, A12 e A14.

Segundo Jayasankar & Dharmalingam (1997) e Dinesh et al (1993) a amplificação deve ser realizada em 40 ciclos, sendo que cada ciclo constitui-se de: 94° C por três min. antes de começar o ciclo; 1 min. A 92° C para desnaturação do DNA; 1 min. A 36° C para anelamento dos primers; 2 min. Para extensão dos segmentos a serem amplificados.

Os produtos da RAPD foram corridos em géis de agarose 1,5% em eletroforese, com marcador molecular de peso e bandas conhecidas, por cerca de três horas e meia à voltagem e miliamperagem constante e potência igual a quinze. Posteriormente, o padrão de bandas geradas por cada DNA amplificado foram analisadas.

Os resultados demonstram que os primers A1, A5, A8, A9 , A11, A12 , e A14 produzem padrões de bandas diferenciadas entre indivíduos de localidades diferentes. Os padrões das bandas sugere homologia para algumas das bandas amplificadas; ao mesmo

tempo são detectadas bandas não homólogas (polimórficas) que diferenciam indivíduos das diferentes localidades. Todavia os demais primers ( A2, A3, A4, A6 e A10) não apresentaram amplificação sugerindo que as seqüências nucleotídica dos primers não encontram, durante a reação de amplificação, homologia com o DNA das espécies em questão. Aproveitando os testes de primers, foi realizada também a otimização da concentração de DNA a ser usada em cada amplificação, aplicando-se várias concentrações em cada teste de primer.

Conclui-se que: Os primers A1, A5, A8, A9, A11, A12 e A14 do Kit comercial de marcadores moleculares da Série A (Operon) demonstraram ser potencialmente eficazes para análise genéticas de RAPD das espécies *B. filamentosum* e *B. flavicans*; Os primers A2, A3 A4 e A10 do Kit comercial de marcadores moleculares da mesma série, mostraram-se ineficazes para a análise de RAPD das espécies em questão. Consistentemente para diversos primers testados, o padrão de bandas para os indivíduos coletados em Belém e no Careiro são diferentes, sugerindo que eles possam pertencer a estoques genéticos descontínuos; Com a tentativa de otimizar a concentração de DNA, se notou que as concentrações de DNA mais baixas possibilitaram uma melhor amplificação. Porém uma conclusão mais detalhada só poderá ser dada com a realização de mais testes.

Alves-Gomes, J. A. et al (1995). Phylogenetic analysis of the south american electric fishes (order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based no morphology, electrophysiology, and mitochondrial seqence data. *Molecular Biology and Evolution*, 12(2): 298-318.

Barthem, R. & Gulding, M. 1997. Ecologia, migração e conservação de peixes amazônicos. Sociedade Civil Mamirauá. MCT - CNPq.

Dinesh, H. R. et al. (1993). RAPD analysis: An efficient method of DNA fingerprinting en fishes. *Zoological Society (Tokyo)*, 10(5): 849-854.

Ferreira, M. L. & Grattapaglia, D. Introdução ao uso de Marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1995. P.38 - 53, 220.

Goeldi, E. A. 1987. A piraíba, gigantesco siluroídeo do Amazonas. *Boletim do Museu Paraense*, n. 3, p. 181-194.

Jayasankar, P. & Dharmalingam, K. (1997). Potential application of RAPD and RAHM markers in genome analysis of scombroid fishes. *Current Science* 72(6):383-390.

Williams, J. G. K. et al. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.