

ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DA REGIÃO CONTROLE DO DNA MITOCONDRIAL PARA AVALIAÇÃO POPULACIONAL DE ESPADA, *TRICHIURUS LEPTURUS* (TRICHIURIDAE, TELEOSTEI) DA COSTA BRASILEIRA.

Pâmela Cristina Barbosa Resende¹; Alexandre Wagner Silva Hilsdorf²

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: pcrsede90@yahoo.com.br¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br²

Área do Conhecimento: Genética

Palavras-chave: Região controle; Peixe-espada; Estrutura populacional.

INTRODUÇÃO

Trichiurus lepturus é uma espécie cosmopolita de extrema importância comercial, sendo a nona espécie mais capturada no mundo com um volume de captura de 1.369.178 t (FAO, 2008). No Brasil, a pesca do espada vêm se tornando cada vez mais expressiva na região sudeste-sul, a última estimativa em 2007 foi de uma captura de 3.359 t (IBAMA, 2007). A conservação da variabilidade genética das populações de peixes ou outros organismos aquáticos é uma etapa fundamental para manutenção da viabilidade de populações a médio e longo prazo (FAO, 1981, LEBERG, 1990). Parte da molécula de DNA mitocondrial corresponde a região controladora ou D-loop, que é uma região não codificante de aproximadamente 1.200 nucleotídeos, esta região é muito mais sensível a mutação que o DNA nuclear, assim, vem sendo amplamente utilizada em pesquisas, fornecendo novas informações sobre a variabilidade genética de várias espécies de peixes e permitindo a delimitação de unidades de gestão e a avaliação de propriedades de conservação (MARTINS *et al.*, 2003).

OBJETIVOS

Testar a hipótese da existência de populações geneticamente distintas de *T. lepturus* por meio da variabilidade genética encontrada na região D-loop do DNA mitocondrial, através do desenvolvimento de iniciadores específicos para *T. lepturus* baseados em sequências presentes nas regiões codificadoras de citocromo b e 12s, ambas que flanqueiam a região D-loop, além da comparação das sequências parciais da região D-loop de indivíduos capturados na pesca comercial do litoral do Pará, Rio Grande do Norte, São Paulo e Rio Grande do Sul.

METODOLOGIA

Foram utilizadas amostras de tecido muscular, coletadas a partir da pesca comercial nos estados do Pará, Rio Grande do Norte, São Paulo e Rio Grande do Sul. O DNA foi extraído das amostras utilizando o protocolo descrito por Taggart *et al.* (1992) e os kits de extração tissue & cells GenomicPrep Mini Spin kit (GE healthcare) e DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen). Sequências de citocromo b e 12s de *T. lepturus* foram utilizadas para o desenvolvimento de iniciadores para amplificação da região D-loop com o auxílio dos programas *Primer 3 imput (version 4.0)* e *IDT Scitools OligoAnalyzer 3.1*. A partir das sequências geradas pela amplificação proporcionada pelos primeiros iniciadores desenvolvidos foi possível a elaboração de um segundo par de iniciadores internos, nas regiões codificadoras de treonina e fenilalanina. Amplificações por PCR comum e PCR *touchdown* foram realizadas utilizando ambos os pares de iniciadores, bem como combinações entre eles.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primeiros pares de iniciadores desenvolvidos revelaram um *amplicon* de aproximadamente 2000 pares de bases, já os iniciadores internos geraram *amplicons* de aproximadamente 1200 pares de bases. Problemas na amplificação ao longo do desenvolvimento do projeto, ocorridos provavelmente pelo nível de degradação do DNA obtido, tornaram necessário o emprego de diferentes formas de extração. Contudo, apesar do número amostral não ser alto, mesmo após de várias tentativas e aplicação da metodologia de PCR *touchdown*, não foi possível amplificar um número razoável de amostras, além da maioria das amostras que amplificavam, ao final do processo de purificação não atingiam a concentração necessária para o seqüenciamento.

CONCLUSÕES

A degradação do DNA extraído é o provável motivo pelo qual ocorreram problemas com a amplificação da região desejada, logo que os amplicons gerados por ambos os pares de iniciadores desenvolvidos são reativamente grandes. Desta forma, foi proposto no parecer de relatório científico da FAPESP que fossem gerados iniciadores ainda mais internos, para a geração de fragmentos por volta de 500 a 600 pares de bases, que abrangesse apenas o terço inicial da região D-loop, que segundo Lee *et. al.* (1995) é a região mais variável para estudos populacionais em peixes. Serão também avaliadas sequências de citocromo b, que segundo Meyer (1993), é uma região bem conservada, mas que possui variação intraespecífica, podendo ser utilizada em identificação de populações de peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FAO/UNEP, Conservation of the genetic resources of fish: Problems and recommendations. Report of the Experts Consultation on the Genetic Resources of Fish, Rome 9-13 June 1980. FAO Fisheries Technical Paper 217. 1981.

FAO. Fishery and Aquaculture Statistics. Yearbook of 2008. Disponível em <www.fao.org/docrep/013/i1890t.pdf>, acesso em 10 de maio de 2011.

IBAMA. Estatística da Pesca 2007 – Brasil. Ministério do Meio Ambiente, Brasília – DF. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/wp-content/files/estatistica_2007.pdf> acesso em 20 de maio de 2011.

LEBERG, P. L. Influence of genetic variability on population growth: implications for conservation. *Journal of Fish Biology*, 37: 193-195. 1990.

LEE, W.-J.; CONROY, J.; HOWELL, W.H.; KOCHER, T.D. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution*. 41, 54-66, 1995.

MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA C.; FORESTI F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genetic and Molecular Biology* 26, 1, 33-38. 2003.

TAGGART, J.B.; HYNES, R.A.; PRODOHL, P.A.; FERGUSON, A.A. Simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology*, 40, 963-965, 1992.

AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida.