

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA PARA IDENTIFICAÇÃO FORENSE DE AGULHÕES DA FAMÍLIA ISTHIOPHORIDAE (OSTEICHTHYES: PERCIFORMES)

Gabriel Okuda¹, Juliana De Biasi², Rodrigo Rodrigues Domingues³, Alexandre Wagner Silva Hilsdorf⁴

Estudante do curso de Medicina: e-mail: gabriel_okuda@hotmail.com¹

Colaborador Universidade de Mogi das Cruzes, jubbiasi@gmail.com²

Co-orientador Universidade de Mogi das Cruzes, domingues.pesca@gmail.com³

Orientador: Universidade de Mogi das Cruzes, wagner@umc.br⁴

Área do conhecimento: Genética molecular e animal.

Palavra-chave: Identificação, agulhões, pesca, conservação.

INTRODUÇÃO:

Os agulhões da família Isthiophoridae estão representados no Brasil por seis espécies: *Kajikia albidus*, *Tetrapturus pfluegeri*, *Tetrapturus georgii*, *Istiophorus platypterus*, *Makaira nigricans* e *Xiphias gladius* (Nakamura, 1985). Essas espécies são demasiadamente capturadas por diferentes artes de pesca comercial e esportiva, principalmente pela pesca atuneira dirigida à captura de atuns (*Thunnus spp.*) e meca (*Xiphias gladius*) onde são capturadas acidentalmente (Nakamura, 1985). De acordo com a *International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas* – ICCAT, estas espécies estão entre as mais exploradas pela pesca pelágica e segundo Myers e Worm (2003) o declínio da abundância dessas espécies pode ser superior a 90%. No entanto, as estimativas para alguns agulhões podem estar superestimada, devido à classificação de mais de uma espécie com o mesmo nome comum nas estatísticas de desembarque de vários países. A natural similaridade fenotípica dessas espécies associado com as práticas dos pescadores de retirada de cabeça e nadadeiras, prejudica a identificação espécie-específica. Desta forma, o presente estudo objetivou o desenvolvimento de um método de identificação molecular prático, rápido e de baixo custo, que permita identificar qualquer uma das seis espécies da família Isthiophoridae, através da técnica de PCR-RFLP.

METODOLOGIA

Para o desenvolvimento de marcador PCR-RFLP das seis espécies de agulhões foi realizada uma busca no banco de dados Genbank para a região Cytochrome Oxidase I (COI) do DNA mitocondrial das espécies citadas. A partir das sequências extraídas do Genbank, foram desenhados iniciadores utilizando o programa Primer 3 Input (version 4.0) e posteriormente avaliados pelo pacote *IDTS citools Oligo Analyzer 3.1* para verificação da qualidade dos mesmos e testada a sua eficiência de amplificação nas espécies de agulhões. Para amplificação da região do gene COI do DNA mitocondrial foi utilizado os iniciadores desenvolvidos (Coi_Ag_F- 5' TCTCGACCAATCACAAAGAC e Coi_Ag_R- 5' TGTRGCGGKAGTTCTACTG). Para cada reação de PCR foi usado 5 µL (0.5 – 2.0 ml) DNA *template*, 10X PCR buffer, 0.01mM de cada *primer*, 50mM de MgCl, 0.05 mM de dNTP's, 0.625 U de Taq polimerase (Fermentas, *Life Sciences*, Brasil) e água ultrapura para um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador PTC – 100 (MJ-Research) programado para desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de

amplificação. Cada ciclo consistiu em 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos.

O produto de PCR foi purificado utilizando o Kit “ExoSAP-IT” (Prodimol), de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante. O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo – USP. Após o sequenciamento as sequências foram editadas pelos pacotes Codon Coder Aligner e Mega 4.1 (Kumar *et al.*; 2003). Para localizar as enzimas de restrição que fornecessem fragmentos espécie-específico foi utilizado o programa Neb Cutter V.2.0. O produto da amplificação da região COI foi submetido a digestão enzimática, contendo 10µL de produto de PCR; 0,2 µL de cada enzima (Hae III e Taq I); 1,5µL de tampão e 3,3µL de água ultrapura. Em seguida, as amostras foram aquecidas em termociclador à 37°C por 30 minutos e posteriormente a 80°C por 30min para inativação da enzima. Após a confirmação em gel de agarose (3%) dos padrões esperados com a restrição enzimática na identificação das seis espécies, foi realizado o teste duplo-cego seguindo a metodologia aplicada por Gusmão (2002), para validar a técnica e a correta identificação das espécies.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 1500 pares de bases da região COI foram analisados das cinco espécies de agulhões e uma de meca da família Istiophoridae.

A partir das sequências consensos, foram achadas duas enzimas eficientes na clivagem que produziram padrões de bandas diagnósticas e uma precisa identificação das espécies.

As enzimas Taq I (TCGA) e Hae III (GGCC) forneceram fragmentos chaves que permitiram diferenciar as seis espécies. As duas enzimas produziram quatro padrões de clivagem cada (A, B, C, D), que combinados, forneceram um padrão espécie-específico (Tabela 1).

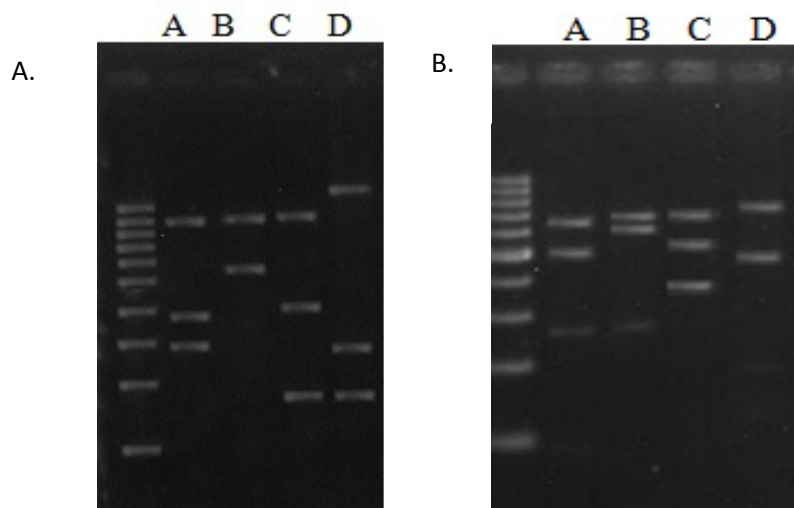


Fig. 1: Os fragmentos de restrição diagnósticos gerados pelas enzimas Taq I (A) e Hae III (B) que produziram 4 padrões diferentes para cada enzima.

Tabela 1: Padrão espécie-específico na clivagem das enzimas Taq I e Hae III.

Espécie	Padrão Taq I /Hae III
T. pfluegeri	CC
T. georgii	AC
T. albidus	BA
M. nigricans	CA
I. platpterus	CB
X. gladius	DD

Após a criação deste padrão espécie-específico, foram produzidos dois géis, um para a enzima Taq I e outro para a enzima Hae III, ambos com quatro padrões de digestão como descritos acima e com dois organismos de cada espécie distribuídos aleatoriamente e numerados de 1 à 12 (Figura 1).

Para a validação da técnica duplo-cego, fotos dos géis com os padrões de digestão e com os haplótipos das 12 amostras foram repassados a 20 pessoas que não estavam vinculadas ao projeto e que não possuíam conhecimentos biomoleculares, para que identificassem as espécies, formando um padrão binário a partir da combinação dos padrões de digestão Taq I /Hae III.

No total de 240 análises (12 análises por pessoa), foram registrados 236 acertos, indicando que a técnica utilizada obteve uma taxa de 98,33% de eficiência na identificação das espécies.

CONCLUSÕES

O fato de alguns agulhões serem agrupados com o mesmo nome no momento do desembarque gera uma falta de dados por espécie que segundo Rosa & Lima (2010) é um dos principais entraves para aplicação dos critérios de avaliação do estado de conservação de peixes marinhos. Esta é a primeira vez que esta técnica é desenvolvida para o oceano Atlântico sul incluindo a espécie *T. georgii* que só foi registrada nesta área recentemente.

Uma correta identificação torna-se imperativa, uma vez que cada espécie responde de maneira diferente a pressão pesqueira. A metodologia criada, concretizada com o teste duplo-cego, poderá ser aplicada nas rotinas de identificação de espécies em desembarques pesqueiros e em mercados de peixes, mesmo após o processamento do pescado, bem como inibindo a comercialização ilegal, o que mostra que a técnica criada além de ser barata e rápida para identificação dos Agulhões e da Meca, pode ser uma ótima ferramenta para ajudar no equilíbrio do meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERNARD, A. M.; SHIVJI, M. S.; DOMINGUES, R. R.; HAZIN, F. H.; Amorim, A. F.; Domingo, A.; Arocha F.; Prince, E. D.; Hoolihan, J. P.; Hilsdorf, A. W. 2012. Broad geographic distribution of roundscale spearfish (*Tetrapturus georgii*) (Teleostei, Istiophoridae) in the Atlantic revealed by DNA analysis: implications for white marlin and roundscale spearfish management. Fisheries Research (Prelo).

IBAMA, 2010. Boletim estatístico da pesca e aquicultura, Brasil 2008 – 2009. 99p.

Myers, R. A. and Worm, B. 2003. Rapid world depletion of predatory fish communities. *Nature*, 423:281-283.

Nakamura, I. 1985. An annotated and illustrated catalogue of marine sailfishes, spearfishes and swordfishes known to date. *FAO Species Catalogue Vol.5. Billfishes of the World. FAO Fisheries Synopsis No.125*: 65pp.

Rosa, R. R. & Lima, F. C. T. 2010. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Ministério do Meio Ambiente, 275p.

Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360, 1847– 1857.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo auxílio financeiro (proc. 2009/54660-6).