



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**

**ESTUDOS PRELIMINARES PARA A IDENTIFICAÇÃO SEXUAL DO
PIRARUCU, *Arapaima gigas* (CUVIER) (TELEOSTEI, OSTEOGLOSSIDAE),
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES DO TIPO RAPD.**

ELIANA MATOS RIBEIRO

**Monografia apresentada ao Departamento de
Engenharia de Pesca do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal do Ceará,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Engenheiro de Pesca.**

**FORTALEZA - CEARÁ - BRASIL
JANEIRO/2007**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manuel Antônio de Andrade Furtado Neto, pela oportunidade e apoio dado para realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Carlos Riedel, pela confiança depositada em mim.

Ao chefe do Centro de Pesquisas em Aqüicultura do DNOCS, Pedro Eymard, por todo suporte fornecido para a realização desse trabalho.

A toda minha família, que direta ou indiretamente colaborou para essa conquista.

Ao meu namorado, que sempre me incentivou e me ajuda em tudo.

Aos colegas do LabGeM, e a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R368e Ribeiro, Eliana Matos.

Estudos preliminares para a identificação sexual do pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier) (Teleostei, osteoglossidae), utilizando marcadores moleculares do tipo Rapd / Eliana Matos Ribeiro. – 2007.

37 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2007.

Orientação: Prof. Dr. Manuel Antônio Andrade Furtado Neto.

1. Pirarucu (Peixe) - Brasil, Nordeste. 2. Pirarucu - Reprodução. 3. Engenharia de Pesca.
I. Título.

CDD 639.2

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Manuel Antônio Andrade Furtado Neto, PhD
Orientador/Presidente

Prof. Carlos Riedel Porto Carreiro, M.Sc
Membro

Prof^a Erivânia Gomes Teixeira, B. Sc.
Membro

VISTO:

Prof. Dr. Moisés Almeida de Oliveira
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof. Dr. Raimundo Nonato de Lima Conceição
Coordenador do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| RESUMO | ii |
| LISTA DE FIGURAS | iii |
| LISTA DE TABELAS | iv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Exploração dos Recursos Pesqueiros | 1 |
| 1.2. Pirarucu | 2 |
| 1.3. Genética de peixes e marcadores moleculares | 6 |
| 1.4. Isolamento de DNA genômico | 7 |
| 1.5. PCR | 8 |
| 1.6. Objetivos | 10 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 11 |
| 2.1. Instalações | 11 |
| 2.2. Coleta e Acondicionamento de Amostras | 13 |
| 2.3. Extração de DNA genômico | 16 |
| 2.4. Quantificação do DNA | 17 |
| 2.5. Reações em cadeia polimerase para identificação de polimorfismos de DNA amplificado com primers arbitrários (PCR-RAPD) | 19 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 21 |
| 3.1 Extração de DNA genômico | 21 |
| 3.2 Teste preliminar de Reações PCR-RAPD para identificação de sexo | 26 |
| 4. CONCLUSÕES | 28 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 29 |

RESUMO

O pirarucu (*Arapaima gigas*) é considerado o maior peixe escamado de água doce do mundo. O mercado brasileiro tem sido abastecido pela pesca, mas a exploração predatória tem reduzido os estoques, estimulando a produção de pirarucu em cativeiro. Entretanto, aspectos relacionados à sua reprodução ainda não se encontram definidos, pois a espécie não apresenta dimorfismo sexual, sendo assim, sua identificação sexual só é realizada quando o peixe atinge a maturação sexual, após cinco anos de vida. O objetivo geral deste trabalho foi a realização de estudos preliminares que fornecessem subsídios para a identificação do sexo do *A. gigas*. Os objetivos específicos foram a comparação da qualidade do DNA extraído de várias partes do animal (músculo, gônada, coração, lamela da escama e sangue), verificação da eficiência de quatro métodos de conservação da amostra antes de ser efetuada a extração e realização de reações teste de PCR (reação em cadeia da polimerase) para verificar aparecimento de bandas polimórficas. Foram utilizados 22 exemplares de pirarucu oriundos do Centro de Pesquisas em Aqüicultura Rodolph Von Ihering do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS). Foram realizadas extrações do DNA genômico das amostras seguindo o protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), quantificação por espectrofotômetro e reações teste por PCR-RAPD. Os resultados mostraram que dentre as amostras comparadas, a lamela da escama se mostrou como sendo a melhor opção para extração, com alta concentração de DNA de boa qualidade e pureza. Foram observados resultados satisfatórios de DNA genômico para todos os métodos de preservação comparados. Nas reações teste de RAPD, foram geradas bandas polimórficas, evidenciando a qualidade do material genômico extraído. Desta forma, o estudo realizado contribuiu para as pesquisas a cerca da identificação sexual do *A. gigas* nos trabalhos realizados pelo DNOCS e aumentou a bibliografia sobre essa espécie.

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1 - Introdução do Pirarucu no DNOCS em 1939. | 4 |
| Figura 2 - Centro de Pesquisas em Aqüicultura Rodolph Von Ihering | 11 |
| Figura 3 - Campus I – Laboratório de Genética Molecular (LabGeM) | 12 |
| Figura 4 - Campus II – Projeto Pirarucu | 12 |
| Figura 5 - Exemplar juvenil de pirarucu indicando o local onde foi retirada a escama para extração de DNA. | 13 |
| Figura 6 - Exemplar de alevino de pirarucu do qual foram obtidas amostras de tecidos. | 13 |
| Figura 7 - Amostras sendo aplicadas no gel. | 18 |
| Figura 8 - Eletroforese de DNA genômico de <i>A. gigas</i> , com amostras de diferentes tecidos e diferentes concentrações. | 24 |
| Figura 9 - Eletroforese de DNA extraído da lamela da escama, acondicionada por alguns minutos em álcool 70%. | 25 |
| Figura 10 - Padrão RAPD-PCR de <i>A. gigas</i> , apresentando bandas polimórficas diferenciadas. | 26 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabela 1 - Identificação dos indivíduos com a suspeita do sexo a partir de características fenotípicas, seus respectivos tecidos amostrados para extração e o tipo de preservação empregada. | 15 |
| Tabela 2 - Quantidade de reagentes utilizados para cada 25 μ L de reação. | 19 |
| Tabela 3 - Seqüência dos primers utilizados. | 20 |
| Tabela 4 - Absorbância e razão das amostras de DNA genômico extraídas através do reagente CTAB. | 22 |
| Tabela 5 - Concentrações diluídas e concentradas das amostras de <i>A. gigas</i> com respectivas diluições para quantificação. | 23 |

ESTUDOS PRELIMINARES PARA A IDENTIFICAÇÃO SEXUAL DO PIRARUCU, *Arapaima gigas* (CUVIER) (TELEOSTEI, OSTEOGLOSSIDAE), UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES DO TIPO RAPD.

ELIANA MATOS RIBEIRO

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Exploração dos Recursos Pesqueiros

A exploração pesqueira no Brasil vem se intensificando ao passar dos anos, contribuindo para a redução dos recursos pesqueiros e podendo ter como resultado a extinção de algumas espécies de importância econômica (MMA, 2006).

A idéia de que os oceanos constituem fontes inesgotáveis de proteína animal vem mudando diante do fato de que algumas das maiores regiões pesqueiras do mundo encontram-se hoje ameaçadas, com cerca de 70% dos seus estoques já extintos ou em vias de extinção (FREITAS, 2003).

Segundo estatísticas da “Food and Agricultural Organization” (FAO), Órgão das Nações Unidas (ONU), o tamanho das frotas pesqueiras mundiais aumentou mais que o dobro entre 1970 e 2000 (FAO, 2005).

Em regiões onde a pesca é economicamente indispensável, os problemas de impacto ambiental por esta atividade têm gerado uma série de impasses sócio-econômicos e ecológicos (MARQUES, 2003). Sendo assim, novas alternativas devem ser estimuladas, visando atender as necessidades atuais do mundo, como a aquicultura que se mostra com enorme potencial quando se compara seu rápido crescimento em relação a outras atividades, como a criação de gado e a pesca por captura (FREITAS, 2003).

Atualmente, há uma preocupação geral com a manutenção e principalmente conservação dos recursos naturais, sendo desenvolvidos vários estudos visando seu uso sustentável, pois, apesar da enorme biodiversidade

da ictiofauna brasileira, as pesquisas relacionadas aos seus aspectos biológicos, taxonomia e genética ainda são escassas (MARQUES, 2003)

Uma das características da exploração dos recursos pesqueiros é o extrativismo, ou seja, explora-se sem a preocupação de repor ao meio ambiente. Dessa maneira, a conservação genética de populações naturais e de recursos genéticos animais se mostra necessária para fornecer as bases para as decisões racionais relacionadas à conservação da biodiversidade, que normalmente estão inseridas em programas de manejo de recursos de interesse econômico (BARKER, 1994).

1.2 – Pirarucu

O pirarucu (*Arapaima gigas*), é um peixe da família Osteoglossidae natural da bacia amazônica, que está entre as espécies de maior porte dos peixes primários de água doce (NELSON, 1994; LI & WILSON, 1996). Sua carne é bastante apreciada pelo sabor e ausência de espinhos no filé, que lhe valem o apelido de “bacalhau de água doce”. Por essa característica, o pirarucu tem despertado um grande interesse para exploração comercial, tornando-se uma importante base econômica pesqueira de considerável escala na região amazônica (GOULDING, 1983).

A intensificação da pesca comercial no Baixo e Médio Amazonas nas últimas três décadas levou os estoques pesqueiros dessa região a sofrerem uma intensa pressão, gerando impacto profundo nas populações das principais espécies comerciais. No caso específico dos pirarucus, há uma tendência geral a sobrepesca, fato agravado pelas características biológicas da espécie que não favorecem uma recuperação rápida dos estoques (IBAMA/PROVARZEA, 2006).

Apesar do pirarucu ser um animal resistente, algumas características ecológicas e biológicas o torna bastante vulnerável à ação dos pescadores. Os cuidados com os ninhos após as desovas expõem os reprodutores à fácil captura com malhadeiras ou com haste e arpão. Durante cerca de seis meses, o macho protege a prole e a necessidade fisiológica de emergir para captar ar ocorre em intervalos menores que o usual, ocasião em que os peixes são capturados. O abate dos machos, após as desovas, expõe os filhotes a predação por peixes carnívoros, especialmente as piranhas, e a longa fase de

imaturidade sexual (3-5 anos) propiciam a captura de espécies juvenis, diminuindo o sucesso reprodutivo (IBAMA, 2006).

Visando a exploração racional, medidas legais de proteção ao pirarucu na Bacia Amazônica foram implementadas pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) a partir de 1991, por meio da Portaria do IBAMA N° 480/91, proibindo anualmente o exercício da pesca do pirarucu no período de 1° de dezembro a 31 de maio, correspondente ao tempo de desova e cuidados parentais. Em 1993, estabeleceu-se o tamanho mínimo de 100 cm para a comercialização da manta ou posta seca (Portaria do IBAMA 014-N, de 15 de fevereiro de 1993) e finalmente, foi estabelecido o tamanho mínimo de 150 cm para a sua captura na Bacia Amazônica (Portaria do IBAMA N° 08/96) e nas bacias dos rios Araguaia e Tocantins (Portaria do IBAMA N°107/98).

Mais recentemente, foram implementadas outras leis, como a que proíbe anualmente a pesca, o transporte, a armazenagem e a comercialização do pirarucu (*A. gigas*) no estado do Amazonas, durante o período de 1° de junho a 30 de novembro (Portaria IBAMA N° 01, de 01 de junho de 2005) (IBAMA, 2006).

Dessa maneira, tem se procurado controlar a exploração dessa espécie para evitar os efeitos nocivos da sobrepesca, gerando uma restrição na oferta de pirarucu para os mercados regionais. Por outro lado, tal restrição se apresenta como fator benéfico ao desenvolvimento da criação dessa espécie em cativeiro.

Segundo Menezes (1951), o trabalho pioneiro de criação desse peixe em cativeiro no Brasil foi realizado em 1935, no Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém, Pará). Desde a década de 40, essa espécie vem sendo introduzida em açudes localizados em estados do Nordeste brasileiro, visando a sua manutenção e propagação em cativeiro.

O DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra as Secas) introduziu o pirarucu pela primeira vez no Nordeste, em 1939 (Figura 1), com o recebimento de 50 exemplares do Museu Paraense, visando o combate biológico às piranhas, *Serrasalmus piraya*, e pirambeba, *S. rhombeus*, que nessa época proliferavam nos açudes nordestinos (FONTENELE, 1955).

Esses peixes foram criados no Posto de Piscicultura da antiga IFOCS (Inspeção Federal de Obras Contra as Secas), em Fortaleza. Em 1942, dezenove desses exemplares foram transferidos para o Posto de Piscicultura Lima Campos, no Ceará, onde hoje está situada a Estação de Piscicultura Pedro de Azevedo. Com o auxílio desses peixes e de outros de desovas ocorridas, foram peixados alguns grandes açudes.



Figura 1. Introdução do Pirarucu no DNOCS em 1939.

Apesar de ter obtido sucesso com o combate às piranhas, a multiplicação do pirarucu nos açudes causou alguns problemas ecológicos, pois, por ser carnívoro e voraz, estava dizimando os cardumes das espécies nativas.

Depois desse acontecimento, em 2004, a espécie foi reintroduzida no Nordeste através do Projeto Pirarucu, uma parceria do DNOCS com a SEAP (Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca da Presidência da República), com o intuito de fornecer subsídios técnicos, científicos e econômicos aos piscicultores que desejam cultivar o pirarucu em cativeiro.

Alguns estudos científicos apontam várias vantagens dessa espécie em relação ao cultivo de outros peixes como: rápida velocidade de crescimento, alcançando 10 kg no primeiro ano de cultivo (CARVALHO & NASCIMENTO, 1992; IMBIRIBA, 2001); rusticidade ao manejo; respiração aérea pulmonar (FONTENELE, 1953, 1955); confinamento em altas densidades, sem

manifestar canibalismo (CAVERO, 2002). Além disso, a espécie habitua-se à alimentação com ração comercial (CRESCÊNCIO, 2001).

Cavero (2002) aponta ainda o pirarucu como a espécie mais promissora para o desenvolvimento da criação de peixes em regime intensivo na região Amazônica. Apesar de todas essas características vantajosas, aspectos relacionados à sua reprodução (técnicas de reprodução e identificação sexual de reprodutores) ainda não se encontram totalmente definidos, sendo necessário o uso de alevinos e reprodutores capturados na natureza.

A falta de informações científicas sobre a biologia reprodutiva do pirarucu que possa subsidiar a elaboração de procedimentos que permitam controlar a sua reprodução constitui o principal obstáculo à produção de alevinos em larga escala (ONO, 2004). O fato da espécie não apresentar dimorfismo sexual externo, faz com que sua identificação sexual só possa ser realizada através de indícios fenotípicos (mudanças na coloração e no comportamento) ou pela observação de suas gônadas, caso sejam dissecados. Geralmente o macho apresenta coloração vermelha mais intensa e mais escura na parte superior da cabeça e na região dorsal, manifestada somente quando o peixe atinge a maturação sexual, o que só ocorre com cerca de cinco anos de idade, com 1,60 m de comprimento, quando então apresenta peso entre 40 e 60 Kg (FONTENELE, 1953; SAINT PAUL, 1986; IMBIRIBA, 2001).

Com o domínio da tecnologia de reprodução do pirarucu em cativeiro, será possível a realização de programas de repovoamento e fornecimento de alevinos aos criadores, uma vez que o abastecimento de indivíduos para criação em cativeiro mostra-se exclusivamente dependente dos estoques naturais.

Tendo em vista as dificuldades referidas, a identificação sexual do pirarucu é complicada, sendo necessária a utilização da genética molecular e o desenvolvimento de marcadores moleculares determinantes de características sexuais.

Além da identificação sexual de peixes, a genética molecular também permite solucionar outros problemas da aqüicultura, tais como: a identificação de vírus em estoques de reprodutores, a verificação de endogâmias (atuando como poderosa ferramenta no melhoramento genético de diversas espécies) e a identificação de populações (facilitando o manejo de estoques).

1.3 - Genética de peixes e marcadores moleculares

Os recentes avanços na biologia molecular abriram novas perspectivas para pesquisas em conservação de espécies e para estudos de biologia como um todo. O potencial de aplicação que a genética e a biotecnologia apresenta para promover melhorias na aquicultura é bastante promissor e vai desde a seleção de linhagens e produção de indivíduos híbridos, poliplóides e monossexuais, até o desenvolvimento de animais transgênicos, via modernas técnicas da engenharia genética (FREITAS, 2003).

Durante a década de 1990, grandes avanços foram alcançados através do desenvolvimento de inúmeras técnicas da biologia molecular. Dentre as diversas descobertas tecnológicas estão o desenvolvimento e identificação de diferentes tipos de marcadores moleculares (FREITAS, 2003). Os marcadores moleculares são utilizados amplamente tanto para estudo de extensão e distribuição da variação entre espécies como também para investigar questões taxonômicas e evolutivas (FERREIRA & GRATTAPLAGIA, 1996; HAIG, 1998). Sendo assim, o uso de marcadores moleculares torna-se, portanto, uma opção viável para atingir tais objetivos, além de gerar informações importantes para um eficiente plano de conservação e manejo.

Ferreira & Grattaplagia (1998) definem marcadores moleculares como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, que podem ser regiões expressas ou não do genoma, e muitas vezes de seqüência de nucleotídeos e função desconhecida. Antes do advento dos marcadores moleculares, os marcadores eram utilizados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenotípicos, de fácil visualização, que contribuiu significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos. No entanto, os marcadores morfológicos tinham uma limitada e restrita aplicação.

Dentre os diversos tipos de marcadores moleculares atualmente disponíveis, os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (WILLIAMS et al., 1990) destacam-se pelas vantagens que apresentam em relação a outros tipos de marcadores (por exemplo, RFLP ou SSR), já que são tecnicamente mais simples, não necessita de radioatividade, não requer o

conhecimento prévio da seqüência alvo a ser amplificada, pequenas quantidades de DNA são suficientes, além de ser aplicável a qualquer espécie. Aliados a estas vantagens estão o baixo custo, facilidade e rapidez no emprego da técnica.

O uso do RAPD em estudos de genética molecular em populações de peixes tem se difundido entre os ictiologistas pelo fato de ser muito útil na caracterização de recursos genéticos, pois representa a variação genética, descartando a influência do ambiente, o que permite a obtenção de “fingerprintings” genômicos de indivíduos, populações e espécies (ALMEIDA, 1998). Em aquicultura, esta técnica tem sido amplamente utilizada em estudos de diversas espécies como: enguias (TAKAGI & TANIGUCHI, 1995), bagres de canal (LIU et al. 1999) e tilápias (NAISH et. al., 1995); funcionando como uma ferramenta valiosa no esclarecimento de questões referentes à identificação sexual, no estabelecimento de relações filogenéticas, definição de estratégias de melhoramento e na identificação de espécies híbridos. Com o passar dos anos e surgimento de novas tecnologias – sobretudo a da PCR (Polimerase Chain Reaction) - aumentaram extraordinariamente o número de marcadores moleculares, possibilitando um grande avanço na utilização de ácidos nucleicos nas elucidações de vários problemas da Biologia, inclusive o da identificação de caracteres sexuais, como é o caso em questão.

1.4 – Isolamento de DNA genômico

Isolar DNA genômico de uma espécie compreende basicamente em submeter amostras de diferentes tecidos a vários processos que incluem principalmente diferenças de temperatura e de pH. Essas diferenças desnaturam proteínas permitindo que os ácidos nucleicos fiquem dispersos em solução, sendo estes posteriormente precipitados e purificados.

De modo geral, o protocolo de extração de DNA mais utilizado para as diferentes espécies é o CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), ou CTAB com algumas modificações e variações daquele descrito por Dellaporta *et al.* (1983). A diferença básica entre os diversos tipos de protocolos de extração disponíveis na literatura está na composição do tampão de extração que, normalmente, integra um agente tamponante para estabilizar o pH em torno de 8.0; um sal para dissociar as proteínas do DNA; um detergente para solubilizar

as membranas e auxiliar na inativação de algumas enzimas; e um inibidor de DNAses para proteger o DNA (BERED, 1998).

Os detergentes devem romper as membranas celulares para que ocorra a liberação do DNA. Dellaporta *et al.* (1983) usam SDS (dodecil sulfato de sódio) como detergente, enquanto Doyle & Doyle (1991) usam o CTAB e Cheung *et al.* (1993) o sarcosyl. Protocolos extremamente simplificados como de Cheung *et al.* (1993) podem fornecer DNAs parcialmente degradados ou contaminados que, apesar de possibilitar ampliações PCR, podem comprometer a reprodutibilidade das reações, resultando muitas vezes em falsos negativos (ROMANO, 1998).

1.5 – PCR

A reação de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA catalisado pela enzima Taq polimerase. É baseada no anelamento e extensão enzimática de pequenas moléculas de DNA de fita simples, que são os oligonucleotídeos sintéticos, denominados “iniciadores” ou “primers” funcionando como ponto de início para a síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde (DNA template). Além disso, a reação requer a presença dos quatro tipos de desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), complementares às extremidades da região do DNA que se deseja amplificar (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Cada ciclo de PCR envolve: a desnaturação da molécula de DNA alvo, obtida por elevação da temperatura para 92°C a 95°C; anelamento dos primers por redução da temperatura até o ponto ideal para a formação das pontes de hidrogênio entre cada par de primer e a fita molde (35° a 40°C); e extensão da síntese da nova fita de DNA (72°C). Uma vez que a replicação do DNA é semiconservativa, ou seja, a enzima DNA polimerase utiliza um molde de fita simples de DNA para sintetizar uma fita complementar, sem o qual a adição de nucleotídeos é interrompida, as fitas recém sintetizadas passam a funcionar como molde para o ciclo seguinte. Ao final de vários ciclos obtém-se o acúmulo exponencial de cópias da região delimitada pelos primers (REGITANO & COUTINHO, 2001). Esta escala de amplificação permite, portanto, iniciar com quantidades mínimas de DNA (na ordem de pico ou nanogramas) e terminar a

reação com grandes quantidades de DNA de uma seqüência específica de interesse (MULLIS & FALOONA, 1987; LIMA 1999).

O passo decisivo para a expansão da técnica da PCR ocorreu quando SAIKI *et al.* (1985) isolaram uma DNA polimerase (*Taq* polimerase) de uma bactéria (*Thermus aquaticus*) que vive em fontes térmicas, polimeriza a 72°C, mantendo assim a atividade por algumas horas a 95°C. Isto possibilitou a completa automatização do processo da PCR, que juntamente com as técnicas de clonagem e sequenciamento de DNA tem possibilitado a descrição da estrutura do genoma de diversas espécies (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). A técnica do RAPD é um tipo de PCR que utiliza primers com 10 pares de bases para localizar e amplificar segmentos aleatórios no DNA genômico, atuando em sítios do DNA genômico incidente e podendo ser visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

Marcadores RAPD possuem caráter dominante, limitando seu uso na estimação de parâmetros genéticos, além de apresentar problemas de reprodutibilidade (KARP *et al.*, 1996). A utilização desta técnica envolve a adoção de três procedimentos básicos: a) otimização das condições de reação, principalmente no que se refere à qualidade e quantidade do DNA genômico utilizado; b) abordagem sistemática na utilização do ensaio RAPD, mantendo constantes as condições de concentrações de reagentes e perfil térmico do termociclador (inicialmente otimizados) e c) adoção de um nível adequado de observação na seleção de quais bandas utilizar, buscando aquelas mais intensas, repetíveis em ensaios sucessivos e registradas por mais de uma pessoa, independentemente.

1.6 – Objetivos

Esse trabalho teve como objetivo geral realizar estudos preliminares que fornecessem subsídios para a identificação do sexo do Pirarucu, *A.gigas*.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Comparar a qualidade e concentração da extração de DNA de vários tecidos do animal: gônada, coração, tecido muscular, lamela da escama e sangue; visando a otimização de extração de DNA.
- Verificar a eficiência de quatro métodos de conservação das amostras antes de ser realizada a extração: congelada por uma semana em temperatura de -20°C; acondicionada em álcool 70%; mantida sob refrigeração por uma semana a 4°C em álcool 70% e *in vivo*.
- Realizar um teste preliminar para verificar a eficácia da técnica de RAPD-PCR na a identificação de sexo do Pirarucu, *A. gigas*.
- Contribuir para programas de manejo e conservação da espécie no Centro de Pesquisas Ictiológicas Rodolpho Von Ihering, do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas - DNOCS.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Instalações

A pesquisa foi desenvolvida nas instalações do Centro de Pesquisas em Aqüicultura Rodolph Von Ihering do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), localizado no município Pentecoste, Ceará (Latitude 03°45'00"S e Longitude 39°21'00"W) e distante 90 Km de Fortaleza (Figura 2).



Figura 2: Centro de Pesquisas em Aqüicultura Rodolph Von Ihering.

O Centro de Pesquisas possui uma área inundada de tanques (48 de 350m² e 10 de 2500m²) e viveiros, totalizando 11,37 ha, nos Campus I e Campus II. Entende-se como área total inundada as estruturas destinadas a acumular água para estocagem e manejo de reprodutores e alevinos das mais variadas espécies. Os viveiros são estruturas escavadas em terra, destinados a manutenção de reprodutores bem como reprodução.

No Campus I está instalado o LabGeM (Laboratório de Genética Molecular) (Figura 3) que desenvolve estudos do genoma para controle de doenças, consangüinidade, identificação sexual, dentre outros.

No Campus II está sendo desenvolvido, desde 2004, o Projeto Pirarucu (Figura 4), que adquiriu, inicialmente, 33 matrizes e 730 alevinos de pirarucu do

Projeto Pacu, uma empresa especializada em reprodução de peixes no estado de Mato Grosso do Sul.



Figura 3: Campus I – Laboratório de Genética Molecular (LabGeM)



Figura 4: Campus II – Projeto Pirarucu.

2.2 – Coleta e Acondicionamento de Amostras

Foram utilizados 22 indivíduos neste trabalho, todos oriundos do Campus II, onde foram também realizados os procedimentos externos de campo. A parte laboratorial foi realizada no LabGeM.

Dentre esses indivíduos, 18 exemplares eram juvenis, com comprimento total médio de 100cm (Figura 5) e 4 alevinos com comprimento total médio de 14cm (Figura 6).

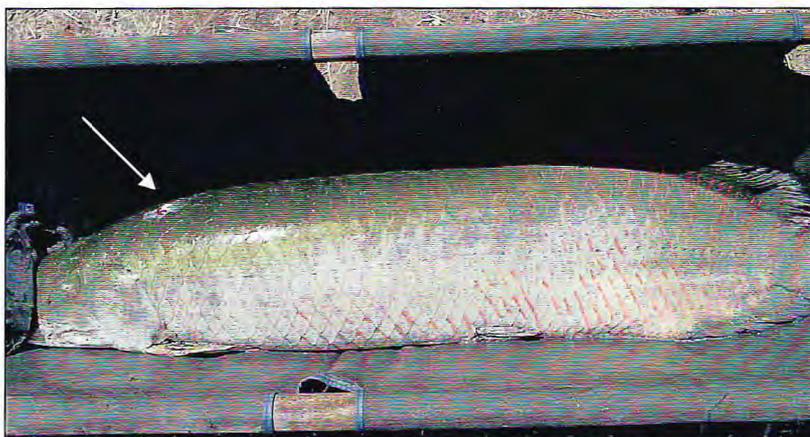


Figura 5: Exemplar juvenil de pirarucu indicando o local onde foi retirada a escama para extração de DNA.



Figura 6: Exemplar de alevino de pirarucu do qual foram obtidas amostras de tecidos.

Inicialmente, três machos e três fêmeas, foram sacrificados e dissecados para a identificação anatômica de suas gônadas. Em seguida, as gônadas foram extraídas e levadas ao microscópio óptico, coradas em solução de aceto carmim, para teste histológico visando confirmação do sexo. Com base nesse resultado, foi iniciado o processo de isolamento de DNA genômico.

Amostras de aproximadamente 1cm³ de diferentes tecidos foram coletadas: gônadas, coração, tecido muscular abdominal, lamela da escama e sangue. A obtenção dessas várias amostras foi realizada objetivando a escolha do melhor tecido para extração de DNA genômico de boa qualidade para estudos de RAPD.

Ao ser coletado, o material foi acondicionado da seguinte maneira:

- Estocado em “freezer” com temperatura de -20°C, até o momento de extração de DNA para análise (que ocorreu uma semana depois da coleta).
- Acondicionado por alguns minutos em um tubo Eppendorf de 1,5mL com 1mL de álcool 70% e logo prosseguida a extração.
- Acondicionado em tubo Eppendorf de 1,5mL com 1mL de álcool 70% e mantido sob refrigeração na geladeira até o momento da extração durante até sete dias.
- *In vivo*, com realização de extração imediata.

Estão apresentados na tabela 1 a identificação de todos os indivíduos utilizados, a suspeita de sexo, as amostras de tecidos utilizadas para extração e o tipo de conservação.

Tabela 1: Identificação dos indivíduos com a suspeita do sexo a partir de características fenotípicas, seus respectivos tecidos amostrados para extração e o tipo de preservação empregada.

| Identificação | Suspeita de sexo | Amostra | Material coletado | Tipo de preservação |
|------------------------|------------------|---------|-------------------|---------------------|
| Pirarucu - 25/10/05 | macho | 1 | músculo | 1 |
| | | 2 | | |
| | | 3 | coração | |
| | | 4 | | |
| Pirarucu - 16/09/05 | fêmea | 5 | gônada | 1 |
| | | 6 | coração | |
| | | 7 | | |
| 3074 | fêmea | 8 | sangue | 4 |
| | | 9 | lamela da escama | 3 |
| 8514 | fêmea | 10 | sangue | 4 |
| | | 11 | | 3 |
| 0874 | macho | 12 | sangue | 4 |
| | | 13 | | |
| | | 14 | lamela da escama | 4 |
| | | 15 | | 3 |
| 9836 | macho | 16 | lamela da escama | 4 |
| | | 17 | | |
| | | 18 | sangue | 4 |
| | | 19 | lamela da escama | 3 |
| 2971 | - | 20 | lamela da escama | 2 |
| 2075 | fêmea | 21 | | |
| 3053 | fêmea | 22 | | |
| 4984 | macho | 23 | | |
| 8085 | - | 24 | | |
| 6192 | fêmea | 25 | | |
| 6424 | - | 26 | | |
| 6393 | fêmea | 27 | | |
| 1128 | fêmea | 28 | | |
| 4340 | macho | 29 | | |
| 8579 | - | 30 | | |
| 3352 | fêmea | 31 | | |
| Alevino 1 | - | 32 | | |
| Alevino 2 | - | 33 | | |
| Alevino 3 | - | 34 | | |
| Alevino 4 | - | 35 | | |

Legenda: Tipos de preservação: Tipo 1 - congelado por 1 semana em temperatura de -20°C; Tipo 2 - acondicionada por alguns minutos em álcool 70%; Tipo 3 - mantida sob refrigeração a 4°C em álcool 70% por 1 semana; Tipo 4 – *in vivo*, com extração imediata.

2.3 - Extração de DNA genômico

Foram realizadas extrações de DNA de 22 indivíduos utilizando o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio), descrito por Murray & Thompson (1980). Algumas modificações foram realizadas no método, tendo em vista que ele é geralmente aplicado para extração de DNA de tecidos vegetais, mas também tem apresentado eficácia para tecidos animais.

A extração teve início com a adição de 6 mL de CTAB e 12 μ L de mercaptoetanol em tubos Falcon identificados individualmente para cada amostra. Os tubos permaneceram em banho-maria, até atingir a temperatura de 60°C.

Enquanto isso, as amostras de tecidos coletadas foram cortadas e pesadas. Foi utilizada, aproximadamente uma grama (1g) de cada tecido, sendo cada amostra macerada com um pouco da solução que estava em cada tubo Falcon.

Após a maceração, o material foi transferido para os tubos Falcon e retornado para o banho-maria, ocorrendo homogeneizações periódicas por inversões dos tubos. Esta fase tem como finalidade promover a digestão de componentes celulares indesejáveis, tais como, lipídeos e proteínas (FREITAS, 2003).

Depois de em média 12 horas de incubação, os tubos foram retirados do banho-maria, sendo adicionado em cada tubo um volume de clorofórmio-álcool isoamílico (na proporção de 25:1, v/v), homogeneizando-se gradativamente.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 15.000 rpm em uma macrocentrífuga de bancada. Ao final, foram formadas três camadas diferentes em cada tubo. O sobrenadante (fase aquosa) de cada tubo, contendo uma solução com ácidos nucleicos, foi removido e transferido para um novo tubo Falcon, devidamente identificado. Para a precipitação do DNA, foi acrescentado dois terços de volume (em relação ao sobrenadante) de isopropanol (100%) gelado, invertendo-se cuidadosamente os tubos, que foram mantidos por 30 minutos à temperatura ambiente ou colocados sob refrigeração a 4°C para favorecer a precipitação do DNA.

Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 15000 rpm, o sobrenadante foi descartado, os pellets foram secos a temperatura ambiente e ressuspensos em 1 mL de NaCl (1M), até dissolver os pellets por completo e

novamente precipitado pela adição de 2,5 volumes de etanol 100% gelado. Realiza-se a centrifugação por 15 minutos a 15000 rpm, descarta o etanol, espera o pellet secar a temperatura ambiente e lava o pellet em 1 mL de etanol 70% durante 10 minutos. Mais uma vez, centrifuga por 15 minutos a 15000 rpm. O etanol 70% foi descartado e os pellets foram resuspenso em 2 mL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e estocados a 4°C.

2.4 - Quantificação do DNA

Para quantificar o DNA foi utilizada a espectrofotometria de absorção, considerado um importante teste de análise química qualitativa e quantitativa.

Foi usado um espectrofotômetro RNA/DNA para se obter a medida da concentração do DNA ($\mu\text{g/mL}$) de cada tecido das amostras, em diferentes diluições (1:4 e 1:29) em TE pH 8,0.

A absorção de luz ultravioleta (UV) pelos anéis aromáticos dos nucleotídeos é freqüentemente usada para se estimar a concentração de DNA, assumindo-se que o valor de absorbância igual a 1 (μm), correspondente a 1 cm de caminho óptico (260nm) obtido a partir de uma solução pura contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA. Os aminoácidos aromáticos (especialmente resíduos de triptofano) absorvem, ao máximo, luz à 280nm. Uma estimativa da contaminação por proteínas pode ser obtida pela razão 260/280 nm, ou seja, a relação entre DNA puro e proteínas contaminantes. Quanto maior for essa razão, menos contaminado será o DNA.

Após a determinação das concentrações do material genético, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a pH neutro, a fim de mostrar por meio de corantes específicos a qualidade de material isolado.

O gel de agarose tem a função de filtrar os genes ou segmentos destes que, quando submetidos a uma corrente elétrica em um líquido condutor adequado, bem como (Tris-Borato-EDTA 0,5 X), migram de um pólo para outro. Durante o caminho do DNA na matriz do gel, os genes ou segmentos se agrupam de acordo com seu peso molecular. As matrizes utilizadas para a eletroforese de ácidos nucléicos baseiam-se em agaroses, que proporcionam um meio poroso, capaz de suportar as condições relativamente agressivas da eletroforese empregada (por exemplo, altas voltagens ou temperaturas). A porosidade da matriz determina seu poder de resolução, sendo geralmente em

função do grau de polimerização. Géis de agarose são mais utilizados em função de sua facilidade de preparo, bem como a recuperação subsequente de DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Foram preparados géis de agarose 1,5% a partir da adição de 0,90 g de agarose adicionada a 6,0 mL de tampão TBE (Tris-Ácido Bórico 0,045 M, EDTA 0,001 M) e 54 mL de água destilada. Após a completa fusão em microondas, a mistura foi resfriada para a adição de 5,0 μ L de brometo de etídeo (EtBr), sendo então transferido o gel para uma cubeta, e fixado o pente até a solidificação do gel.

Em seguida, foram aplicadas nos poços do gel alíquotas de 10 μ L das amostras, com 2 μ L de corante azul de bromofenol, para facilitar a visualização da corrida e fixar as amostras nos poços (Figura 7). Com o gel submerso em solução (190mL de TBE 0,5 X e 1900 mL de água destilada), contendo EtBr (10 μ L), as amostras foram submetidas a uma corrente elétrica constante de 90V até o azul de bromofenol percorrer aproximadamente 2/3 do comprimento total do gel. Concluída a corrida, o gel foi transferido para um transluminador onde as bandas foram visualizadas em luz UV (302nm) devido à presença do brometo de etídeo impregnado nos ácidos nucleicos. Uma banda de alto peso molecular, correspondente à molécula de DNA, pode ser evidenciada.

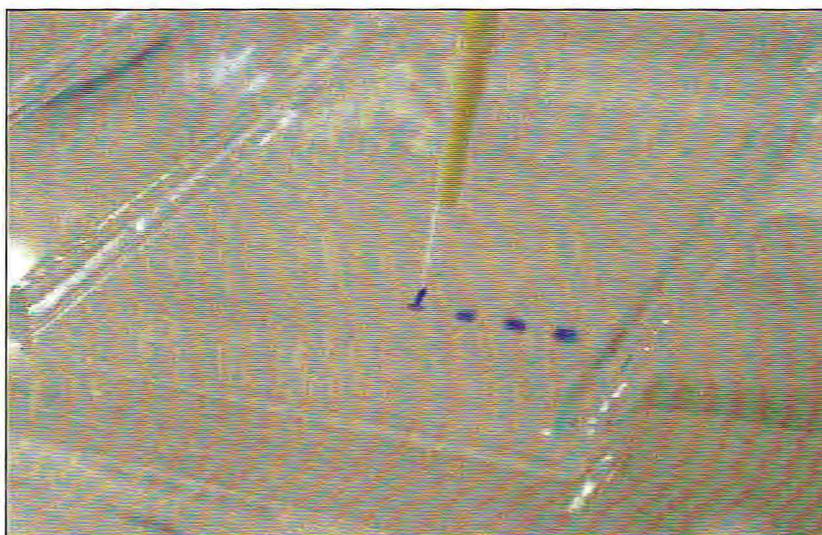


Figura 7: Amostras sendo aplicadas no gel.

Como registro e para posterior análise, os géis foram fotografados com máquina digital Sony DSC-S85.

Depois de extraído e devidamente quantificado, o DNA está pronto para ser utilizado em diferentes procedimentos da Biologia Molecular, incluindo reações de amplificação e construção de bibliotecas genômicas.

2.5 – Teste preliminar de Reações PCR-RAPD para identificação de sexo

Para termos confiança e verificarmos a eficiência da utilização das amostras de DNA para futuras reações de PCR-RAPD propriamente ditas, foram realizadas reações de teste para verificar se haveria o aparecimento de bandas polimórficas nos géis de eletroforese.

Com esse intuito, as reações de RAPD foram realizadas usando três primers sintetizados da Invitrogen Life Technologies Inc. As quantidades de reagentes utilizados para cada 25 μ L de reação encontram-se na tabela 2, enquanto que a seqüência dos primers encontra-se na tabela 3.

Foram separadas alíquotas de DNA diluído a diferentes concentrações finais para uso na PCR.

Tabela 2: Quantidade de reagentes utilizados para cada 25 μ L de reação.

| Reagente | Volume para uma reação 25 μ L |
|--------------------|--------------------------------------|
| Água | 17,3 μ L |
| Tampão | 2,5 μ L |
| DNTP | 2,5 μ L |
| Primer | 2,5 μ L |
| Taq DNA Polimerase | 0,2 μ L |

Tabela 3: Seqüência dos primers utilizados.

| Primers | Seqüência (5' para 3') |
|----------------|-------------------------------|
| OPF 03 | CCT GAT CAC C |
| OPF 06 | GGG AAT TCG G |
| OPF 08 | GGG ATA TCG G |

Nota: Convenções utilizadas: A - Adenina, G – Guanina, C – Citosina e T – Timina.

O programa de amplificação consistiu de 40 ciclos com temperatura de desnaturação de 92°C (1 minuto), temperatura de anelamento de 35°C (1 minuto) e temperatura de extensão de 72°C (2 minutos) no termociclador. A duração da termociclagem foi de aproximadamente 4 horas, quando então os produtos da amplificação foram retirados e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz UV.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Extração de DNA genômico

A extração de DNA dos 22 indivíduos, baseada no método de CTAB possibilitou a obtenção de boas quantidades de DNA e baixa concentração de proteína. Este é um aspecto muito importante, pois a presença de impurezas nas amostras afeta significativamente na realização de reações que envolvem etapas de ligação e amplificação (GONÇALVES, 2004).

A razão do comprimento de onda de DNA e de proteínas (260/280), que mede o grau de pureza das amostras, apresentou valores de níveis de pureza com variações de 1.15 a 2.38 (Tabela 4).

De acordo com Sambrook et al. (1989), se a razão 260/280 apresentar valores entre 1,8 e 2,0, a absorção é provavelmente devido a ácidos nucleicos de boa qualidade. No presente estudo, embora a maioria das amostras apresentou razões satisfatórias, indicando baixo nível de contaminação, apenas o sangue não obteve razões menores que 1,8, que juntamente com a lamela da escama, apresentou menor nível de contaminação.

As concentrações de DNA genômico pela medida da absorbância a 260nm e 280nm obtiveram variação de 79,6 a 494,5µg/mL (Tabela 5), considerando todos os tipos de amostras que foram utilizadas. Foi obtida uma média de 337,42µg/mL a partir de aproximadamente 1g por amostra de tecido.

Segundo Walker (1999), o isolamento de DNA em quantidade, pureza e integridade suficientes, representam um requerimento essencial para a obtenção de boas reações de RAPD.

Outro fator significativo para obtenção de bons resultados é a conservação da amostra, pois tecidos em perfeito estado podem garantir o sucesso das etapas subseqüentes dos experimentos realizados em laboratório (FREITAS, 2003). Portanto, a realização de extrações de amostras diferencialmente conservadas no presente estudo foi importante para se verificar a eficácia dos tipos de conservação.

Tabela 4: Absorbância e razão das amostras de DNA genômico extraídas através do reagente CTAB.

| Amostra | ABS% 260 | ABS% 280 | Razão 260/280 |
|----------------|-----------------|-----------------|----------------------|
| 1 | 0,548 | 0,398 | 1,37 |
| 2 | 0,398 | 0,278 | 1,43 |
| 3 | 0,997 | 0,678 | 1,47 |
| 4 | 1,512 | 0,776 | 1,9 |
| 5 | 0,924 | 0,805 | 1,15 |
| 6 | 1,169 | 0,755 | 1,55 |
| 7 | 1,004 | 0,719 | 1,39 |
| 8 | 0,197 | 0,098 | 2,010 |
| 9 | 0,220 | 0,093 | 2,365 |
| 10 | 0,188 | 0,082 | 2,292 |
| 11 | 0,171 | 0,079 | 2,164 |
| 12 | 0,185 | 0,088 | 2,102 |
| 13 | 0,186 | 0,078 | 2,384 |
| 14 | 0,232 | 0,101 | 2,297 |
| 15 | 0,277 | 0,133 | 2,083 |
| 16 | 0,190 | 0,085 | 2,235 |
| 17 | 0,20 | 0,089 | 2,247 |
| 18 | 0,204 | 0,093 | 2,193 |
| 19 | 0,226 | 0,111 | 2,036 |
| 20 | 0,268 | 0,115 | 2,33 |
| 21 | 0,302 | 0,155 | 1,94 |
| 22 | 0,214 | 0,142 | 1,5 |
| 23 | 0,341 | 0,200 | 1,7 |
| 24 | 0,281 | 0,129 | 2,18 |
| 25 | 0,313 | 0,138 | 2,26 |
| 26 | 0,260 | 0,117 | 2,22 |
| 27 | 0,313 | 0,146 | 2,14 |
| 28 | 0,314 | 0,138 | 2,27 |
| 29 | 0,356 | 0,159 | 2,24 |
| 30 | 0,281 | 0,133 | 2,11 |
| 31 | 0,298 | 0,132 | 2,26 |
| 32 | 0,318 | 0,156 | 2,04 |
| 33 | 0,292 | 0,129 | 2,26 |
| 34 | 0,325 | 0,152 | 2,14 |
| 35 | 0,288 | 0,129 | 2,23 |

Tabela 5: Concentrações diluídas e concentradas das amostras de *A. gigas* com respectivas diluições para quantificação.

| Amostra | Diluição | Concentração (*) (μg de DNA/mL) | |
|---------|----------|--|--|
| | | Diluída ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Concentrada ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
| 1 | 1/4 | 27,4 | 109,6 |
| 2 | 1/4 | 19,9 | 79,6 |
| 3 | 1/4 | 49,85 | 199,4 |
| 4 | 1/4 | 75,6 | 302,4 |
| 5 | 1/4 | 46,2 | 184,8 |
| 6 | 1/4 | 58,45 | 233,8 |
| 7 | 1/4 | 50,2 | 200,8 |
| 8 | 1/29 | 9,85 | 285,65 |
| 9 | 1/29 | 11,00 | 319 |
| 10 | 1/29 | 9,4 | 272,6 |
| 11 | 1/29 | 8,55 | 247,95 |
| 12 | 1/29 | 9,25 | 268,25 |
| 13 | 1/29 | 9,3 | 269,7 |
| 14 | 1/29 | 11,6 | 336,4 |
| 15 | 1/29 | 13,85 | 401,65 |
| 16 | 1/29 | 9,5 | 275,5 |
| 17 | 1/29 | 10,0 | 290,0 |
| 18 | 1/29 | 10,2 | 295,8 |
| 19 | 1/29 | 11,3 | 327,7 |
| 20 | 1/29 | 13,4 | 388,6 |
| 21 | 1/29 | 15,1 | 437,9 |
| 22 | 1/29 | 10,7 | 310,3 |
| 23 | 1/29 | 17,05 | 494,45 |
| 24 | 1/29 | 14,05 | 407,45 |
| 25 | 1/29 | 15,65 | 453,85 |
| 26 | 1/29 | 13,0 | 377 |
| 27 | 1/29 | 15,65 | 453,85 |
| 28 | 1/29 | 15,7 | 455,3 |
| 29 | 1/29 | 17,8 | 516,2 |
| 30 | 1/29 | 14,1 | 408,9 |
| 31 | 1/29 | 14,9 | 432,1 |
| 32 | 1/29 | 15,9 | 461,1 |
| 33 | 1/29 | 14,6 | 423,4 |
| 34 | 1/29 | 16,25 | 471,25 |
| 35 | 1/29 | 14,4 | 417,6 |

(*) Valor calculado admitindo-se que uma solução de absorvância a 260nm de 1,0 contém aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de fita dupla.

Ferreira & Grattapaglia (1998) constataram que a quantidade e qualidade de DNA obtido em extrações são afetadas pela condição do tecido antes da extração, sendo preferível a extração de DNA de tecidos vivos sempre que possível, assim como a manutenção dos tecidos entre a coleta e o momento da extração em laboratório.

Durante o procedimento de extração, foi verificado que a amostra de gônada obteve mais dificuldade na etapa de precipitação, momento em que foi adicionado isopropanol (100%) gelado. Foi necessário manter a solução sob refrigeração a 4°C para favorecer a precipitação do DNA, prolongando o processo.

Em relação aos diferentes tecidos utilizados, a eletroforese (Figura 8) de DNA genômico realizada em gel de agarose a 0,8% em geral apresentou bons resultados, sendo observadas algumas diferenças: Colunas 1, 2, 3, 4, 5, e 7 (amostras de sangue, lamela da escama, coração e gônada) apresentaram banda única e nítida, com as amostras de sangue concentradas apresentando melhores resultados; Colunas 8, 9, 10 e 11 não apresentaram nenhuma banda, o que pode ter sido causado por apresentarem níveis baixos de concentrações.



Figura 8: Eletroforese de DNA genômico de *A. gigas*, com amostras de diferentes tecidos e diferentes concentrações.

Legenda: Coluna 1 – Amostra 18 (C=292,9µg/mL); Coluna 2 – Amostra 10 (C=136,3µg/mL); Coluna 3 – Amostra 8 (C=159,5µg/mL); Coluna 4 – Amostra 14 (C=168,2µg/mL); Coluna 5 – Amostra coração macho (C=21,6µg/mL); Coluna 6 – Amostra gônada fêmea (C=6,95µg/mL); Coluna 7 – Amostra 18 (C=5µg/mL); Coluna 8 – Amostra 10 (C=5µg/mL); Coluna 9 – Amostra 14 (C=5µg/mL); Coluna 10 – Amostra 8 (C=5µg/mL); Coluna 11 – Amostra 1 (C=27,4µg/mL); Coluna 12 – Amostra 6 (C=58,45µg/mL).

Para as amostras concentradas de lamela da escama que foram conservadas em solução de álcool a 70% por alguns minutos, foi obtida uma eletroforese que apresentou bandas nítidas e definidas, com aproximadamente 23Kb, como mostra a figura 9.

Quando o DNA se encontra muito degradado, em vez de uma única banda evidente, é visualizado um grande rastro difuso ao longo do gel (CARREIRO, 2001).



Figura 9: Eletroforese de DNA extraído da lamela da escama, acondicionada por alguns minutos em álcool 70%.

Legenda : Coluna 1 – Amostra 20; Coluna 2 – Amostra 21; Coluna 3 Amostra 22; Coluna 4 – Amostra 23; Coluna 5 – Amostra 29; Coluna 6 – Amostra 24; Coluna 7 - Amostra 24; Coluna 8 – Amostra 25; Coluna 9 – Amostra 31; Coluna 10 – Amostra 26; Coluna 11 – Amostra 27; Coluna 12 – Amostra 30; Coluna 13 – Amostra 28; Coluna 14 – Amostra 32; Coluna 15 – Amostra 33; Coluna 16 – Amostra 34; Coluna 17 – Amostra 35; Coluna 18 – Amostra 32.

Quanto aos melhores tecidos verificados para extração de DNA, a lamela da escama e o sangue apresentaram vantagens em relação aos outros, pois possuíram alta concentração de DNA, com boa qualidade e pureza. Sendo o processo de retirada de escama mais prático, sem necessidade de prática para a realização e menos traumático para o animal quando da sua obtenção, permitindo uma melhor manipulação no processo de coleta da amostra. A retirada do sangue com a seringa foi de difícil realização, pois é necessário um mínimo de experiência para encontrar a veia no peixe, além do risco de acidente ser maior, pois o animal pode se debater a qualquer momento.

3.2. Teste preliminar de Reações PCR-RAPD para identificação de sexo

As análises preliminares da técnica RAPD foram realizadas com o objetivo de ser mais um parâmetro para a avaliação da qualidade do DNA extraído.

Dos três primers utilizados, o primer OPF 03 foi o mais eficiente, gerando produtos de amplificação polimórficos e com repetibilidade. Tanto o primer OPF 06 e OPF 08 não apresentaram bandas polimórficas.

Para as reações de teste realizadas, foram escolhidas amostras de um macho (amostra 4) e de uma fêmea (amostra 8), tendo em vista que apresentaram níveis baixos de contaminação e boa concentração. Mesmo assim, foi necessário efetuar diluições para que permitisse uma boa visualização no gel. A amostra 4 foi diluída 1:14, ficando com concentração de 21,6µg/mL. Da mesma maneira foi diluída a amostra 8, que ficou com concentração de 16,7µg/mL.

Como resultado satisfatório, foi obtida uma eletroforese com as referidas amostras de concentrações variadas, apresentando bandas polimórficas diferenciadas, mostrada na figura 10.



Figura 10: Padrão RAPD-PCR de *A. gigas*, apresentando bandas polimórficas diferenciadas.

Legenda: Colunas 1 a 9 – Amostra 8 ; Colunas 10 a 18 – Amostra 4

Os resultados verificaram que a técnica de RAPD utilizada foi eficiente em gerar fragmentos polimórficos. Esse marcador molecular exige amostras de

DNA com alto nível de pureza, pois a qualidade das mesmas é um fator crucial para o sucesso desta técnica (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Dessa forma, foi constatado que o DNA genômico extraído foi bastante eficiente.

Estudos genéticos em *A. gigas* são praticamente inexistentes, dentre eles está o trabalho publicado por Farias et al (2003), que a partir da utilização de marcadores moleculares, registraram um alto nível de variabilidade intra-populacional da espécie na bacia amazônica, mostrando que a população tem condições genéticas satisfatórias para se manter no ambiente.

O estudo realizado forneceu contribuições importantes para a genética do pirarucu, *A. gigas*, colaborou para as pesquisas a cerca da identificação sexual desse animal nos trabalhos realizados pelo DNOCS, além de ter aumentado a bibliografia sobre essa espécie.

Estudos futuros de uso de técnicas de RAPD-PCR baseados nesta pesquisa, irão contribuir para programas de manejo e conservação da espécie no Centro de Pesquisas Ictiológicas Rodolpho Von Ihering, do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS). Isto porque a aplicação dessa tecnologia poderá permitir a prévia seleção de casais de reprodutores, o que irá economizar tempo e dinheiro no processo biotecnológico de reprodução, e no fornecimento de reprodutores previamente sexados aos produtores que pretendem desenvolver o cultivo de pirarucu no Ceará.

4 – CONCLUSÕES

- ✓ As extrações de DNA genômico pelo método CTAB apresentaram resultados satisfatórios para todos os métodos de preservação das amostras.
- ✓ O sangue apresentou bons resultados, com boas concentrações de DNA e baixa contaminação, mas é preciso uma considerável prática para retirada da amostra.
- ✓ A lamela da escama se mostrou, nesse caso, como sendo a melhor opção para extração, com alta concentração de DNA de boa qualidade e pureza, sem necessitar de um certo nível de especialização para a coleta da amostra, além de ser menos traumático ao animal.
- ✓ As reações teste de RAPD foram eficientes em gerar fragmentos polimórficos, evidenciando a qualidade do DNA extraído.
- ✓ Os resultados obtidos no presente trabalho fornecem contribuições importantes para a genética do pirarucu, *A. gigas*, a cerca de sua identificação sexual nos trabalhos realizados pelo DNOCS.
- ✓ Novos estudos devem ser realizados com o intuito de aumentar a bibliografia sobre o *A. gigas* e fornecer subsídios que impulsionem o cultivo, conservação ou exploração sustentável da espécie.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. S. **Análise da variabilidade genética em Pimelodidae e Rhamdiidae (Pisces-Siluriformes) da bacia do rio Tibagi**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 102 p. 1998.

BARKER, J. S. F. Animal breeding and conservation genetics. In: LOESCHCKE, V.; TAMIUK, J.; JAIN, S. K. **Conservation genetics**. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel, 1994.

BERED, F. Extração de DNA - considerações e prática. In: MILACH, S. (Ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, 141p. 1998.

CARREIRO, C. R. P. **Identificação de populações de lagosta vermelha, *Panulirus argus*, do Norte e Nordeste do Brasil usando marcadores moleculares**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Pesca. 65p. 2001.

CARVALHO, L. O. D. M.; NASCIMENTO, C. N. B. do. **Engorda de pirarucus (*Arapaima gigas*) em associação com búfalos e suínos**. Belém: Embrapa-CPATU, 21 p. (Circular Técnica, 65). 1992.

CAVERO, B. A. S. **Densidade de estocagem de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) em tanques-rede de pequeno volume**. 2002. 51 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação. Universidade do Amazonas, Manaus, 2002.

CHEUNG, W.Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **Technical Tips**, v. 3, p.69-70, 1993.

COUTINHO, L. L.; REGITANO, L. C. A. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. In: Congresso de Genética Molecular. Santa Catarina. Genetics Molecular. p. 26. 2001.

CRESCÊNCIO, R. **Treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), utilizando atrativos alimentares**. 2001. 35 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, 2001.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Report**. v.1, p. 19-20, 1983.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 1, 13-15, 1991.

FAO, FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2005. www.fao.org.

FARIAS, I. P.; HRBEK, T.; CROSSA, M.; SAMPAIO, I.; PORTO, J.; MEYER, A. Avaliação da variabilidade genética das populações de *Arapaima gigas* (pirarucu) da Bacia Amazônica através de marcadores moleculares de microssatélites. In: **XV ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA**. São Paulo. 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPLAGIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares na análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN. 200p. 1996.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. p.220. (Documento, 20). 1998.

FONTENELE, O. **Contribuição ao conhecimento do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) em cativeiro (Actinopterygii, Osteoglossidae)**. Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas, p. 235-250. (Publicação, 166). 1955.

FONTENELE, O. **Hábitos de desova do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Pisces: Isospondyli, Arapaimidae), e evolução da sua larva**. Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas, 22 p. (Publicação, 153). 1953.

FONTENELE, O. **Contribuição ao conhecimento do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) em cativeiro (Actinopterygii, Osteoglossidae)**. Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas, p. 235-250. (Publicação, 166). 1955.

FREITAS, P. D. **Estudos de diversidade genética em estoques reprodutores de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados no Brasil**. Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos. 2003.

GONÇALVES, M. M. **Diversidade Genética do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado no Nordeste do Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Pesca. 49p. 2004.

GOULDING, M. Amazonian fisheries. In: MORAN, E. F. **The dilemma of amazonian development**. Bolder: Westview Press, 1983.

GURGEL, J. J. S. Trabajos presentados al Taller internacional sobre ecología y manejo de peces en lagos y embalses. Santiago, Chile, 1984.

HAIG, S. M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, v.79, n.2, p.413-425, 1998.

IBAMA, 2006. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. www.ibama.gov.br

IBAMA/PROVARZEA, 2006. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/ Projeto Iara/ Santarém-PA. www.ibama.gov.br/provarzea/download.

IMBIRIBA, E.P. Potencial da criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. **Acta Amazonica**, v.31, p.299-316, 2001.

KARP, A.; SEBERG, O.; BUIATTI, M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annals of Botany**, v.78, n.2, p.143-149, 1996.

LI, G. Q.; WILSON, M. V. H. Phylogeny of Osteoglossomorpha. In: STIASSNY, M. L.; PARENTI, L. R.; JOHNSON, G.D. (Ed.). **Interrelations of fishes**. San Diego: Academic, p. 163-174. 1996.

LIMA, F. M. **Estudo da variabilidade genética através de marcadores moleculares do tipo RAPD em algumas espécies e híbridos de tilápias (Pisces; Ciclidae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Pesca. 1999.

LIU, Z. J.; ARGUE, B. J.; DUNHAM, R. A.; Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. **Aquaculture**, v.174, p.59-68, 1999.

MARQUES, D. K. S. **Caracterização genética do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da bacia Tocantins-Araguaia, Estado do Mato Grosso**. Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, 2003.

MENEZES, R. S. de. **Notas biológicas e econômicas sobre o pirarucu**. Série estudos técnicos – nº 3. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1951.

MMA, 2006. Ministério do Meio Ambiente. www.mma.gov.br

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucl. Acids. Res.** 8: 4321-432. 1980.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vivo via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.** V. 55, p. 335-350, 1987.

NAISH, K. A.; WARREN, M.; BARDACKI, F.; SKIBINSKI, P.; CARVALHO, G. R. Use of DNA fingerprinting, RAPD and RAPD/RFLP markers for estimating variation between aquaculture strains of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.137, p.48. 1995. (Resumos).

- NELSON, J. S. Fishes of the world. 3rd ed. **New York: J. Wiley.** 600 p. 1994.
- ONO, E. A. "Pirarucu, O gigante esquecido". **Panorama da Aqüicultura.** vol.14. n.81. Jan/fev 2004. pág 14 a 25. 2004.
- ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas.** Brasília. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEN.. p.163-177. 1998.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S. J.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIN, N. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science.** Washington. V.230. p.1350-1354. 1985.
- SAINT-PAUL, V. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. **Aquaculture** 5: 205–240.1986.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH & T. MANIATIS. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- TAKAGI, M.; TANIGUSHI, N. Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of three species of *Anguilla*, *A. japonica*, *A. australis* and *A. bicolor*. **Fisheries Science**, v.61, n. 5, p. 884-885. 1995.
- WALKER, M. R. Guia de Rotas da Tecnologia do Gene. Tradução de Fernando Salvador Moreno. São Paulo: Atheneu. 334 p. 1999.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535. 1990.