



DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE TUBARÕES DO GÊNERO *CARCHARHINUS* CAPTURADOS PELA PESCA ATUNEIRA NO SUDESTE E SUL DO BRASIL

Domingues, R.R.^{1,2}; Rezende, P.C.²; Amorim, A. F.¹, Hilsdorf, A.W.S.²

1. Instituto de Pesca/APTA/SSA/SP, Santos-SP, Brasil, domingues.pesca@gmail.com; 2.Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA), Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes

RESUMO

A pesca atuneira que atua no sudeste e sul do Brasil captura grande quantidade de tubarões que nas estatísticas de desembarque estão divididos em cinco grupos: azul (*Prionace glauca*), martelo (*Sphyrna lewini* e *S. zygaena*); raposa (*Alopias superciliosus* e *A. vulpinus*); anequim (*Isurus oxyrinchus*) e os “outros tubarões” representados principalmente pelo gênero *Carcharhinus*. Dentre os tubarões do gênero *Carcharhinus* existe uma natural similaridade morfológica que dificulta a identificação precisa da espécie, associado à prática usual da retirada da cabeça, vísceras e nadadeiras ainda no mar, caracteres chave para a identificação morfológica. O presente estudo objetivou o desenvolvimento de um método prático, rápido e de baixo custo para a identificação molecular de três espécies do gênero *Carcharhinus* capturadas pela pesca atuneira na citada área, através do método PCR-RFLP. Foram recebidas cabeças de *C.falciformis*, *C.signatus* e *C.limbatus*, identificadas através da contagem e forma dos dentes e posteriormente coletado tecido muscular da região dorsal próxima à cabeça. Para a extração do DNA, utilizou-se o kit GE Healthcare *Life Sciences*®, sendo o DNA amplificado por reação de PCR do gene 16S ribossomal do DNA mitocondrial, purificado e sequenciado. Após o seqüenciamento as amostras foram tratadas e alinhadas *in silico* pelo pacote MEGA 4.1. Para localizar as enzimas de restrição utilizou-se o programa Neb Cutter V.2.0. Um total de 541 pares de bases do mtDNA 16S foram analisados para ambas as espécies e 43 enzimas de restrição clivaram o gene, no entanto apenas duas enzimas (DraI, PstI) produziram diagnósticos para determinação de cada espécie. O emprego desta metodologia pode auxiliar nas estatísticas de desembarque, que comumente agrupam mais de uma espécie com um mesmo nome comum, bem como futuros planos de manejo dessas espécies que se encontram na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção da IUCN como quase ameaçada e vulnerável.

Palavras-chave: Identificação, tubarões, mtDNA, pesca, conservação

INTRODUÇÃO

A pesca atuneira que atua no sudeste e sul do Brasil captura grande quantidade de tubarões que nas estatísticas de desembarque estão divididos em cinco grupos: azul (*Prionace glauca*), martelo (*Sphyrna lewini* e *S. zygaena*); raposa (*Alopias superciliosus* e *A. vulpinus*); anequim (*Isurus oxyrinchus*) e os “outros tubarões” representados principalmente pelo gênero *Carcharhinus* (Domingues *et al.*, 2009). Dentre os tubarões do gênero *Carcharhinus* existe uma natural similaridade morfológica que dificulta a identificação precisa da espécie, associado à prática usual da retirada da cabeça, vísceras e nadadeiras ainda no mar, que são caracteres chave para a identificação morfológica (Shivji *et al.*, 2005).

Para tubarões, o uso de marcadores moleculares tem sido bastante utilizada ao redor do mundo a fim de se obter uma identificação precisa das espécie e desmembrar grupos de diferentes espécies com um mesmo nome comum, auxiliando a estatística de desembarque e planos de manejo. O presente estudo objetivou o desenvolvimento de um método prático, rápido e de baixo custo para a identificação molecular de três espécie do gênero *Carcharhinus* capturadas pela pesca atuneira na citada área, através do método PCR-RFLP.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram recebidas cabeças de *C. falciformis*, *C. signatus* e *C. limbatus*, identificadas através da contagem e forma dos dentes e posteriormente coletado tecido muscular da região dorsal próxima à cabeça. Para a extração do DNA, utilizou-se o kit GE Healthcare *Life Sciences*[®], após a extração, o DNA foi avaliado quanto a sua integridade e concentração por meio de gel de agarose a 0,8% em tampão TAE 1X (0,04M Tris-acetato; 0,001M EDTA).

Para a amplificação da região do gene 16S ribossomal do DNA mitocondrial foram realizadas reações de PCR contendo DNA *template*, tampão 1X (50 mM de KCl e 20 mM de Tris-HCl – pH 8,4), 0,2 µM de cada *primer*, 2 mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas Life Sciences, Brasil), 0,25 mM de dNTP e água esterilizada para um volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador PTC – 100 (MJ Research) programado para desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C e extensão final de 10 minutos a 72°C. Os *primers* utilizados foram L2510 5'- CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT - 3' e H3080 5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T - 3' (Palumbi, 1996).

O produto de PCR foi purificado utilizando o kit “GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare), de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante. O seqüenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. Após o seqüenciamento as amostras foram analisadas *in silico* pelo pacote MEGA 4.1 (Kumar *et al.*, 1993). Para localizar as enzimas de restrição utilizou-se o programa Neb Cutter V.2.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 541 pares de bases do mtDNA 16S foram analisados para ambas as espécies sendo que 43 enzimas de restrição clivaram o gene, porém apenas 02 foram eficientes para produzir fragmentos diagnósticos para uma precisa identificação de cada espécie. As enzimas Dral (5'-TTTAAA-3') e Pasi (5'-CCCWGGG-3') forneceram fragmentos chaves que permitiram diferenciar as espécies.

Tabela 1. Sequência de 16S e sítios de restrição de Pas I (CCCAGGG) e Dra I (TTTAAA).

<i>C. falciformis</i>	TTCAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCGTAATCACTGTCTTTTAAATGAAGACCTGTATGAAAGGCATCACGAGAGTTAACTGTCTCT ATTTTCTAATCAATGAAATTGATCTATTCGTGCAGAAGCGAATATAATAACATTAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTCAAACACTTAAATTAATTATGT AATCCTCCCCTCCCAGGGGATAAACAACATACAATACTTCTAATTTAACTGTTTTGGTTGGGGTGACCAAGGGGAAAAACAAATCCCCTCATCGA TTGAGTACTAAGTACTTAAAAATTAGAATGACAATTCTAATTAATAAAACATTTATCGAAAAATGACCCAGGATTTCTGATCAATGAACCAAGTTACCC TAGGGATAACAGCGCAATCCTTTCTCAGAGTCCCTATCGAAGAAAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGAACCCGCTATTA GGGTTGTTTTGTTCAACGATTAACAGTCTACGTGATCTGA
<i>C. signatus</i>	TTCAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGMAGTAGCGTAATCACTGTCTTTTAAATGAAGACCTGTATGAAAGGCATCACGAGAGTTAACTGTCTCT ATTTTCTAATCAATGAAATTGATCTATTCGTGCAGAAGCGAATATAATAACATTAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTTAAACACTTAAATTAATTATGT ATTACCCACCTCCCAGGACATAAACAATAACAATATTTCTAATTTAACTGTTTTGGTTGGGGTGACCAAGGGGAAAAATAAATCCCCTTATCGA TTGAGTACTAAGTACTTAAAAATTASAACAACAATTCTAATTAATAAAATTTTATCGAAAAATGACCCAGGATTTCTGATCAATGAACCAAGTTACCC TAGGGATAACAGCGCAATCCTTTCTCAGAGTCCCTATCGAAGAAAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGAACCCGCTATTA GGGTTGTTTTGTTCAACGATTAATAGTCTACGTGATCTGA
<i>C. limbatus</i>	TTCAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCGTAATCACTGTCTTTTAAATGAAGACCTGTATGAAAGGCATCACGAGAGTTAACTGTCTCT ATTTTCTAATCAATGAAATTGATCTATTCGTGCASAAGCGAATATAATAACATTAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTCAAACACTTAAATTAATTATGT AATCATCCACTCCCAGGATATAACAATAACAATACTTCTAATTTAACTGTTTTGGTTGGGGTGACCAAGGGGAAAAACAAATCCCCTCATCGA ATTGAGTACTAAGTACTTAAAAATTASAATGACAATTCTAATTAATAAAATTTTATCGAAAAATGACCCAGGATTTCTGATCAATGAACCAAGTTACCC AGGGATAACAGCGCAATCCTTTCTCAGAGTCCCTATCGAAGAAAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGAACCCGCTATTA AGGTTGTTTTGTTCARCGATTAATAGTCTACGTGATCTGA

Em tubarões, a identificação forense tem sido amplamente utilizada em todo o mundo. Pank *et al.* (2001) aplicaram a reação de PCR multiplex para regiões do DNA nuclear (ITS 2, internal transcribed spacer 2) e mitocondrial (citocromo b) na discriminação das espécies *Carcharhinus obscurus* e *C. plumbeus*. Outras seis espécies de tubarões, sendo três espécies da família *Lamnidae* (*Isurus oxyrinchus*, *I. paucus* e *Lamna nasus*) e três da família *Carcharhinidae* (*Prionace glauca*, *Carcharhinus obscurus* e *C. falciformis*) puderam ser também discriminadas com o uso de marcadores moleculares (Shivji *et al.*, 2002). Abordagem semelhante foi utilizada por Chapman *et al.* (2003) e mais recentemente por Shivji *et al.* (2005) em amostras com o nome genérico de “caçãõ” obtidas em mercados asiáticos. Estes dois trabalhos constataram a presença de carne e nadadeiras do tubarão-branco (*Carcharodon carcharias*) entre as espécies comercializadas, ainda que esta espécie seja protegida por lei em vários países.

Embora esta técnica seja amplamente utilizada para identificação de tubarões, a sequência parcial do 16S foi utilizada pela primeira vez para identificação das citadas espécies.

Uma correta identificação torna-se imperativa, uma vez que cada espécie responde de maneira diferente à pressão pesqueira. O emprego desta metodologia pode auxiliar nas estatísticas de desembarque, que comumente agrupam mais de uma espécie com um mesmo nome comum, bem como futuros planos de manejo dessas espécies que se encontram na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção da IUCN como quase ameaçada e vulnerável.

APOIO

FAPESP, Project Aware Foundation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Domingues, R.R; Piva-Silva, N.; Amorim, A.F. 2009. Participação do gênero *Carcharhinus* (Chondrichthyes – Carcharhiniformes) na pesca atuneira no sudeste e sul do Brasil. I Encontro da Pós-Graduação do Instituto de Pesca – SP(online).
- Kumar S, Tamura K & Nei M (1993) MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Palumbi SR (1996) Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Molecular Systematics (eds Hillis DM, Moritz C, Mable BK), pp. 205–247. Sinauer & Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Pank, M., Shivji, M., Stanhope, M., Natanson, L., Kohler, N. 2001. Rapid and Simultaneous Identification of Body Parts from the Morphologically Similar Sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) Using Multiplex PCR. *Marine Biotechnology*. 3: 231–240
- Shivji, M., Clarke, S., Pank, M., Natanson L., Kohler, N., Stanhope, M.m 2002. Genetic Identification of Pelagic Shark Body Parts for Conservation and Trade Monitoring. *Conservation Biology* 16: 1036-1047.
- Shivji, M.S, Chapman, D.D, Pikitch, E.K., Raymond, P.W., 2005. Genetic profiling reveals illegal international trade in fins of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. *Conservation Genetics* 6: 1035-1039