

## 17. IMPLANTAÇÃO DO BANCO DE DNA DE PEIXES DA BACIA ARAGUAIA-TOCANTINS: APLICAÇÕES NA TAXONOMIA, PRODUÇÃO E CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS.

Aurisan da Silva Barroso<sup>78</sup>, Lorranny Rodrigues Silva<sup>79</sup>, Vanessa Mendes Barros<sup>80</sup>, Artur da Silva Oliveira<sup>81</sup>, Mariana Saragiotto Silva Alves<sup>82</sup>, Eduardo S. Varela<sup>83</sup>, Diogo Teruo Hashimoto<sup>84</sup>, Anderson Luis Alves<sup>85</sup>

### RESUMO

Atualmente, as coleções de DNA ou de tecidos biológicos, tais como nadadeiras, sangue e músculo, são comuns nos principais Museus de História Natural ou de Zoologia nos EUA e Europa. No Brasil, está é uma atividade recente, sobretudo em coleções ictiológicas. A dificuldade em se obter a identificação precisa das espécies de peixes Neotropicais vem motivando as coleções e museus a manter além de peixes fixados em formol, tubos com amostras de tecidos para análise de DNA. Estes bancos ainda tem a função de identificar a diversidade genética de populações naturais, visando a conservação de recurso genético e direcionamento do uso destes recursos em sistemas de produção. Com isso, a formação de um banco de amostras de DNA na Embrapa Pesca e Aquicultura tem por objetivo, identificar taxonomicamente as espécies com potencial zootécnico e auxiliar na conservação das espécies nativas da bacia Araguaia-Tocantins. A domesticação de espécies de peixes para o cultivo em sistemas de produção é uma das formas mais importantes de exploração da biodiversidade. Entretanto, estudos mostraram que apenas 36 espécies de peixes amazônicos são exploradas comercialmente, seja para produção ou como ornamentais, entre eles os mais conhecidos são o tambaqui, matrinchã, pirapitinga, pirarucu, piau, curimatã, surubins, oscar, neons e arraias, e ainda assim, com alguns problemas de identificação taxonômica. O presente trabalho apresenta a coleção de amostras de tecidos e de DNA extraído de peixes amazônicos, da bacia dos rios Araguaia-Tocantins, que possui atualmente 1180 indivíduos amostrados, pertencentes a 68 espécies de 54 gêneros, 22 famílias e 6 ordens. Embora o banco de amostras de DNA esteja em fase de implantação, tendo sido criado em junho de 2012, os números são expressivos e reflete o enorme potencial da atividade em termos de conservação de recursos genéticos voltados a produção e podem servir de base para programas de identificação de espécies.

**Palavras-chaves:** Conservação genética, biodiversidade, coleção.

### ABSTRACT

Currently, the collections of DNA or biological tissues, such as fins, muscle and blood, are common in major Museums of Natural History or Zoology in the U.S. and Europe. In Brazil, this is a recent activity, especially in ichthyological collections. The difficulty in obtaining accurate identification of Neotropical fishes species motivating the collections and museums

<sup>78</sup> Acadêmico da Faculdade Católica do Tocantins, Curso de Zootecnia. E-mail: [aurisan93@hotmail.com](mailto:aurisan93@hotmail.com)

<sup>79</sup> Acadêmica da Faculdade Católica do Tocantins, Curso de Zootecnia; E-mail: [lorranny@outlook.com](mailto:lorranny@outlook.com)

<sup>80</sup> Acadêmica da Faculdade Católica do Tocantins, Curso de Zootecnia E-mail: [vanessabarroszoot@hotmail.com](mailto:vanessabarroszoot@hotmail.com)

<sup>81</sup> Acadêmico da Faculdade Católica do Tocantins, Curso de Zootecnia. E-mail: [artur.a.s.o@hotmail.com](mailto:artur.a.s.o@hotmail.com)

<sup>82</sup> Professora da Faculdade Católica do Tocantins, Curso de Zootecnia. E-mail: [mariana@catolica-to.edu.br](mailto:mariana@catolica-to.edu.br)

<sup>83</sup> Pesquisador da Embrapa Pesca e Aquicultura. E-mail: [eduardo.varela@embrapa.br](mailto:eduardo.varela@embrapa.br)

<sup>84</sup> Pesquisador da Embrapa Pesca e Aquicultura. E-mail: [diogo.hashimoto@embrapa.br](mailto:diogo.hashimoto@embrapa.br)

<sup>85</sup> Pesquisador da Embrapa Pesca e Aquicultura. E-mail: [anderson.alves@embrapa.br](mailto:anderson.alves@embrapa.br)

in addition to keeping fish in formalin fixed, tubes with tissue samples for DNA analysis. These banks also have the function of identifying the genetic diversity of natural populations to conserve the genetic resource and directing the use of resources in production systems. Thus, the formation of a DNA samples bank at Embrapa Fisheries and Aquaculture aims, taxonomically identify the species with potential livestock and assist in the conservation of native species from the Araguaia-Tocantins river basin. The domestication of fish species for cultivation in production systems is one of the most important forms of biodiversity exploitation. However, studies have shown that only 36 species of Amazonian fishes are commercially exploited, whether for production or as ornamentals, among them the best known are the tambaqui, Matrinchã, pirapitinga, arapaima, piau, curimatã, surubins, oscar, neons and stingrays, and still some problems of taxonomic identification. This paper presents a collection of tissue samples and DNA extracted from Amazonian fish (Araguaia-Tocantins river basin), which currently has 1180 individuals sampled, belonging to 68 species of 54 genera, 22 families and 6 orders. Although the bank of DNA samples are being implemented, having been created in June 2012, the numbers are impressive and reflects the huge potential of the activity in terms of conservation of genetic resources geared to production and can serve as a basis for programs species identification.

**Keyword:** Genetic Conservation, biodiversity, collection.

## INTRODUÇÃO

A biodiversidade nos ambientes aquáticos continentais tem sido ameaçada pelos constantes impactos ambientais. A ictiofauna, que corresponde a aproximadamente 25% das espécies de vertebrados existentes (Reis et al., 2003), vêm sofrendo os efeitos das mudanças ambientais como poluição, desmatamento, assoreamento, sobrepesca e construção de barragens, entre outros (Agostinho e Júlio Jr., 1999). Visto que os peixes têm uma acentuada importância como fonte de alimento e de geração de riquezas, principalmente com o desenvolvimento expressivo das atividades da piscicultura e, mais recentemente, com a intensiva produção e comercialização de peixes híbridos, a conservação e manejo da biodiversidade, incluindo a variabilidade genética, devem ser priorizados.

A conservação de recursos genéticos, tanto em animais como em plantas, possuem duas estratégias bem estabelecidas, denominadas de conservações em *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* representa a estratégia de manter o recurso genético protegido em seu local de origem e de distribuição geográfica, de modo geral, através de áreas de proteção ambiental ou áreas de acesso e uso restritos. Por outro lado, a estratégia de conservação *ex situ* indica que o recurso genético será preservado fora da área de origem ou de ocorrência natural, sendo este mantido em bancos de germoplasma, coleção de tecidos ou ainda criopreservados, neste caso para animais: sêmen, ovócitos, embriões, células somáticas e DNA. Os dois métodos de conservação visam manter a variabilidade genética dos organismos de interesse comercial ou de biodiversidade (Toledo-Filho et al., 1998). No entanto, a estratégia de conservação *ex-situ* ainda pode ser de duas maneiras, o ativo, onde o recurso genético pode ser utilizado a qualquer momento para manutenção e inclusão de variabilidade genética em estoques cultivados, por exemplo, ou o preservado/inativos, onde as amostras de DNA são utilizadas para o conhecimento científico e aplicações tecnológicas. De modo geral os bancos ativos e preservados/inativos não possuem apenas a função de armazenar o material genético, sendo também responsáveis pelas atividades de prospecção, coleta, introdução de variabilidade, intercâmbio, quarentena, caracterização, conservação, multiplicação e regeneração do germoplasma (Toledo-Filho et al, 1999).

A implantação e a manutenção de coleções de DNA visam promover inicialmente o conhecimento dos genomas das espécies que se queira preservar. Estes estudos se iniciam com o desenvolvimento de metodologias de detecção de informações genéticas intra e interespecíficas, e a partir destes dados pode-se proceder, por exemplo, análises da estruturação genética de populações, filogenia molecular em comparações interespecíficas de relacionamento, identificação de novas espécies e de níveis de endogamia intraespecífica (Toledo-Filho et al, 1999). Estes estudos podem ser empregados em vários problemas da biologia da conservação, tal como na discriminação de espécies e/ou subespécies ameaçadas, desenvolvimento de estratégias de manejo reprodutivo para evitar endogamia e determinação do status de conservação de uma espécie utilizando-se parâmetros de estruturação da diversidade genética.

Atualmente no Brasil vários laboratórios de genética e museus com coleções ictiológicas, como o MZUSP e INPA, possuem coleções ou bancos de amostras de tecidos de peixes para análises de DNA, com interesse científico. No entanto não há no país nenhum Banco Ativo de Germoplasma de Peixes Nativos ou Coleção de tecidos para DNA com o interesse em prospecção de biodiversidade e aplicações biotecnológicas na produção e na conservação. Nesse sentido a Embrapa Pesca e Aquicultura vem contribuir para o conhecimento e formação de um núcleo de conservação de recursos genéticos em peixes, em especial da bacia Amazônica, envolvendo os rios Araguaia-Tocantins.

O presente trabalho se insere em uma plataforma de estudos genéticos e genômicos de peixes nativos de água doce desenvolvida na Embrapa Pesca e Aquicultura com enfoque em melhoramento genético, prospecção de biodiversidade e conservação de recursos genéticos. Esta plataforma conta com a colaboração da FACTO na fase inicial da implantação da estrutura física do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa. Nesse sentido, temos como objetivo principal deste trabalho desenvolver a coleção de tecidos e DNA de peixes nativos, em especial dos amazônicos e contribuir com a formação de recursos humanos na área de conservação de recursos genéticos;

## **METODOLOGIA**

As amostragens foram realizadas em ambiente natural e em pisciculturas na bacia do rio Araguaia-Tocantins (Figura 1). Em ambiente natural no rio Tocantins em Porto Nacional e em Lajeado, na bacia do rio Araguaia em Cazeara, enquanto nas pisciculturas no estado do Tocantins foram amostradas espécies nativas da bacia Araguaia-Tocantins utilizadas como matrizes em piscicultura e que foram capturadas em ambiente natural. Para a formação do banco de amostras de tecidos foram utilizados apenas peixes vivos, congelados vivo, ou sob efeito de anestésico. Qualquer tecido pode ser utilizado, mais para que o animal não seja ferido, buscamos utilizar um pedaço da nadadeira caudal para as amostragens. Os procedimentos utilizados são os seguintes:

1. Cortar um pequeno pedaço de tecido da nadadeira caudal do peixe, sempre usando uma tesoura e pinças limpas. O tamanho ideal do tecido deve estar em torno de 1,5x2 cm. (Figura 2a e b)
2. Colocar a amostra de nadadeira no tubo contendo álcool. O material pode ser preservado à temperatura ambiente ou na geladeira. É fundamental que as amostras de tecido fiquem totalmente dentro do álcool. (Figura 2 c e d).

Não é necessário o uso de luvas cirúrgicas, mas as mãos do coletor devem ser limpas com água para retirar o muco e/ou escamas de peixe entre cada manipulação, assim como a tesouras e pinças devem ser lavadas em álcool 70% (comum) entre cada coleta de amostras de cada peixe. Essas medidas visam minimizar a chance de contaminação cruzada (amostra de DNA de duas espécies diferentes ou dois indivíduos no mesmo tubo). Os tubos coletores são

armazenados em caixas plásticas numeradas, sendo mantidas sob temperatura de -20C em freezers.

O material coletado tem as informações lançadas em planilha, contendo: 1) PROCEDÊNCIA: local da coleta (rio, bacia hidrográfica, ou piscicultura). 2) DATA: informar a data da coleta do material. 3) ESPÉCIE: Nome científico, família, Ordem. 4) SEXO: M-macho e F-fêmea (quando possível identificar) 5) IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA: (número do tubo) 6) IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL: (número do tag, se houver).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho apresenta a coleção de amostras de tecidos para análises de DNA em especial dos peixes amazônicos, que possui atualmente 1180 indivíduos amostrados, pertencentes a 68 espécies de 54 gêneros, 22 famílias e 6 ordens (Tabela 1). As amostragens foram realizadas em rios da bacia do rio Tocantins e rio Araguaia, bem como na bacia do rio Teles Pires, e no rio Tapajós ambos pertencentes a bacia hidrográfica do rio Amazonas. Amostras adicionais foram amostradas para as bacias do rio Paraguai (Rios Cuiabá, Paraguaia, Miranda e Aquidauana), para as espécies comerciais *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) e *P. reticulatum* (cachara), além de *Piaractus mesopotamicus* (pacu) (Tabela 1), no entanto, tais espécies são produzidas na pisciculturas do estado do Tocantins e existem relatos de indivíduos adultos amostrados nos afluentes da bacia do rio Tocantins, evidenciando possíveis escapes e ou iniciativas de introdução de espécies exóticas a bacia.

Estima-se para a bacia dos rios Araguaia-Tocantins a ocorrência de cerca de 250 espécies, deste modo, o Banco de amostra de DNA da Embrapa Pesca e Aquicultura já possui cerca de 25% das espécies da bacia amostradas para análises de DNA e prospecção gênica e de biodiversidade, possibilitando a correta identificação taxonômica, sobretudo aquelas espécies com dificuldades de identificação, como cachara, jaú, piaus, cascudos, em especial os tucunarés, que ocorrem naturalmente na bacia, mas a taxonomia é controversa quanto ao número preciso de espécies, além da possibilidade de ocorrência de hibridação natural. Outra importante aplicação do banco é o auxílio em futuros programas de identificação de espécie (DNA barcoding) a partir de ovos e larvas de peixes nativos da bacia, tal identificação baseado apenas na morfologia de ovos e larvas se torna difícil e baixa precisão, nesse sentido, análises de DNA em indivíduos adultos podem se tornar referência para a identificação dos ovos e larvas.

O banco de DNA também possibilitará o conhecimento da diversidade genética dos estoque pesqueiros das principais espécies de interesse esportivo e comercial, como os tucunarés, surubins, caranhas e pirarucus que são nativos das bacias Araguaia-Tocantins, bem como poderão direcionar ações de conservação ao longo da bacia, pois possibilitará a identificação dos efeitos das barragens de hidroelétricas sobre as populações de peixes migradores na bacia do rio Tocantins.

Finalmente, a formação do banco tem uma aplicação direta na prospecção de biodiversidade para identificar possíveis espécies com potencial para piscicultura, além de identificar a diversidade genética das espécies comerciais em ambiente natural para conduzir a formação de plantel de reprodutores com alta diversidade genética. Adicionalmente, os piscicultores têm no banco de DNA a oportunidade de fornecer material genética das espécies produzidas na piscicultura do estado buscando identificar a estrutura genética das matrizes para detectar níveis de endogamia, bem como a ocorrência de híbridos entre os reprodutores, que podem causar contaminação genética ao estoque e depreciação na produção.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o banco de amostras de DNA esteja em fase de implantação, tendo sido criado em junho de 2012, os números são expressivos e refletem o enorme potencial da atividade em termos de conservação de recursos genéticos voltados a produção sustentável.

## AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem a Faculdade Católica do Tocantins por proporcionar a realização deste trabalho fornecendo a infraestrutura física necessária. Ao Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) pelo financiamento parcial deste trabalho e a Embrapa Pesca e Aquicultura pelo apoio.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO-JR, H.F. (1999) Peixes da bacia do alto Paraná. *In*: LOWEMcCONNELL, R.H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Trad.: Vazzoler, A.E.A.M.; Agostinho, A.A.; Cunningham, P.T.M. São Paulo: **Edoousp**, p. 374-399.

TOLEDO-FILHO, S. A. et al. Cadernos de Ictiogenética 4: Programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura. São Paulo, CCS/USP, 1998. 56p.

TOLEDO-FILHO, S. A. et al. Cadernos de Ictiogenética 5: Projeto de bancos genéticos na piscicultura brasileira. São Paulo, CCS/USP, 1999. 53p.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. (2003) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA), Porto Alegre, **Edipucrs**, p. 729

## DIREITOS AUTORAIS

Os autores são os únicos responsáveis pelo conteúdo do material incluídos neste trabalho.

**Anexos (Figura)**

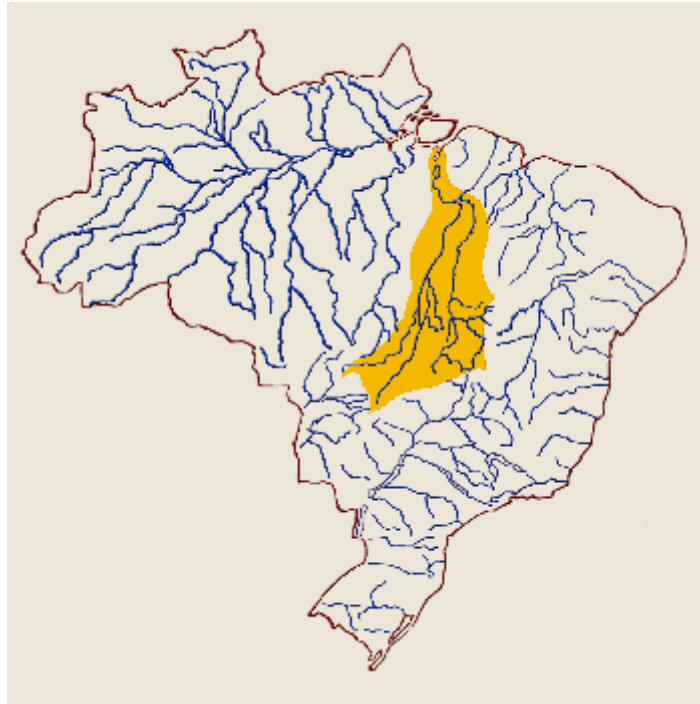


Figura 1: Principais bacias hidrográficas do Brasil em destaque a dos rios Araguaia-Tocantins.

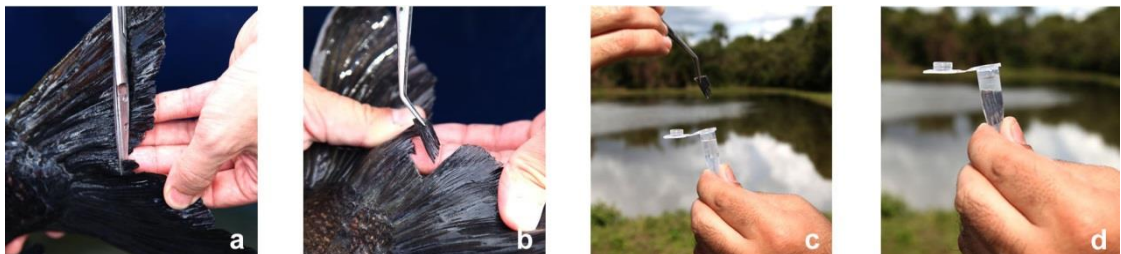


Figura2. Esquema de coleta e acondicionamento de amostras de tecido para análises de DNA.

## Anexo (Tabela)

Tabela 1. Lista das espécies pertencentes ao Banco de amostras de DNA.

Ordem	Família	Espécie	Popular	N
<b>Beloniformes</b>	Belontiidae	<i>Pseudotilapia microps</i>	Espadinha	20
<b>Characiformes</b>	Ctenopomidae	<i>Boulengerella cuvieri</i>	Bicuda	1
	Cynodontidae	<i>Hydrolycus cf. armatus</i>	Cachorra	3
		<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	Cachorra	5
	Hemiodontidae	<i>Hemiodus microlepis</i>	Cruzeiro do sul	1
		<i>H. unimaculatus</i>	Cruzeiro do sul	5
	Bryconidae	<i>Salminus icquimensis</i>	Tabarana	2
		<i>Brycon pesu</i>	Matrinchã	2
	Acestrorhynchidae	<i>Acestrorhynchus microlepis</i>	Peixe cachorro	6
	Anostomidae	<i>Schizodon vittatus</i>	Piau pororoca	1
		<i>Anostomidae sp.</i>	Papa terra	3
		<i>Leporinus cf. trifasciatus</i>	piau	2
		<i>L. sp.1b</i>	Piau	1
	Curimatidae	<i>Curimata acutirostris</i>	Curimba	4
	Prochilodontidae	<i>Semaprochilodus brama</i>	Jaraqui	11
		<i>Semaprochilodus insignis</i>	Jaraqui	201
		<i>Prochilodus nigricans</i>	curimba	4
	Serrasalminidae	<i>Myloplus sp.</i>	Prata 1	3
		<i>M. torquatus</i>	Prata 2	3
		<i>Myleus setiger</i>	Rabo vermelho	18
		<i>Serrasalmus cf. maculatus</i>	Piranha	3
		<i>Colossoma macropomum</i>	tambaqui	250
		<i>Piaractus brachipomus</i>	caranha	135
		<i>P. mesopotamicus</i>	pacu	5
	Characidae	<i>Agoniatodes halesinus</i>	Apapá	2
		<i>Roebooides affinis</i>	Cachorro	9
		<i>Tetragonopterus chalcus</i>	pataca	3
		<i>Triportheus albus</i>	Sardinha	12
	Erythrinidae	<i>Erythrinus erythrinus</i>	jeju	4
		<i>Hoplias malabaricus</i>	Traíra	7
		<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	Jeju	2
<b>Clupeiformes</b>	Pristigasteridae	<i>Pellona flavipinis</i>	Apapá/Dorada	2
		<i>Pristigaster cayana</i>	Borboleta	8
	Engraulidae	<i>Lycengraulis batesi</i>	Sardinha prata	7
<b>Osteoglossiformes</b>	Arapaimidae	<i>Arapaima gigas</i>	pirarucu	31
	Osteoglossidae	<i>Osteoglossum bicirrhosum</i>	Aruanã	3
<b>Perciformes</b>	Cichlidae	<i>Geophagus sveni</i>	Cara	15
		<i>G. aff. altifrons</i>	cará	1
		<i>Cichla piquiti</i>	Tucunaré azul	2

		<i>C.kelberi</i>	tucunaré amarelo	2
		<i>C. sp.</i>	Tucunaré	41
		<i>Astronotus ocellatus</i>	oscar	10
		<i>Geophagus neambi</i>	Cara	1
		<i>Ciclhassoma araguaiense</i>	Cará	2
		<i>Mesonauta cf. acora</i>	Acará festivo	4
	Sciaenidae	<i>Plagiosum squamosissimus</i>	Curvina	5
<b>Siluriformes</b>	Loricariidae	<i>Hypostomus sp.9</i>	Cascudo	1
		<i>H. sp.7</i>	Cascudo	8
		<i>Baryancistrus niveatus</i>	cascudo	6
		<i>Glyptoperichthys joselimaianus</i>	Cascudo abacaxi	1
	Pimelodidae	<i>Pimelodina flavipinis</i>	Mandi moela	9
		<i>Hypophthalmus marginatus</i>	Mapará	15
		<i>Hassar wilderi</i>	Mandi cabeça ferro	2
		<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	cachara amazonica	88
		<i>P. reticulatum</i>	cachara pantanal	90
		<i>P. tigrinum</i>	surubim	20
		<i>P. corruscans</i>	pintado	9
		<i>Leiarius marmoratus</i>	jundia	19
		<i>Surubim lima</i>	jurupessem	6
		<i>S. tigocephalus</i>	jurupessem	5
		<i>Hemisurubim platyrhynchus</i>	jurupoca	2
		<i>Zungaro zungaro</i>	jau	3
	Doradidae	<i>Oxydoras niger</i>	Cuiu-Cuiu	10
		<i>Pterodoras granulosus</i>	Armado	6
		<i>Platydoras armatulus</i>	Armado amarelo	5
		<i>Rhinodoras cf. dorbignyi</i>	Armado preto	4
	Auchenipteridae	<i>Auchenipterus nuchalis</i>	Bagre	8
	?	<i>Hypothinemus mentalis</i>	?	1
<b>Total</b>				<b>1180</b>