

CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES COM APLICABILIDADE PARA IDENTIFICAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE PEIXE COM INTERESSE FORENSE: *PROCHILODUS ARGENTEUS* E *PROCHILODUS COSTATUS*

RESUMO

A crescente preocupação com as questões ambientais, aliada ao advento de leis que procuram proteger os recursos naturais, tem criado uma nova demanda na área das ciências forenses que trata das perícias ambientais. Em relação às atividades de pesca, existem diversas cartas legislativas em vigor que buscam proteger os recursos pesqueiros. Em contrapartida, a correta identificação de espécimes apreendidos em ocorrências de pesca ilegal ainda é feita de modo precário. Dessa forma, seria desejável o estabelecimento de protocolos simplificados que permitam a correta identificação de materiais apreendidos, como forma de fortalecer as ações de fiscalização e, posteriormente, a prova no meio jurídico. Nesse aspecto, as técnicas moleculares podem oferecer grande ajuda através do estabelecimento de marcadores espécie-específicos, que permitam afirmar que o material questionado é proveniente, de fato, de espécie cuja pesca não é permitida. O presente trabalho objetiva caracterizar marcadores moleculares para as espécies *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus costatus*, ambas de grande importância ecológica e econômica na região da bacia hidrográfica do rio São Francisco. Para tanto, foi feito o sequenciamento de DNA genômico das duas espécies, montagem *de novo* das *reads* geradas, montagem e anotação das sequências de DNA mitocondrial e comparação com a sequência de DNA mitocondrial de outra espécie do mesmo gênero: *Prochilodus lineatus*. Foram selecionados marcadores mitocondriais gênero-específicos e espécie-específicos e o desenho de *primers* foi feito levando-se em conta a possibilidade de identificação de gênero e espécie através de *amplicons* gerado em reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram identificados um par de *primers* gênero-específicos, que apresentam boa sensibilidade e especificidade na detecção de DNA do gênero *Prochilodus*. Quanto aos *primers* espécie-específicos, foi encontrado um par que apresentou amplificação apenas para DNA de *Prochilodus argenteus*. O presente trabalho também obteve sucesso na extração de DNA de petrechos de pesca (uma rede e uma tarrafa) que foram utilizados para coleta de espécimes de *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus costatus*. Através de PCR utilizando marcadores mitocondriais, foi possível detectar a presença de material genético de *Prochilodus* no DNA extraído dos petrechos de pesca. Os dados obtidos a partir do sequenciamento de *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus costatus* também permitiram a identificação de dezenas de milhares de marcadores microssatélites, que ainda precisam ser avaliados quanto à aplicabilidade para a identificação de espécies e para estudos de diversidade. A tecnologia apresentada no presente trabalho possui potencial para ser expandida para outras espécies e para ser aplicada em estudos de ecologia molecular, genética de conservação e na área forense como meio de determinação de materialidade de delitos e, conseqüentemente, fortalecimento da prova pericial no âmbito jurídico.

CHARACTERIZATION OF MOLECULAR MARKERS APPLIED TO THE IDENTIFICATION OF TWO FISH SPECIES OF FORENSIC INTEREST: PROCHILODUS ARGENTEUS AND PROCHILODUS COSTATUS

ABSTRACT

*The increasing concern about environmental issues added to specific legislation aiming inhibition of environmental damage gave rise to new challenges in forensic science. Regarding fishing activities, there are several laws with the purpose of protecting fishing resources. On the other hand, the correct identification at species-level of samples seized in enforcement actions is far from accurate. Thus, it became extremely important the establishment of techniques that enable the correct identification of the seized samples, ideally through easy handling protocols. This would strength the enforcement actions and the juridical proof. Considering this, molecular techniques can provide species-specific markers for unambiguously identification. This information is important in juridical process for determining if seized samples are indeed from one of the species whose fishing is prohibited. The aim of this study was to characterize molecular markers for two fish species: *Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus*. Both species present great ecological and economic relevance in São Francisco river basin. The genomic DNA of both species were sequenced and a de novo assembly was carried out, as well as the annotation of mitochondrial DNA sequences and its comparison to the mitogenomes of a closely related species: *Prochilodus lineatus*. Genus-specific and species-specific markers were selected considering its potential ability of genus and species identification based just on the PCR products sizes through electrophoresis gel. One pair of genus-specific primers presented highly sensitivity and specificity for *Prochilodus* genus. Regarding species-specific primers, one pair proved to be specific for *Prochilodus argenteus*. The present study was also able to extract DNA from fishing artefacts used for *Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus* capture. *Prochilodus* DNA was detected in those artefacts through PCR using mitochondrial markers. Genomic DNA sequencing also enabled the identification of dozens of thousands microsatellites markers. Later, they are going to be evaluated for species identification and genetic diversity studies. The methodology presented in this project can be potentially applied to other species and used for molecular ecology studies, conservation genetics and in the forensic science, establishing crimes materiality and, consequently, strengthening the juridical proof.*

CHAGAS, A.T.A. Caracterização de marcadores moleculares com aplicabilidade para identificação de duas espécies de peixe com interesse forense: *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus costatus*. 2015. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-graduação em Genética, Belo Horizonte.

ORIENTADA: Aline Torres de Azevedo Chagas

ORIENTADOR: Evanguedes Kalapothakis

Data de defesa: 03/07/2015.