

AVALIAÇÃO DA CONECTIVIDADE GENÉTICA DE *Epinephelus marginatus* POR SEQUÊNCIA D-LOOP MITOCONDRIAL

Kenneth Gabriel Mota¹, Jussara Oliveira Vaini², Alexandre Wagner Silva Hilsdorf³

Estudante do curso de Ciências Biológicas; e-mail: kenneth.mota2@etec.sp.gov.br 1

Estudante de Pós-graduação em Biotecnologia; e-mail: jussaravaini@hotmail.com 2

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br 3

Área do conhecimento: Biotecnologia

Palavras-chave: Região controle; Diversidade genética, Peixes, Conservação

INTRODUÇÃO

A garoupa verdadeira, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) na América do Sul ocorre desde o Rio de Janeiro/Brasil até o Golfo da Patagônia/Argentina (GILLES *et al.*, 2000). A espécie possui hermafroditismo protogínico, maturação sexual tardia, inversão sexual, sedentarismo, habita litoral rochoso, apresenta fidelidade territorial, além de grande importância para a pesca comercial, devido seu grande porte e aceitação pelo mercado consumidor. Essas características inseriram-na no Livro de Espécies Ameaçadas de Extinção da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) e recentemente na fauna ameaçada de extinção do Estado de São Paulo (RODRIGUES-FILHO *et al.*, 2009). Sendo assim, um pré-requisito importante para o manejo sustentado dos recursos marinhos é o conhecimento de como as populações de uma determinada espécie estão estruturadas geneticamente (HILBORN *et al.*, 2003), e para avaliar essa diversidade genética utiliza-se técnicas moleculares, onde as mais utilizadas são as do DNA mitocondrial, que é uma molécula circular, de transmissão materna, com rápida taxa de evolução e transmissão sem recombinação (MARTINS *et al.*, 2003). Parte dessa molécula corresponde à região controladora ou D-loop, que é uma região não codificante de aproximadamente 1.200 nucleotídeos, além de ser mais sensível a processos mutacionais quando comparado ao DNA nuclear (MARTINS *et al.*, 2003), sendo então muito utilizada para estudos de diversidade genética populacional.

OBJETIVO

Avaliar a diversidade genética da população de *Epinephelus marginatus* do litoral paulista pela comparação de sequências da região D-loop do DNA mitocondrial, a fim de fornecer subsídio para programas de manejo e conservação desse recurso genético.

METODOLOGIA

O DNA total de 40 indivíduos coletados no litoral paulista, sendo São Sebastião (n=20) e Bertioga (n=20) foi extraído seguindo o protocolo de extração salina, logo após, quantificado em gel de agarose 2% e em espectrofotometria óptica. Posteriormente realizou-se teste de gradiente de temperatura e concentração de MgCl₂ com os *primers* Dloop-FI3 e 12S-RE4 (Tabela 1) para obter a melhor condição da reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a fim de amplificar a região D-loop do DNA mitocondrial. Após a obtenção das melhores condições foram realizadas reações de PCR com todas as amostras. Os produtos de PCR (*amplicons*) foram purificados com ExoSAP (Exonuclease I - Shrimp Alkaline Phosphatase -Affymetrix®) e enviados para sequenciamento na ESALQ-USP/Piracicaba,SP. As sequências obtidas foram editadas

no *software* CodonCode Aligner (Codon Code Corporation). A diversidade (haplotípica e nucleotídica) e expansão populacional foi verificada pelos *softwares* DNAsp 3.0 (ROZAS & ROZAS, 1999) e ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER *et al.*, 2010). A rede de haplótipos foi obtida utilizando o *software* NetWork (BANDELDT *et al.*, 1999).

Tabela 1. Descrição dos *primers*, localização no DNA mitocondrial, tamanho do *amplicon* em pares de bases (pb) utilizados nas reações de amplificação.

| <i>Primer</i> | Sequência (5'-3') | Local | <i>Amplicon</i> | Referência |
|---------------|--------------------------|----------------|-----------------|------------------------------------|
| Dloop-FI3 | F: CTGGCATTGTTCTACTTCAGG | Meio do D-loop | 700-750 | DAMASCENO <i>et al.</i> , 2015 |
| 12S-RE4 | R: GCGGATACTCGCATGTGTAA | 12S | | SANTA BRÍGIDA <i>et al.</i> , 2007 |

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de DNA foi eficiente. Segundo Faleiro *et al.* (2002) a extração de DNA é uma das etapas básicas para o sucesso de análises genéticas, uma boa qualidade de extração tem relação direta ao sucesso do uso dos marcadores moleculares. O teste de gradiente para os *primers* Dloop-FI3 e 12S-RE4 revelou que a melhor condição para a reação de PCR foi com a temperatura de anelamento a 54°C e a concentração de MgCl₂ a 3.0mM, onde foi possível obter *amplicon* de 700-750pb. Das 40 amostras sequenciadas, sendo 20 de São Sebastião e 20 de Bertioga, somente 17 amostras de São Sebastião puderam ser utilizadas nas análises estatísticas do presente estudo. As amostras de Bertioga vieram com sequências inadequadas para análise, por este motivo, não foram utilizadas, pois quando analisadas no Blast/NCBI não demonstraram similaridade com nenhuma espécie do gênero *Epinephelus*, isso levou a acreditar que talvez essas amostras não fossem realmente de *Epinephelus marginatus*, pois as mesmas foram coletadas por pescadores da região de Bertioga, não sendo possível uma identificação morfológica. Mas, análises do gene COI serão realizadas a fim de confirmar se essas amostras são realmente de *E. marginatus*. Sendo assim, essas amostras de Bertioga não puderam ser utilizadas nesse estudo, a fim de evitar resultados equivocados. Sendo assim, foi possível avaliar a diversidade genética da população de São Sebastião e sua expansão populacional. As sequências da região controle do DNA mitocondrial (D-loop) apresentaram 28 sítios variáveis em 536pb e 11 haplótipos identificados em 17 indivíduos de *Epinephelus marginatus* coletados em São Sebastião/Litoral Paulista, A frequência nucleotídica foi de C: 17.44%, T: 22.06%, A: 37.61%, G: 22.90%. Segundo Meyer (1993), as extremidades do D-loop são regiões ricas em AT, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, onde AT (59,67%) apresentou índices mais elevados que CG (40,34%). A diversidade nucleotídica encontrada em *Epinephelus marginatus* (0,015= 1,5%) e diversidade haplotípica (0,94) (Tabela 2) foram consideradas altas, pois segundo Grant & Bowen (1998) a diversidade nucleotídica e haplotípica são altas quando são maiores que 0.5% e 0.5, respectivamente. De acordo com Grant & Bowen (1998), níveis altos de diversidade entre haplótipos pode ser atribuído à um contato secundário entre linhagens que passaram por um longo período de isolamento, produzindo a distribuição bimodal encontrada nessa população. O teste de neutralidade (desvios em relação a neutralidade) de D de Tajima apresentou D=-0,14 (p>0,10) e o teste Fs de Fu apresentou Fs=-0,89 (p>0,02) (Tabela 2) não foram significativos, demonstrando existir uma seleção sobre os heterozigotos que por serem mais diversos geneticamente sobrevivem a essa seleção, revelando os altos níveis de diversidade, mas essa diversidade só está sendo alta por que a população está sofrendo uma pressão.

Tabela 2. Análise da diversidade e teste de neutralidade.

| População | Número amostral | Número de haplótipos | Diversidade haplotípica | Diversidade nucleotídica | Fu's | | Tajima D | |
|---------------|-----------------|----------------------|-------------------------|--------------------------|-------|------|----------|------|
| | | | | | Fs | p | D | p |
| São Sebastião | 17 | 11 | 0.949 | 0.015 | -0.89 | 0,38 | -0.14 | 0,44 |

Os resultados da rede de haplótipos (*networks*) e da matriz de distância nucleotídica revelaram que o haplótipo mais frequente foi o Hap 5 e que a população apresentou 3 grandes grupos, sendo, grupo 1 (haplótipos 2, 7, 10, 6, 4 e 11), grupo 2 (haplótipo 5), grupo 3 (haplótipos 8, 1, 9 e 3), mas com ausência de estruturação populacional, pois a grande maioria dos ramos da árvore de Neighbour-joining apresentou baixos valores de *bootstrap*.

CONCLUSÃO

Foi possível avaliar a diversidade genética da população de *Epinephelus marginatus* de São Sebastião/Litoral Paulista, por meio de análise do DNA mitocondrial (D-loop). A população apresentou altos índices de diversidade genética (haplotípica e nucleotídica) e padrão de distribuição bimodal, revelando um contato secundário entre linhagens que passaram por um longo período de isolamento. Os altos índices de diversidade genética sugerem que a população está sofrendo uma pressão, pois os testes de neutralidade não foram significativos. Sendo assim, tornam-se necessárias medidas de manejo e conservação desse recurso genético.

REFERÊNCIAS

- BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37-48, 1999.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.
- FALEIRO, F.G.; ARAÚJO, I.S.; BAHIA, R.C.S.; SANTOS, R.F.; YAMADA, M.M.; AHNERT, D. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando a obtenção de marcadores RAPD. **Agrotrópica**, v.2, p. 31-34. 2002.
- GILLES, A.; MIQUELIS, A.; QUIGNARD, J.; FAURE, e. Molecular phylogeography of western Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus*. **Life science**, v. 323, p. 195-205, 2000.
- GRANT, W. S.; BOWEN, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from Sardines and Anchovies and lessons for conservation. **The Journal of Heredity**, v. 89, n. 5, p. 415-426, 1998.
- HILBORN, R.; QUINN, T. P.; SCHINDLER, D. E.; ROGERS, D. E. Biocomplexity and fisheries sustainability. **PNAS**, v. 100, n. 11, p. 6564-6568, 2003.
- MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 33-38, 2003.
- MEYER, A. Evolution of Mitochondrial DNA in fishes. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, 2: 1-38. 1993

RODRIGUES-FILHO, J. A.; SANCHES, E. G.; GARCIA, C. E. O.; SEBASTINI, E.F.; PANNUTI, C.V.; MOREIRA, R. G. Threatened fishes of the world: *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Serranidae: Epinephelinae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 85, p. 301-302, 2009.

ROZAS, J.; ROZAS R. DNASP version 3: An integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. **Bioinformatics Applications Note**, v. 15, n. 2, p. 174-175, 1999.