

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Epinephelus marginatus* POR MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES

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

Estudante do curso de Ciências Biológicas; e-mail: kenneth.mota2@etec.sp.gov.br¹

Doutorando em Biotecnologia; e-mail: jussaravaini@hotmail.com²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br³

Área do conhecimento: Biotecnologia

Palavras-chave: STR, Estruturação genética, Conservação, Garoupa, Hermafroditismo protogínico.

INTRODUÇÃO

A espécie, *Epinephelus marginatus* conhecida popularmente como garoupa verdadeira possui distribuição sul americana desde o Rio de Janeiro/Brasil até o Golfo da Patagônia/Argentina. 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 *International Union for Conservation of Nature* e recentemente na fauna ameaçada de extinção do Estado de São Paulo. Diante do exposto, o conhecimento de como as populações de uma determinada espécie estão estruturadas geneticamente é de suma importância para um manejo sustentado dos recursos marinhos. Para avaliar a diversidade e estrutura genética de populações faz-se uso dos microssatélites, por serem altamente informativos.

OBJETIVOS

Avaliar a diversidade genética de *Epinephelus marginatus* por meio de microssatélites espécie-específicos; Estimar os índices de diversidade genética intra e interpopulacional no litoral de Itajaí (SC), Rio de Janeiro (RJ) e São Sebastião (SP); Verificar se há estruturação genética nas populações; Fornecer subsídio para programas de manejo e conservação dessa espécie.

METODOLOGIA

O DNA total de 67 indivíduos coletados no litoral Brasileiro, sendo São Sebastião (n=23), Rio de Janeiro (n=22) e Itajaí (n=22) foi extraído seguindo o protocolo de extração salina, logo após, quantificado em gel de agarose 2% e em espectrofotometria óptica. Para a avaliação genética das populações de garoupa foram utilizados 10 *loci* microssatélites espécie-específicos *E. marginatus*, desenhados por OJEDA, 2013. As reações de amplificação foram verificadas em gel desnaturante de poli(acrilamida) 6,0% e genotipadas no 4300 DNA Analyzer (LI-COR). O número de alelo por *locus*, heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), e as estimativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram avaliados usando o *software* HW-Quickcheck. O desequilíbrio de ligação por meio do GENEPOP. A presença de alelos nulos e *dropout* foi verificada pelo *software* Micro-Checker. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi determinado pelo Cervus v. 3.0. O *software* FSTAT 2.9.3 foi utilizado para calcular a riqueza alélica (RA) e coeficiente de endogamia (F_{is}). O valor de diferenciação genética

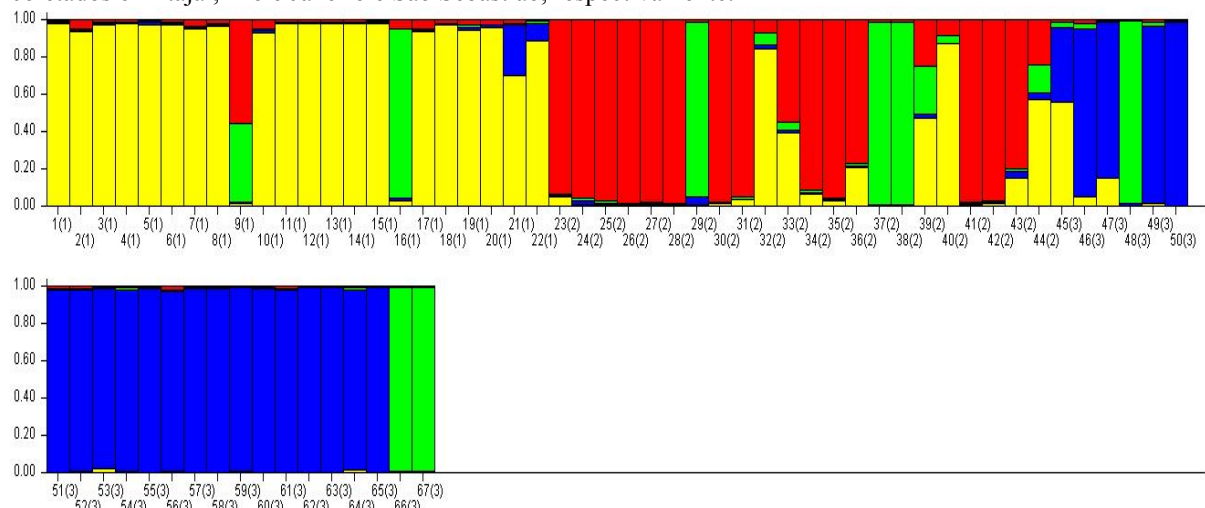
interpopulacional (D_{st}) foi calculado pelo pacote Demetics no *software* R. Os indivíduos foram agrupados em determinado número de populações inferidos pela metodologia Bayesiana implementada no *software* STRUCTURE 2.3. Para escolher o número apropriado de populações inferidas, foram realizadas várias análises com k (número de populações inferidas) variando de 2 a 5 e 300.000 interações, com três repetições independentes para cada uma das análises. Os valores reais de K foram inferidos a partir da magnitude de ΔK dada em função de K , com o auxílio do *software* STRUCTURE HARVESTER web 0.6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na população de Itajaí o número médio de alelos por *locus* foi 6.2, variando de 04 (Ema26) a 11 (Ema35). Na população do Rio de Janeiro o número médio de alelos por *locus* também foi 6.2, variando de 04 (Ema06) a 13 (Ema35). Já na população de São Sebastião o número médio de alelos por *locus* foi 6.8, variando de 04 (Ema42) a 11 (Ema17). Os 10 *loci* microssatélites utilizados nas três populações naturais de *E. marginatus* mostraram-se polimórficos, com valor médio de alelos de 6.4, variando de 4 (Ema42 e Ema26) à 11 alelos (Ema17, Ema35 e Ema06). Segundo Barker (1994) para um marcador microssatélite ser viável os *loci* devem apresentar ao menos 4 alelos diferentes, dessa forma, todos os *loci* utilizados no presente estudo apresentaram-se viáveis e informativos para caracterização da diversidade genética da espécie. Para Itajaí, a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) variaram respectivamente de 0.40 (Ema26) a 0.90 (Ema22 e Ema23) e de 0.47 (Ema26) a 0.83 (Ema22 e Ema17), respectivamente. Já para a população do Rio de Janeiro a H_o variou de 0.40 (Ema26) a 0.90 (Ema22 e Ema23) e a H_e de 0.40 (Ema26) a 0.83 (Ema17 e Ema22). Para São Sebastião a H_o variou de 0.43 (Ema42) a 1.0 (Ema23) e a H_e de 0.64 (Ema13) a 0.87 (Ema17). A maior riqueza alélica foi de 10.51 na população do Rio de Janeiro e a menor foi de 9.19 na população de Itajaí. De acordo com Moreira *et al.* (2007), a variabilidade genética de uma população natural pode ser medida pela heterozigosidade bem como pela diversidade alélica. A estimativa da presença de alelos nulos mostrou-se positiva para 04 dos 10 *loci*, sendo eles Ema02, Ema35, Ema26 e Ema42. Já o alelo *dropout* não foi encontrado. Em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), as três populações do presente estudo apresentaram desvio significativo do EHW em algum *loci*, sendo para a população de Itajaí o *locus* Ema35, para São Sebastião os *loci* Ema13, Ema17, Ema23, Ema26 e Ema35 e para Rio de Janeiro os *loci* Ema13 e Ema35. Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg podem indicar a ocorrência de processos evolutivos na população como, por exemplo, migração, mutação, seleção e *bottlenecks* (HILSDORF & HALLERMAN, 2017). Todas as populações apresentaram valor médio de F_{is} positivo, indicando excesso de homozigotos nessas populações, corroborando com a presença de alelos nulos encontrados. A população de Itajaí apresentou um valor médio de F_{is} sendo de 0.054 (5.4% de endogamia), Rio de Janeiro apresentou 0.113 (11.3% de endogamia) e São Sebastião com 0.049 (4.9% de endogamia). Ou seja, comparando as três populações, a do Rio de Janeiro apresentou maior coeficiente de endogamia. A endogamia é a probabilidade de dois indivíduos apresentarem, num determinado *locus*, alelos que são cópia de um gene presente num ancestral, aumentando a frequência de homozigotos (WRIGHT, 1965). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) corresponde ao poder do marcador em detectar o polimorfismo existente na população, e seu valor mínimo e máximo encontrado nas populações de Itajaí e Rio de Janeiro foram os mesmos, sendo o valor médio de 0.61 variando de 0.42 (Ema26) a 0.78 (Ema22). Já para São Sebastião a média do PIC foi de 0.67, variando de 0.33 (Ema42) a 0.83 (Ema17). O conjunto dos 10 *loci* utilizados pode ser considerado altamente

informativo, pois de acordo com Botstein *et al.* (1980) o PIC acima de 0.50 é altamente informativo, entre 0.50 e 0.25 é medianamente informativo e valores inferiores a 0.25 são pouco informativos. A diversidade genética entre as populações (D_{st}) mostrou que entre Itajaí e Rio de Janeiro há pouca diferenciação genética (17%), ou seja, compartilham mais alelos entre si. Comparando a população de Itajaí com São Sebastião houve 39% de diferenciação. Já as populações mais divergentes entre si foram Rio de Janeiro e São Sebastião, apresentando D_{st} de 41%, ou seja, compartilham poucos alelos entre si. Este índice D_{st} mede a fração da variação alélica das populações, onde para este teste estatístico não importa o modelo mutacional do marcador utilizado ou modelo de estruturação genética da espécie. O valor máximo é 1 (100%), demonstrando diferenciação total das espécies, e mínimo é 0, demonstrando não diferenciação (HILSDORF & HALLERMAN, 2017). As análises sugeriram quatro agrupamentos genéticos e não três (Itajaí, Rio de Janeiro e São Sebastião). Analisando o dendograma da Figura 1, pode-se observar que os indivíduos da população do Rio de Janeiro possuem muitos alelos compartilhados com indivíduos de Itajaí. Corroborando com os dados obtidos de D_{st} .

Figura 1. Dendograma da estrutura populacional de *Epinephelus marginatus* estimada com o modelo K=4. Cada indivíduo é representado por uma linha vertical. Cores diferentes na mesma barra indicam compartilhamento de alelos entre o grupo. Os números 1, 2 e 3 entre parênteses indicam os indivíduos coletados em Itajaí, Rio e Janeiro e São Sebastião, respectivamente.



Geograficamente, Rio de Janeiro e Itajaí são mais distantes, porém, geneticamente, nesse estudo, compartilham muitos alelos. Isso pode ser explicado pelo fato da conectividade ser influenciada não somente por distância geográfica (EVANNO *et al.*, 2005). A garoupa verdadeira *E. marginatus* é um peixe marinho hermafrodita protogínico, e de acordo com Choquet *et al.* (2009), avaliar a estruturação genética em peixes marinhos que apresentam hermafroditismo sequencial ainda precisa ser mais estudado, a duração do estágio larval, comportamento migratório do adulto, tamanho máximo do adulto, diferença de salinidade, temperatura e pressão de predação também podem influenciar no fluxo gênico.

CONCLUSÕES

Foi possível avaliar a diversidade genética das populações de garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* no litoral brasileiro por meio de *loci* microsatélites espécie-específicos, os *loci* mostraram-se altamente polimórficos, demonstrando serem

eficientes em estudos populacionais da espécie em questão. Os índices de diversidade genética inter e intrapopulacional puderam ser estimados. O coeficiente de endogamia (F_{is}) indicou excesso de homozigotos. Em relação a diversidade entre as populações, verificou-se que a população do Rio de Janeiro e Itajaí apresentam pouca diferenciação genética, já as populações do Rio de Janeiro e São Sebastião foram as que menos compartilharam alelos entre si. Dessa forma, este estudo serve de subsídio para programas de manejo e conservação da espécie em questão, pois este foi o primeiro trabalho a utilizar *loci* microssatélite espécie-específicos para *E. marginatus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARKER, J. S. F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph and Ontario, Canada. 1994.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetic**, v. 32, p. 314–331. 1980.

CHOPELET, J.; WAPLES, R. S.; MARIANI, S. Sex change and the genetic structure of marine fish populations. **Fish and Fisheries**, v. 10 p. 329–343, 2009.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

HILSDORF, A. W. S.; HALLERMAN, E. M. **Genetic Resources of Neotropical Fishes**. Cham: Springer, 2017. 258 p.

MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W. S.; SILVA, J. V.; SOUZA, V. R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.4, p.521-526, 2007.

OJEDA, A. P. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites para garoupa verdadeira, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) por pirosequenciamento**. 2013. 48 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade de Mogi das Cruzes, 2013.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395-420, 1965.