

ANÁLISE DA FUNCIONALIDADE DE 17 INICIADORES MICROSSATÉLITE DESENVOLVIDOS PARA *JOHNGARTHIA LAGOSTOMA* (H. MILNE EDWARDS, 1837)

Maria Catarina de Alencar¹, Fabíola Cristina Ribeiro de Faria²

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: mcatarina92@gmail.com¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: fabiola@umc.br²

Área do Conhecimento: Genética Molecular

Palavras-chave: Conservação; Conectividade genética; Gecarcinidae; SSR

INTRODUÇÃO

Muito além da variabilidade genética, a genética de populações, permite a compreensão de como as populações estão estruturadas e conectadas, isto é, a quantidade e a direção do fluxo gênico em uma escala de tempo de várias gerações, podendo determinar a extensão das diferenças genéticas entre populações, como o tamanho efetivo, a diversidade genética, a tendência genética e em alguns casos a especiação (SALE *et al.*, 2010). Estudos de polimorfismos genéticos em populações naturais é a base para a compreensão dos fenômenos evolutivos demográficos e ecológicos que devem ser considerados em programas de conservação destas populações (EIZIRIK, 1996). Com uma distribuição geográfica restrita a 5 ilhas oceânicas, Atol das Rocas (Rio Grande do Norte), Arquipélago de Fernando de Noronha (Pernambuco), ilhas de Trindade e Martim Vaz (Espírito Santo), no Brasil e Ascensão, ilha britânica no oceano Atlântico (HARTNOLL *et al.*, 2010), o caranguejo terrestre *Johngarthia lagostoma* se torna um modelo interessantíssimo para estudos de padrões de especiação e biogeografia. Habitantes de galerias escavadas em terra firme, a dispersão larval planctônica seria uma das formas mais efetivas de conectividade entre suas populações, no considerando-se a distância geográfica entre as ilhas, estas populações podem estar, em graus variáveis, abertas ou fechadas à entrada de migrantes. Um modo indireto de se estimar a conectividade entre populações é através de marcadores genéticos. Atualmente, dentro dos diferentes marcadores genéticos utilizados em estudos populacionais, os microssatélites têm sido muito utilizados, pois são variáveis e abundantemente distribuídos no genoma de eucariotos, sendo ideais para estudos populacionais em diferentes níveis, contribuindo para responder a questões como o grau de mistura genética entre as populações, diferentes níveis de parentesco e fluxo gênico (ZOLET *et al.*, 2013). Com o advento de novas tecnologias de sequenciamento (NSG - sequenciamentos de nova geração) houve uma redução do tempo e custos, para a obtenção de bibliotecas genômicas completas, auxiliando no desenvolvimento dos iniciadores microssatélites, viabilizando o seu uso em estudos populacionais.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo validação de 17 pares de iniciadores microssatélites espécie específicos de *Johngarthia lagostoma*, desenvolvido em um estudo prévio. Testando, por meio da técnica de PCR, sua funcionalidade e repetitividade dos resultados em indivíduos de diferentes localidades e classificando os *loci* como polimórficos ou monomórficos, em razão da existência de alelos distintos, por meio de genotipagem. Sendo considerados válidos aqueles iniciadores que apresentarem

repetitividade dos resultados em diferentes localidades e que forem caracterizados como polimórficos.

METODOLOGIA

No presente trabalho foram testados 17 iniciadores microssatélites espécie específico de *Johngarthia lagostoma* desenvolvidos por Camargo (2015). Para tal foi realizada a padronização das reações de PCR, onde as condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram otimizadas para as temperaturas anelamento e para as concentrações de $MgCl_2$ e *Taq DNA Polymerase*. Os produtos de PCR foram primeiramente avaliados em eletroforese horizontal em gel de agarose 2% e identificados por meio da visualização das bandas em um fotodocumentador de imagem exposto a luz UV. Foram considerados como resultado positivo aqueles iniciadores cujos o fragmento amplificado apresentou o tamanho (em número de pb) esperado, considerando também a repetitividade nos indivíduos analisados. Para a otimização das reações de PCR, utilizou-se DNA previamente extraído de tecido muscular de indivíduos representantes das localidades de ocorrência da espécie (Ilha de Trindade, Arquipélago de Fernando de Noronha e Ilha de Ascensão) depositados na coleção carcinológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), do Museu Nacional de História Natural de Washington, D.C, Estados Unidos América (USNM) e do Museu de História Natural Sam Noble Oklahoma (OMNH), Estados Unidos da América. Após estabelecidos os parâmetros de amplificação para cada iniciador foram realizadas reações de PCR com o objetivo de aumentar o número amostral de indivíduos de cada localidade para a genotipagem. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, corados com nitrato de prata. Para este estudo considerou-se como padrão de banda a que apresentou melhor intensidade e que correspondência ao tamanho do fragmento desejado. As bandas foram medidas com o programa ImageQuant™ TL analysis (GE healthcare), sendo os alelos nomeados de acordo com o número de pares de bases determinado por comparação com marcadores de peso molecular conhecido. Os dados foram analisados no programa Cervus 3.0.7. para a obtenção do número de alelos e do índice de conteúdo polimórfico (PIC). A verificação de alelos drop-out e/ou nulos foi feita no programa MicroChecker 2.2.3. Para os cálculos da frequência alélica, heterozigosidade observada e esperada e o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi utilizado o programa HW-QuickCheck. O programa GENEPOP foi utilizado para detectar o desequilíbrio de ligação dos iniciadores validados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 17 iniciadores, 15 (88%) deles foram funcionais, considerando-se os padrões previamente especificados como: especificidades das bandas e repetitividade. A concentração ideal de $MgCl_2$ e *Taq DNA Polymerase* estabelecida foi de 2,0mM e 1,5U/ μ L, respectivamente, para uma reação de volume final 20 μ L, e as temperaturas de anelamento ideais variaram de 56°C à 62°. Dos 15 iniciadores funcionais, 10 amplificaram um número amostral significativo e com qualidade de banda para a genotipagem em gel e poliacrilamida e análise estatística, sendo então selecionados para a validação (Tabela 1). Foram observados um total de 130 alelos, com média de 13 alelos por *locus*, variando de 6 (*locus* JI 32) a 24 (*locus* JI 25) alelos. Apesar do número amostral baixo utilizado para análise foi possível observar uma quantidade alta de alelos, pois as altas taxas de mutações nos microssatélites tendem a gerar altos níveis de diversidade alélica como observado na Tabela 1. (KLUG *et al.*, 2010). O índice de conteúdo polimórfico (PIC) foi alto, variando de 0,69 a 0,94 (Tabela 3), sendo considerados como altamente informativos. De acordo com Botstein *et al.*, (1980), os valores de PIC são

agrupados em três níveis: altamente informativo ($PIC > 0,5$); moderadamente informativo ($0,25 < PIC < 0,5$) e pouco informativo ($PIC < 0,25$) (Tabela 1).

Tabela 1: Características genéticas dos 10 *loci* microssatélites específicos para *J. lagostoma*.

Iniciador	Ta (°C)	No.	Alelos	Faixa de tamanho dos alelos (pb)	Ho	He	PIC	HWE
Jl 05	62°C	14	9	143 – 183	0,14	0,84	0,78	0
Jl 08	60°C	30	14	262 – 302	0,37	0,89	0,86	0
Jl 16	62°C	31	18	267 – 303	0,45	0,87	0,84	0
Jl 18	60°C	16	11	162 – 190	0,75	0,89	0,84	0,09
Jl 25	56°C	28	24	229 – 257	0,46	0,96	0,94	0
Jl 28	60°C	33	15	229 – 257	0,42	0,91	0,89	0
Jl 30	60°C	33	7	160 – 216	0,61	0,74	0,69	0,05
Jl 31	60°C	26	14	251 – 279	0,31	0,91	0,88	0
Jl 32	60°C	22	6	213 – 241	0,00	0,76	0,70	0
Jl 35	60°C	32	12	247 – 301	0,38	0,91	0,88	0

Ta (°C) - temperatura de anelamento, No. - número de indivíduos analisado, Alelos - alelos encontrados, Faixa de Tamanho dos alelos (pb) - variação do tamanho do alelo encontrado para cada iniciador, Ho- heterozigosidade observada, He- heterozigosidade esperada, PIC- índice de conteúdo polimórfico, HWE- equilíbrio de HardyWeinberg.

Os resultados apontam para um desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HEW) em 80% dos *loci* testados. Fato este também observado pelas discrepâncias nos valores das heterozigosidades observada e esperada (Tabela 1). Devido ao baixo número amostral de cada população as três localidades foram testadas em conjunto, portanto, não foi possível verificar estatisticamente se as populações analisadas realmente não estão em equilíbrio, ou se o resultado é um reflexo de um possível distanciamento genético entre populações de diferentes ilhas, fato este que não pode ser previamente afirmado por ausência de estudos genéticos com SRR para a espécie, atualmente existe apenas um estudo genético com esses organismos realizado por Rodríguez-Rey *et al* (2016) no qual foi utilizado gene ribossomal 16S e o gene COI concluindo-se que a espécie tem níveis de variação genética baixos a moderados o que pode indicar uma separação entre populações de ilhas diferentes, este padrão de distribuição da espécie pode levar a uma estratificação das populações, onde o efeito principal deste isolamento é uma variação das frequências genéticas entre os estratos, o que resulta em uma diminuição da heterozigozidade encontrada em comparação a esperada que pressupõem que ocorrem acasalamentos aleatórios numa hipotética população total (efeito de Wahlund), pois o isolamento leva a um consequente aumento da endogamia aumentando também a homozigose. Sendo assim, os resultados de análise onde a média da heterozigosidade observada (Ho), é menor que a heterozigosidade esperada (He), corroboram com padrões esperados para uma população segregante (Machado *et al.*, 2016).

CONCLUSÕES

Foram validados 10 iniciadores microssatélites com alto conteúdo de informação polimórfica que poderão ser utilizados como ferramenta molecular para a caracterização de populações de *Johngarthia lagostoma*, sendo estes os primeiros descritos para esta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOTSTEIN, David; WHITE, Raymond. L; SKOLNICK, Mark; DAVIS, Ronald. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American journal of Human Genetics**. v. 32, p. 314-331, 1980.

CAMARGO, Laís Ramires. **Validação de iniciadores microsatélite espécie específico de *Johngarthia lagostoma* (H. Milne-Edwards, 1837) (Brachyura, Gecarcinidae)**. 2015. 4 p. TCC (Graduação em biologia) - UMC, Mogi das Cruzes, 2015.

EIZIRIK, Eduardo. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de Unidades Evolutivamente Significativas. **Revista Brasileira de Genética** (Suplemento), v. 19 (1), p. 23-29, 1996.

HARTNOLL, Richard G; BRODERICK Annette C; GODLEY Brendan J; MUSICK Susanna; PEARSON Mark; STROUD Stedson A; SAUNDERS Kate E. Reproduction In The Land Crab *Johngarthia Lagostoma* On Ascension Island, **Journal Of Crustacean Biology**, v. 30 (1), p. 83-92, 2010.

KLUG, William S., CUMMINGS, Michael R., SPENCER, Charlotte A., PALLADINO, Michel A. **Conceitos de Genética**. 9ª edição. ArtMed, 01/2010.

MACHADO, Edna Lôbo; SIVA, Simone Alves; FERNANDES. Santos. Luciel; BRASILEIRO, Santos. Helison. Genetic variability and homozygosity in a F4 castor bean population by microsatellite markers. *Bragantia*. **Plant breeding**, v. 75, n. 3, p.307-313, 2016.

RODRÍGUEZ-REY Ghennie T; HARTNOLL Richard G; SOLÉ-CAVA Antonio M. Genetic structure and diversity of the island-restricted endangered land crab, *Johngarthia lagostoma* (H. Milne Edwards, 1837). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 2016.

SALE P. F., H. VAN LAVIEREN; M. C. ABLAN LAGMAN. Preserving Reef Connectivity: A Handbook for Marine Protected Area Managers. **Connectivity Working Group, Coral Reef Targeted Research and Capacity Building for Management Program, UNU-INWEH**, 2010.

ZOLET Andreia Carina Turchetto; SEGATTO Ana Lúcia Anversa; TURCHETTO Caroline; SILVA Clarisse Palma; FREITA Loreta Brandão de. **Guia prático para estudos filogeográficos**. Rio Grande do Sul: Sociedade Brasileira de Genética, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/100134>>. Acesso em: 21 abr. 2016.