ANÁLISE MOLECULAR DE CALLINECTES SAPIDUS, RATHBUN, 1896 AO LONGO DA COSTA LESTE DO CONTINENTE AMERICANO

Luiz Henrique de Souza[1]; Juliana Beltramin De Biasi[2];
Fabíola Cristina Ribeirode Faria[3]

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail; henrique_guita_@hotmail.com [1]
Colaboradora da Universidade de Mogi das Cruzes; jubbiasi@gmail.com [2]
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail fabiola@umc.br [3]

Área do Conhecimento: Biologia Molecular.

Palavras-chave: *Callinectes sapidus*; *Callinectes sapidus acutidens*; Gene 16s; Gene COI

INTRODUÇÃO

Callinectes sapidus Rathbun, 1896 (siri azul) é uma espécie de caranguejo de grande valor comercial, segundo VAN ENGEL (1958) é a espécie da família dos Portunidae mais comercializada por toda a costa leste do continente americano. Ocorre no litoral do Atlântico Ocidental de forma disjunta em duas áreas. A primeira, que corresponde a área de ocorrência da população setentrional, que abrange toda costa leste dos Estados Unidos até a Venezuela e uma segunda, correspondendo a área da população meridional, entre a Bahia (Brasil) até o norte da Argentina (MELO, 1996). Muitos taxonomistas têm postulado que a taxonomia incorreta de algumas espécies, devido a convergências morfológicas, pode sugerir, erroneamente, um padrão de distribuição disjunta, o qual não pode ser explicado por modelos de dispersão ou vicariância. O uso de dados moleculares possibilita uma abordagem complementar para a discriminação de espécies separadas por caracteres morfológicos sutis (KNOWLTON *et al*.,1993; MACPHERSON & MACHORDOM 2005), como é o caso da espécie do presente estudo, bem como a correta identificação, em nível de espécie de invertebrados marinhos de interesse pesqueiro em qualquer estágio de desenvolvimento (THORPE *et al.* 2000). A pesca de *Callinectes sapidus* na costa leste do Continente Americano constitui um comércio de grande importância. As capturas expressivas desta espécie demandam manejo adequado para atingir o uso sustentável deste recurso, assim o reconhecimento de espécies crípticas é de fundamental importância.

OBJETIVOS

Considerando-se o potencial dos dados moleculares na distinção de espécies crípticas, o presente estudo tem como objetivo a identificação de possíveis espécies crípticas confundidas sob a mesma denominação de *Callinectes sapidus.* Através do sequenciamento e análise de distância de fragmentos dos genes mitocondriais 16S e COI.

METODOLOGIA

As amostras de tecidos, utilizadas no presente relatório, foram obtidas de espécimes depositados na coleção Carcinológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. O material genético foi extraído utilizando o kit de extração QIAGEM DNeasy Blood & Tissue, conforme instruções contidas no protocolo do fabricante. Os fragmentos do gene mitocondrial 16S rRNA e COI foram amplificados por meio da

técnica de PCR (polymerase-chain-reaction) onde inicialmente foram testados os iniciadores universais para o gene 16S e COI descritos por PALUMBI, (1996) e FOLMER et al. (1994) respectivamente. Os produtos de PCR selecionados para sequenciamento foram purificados com ExoSAP e então encaminhados para o Centros de Estudos do Genoma Humano para sequenciamento. Todas as sequências obtidas foram confirmadas pelo sequenciamento de ambas as fitas e construção de uma sequência de consenso, esta etapa foi realizada no programa BIOEDIT.
As sequências consenso foram exportadas para o software Mega 5.0 (TAMURA *et al*., 2011) onde foram alinhadas e a partir deste alinhamento foram geradas matrizes de similaridade e dendogramas baseados em distâncias par-a-par ambos utilizando modelo Kimura-2 parâmetros (KIMURA, 1980), testados através do método bootstrap com 1.000 auto replicações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi extraído tecido muscular do quelípodo de 37 exemplares de *C. sapidus* abrangendo representantes de populações da área setentrional de populações meridional. Algumas destas amostras foram provenientes de espécimes previamente fixados em formaldeído, assim para a obtenção de um DNA de boa qualidade essas amostras passaram por um processo prévio de lavagem pré-extração. Além da qualidade do material biológico, outros fatores podem influenciar no sucesso na obtenção do fragmento desejado entre os mais comuns podemos citar: quantidade insuficiente de DNA pré-extraído, presença de enzima inibidora na reação (resíduo de etanol), temperatura de anelamento do iniciador muito alta, iniciador degradado ou inespecífico, ausência de DNA na reação (Nguyen *et al*., 2006). Neste sentido, vários procedimentos foram adotados para a otimização das reações de PCR, como por exemplo: mudanças na concentração do DNA pré-extraído utilizado nas reações de PCR; diminuição da temperatura de anelamento do iniciador; adoção de um novo ciclo do termociclador; construção de iniciadores específicos. Para o teste destas modificações foram selecionadas uma amostra de cada região (EUA, Rio Grande do Norte, Ceará, São Paulo e Rio Grande do Sul) que apresentaram melhor qualidade do DNA extraído. Com a adoção dos procedimentos acima citados, as condições da reação de PCR foram ajustadas obtendo-se sucesso na amplificação das 5 amostras selecionadas para os dois fragmentos mitocondriais de interesse. Os valores de divergência intraespecífica obtidos para o gene 16S não foram suficientes para indicar a ocorrência de uma nova espécie, porém a análise para o gene COI apresentou maiores valores tanto de diversidade interespecífica quanto intraespecífica. Os dendogramas gerados para os dois genes, apontam para a separação da porção setentrional (EUA) (figuras 1 e 2).

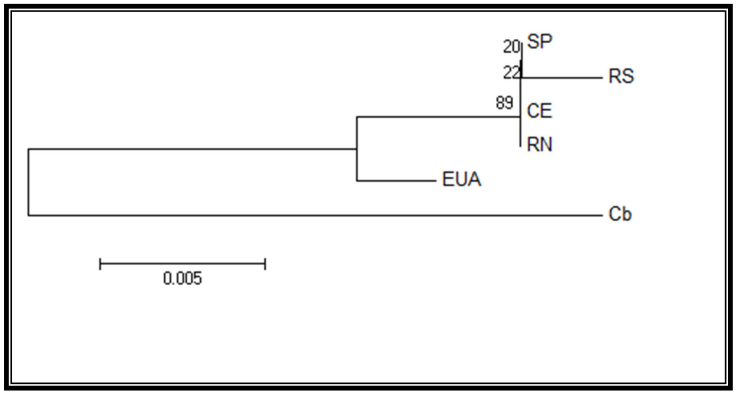

Figura 1 - Dendograma enraizado contendo as sequências para o gene 16S. Cb: *C. bocouti*; as siglas EUA, RN, CE, SP e RS representam as localidades dos indivíduos de *C. sapidus*. Os números plotados próximos aos ramos correspondem aos valores de Bootstrap.

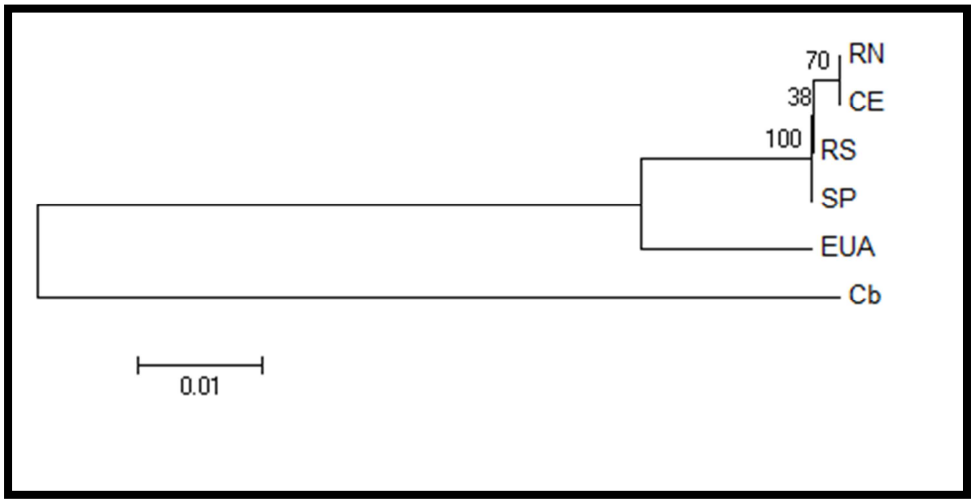

Figura 2 - Dendograma enraizado contendo as sequências para o gene COI. As siglas representam as localidades dos indivíduos, sendo RN amostra 15, CE-4, RS-19, SP-1, EUA-30 e Cb que representa uma sequência de C*allinectes bocourti* utilizado para enraizamento do dendograma. Os valores de bootstrap se encontram próximos aos ramos.

CONCLUSÕES

Devido há dificuldades encontradas no início do presente estudo, relacionadas à amplificação dos fragmentos mitocondriais 16S e COI, os resultados obtidos até o presente momento ainda são inconclusivos, apesar de muito promissores. Com a adoção de uma metodologia específica uma nova etapa de trabalho está em andamento. Estão sendo amplificados mais haplótipos de *C. sapidus* de cada região e também serão inclusos nas análises outras espécies do gênero *Callinectes*, conferindo maior robustez na análise dos dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ R. & VRIJENHOEK, R.. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3: 294-299. 1994

KIMURA, M. A sample method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16: 111-120. 1980.

KNOWLTON, N.; WEIGHT, L. A.; SOLO´RZANO, L. A.; MILLS, D. K. & BERMINGHAM, E. Divergence of proteins, mitochondrial DNA and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. Science 260: 1629-1632. 1993.

MACPHERSON, E. & MACHORDOM, A. Use of morphological and molecular data to identify three new sibing species of the genus *Munida leach*, 1820 (Crustacea, Decapoda, Galatheidae) from New Caledonia. Journal of Natural History 39: 819:834. 2005.

MELO, G. A. S. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. São Paulo, Plêiade/FAPESP. 604p. 1996.

NGUYEN, T.T.T.; HURWOOD, D.; MATHER, P.; NA- NAKORN, N. & BARTLEY D. Manual on applications of molecular tools in aquiculture and inland fisheries management, Part 2: Laboratory protocols and data analysis. NACA Monography No. 2: 134p. 2006.

PALUMBI S. R. Nucleic Acids II: the polymerase chain reaction. Molecular Systematics (eds Hillis DM, Moritz C, Mable BK) 205-247. 1996.

TAMURA, K., PETERSON, D.; PETERSON, N., STEICHER, G., NEI, M., KUMAR, S., MEGA 5 Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739. 2011.

THORPE, J. P.; SOLE-CAVA, A. M. & WATTS, P.C. Exploited Marine Invertebrates: Genetics and Fisheries. In: Marine Genetics, Sole-Cava, A.M., C.A.M. Russo and J.M. Thorpe (Eds.). Kluwer Academic Publisher, Drodrecth, pp: 165-184. 2000.

VAN ENGEL, W. The blue crab and its fishery in Chesapeake Bay. Part 1. Reproduction, early development, growth and migration. Commercial Fisheries Review 24 (9): 1-10. 1958.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao CNPQ pela concessão da bolsa, o que me permitiu desenvolver este Projeto.
Ao professor Alexandre Hilsdorf pelo desenvolvimento do projeto em seu laboratório, pela mãozinha com parte do sequenciamento e pelas dicas e conselhos decisivos em grandes passos do projeto.
A minha orientadora pela proposta, paciência, pela amizade e por me ensinar um pouquinho do que um biólogo pode fazer com algumas fitas de DNA. E aos seus companheiros de trabalho do museu de zoo da USP Prof Marcos e Joana.
A minha co-chefa Juliana, pecinha fundamental que sem ela não sei o que seria de mim.
A toda a galera do LAGOAA, pela convivência ao longo dos meses, pelos brigadeirões (não é mais segredo), e um agradecimento especial a Pequena grande Letícia e a senhorita Kaori e as demais instrutoras de pipetagem.