

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Johngarthia lagostoma* (H. Milne Edwards, 1837) ESTIMADA POR MARCADORES SSR

Maria Catarina de Alencar¹; Fabíola Cristina Ribeiro de Faria²

1. Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: mcatarina92@gmail.com
2. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: fabiola@umc.br

Área de Conhecimento: **Genética Molecular**

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

INTRODUÇÃO

Johngarthia lagostoma é uma espécie endêmica de ilhas oceânicas, sendo encontrada no Brasil em Atol das Rocas (Rio Grande do Norte), Arquipélago de Fernando de Noronha (Pernambuco), ilhas de Trindade e Martim Vaz (Espírito Santo) e Ascensão ilha britânica no oceano Atlântico Sul (HARTNOLL *et al.*, 2006). É preocupante o status atual da espécie, afirmando isso há evidências de um declínio nos números de indivíduos ao longo dos anos, o que a categorizada como “Em perigo (EN)”, segundo o ICMBio. Além da indispensabilidade de estudos para a conservação da espécie há também o fato de que sua distribuição atual é pouco explicada. E 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. Segundo Hartnoll, *et al* (2006) espera-se que estudos genéticos possam fornecer mais evidências para auxiliar nessas discussões acerca da espécie. Sendo assim, há necessidade de avaliar a diversidade genética da espécie em questão, onde atualmente, dentro dos diferentes marcadores moleculares, os microsatélites são os mais utilizados. Microsatélites, são amplamente distribuídos pelo genoma, de natureza multialélica e alto grau de polimorfismo (KLUG *et al.*, 2010), o que leva à possibilidade de identificar perfis característicos de cada indivíduo de uma mesma espécie. Esses marcadores são ideais para estudos populacionais em diferentes níveis, pois podem trazer informações para responder a questões como o grau de mistura genética entre as populações e diferentes níveis de parentesco e fluxo gênico.

OBJETIVOS

Avaliar a diversidade genética e a estrutura de populações de *Johngarthia lagostoma* (H. Milne Edwards, 1837) nas localidades de ocorrência da espécie utilizando marcadores microsatélites espécie-específico. Visando explicar a distribuição atual das populações verificando a diversidade genética de cada uma, buscando fornecer subsídios para futuros estudos para a conservação da espécie que atualmente encontra-se categorizada “Em perigo (EN)”.

METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado LAGOAA no Núcleo Integrado de Biotecnologia na Universidade de Mogi das Cruzes, onde houve a seleção de iniciadores microsatélites com alto grau de polimorfismo, o qual foi previamente desenvolvido e validado como altamente

informativos, possuindo um alto grau de polimorfismo. Para a otimização das reações de PCR, o DNA utilizado foi extraído de amostras de indivíduos de *J. lagostoma* representantes das localidades de ocorrência da espécie do MZUSP. A extração do material genético foi realizada utilizando-se o kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), seguindo o protocolo do fabricante, a partir de tecido retirado previamente dos espécimes selecionados. Para padronizar as reações de PCR foram utilizadas diferentes concentrações de $MgCl_2$ e *Taq* polimerase para um volume final de solução de 20 μ l, e a temperatura de anelamento variou de 52°C a 62°C. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corada com GelRed e em seguida visualizados, para a verificação da qualidade das bandas, no fotodocumentador ImageQuant TM 300 Imager (GE HealthcareLife). E as amplificações que apresentaram os resultados esperados, com bandas fortes e repetitividade nos resultados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata, todo o procedimento foi realizado conforme descrito por Menegatti (2017). As bandas foram medidas com o programa ImageQuantTM 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. O número de alelos e o índice de conteúdo polimórfico (PIC) foram calculados no programa Cervus 3.0.7 para cada iniciador. A verificação de alelos *drop-out* e ou nulo 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. E o programa GENEPOP v. 4.0 foi utilizado para detectar o desequilíbrio de ligação dos iniciadores validados. Com o STRUCTURE foi analisada a estrutura populacional. A riqueza alélica e índices de diferenciação genética foram estimados por meio do software FSTAT 2.9.3.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados um total de 151 alelos, com média de 11 alelos por *locus*, variando de 3 (*locus* JI11) a 24 (*locus* JI25) 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 (KLUG *et al.*, 2010). O índice de conteúdo polimórfico (PIC) foi alto, variando de 0,50 a 0,94, sendo considerados como altamente informativos (BOTSTEIN *et al.*, 1980).

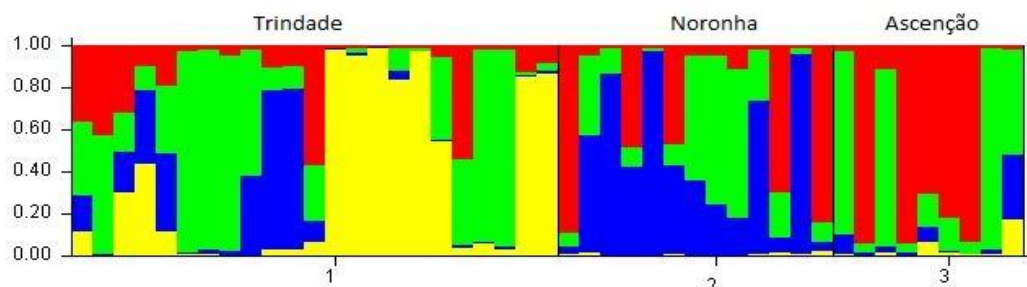
Os resultados apontam para um desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HEW) em 85% dos *loci* testados (Valor < 0,05) que podem indicar desvios de cruzamentos aleatórios e/ou a atuação de forças evolutivas como deriva genética ou fluxo gênico nessas populações analisadas (SEOANE *et al.*, 2005). O Genepop calcula o fluxo gênico baseado no método proposto por Slatkin (1985) onde $Nm < 1$ aponta que a deriva genética tem maior atuação, resultando em significativa diferenciação genética entre as populações, como é possível observar no resultado obtido pelas análises, onde todos os valores foram < 1, demonstrando uma possível diferenciação das populações analisadas.

A baixa diversidade genética em populações insulares é geralmente atribuída ao efeito fundador no momento da colonização, porque apenas uma fração da diversidade genética presente na população de origem é introduzida no novo habitat (Rodríguez-Rey *et al.*, 2016). Segundo Wright (1978) valores de *Fst* indicam pouca diferenciação entre Trindade e Ascensão, e moderada entre Trindade e Fernando de Noronha e Fernando de Noronha e Ascensão. O *Fis* -Coeficiente de endogamia- (0,532) e o *Fit* -Índice de Fixação- (0,559), foram elevados podendo indicar um alto grau de endocruzamento entre indivíduos de uma mesma população, como as estimativas do índice de fixação foram positivas e estatisticamente diferentes de zero aponta para um excesso de homozigotos.

Esse padrão de diferenciação entre as populações poderia ser explicado pelas características biológicas que determinam o potencial de dispersão dessa espécie, as larvas de *J. lagostoma* podem viver por mais de 30 dias no plâncton, e a distância média de

dispersão larval é de 25 a 150 km, o que impossibilitaria a dispersão de indivíduos entre ilhas mais distantes como Ascensão (RODRÍGUEZ-REY *et al.*, 2016). E estudos ecológicos sobre essa espécie em Ascensão apontou que, embora as populações pareçam ser abundantes durante as migrações de reprodução, a característica mais marcante foi a escassez de juvenis, indicando problemas de recrutamento, ou seja a baixa no retorno a terra após a fase larval planctônica (HARTNOLL *et al.*, 2009).

Figura 1: Representação gráfica do valor de K para a formação de grupos e análise de estrutura populacional com base em 13 marcadores de microssatélites.



O eixo y exibe a ascendência estimada de cada indivíduo em um determinado grupo ou subpopulação, usando o modelo de mistura.

O software Structure indicou $K = 4$ e esses resultados sugerem que existem quatro subgrupos genéticos, dois em Trindade, um em Fernando de Noronha e um em Ascensão. Observa-se, na Figura 1, que Trindade apresentou predominância de dois materiais genéticos diferentes (cores verde e amarelo); no entanto, Fernando de Noronha e Ascensão apresentaram predominância de material genético nas cores azul e vermelha, respectivamente. Soto (2009) sugere que *J. lagostoma* foi introduzido em Trindade no século XIX, entretanto Rodríguez-Rey *et al* (2016) conceituou ser mais plausível considerar que Trindade abriga uma população nativa geneticamente diferenciada de *J. lagostoma*. Com as análises realizadas onde Trindade apresenta dois subgrupos genéticos, pode se supor uma possível introdução de espécimes na ilha, entretanto esta já abrigava uma população nativa, o que pode ter dado origem a esses dois subgrupos atualmente existentes. Diante do exposto pode se sugerir que a espécie merece status de conservação e pela estrutura genética observada pode se sugerir que, para fins conservacionistas, pelo menos três unidades de manejo devem ser consideradas sendo uma da ilha de Ascensão, uma segunda unidade de Trindade e uma terceira unidade em Fernando de Noronha.

CONCLUSÕES

Foi avaliada a diversidade genética e a estrutura de populações de *Johngarthia lagostoma* (H. Milne Edwards, 1837) em três das cinco localidades de ocorrência da espécie utilizando marcadores microssatélites espécie-específico. Onde a distribuição atual das populações pode ser analisada verificando a diversidade genética de cada uma, e com isso foi possível fornecer subsídios para futuros estudos para a conservação da espécie que atualmente encontra-se categorizada “Em perigo (EN)” indicando proximidade genética de cada população.

REFERÊNCIAS

HARTNOLL Richard G; MACKINTOSH Terri; PELEMBE Tara J. *Johngarthia lagostoma* (H. Milne Edwards, 1837) on Ascension Island: a very isolated land crab population. **Crustaceana** 79:197–215. 2006.

HARTNOLL, Richard G; BRODERICK Annette C; GODLEY Brendan J; SAUNDERS Kate. E. Population Structure Of The Land Crab *Johngarthia Lagostoma* On Ascension Island, **Journal Of Crustacean Biology**, v. 29 (2), p. 57-61, 2009.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). **Invertebrados Aquáticos** - *Johngarthia lagostoma* (H. Milne Edwards, 1837) Caranguejo-amarelo. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies/5822-especie-5822>. Acesso em: 07 abr. 2017.

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

MENEGATTI, Leila Maria de Faria. **Desenvolvimento e validação de iniciadores microssatélites espécie-específico para *Plagusia depressa* (Fabricius, 1775) (Brachyura, Plagusiidae)**. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2017.

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.

SOTO, J.M.R. **Ações antrópicas negativas nas ilhas oceânicas brasileiras**. In: Mohr, L.V.M., Castro, J.W.A., Costa, P.M.S., Válka, R. (Eds.), *Ilhas Oceânicas Brasileiras – da Pesquisa ao Manejo*. MMA Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Brasília, DF, Brasil, pp. 321–342. 2009.

SEOANE, C. E. S. et al. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. *Rev. Inst. Flor.*, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 25-43, jun. 2005.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations**. Chicago: The University of Chicago Press, v. 4, 1978.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais deixo uma palavra de gratidão por todo apoio, carinho e inspiração, pois sem eles nada disso seria possível. Agradeço a esta instituição pelo ambiente propício à evolução e crescimento, a FAPESP pela bolsa concedida, a minha orientadora Professora Fabíola Cristina pela oportunidade e auxílio. E, todos os meus amigos de verdade eu quero que saibam que reconheço tudo que fizeram por mim, a força que me deram para não desistir e o conforto de saber que nunca estarei só, de um modo especial: Bruna Nobre, Carolina Ofir, Débora Yumi, Fabíola Maciel, Fernanda de Sousa, Jussara Vaini, Kenneth Mota, Lara Endres, Leonardo Willian e Rodrigo Carvalho.