

ESTUDO GENÉTICO POPULACIONAL DE *Mimagoniates lateralis* DA ILHA DE SÃO FRANCISCO DO SUL/SC**TANISI X. DE VICENTE¹, VANESSA F. SILVA², ROBERTO F. ARTONI³, DANIEL M. LIMEIRA⁴,
ARTUR L. PRETO⁴**

¹ Estudante do Curso de Medicina Veterinária – IFC/ARAQUARI – Araquari/SC – tanisixv@gmail.com; ² Estudante do Curso de Medicina Veterinária – IFC/ARAQUARI – Araquari/SC; ³ Docente – UEPG – Campus Uvaranas; ⁴ Docente – IFC/Araquari – Araquari/SC

ÁREA: (X) Pesquisa; () Extensão **NÍVEL:** () Ensino médio; (X) Superior
INFORMAR EDITAL ESPECÍFICO: Edital 045/2012

RESUMO

Mimagoniates lateralis (Pisces: Characidae: Glandulocaudinae), conhecido popularmente como lambari-azul-listrado, é uma espécie endêmica da Mata Atlântica, comumente encontrada entre Joinville/SC e Itanhaém/SP. Embora *M. lateralis* seja classificada como espécie vulnerável na Lista de Espécies Ameaçadas do ICMBio, pouco se sabe sobre sua biologia, sobretudo sobre sua estrutura populacional. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a estrutura populacional desta espécie com o uso de marcadores moleculares baseados em microssatélites. Os exemplares de *M. lateralis* foram coletados em córregos da ilha de São Francisco do Sul/SC. De início, foi realizado um teste de transferibilidade de marcadores microssatélites descritos para *Astyanax altiparanae*, no qual foram realizadas PCRs com 12 diferentes temperaturas de anelamento para cada marcador. Em seguida os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2% para avaliar quais marcadores são aptos para o uso em *M. lateralis* e suas temperaturas de anelamento ideais. Dos 11 marcadores testados, oito foram capazes de amplificar o DNA de *M. lateralis*. Após este teste, deu-se início a PCRs em três populações de *M. lateralis*, para os marcadores Asty 16, Asty 24 e Asty 26. Os produtos destas reações foram aplicados em gel de poliacrilamida 12% para a genotipagem. Somente Asty 26 apresentou-se monomórfico, não sendo possível o uso na análise populacional. A análise genético populacional baseada nos outros dois marcadores, demonstrou que as populações de São Francisco do Sul apresentam bons níveis de heterozigidade, mas parecem caminhar para um isolamento que pode causar processos demográficos irreversíveis.

Palavras-chave: Genética da conservação; Rio Acaraí; Peixes.

INTRODUÇÃO

Estudos de diversidade ou variação genética podem ser feitos em diversos níveis ou com variados marcadores. Nesses últimos anos muitos pesquisadores têm estudado a estrutura populacional de diversos organismos aquáticos com o uso de marcadores de microssatélites que, segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), nada mais são do que sequências simples de bases repetidas em tandem presentes no genoma de um determinado organismo. Segundo Ward (2000), comparado a sistemas enzimáticos, o uso de microssatélites para análise de

estrutura populacional é o mais indicado, devido ao fato dos microssatélites refletirem isolamento genético, e os sistemas enzimáticos a seleção disruptiva dentro de uma população panmítica, sendo assim, a interpretação de dados se torna mais difícil ou mais sujeita a diferentes visões.

Estudos utilizando marcadores baseados em DNA, mostraram que a redução de populações naturais e a introdução de novas espécies em um determinado ambiente podem levar a uma queda na diversidade genética. Por esse motivo, é importante a realização de análises de variação genética entre indivíduos de uma mesma população, uma vez que estas análises são ferramentas muito úteis em programas de conservação (O.BRIEN, 1994; AVISE, 1996; SNOW; PARKER, 1998).

Mimagoniates lateralis é um caracídeo de tamanho reduzido, pertencente a subfamília Glandulocaudinae e que apresenta tipicamente duas faixas ântero-posterior de cor mogno dos lados esquerdo e direito do corpo (MENEZES, 1996). *M. lateralis* ocorre de Joinville/ SC a Itanhaém/SP, sendo tipicamente encontrado em corpo d'água pequenos e escuros, sempre próximo ao litoral (ABILHOA; DUBOC, 2004). Por ser uma espécie rara e ameaçada – encontra-se na Lista de Espécies Ameaçadas do ICMbio, onde é classificada como vulnerável - são escassos estudos sobre sua biologia (MACHADO et al., 2005), fatores esse que justificam estudos que elevem o grau de conhecimento científico sobre a espécie e que possam embasar ações de preservação.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo populacional da espécie *Mimagoniates lateralis*, com base em marcadores de microssatélites, tendo em vista o aumento do conhecimento sobre a estrutura populacional desse peixe.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de três populações de *Mimagoniates lateralis* foram coletados em córregos localizados no município de São Francisco do Sul. O número amostras das três populações testadas são: Pop01 - 07 indivíduos; Pop02: 22 indivíduos e Pop03: 31 indivíduos, sendo as populações 01 e 02 pertencentes a bacia do Rio Acaraí. Após a coleta, os animais foram eutanasiados via anestesia profunda com eugenol (1 %) e fixados em álcool etílico absoluto. Posterior à fixação, foram submetidos a um processo de extração de DNA, utilizando o protocolo de extração com tampão CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), proposto por Boyce e Zwick (1989). Para a escolha dos marcadores microssatélites a serem utilizados neste estudo, foram realizados testes de transferibilidade de iniciadores descritos por Zaganini et al. (2012) para *Astyanax paranae*. Para tanto, foram realizadas PCRs com DNA de *M. lateralis* com 12 diferentes temperaturas de anelamento para cada marcador testado. Para as reações de PCR, foi adotado o protocolo descrito por Zaganini et al. (2012), com alterações que otimizam as reações para a nossa espécie. As amostras foram amplificadas, e então analisadas em gel de poliacrilamida 12%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testados 11 iniciadores de microssatélites descritos por Zaganini et al. (2012), destes, oito foram capazes de amplificar de maneira satisfatória o DNA de *M. lateralis*. As temperaturas de anelamento foram bastante variadas para os diferentes marcadores. Apesar dos oito marcadores terem amplificado DNA de *M. lateralis* percebeu-se na observação dos géis de agarose que a intensidade das bandas de DNA de alguns dos marcadores testados foi mais fraca do que a de outros, em alguns marcadores foi observada

a presença de bandas espúrias e em todas as reações foi observado um excesso de reagentes no final destes géis. Todas estas observações indicaram a necessidade de se otimizar as reações de PCR. As otimizações foram feitas mudando as concentrações de $MgCl_2$, a temperatura de anelamento e o teor de DNA no volume final das reações.

Dentre os marcadores testados, três (Asty 16, Asty 24 e Asty 26) foram amplificados para as três populações de *M. lateralis*. De acordo com Zaganini et al. (2012), o *loci* Asty 16 possui 165 pb, Asty 24 possui 139 pb e Asty 26 190 pb. As amplificações aqui realizadas mostraram que os fragmentos desses marcadores, variaram entre 100pb e 140pb.

Somente Asty 24 revelou-se monomórfico em todas as populações. As heterozigosidades médias observadas e esperadas nas três populações, o número de alelos, o número efetivo de alelos e os valores de F_{is} podem ser melhor visualizados na tabela 1. Somente a População 03 apresentou valor negativo de F_{is} (índice de fixação gênica) indicando não apresentar déficit de heterozigotos, já as outras duas populações apresentaram excesso de homozigotos. Somente o *locus* Asty 16 encontra-se fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações 01 e 02.

Tabela 1 - Análise genético populacional de três populações de *M. lateralis* coletadas na ilha de São Francisco do Sul/SC. Onde n_a : número de alelos; n_e : número efetivo de alelos; H_o : Heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada; F_{is} : índice de fixação; * valores impossíveis de estimar devido à ausência de polimorfismo; ** *locus* fora do EHW

	Locus	n_a	n_e	H_o	H_e	F_{is}
Pop01	Asty16	3,000	2,571	0,000	0,611	1,000 **
	Asty24	1,000	1,000	0,000	0,000	*
	Asty26	2,000	1,324	0,286	0,245	-0,167
	Média	2,000	1,632	0,095	0,285	0,417
Pop02	Asty16	2,000	1,893	0,190	0,472	0,596 **
	Asty24	1,000	1,000	0,000	0,000	*
	Asty26	4,000	1,980	0,636	0,495	-0,286
	Média	2,333	1,624	0,276	0,313	0,155
Pop03	Asty16	2,000	1,523	0,440	0,343	-0,282
	Asty24	1,000	1,000	0,000	0,000	*
	Asty26	3,000	1,265	0,233	0,209	-0,114
	Média	2,000	1,262	0,224	0,184	-0,198

A comparação entre os índices de variabilidade genética entre as populações, mostrou maior semelhança entre as populações 01 e 02 ($F_{st} = 0,106$) e maior diferença entre as populações 02 e 03 ($F_{st} = 0,214$). Isso pode ser explicado pelo fato de que o Ponto 01 e Ponto 02 pertencem à bacia do Rio Acaraí, ao passo que o Ponto 03 não pertence, embora, geograficamente, esteja mais próximo do Ponto 02 do que este está do Ponto 01. Esses dados podem ser melhor visualizados na matriz de F_{st} abaixo.

Tabela 2 - Matriz de valores par a par de F_{st} para três populações de *M. lateralis* coletadas em São Francisco do Sul/SC.

	Pop01	Pop02	Pop03
Pop01	0,000		
Pop02	0,106	0,000	
Pop03	0,031	0,214	0,000

CONCLUSÕES

A análise dos dados mostra que os *locus* Asty 16 e Asty 26 são eficazes no estudo de populações naturais de *M. lateralis*. Pode-se ainda concluir que as populações naturais desses peixes, embora isoladas em uma ilha, apresentam bons níveis de variabilidade genética. Porém o isolamento delas em pequenos corpos d'água, parece estar levando à diferenciação genética dessas populações. Esse isolamento em pequenas populações associado à fragmentação do hábitats pode levar esses animais à processos demográficos irreversíveis, aumentando ainda mais seu risco de extinção.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a FAPESC pelo aporte financeiro dado ao nosso projeto, e ao Instituto Federal Catarinense- *Câmpus* Araquari, pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

- ABILHOA, V.; DUBOC, L.F. Peixes. In: MIKICH, S.B.; BÉRNILS, R.S. (EDS.) **Livro Vermelho dos Animais Ameaçados de Extinção no Estado do Atlântica do Sul e Sudeste Brasileiro: peixes de água doce**. Workshop: Padrões de Biodiversidade da Mata Atlântica do Sudeste e Sul do Brasil. Campinas, SP, 1996.
- AVISE, J.C. Introduction: the scope of conservation genetics. In: AVISE J.C.; HAMRICK J.L. (eds.). **Conservation Genetics: Case Histories from Nature**. New York, USA: Chapman & Hall, 1996.
- BOYCE, T.M.; ZWICK, M.E. **Mitochondrial DNA in bark weevils: size, structure, and heteroplasmy**. Genetics Austin, n. 12, v. 3, p. 825-836, 1989.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, p. 220, 1998.
- MACHADO, A.B.M.; MARTINS, C.S.; DRUMMOND, G.M.; SEBAIO, F. **Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo as listas das espécies quase ameaçadas e deficientes em dados**. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, 2005.
- MENEZES, N. A. **Padrões de distribuição da biodiversidade da Mata**
- O'BRIEN, S.J. **A role for molecular genetics in biological conservation**. Proceedings of the Natural Academy of Science. USA, 91:5748-5755, 1994.
- Paraná**. Curitiba, Mater Natura e Instituto Ambiental do Paraná, p. 581 – 677, 2004.
- SNOW, A.A.; PARKER, P.G. **Molecular markers for population biology**. Ecology, n. 79, p. 359-360, 1998.
- WARD, R.D. **Genetics in fisheries management**. Hydrobiologia n. 420, p. 191-201, 2000.
- ZAGANINI, R.L.; HASHIMOTO, D.T.; PEREIRA, L.H.G., OLIVEIRA, C.; MENDONÇA, F.F.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification. **Journal of Genetics** - Online Resources, n. 91, p. 24-26, 2012.