

VI Seminário de Iniciação Científica

Pesquisa na Amazônia: Novos cenários

27 a 29 de Outubro de 2020

On-line pela plataforma Google Meet

UNIFESSPA | PROPIT

ANÁLISE GENÉTICA DE *SCOMBEROMORUS BRASILIENSIS* DA COSTA BRASILEIRA ATRAVÉS DA REGIÃO CONTROLE DO DNA MITOCONDRIAL.

Gerson de Almeida de Araujo¹ – Unifesspa *e-mail*:
gerson.almeida@unifesspa.edu.br

Divino Bruno da Cunha² - Unifesspa
e-mail: divinobruno@unifesspa.edu.br

Agência Financiadora: PIBIC/CNPq/FAPESPA

Eixo Temático/Área de Conhecimento: Genética animal

1. INTRODUÇÃO

A diversidade genética das populações naturais é essencial para as espécies se adaptarem às mudanças ambientais, sendo que, pesquisas sobre a diversidade genética em organismos explorados para a comercialização e consumo são imprescindíveis para condução de políticas de manejo e conservação da espécie e do recurso alimentar (Reiss et al., 2009).

A família Scombridae (Perciformes) é composta de aproximadamente de 15 gêneros e 49 espécies. Destas, somente três espécies ocorrem no Brasil, *Scomberomorus regalis*, *Scomberomorus cavalla* e *Scomberomorus brasiliensis*. As duas últimas são conhecidas comumente como cavala e serra, respectivamente, tais espécies são um importante recurso pesqueiro das águas do Oeste do Atlântico Central e costa brasileira, sendo que ambas distribuem-se ao longo das costas do Caribe, Atlântico Central e América do Sul até a Argentina (Stevenson, 1981; Collette & Russo, 1984; Fonteles-Filho, 1988).

O peixe serra possui hábitos costeiros, comuns em costões, ilhas e praias abertas. Quando jovens, formam grandes cardumes, já quando adultos vivem em pequenos grupos ou solitários. Sua reprodução é ovulípara, com fecundação e desenvolvimento externo, com produção de ovos pelágicos. Quanto à desova, esta é periódica (anual), sendo que se verifica uma época mais intensa nos meses de setembro a março, meses correspondentes às estações de primavera e verão no Nordeste (Gesteira & Mesquita, 1976).

De 1970 a 2000 a captura de *S. brasiliensis* em todo o Brasil foi em média de 2.733 mil t/ano (FAO, 2000 - FISHSTAT). Tem sido documentado na literatura alguns exemplos de espécies do gênero *Scomberomorus* com sinais de sobre-exploração. Por exemplo, de acordo com Govender (1994) os estoques de *S. commerson* no Sul da África estão sendo explorados acima do limite máximo do nível de produção biológica; e segundo Arreguín-Sanchez (1995) foi verificado indícios de sobre-exploração para *S. cavalla* no México. Mesmo sendo um dos mais importantes recursos pesqueiros da costa sul-americana, não há estudos sobre a variabilidade genética de *S. brasiliensis*, sendo que estados como o Ceará, que antes possuía uma das maiores produções do território, agora é importador do Pará e Amapá (Nóbrega, 2002). Segundo Gold et al (2010) a pesca somente da serra na costa da América Central entre os anos de 1996 e 2006 representou 19% dos desembarques anuais da frota artesanal de Trindad e Tobago, correspondendo a uma média de 1.800 toneladas. Sendo que, isso corresponde a um grande esforço de pesca sobre esta espécie ao longo de sua distribuição (Henry & Martin, 1992; Gold et al., 2010). Nesse mesmo estudo usando marcadores microssatélites, Gold et al. (2010) encontraram evidências de estruturação nas populações de *S. brasiliensis*

¹Graduando em Licenciatura em Ciências Biológicas - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (IEX/Unifesspa).

²Doutor em Genética e Biologia Molecular - Professor Titular Adjunto da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (IEX/Unifesspa).



da costa da Venezuela (Ilha Margarita e Cumana), o que foi corroborado por seqüências mitocondriais do gene ND4.

Na região da costa Norte, Nordeste e Sul do Brasil existe uma escassez de informações a respeito da diversidade genética de *S. brasiliensis*. Sendo que, não há nenhum estudo acerca da variabilidade genética de serra utilizando marcadores moleculares. Desta forma, a presente proposta de estudo visa estimar os padrões de diversidade genética para *S. brasiliensis* ao longo da costa brasileira utilizando sequências da região controle do DNA mitocondrial.

2. MATERIAS E MÉTODOS

Amostragem: Os indivíduos de *S. brasiliensis* foram obtidas de três diferentes regiões da costa brasileira. Foram coletadas 80 amostras de Macapá (Amapá), 15 de Fortaleza (Ceará) e 15 de Paranaguá (Paraná). As amostras de serra da costa brasileira foram obtidas diretamente através de pesca artesanal. Quanto ao tamanho dos indivíduos coletados, todos apresentaram comprimento variando entre 50 a 80 cm, sendo os tecidos musculares retirados e estocados em etanol 100% a -30°C até a extração do DNA.

Extração de DNA, amplificação por PCR e seqüenciamento: O DNA total foi extraído de tecidos musculares de todas as amostras usando o método padrão de fenol clorofórmio, seguindo a precipitação por acetato de sódio (Sambrook et al., 1989). Os iniciadores usados para a amplificação da região controle foram L1 e Perc 12S 1R (Santa-Brígida et al. 2007). A reação foi realizada em um volume total de 10 µl. A PCR foi realizada usando 1,5 µl de DNA (10-20 ng); 1 µl de buffer 10x (Invitrogen; Tris-HCl, KCl, MgCl₂, pH 7.8); 1,25 µl de MgCl₂ (Invitrogen); 0,6 µl de dNTP; 0,1 µl de Taq polimerase (Invitrogen); 0,5 µl de cada iniciador (10 pmol/ µl); 5,05 µl de H₂O bi-destilada estéril. A PCR foi efetuada em um termociclador modelo Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems), com um perfil de ciclo de 94 °C por 3 min, seguido por 30 ciclos de 94°C para desnaturação e 50°C por 1 min para annealing, 72°C por 1 min, com um período de extensão adicional de 72°C por 10 min no último ciclo.

Seqüenciamento: Os produtos da PCR foram purificados utilizando-se o kit ExoSAP-IT (Amersham Pharmacia Biotech) e seqüenciados usando o Big Dye 3.1 no seqüenciador automático de DNA ABI 3100, seguindo as orientações do fabricante (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). **Análises Demográficas:** As seqüências foram alinhadas usando o programa CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) implementado no programa BIOEDIT (Hall 1999). Relações filogenéticas foram realizadas com auxílio do PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002) usando os métodos de agrupamento de vizinhos e máxima verossimilhança, enquanto que a partir de uma árvore máxima verossimilhança foi gerada a rede de haplotípos no programa Haploviewer (Salzburger et al. 2011). Para testar a heterogeneidade da taxa de mutação na região analisada foi utilizado o programa jModeltest 0.1.1 (Posada 2008) segundo o AIC (Akaike Information Criterion). A divergência genética dentro e entre as populações foi calculada no Mega versão 5 (Kumar et al. 2011). O software ARLEQUIN 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) foi usado para estimar os índices de diversidade genética (h ; Nei 1987) e nucleotídica (π ; Nei 1987) em cada uma das populações. Os testes D de Tajima (Tajima, 1983) e F_s de Fu (Fu, 1997), os quais são mais sensíveis para detectar desvios da neutralidade devido à expansões recentes da população ou "bottlenecks" (Tajima, 1983; Fu, 1997). Estes dois testes resultam em valores negativos em casos de expansão populacional recente ou seleção direcional (Ray et al. 2003), já valores positivos são esperados em caso de seleção balanceadora. A diferenciação genética entre pares de populações foi estimada usando o índice de fixação F_{st} (Excoffier et al. 1992) e sua significância testada por 10 000 permutações. A investigação da variabilidade genética entre populações foi testada usando a análise hierárquica de variância molecular, AMOVA (Excoffier et al. 1992) realizada no ARLEQUIN 3.5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 387 pares de bases (bp) da região 3 'da região controle foi seqüenciado em 110 espécimes de *S. brasiliensis* representando os três locais de estudo (Macapá, Fortaleza e Paranaguá). Uma seqüência repetitiva complexa e altamente variável composta de bases A e T foi observada próximo ao início da região controle, com muitas deleções e substituições encontradas neste segmento (Figura 1).

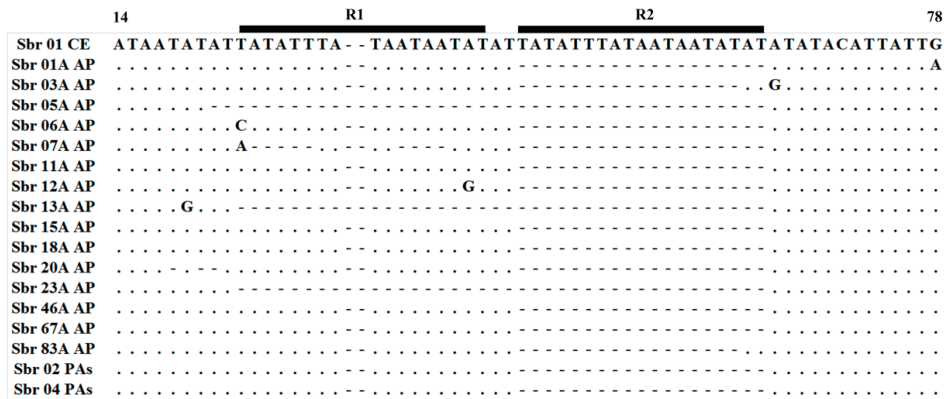


Figura 1. Representação esquemática da repetição encontrada na Região Controle do genoma mitocondrial de *S. brasiliensis*. O principal segmento repetitivo está marcado como R1. Os números no topo da figura indicam as posições dos nucleotídeos.

Dada a complexidade dessa região, com sua acentuada variabilidade e alto nível de homoplasia, foi excluída das análises subsequentes. Excluindo esse segmento repetitivo (entre as bases 23-65), analisou-se um total de 344 pb, dos quais foram identificados 73 haplótipos, sendo dois (H5 e H10) bem representados, enquanto 58 eram únicos (Figura 2). Foram identificados vários indels diferentes - entre um e 11 pb - nesses haplótipos, cuja exclusão resultou em 47 locais variáveis e 25 parcimoniosos. Todas as três populações apresentaram altos níveis de diversidade haplotípica e nucleotídica (Tabela 1). Todas as três populações retornaram valores negativos significativos para desvios da neutralidade (dados não mostrados), assim como a população combinada. Nenhum dos valores de F_{st} foi significativo para qualquer comparação entre populações, o que é corroborado pela AMOVA, que indica que apenas 1,26% da variância registrada foi devida àquela entre as populações, conforme suportado pelo valor não significativo de F_{st} para a comparação geral.

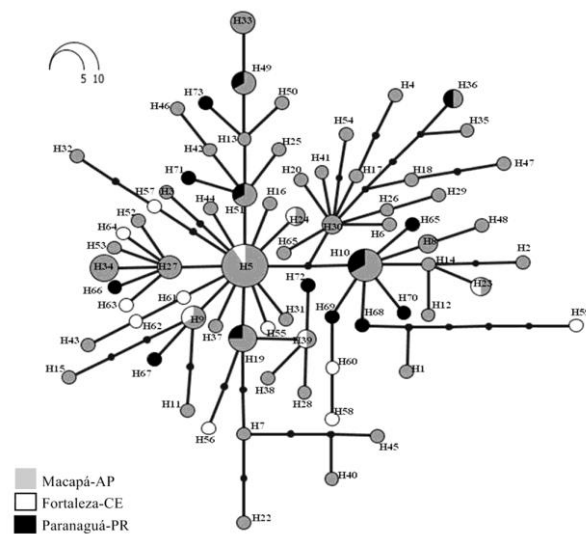


Figura 2. Genealogia de haplótipos da análise de máxima verossimilhança da Região controle para *S. brasiliensis* realizada no software Haploviewer. O modelo de substituição de nucleotídeos utilizado foi ML: HKY. Cada população é representada por uma cor diferente e cada círculo indica um determinado haplótipo,



cuja frequência é representada por seu tamanho. Os comprimentos dos ramos também são proporcionais ao número de mutações que separam os respectivos haplótipos.

Table 1. Diversidade Nucleotídica (π) e Haplótípica (h) da Região Controle de *Scomberomorus brasiliensis* na costa brasileira.

Localidades	Diversidade Nucleotídica (π)	Diversidade Haplótípica (h)
Macapá-AP	0.011 (\pm 0.006)	0.977 (\pm 0.008)
Fortaleza-CE	0.011 (\pm 0.006)	1.000 (\pm 0.024)
Paranaguá-PR	0.011 (\pm 0.007)	0.990 (\pm 0.028)
Combinados	0.011 (\pm 0.006)	0.982 (\pm 0.005)

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises filogenéticas foram inconclusivas, devido aos altos níveis de variabilidade registrados, além dos acentuados níveis de homoplasia entre as populações. Isso se reflete diretamente na genealogia dos haplótipos da Região de Controle, na qual a maioria dos haplótipos é separada por apenas uma única mutação (com exceção do H59). O modelo de expansão para a história demográfica da população como um todo não pôde ser calculado (o procedimento pelo menos quadrado para ajustar a distribuição de incompatibilidade de modelo e a distribuição observada não convergiu após 1800 etapas). No entanto, a distribuição das diferenças aos pares é unimodal (dado não mostrado), o que é típico de uma população em rápida expansão (Rogers e Harpending 1992, Marjoram e Donnelly 1994). A sobre pesca pode levar uma determinada espécie a extinção ou próximo a extinção, por exemplo podemos citar o peixe mero (*Epinephelus itajara*) que hoje encontra-se na lista vermelha da FAO devido a sobre pesca desta espécie. Desta forma este estudo mostra como está a variabilidade genética da serra na costa brasileira, contribuindo com informações sobre *S. brasiliensis*. Vale ressaltar que, a serra faz parte da cadeia alimentar no oceano Atlântico Sul, e tais informações poderão ser úteis em futuros planos de manejo caso haja a necessidade.

REFERÊNCIAS

- Arreguín-Sánchez, S. 1995. Population dynamics of the king (*Scomberomorus cavalla*) of Campeche Bank, Mexico. *Sci Mar* 59 (3-4): 637-645.
- Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Norte (CEPNOR/IBAMA), http://www.ibama.gov.br/cepnor/index.php?id_menu=52 (23 de Janeiro, 2006).
- Collette, B.B., Russo, J.L. 1984. Morphology, systematics, and biology of the Spanish mackerels (*Scomberomorus maculatus*, Scombridae). *Fish Bull* 82(4): 545-692.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- FAO (2000) Fishery statistics- Capture production. FAO fisheries Series. N° 54. Vol. 86/1, 719 p.
- Fonteles-Filho, A. 1988. Sinopse de informações sobre a cavala, *S. cavalla* (Cuvier) e a serra, *S. brasiliensis* Collette, Russo and Zavalla-Camim (Pisces: Scomberomorus) no estado do Ceará, Brasil. *Arquivo de Ciências do Mar* 27:21-48.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Gesteira, T.C.V., Mesquita, A.L.L. 1976. Época de reprodução, tamanho e idade na primeira desova da cavala e da serra, na costa do Estado do Ceará (Brasil). *Arq. Ciên. Mar, Fortaleza*, 16(2): 83-88.
- Govender, A. 1994. Mortality and biological reference points for the king mackerel (*Scomberomorus commerson*) fishery off Natal, South Africa (based on a per-recruit assessment). *Fish Res* 23: 195-208.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.

VI Seminário de Iniciação Científica
Pesquisa na Amazônia: Novos cenários
 27 a 29 de Outubro de 2020
 On-line pela plataforma Google Meet
 UNIFESSPA/PROFIT

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Marjoram, P., Donnelly, P. 1994. Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Subdivided Populations and Implications for Early Human Evolution. *Genetics* 136: 673-683.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York, NY, USA. 512p.
- Nóbrega, F.M. 2002. Idade, crescimento e avaliação de estoques da serra *Scomberomorus brasiliensis* (Teleostei: Scombridae), na plataforma continental do nordeste do Brasil. M.Sc. Thesis, Universidade Federal Pernambuco, Recife.
- Posada, D., Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinf* 14(9): 817-818.
- Ritchie, P.A., Lambert, D.M. 2000. A repeat complex in the mitochondrial control region of Adélie penguins from Antarctica. *Genome* 43(4): 613-618.
- Reiss, H., Hoarau G., Dickey-Collas, M., Wolff, W.J. 2009. Genetic population structure of marine fish: mismatch between biological and fisheries management units. *Fish and Fisheries*.
- Rogers, A.R., Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol and Evol* 9(3): 552-569.
- Rozas, J., Librado, P. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinf* 25: 1451-1452.
- Salzburger W, Ewing GB, Von Haeseler A: The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology* 2011, 20:1952-1963.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Swofford, D.L. 2002. *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other Methods Version 4*. Sinauer Associates, Inc. Publisher, Sunderland, Ma.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.