

POLIMORFISMO GENÉTICO DE POPULAÇÕES DE *Drosophila sturtevantii* EM REGIÃO DE FLORESTA AMAZÔNICA NO PARÁ

Mariana Angonese¹; João Henrique Oliveira²; Tuane Fürst²; Marlúcia Martins³; Lizandra Robe⁴; Juliana Cordeiro⁵

1- Laboratório de Diversidade Genética; Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética; Instituto de Biologia; Universidade Federal de Pelotas – e-mail: mariangonese4@hotmail.com

2- Laboratório de Diversidade Genética; Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética; Instituto de Biologia; Universidade Federal de Pelotas

3- Coordenação de Zoologia, Museu Paraense Emílio Goeldi

4- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade do Rio Grande

5- Laboratório de Diversidade Genética; Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética; Instituto de Biologia; Universidade Federal de Pelotas – e-mail: jlncdr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Desde 1852, a Amazônia vem sendo caracterizada por regiões endêmicas, isto é, regiões delimitadas pelos grandes rios que abrigam assembleias bióticas específicas com suas próprias relações evolutivas (WALLACE, 1852).

É estimado que cerca de 26.000 km são desmatados a cada ano na região amazônica (IMAZON, 2013). No entanto, a pressão do desmatamento não é homogênea e está concentrado na Amazônia Oriental, em uma região conhecida como o "arco desmatamento" (SILVA ET AL., 2005).

O conhecimento desta biodiversidade é de grande importância principalmente quando se trata de espécies presentes nesta região, área de intensa e acelerada atividade humana. Esta área abrange o sul do Bioma Amazônia, do Maranhão até o Acre, atingindo um dos principais centros de endemismo, o Belém (CEB); além dos centros de endemismo Xingu (CEX) e Tapajós (CET). O CEB é a área mais ameaçada em relação à potencial de perda de biodiversidade, por ter um histórico de utilização humana da terra mais antigo (GASCON ET AL., 2001).

Algumas espécies da família Drosophilidae apresentam características biológicas que sugerem um alto potencial bioindicador (MATA ET AL., 2008) por serem especialistas ou generalistas e extremamente sensíveis à mudanças nas condições habitats em que se encontram. Neste sentido, *Drosophila sturtevantii* é uma das mais frequentes nas coletas realizadas na Amazônia, depois de espécies do grupo *willistoni* (AMADOR, 2012).

A caracterização da diversidade genética em populações naturais é importante, pois desta forma pode-se inferir a capacidade de resposta da população às alterações ambientais. Uma população com baixa diversidade pode estar comprometida e potencialmente diminuir em tamanho, levando à extinção (HARTL e CLARCK, 2010). Ou ainda, pode demonstrar o quão degradado está uma região, impossibilitando o fluxo gênico entre populações vizinhas, desta forma promovendo a manutenção da diversidade genética (FRANKHAN et al., 2008).

Neste sentido, apesar dos indivíduos pertencerem a uma mesma espécie, eles não são geneticamente idênticos entre si. Cada indivíduo possui uma combinação única de sequências gênicas, o que corresponde a diversidade ou variabilidade genética dentro uma população. A variabilidade genética tem fundamental importância para a evolução, e pode ser usada como instrumento de análise para estimar níveis de migração, dispersão e os fluxos gênicos entre populações (FRANKHAN et al., 2008)

Desta forma, nosso objetivo foi analisar a diversidade genética de quatro populações de *D. sturtevantii* na Amazônia, buscando avaliar os possíveis efeitos do desmatamento e as prioridades de conservação ao longo deste bioma

2. METODOLOGIA

Os indivíduos de *D. sturtevantii* analisados foram coletados e identificados pela equipe de pesquisa do Laboratório de Ecologia de Insetos do Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém, Pará) nos anos de 2009 a 2011. As moscas foram conservadas em etanol 70%. A identificação foi feita com base na análise da morfologia da genitália interna do macho (edeago). As populações foram amostradas em localidades com diferentes níveis de alteração ambiental: Flona Caxiuanã, pertencente ao CEX, é o ponto mais preservado, com menor atividade humana; Moju, pertencente ao CEB, é um ponto com mediana alteração humana, por se localizar em uma reserva da EMBRAPA; Reserva Mocambo, pertencente ao CEB, é um ponto que foi altamente alterado e situa-se no meio da cidade de Belém; Rebio Gurupi, pertencente ao CEB, apesar de ser uma reserva, sofre intensamente com a atividade madeireira, é um dos últimos remanescentes florestais do Maranhão.

Para a extração de DNA foram usados somente machos. A extração de DNA foi realizada com kit de extração forense NucleoSpin-XS (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR foram feitas em 25ul finais usando aproximadamente 10ng de DNA, 5pmol de cada primer, 1U de Taq PhireHotStart (Thermo Scientific), 0,2mM de cada dNTP, 1X de tampão. Os ciclos de PCR foram feitos com temperatura de anelamento de 58°C com o uso dos primers TYJ e C1N (SIMON et al., 1994). Esses primers anelam na porção inicial do gene mitocondrial citocromo oxidase 1 (COI), gerando um fragmento de aproximadamente 600pb. Os amplicons foram conferidos em gel de agarose 1%. Amostras com uma banda foram purificadas com ExoSAPIT (USB), as amostras que apresentaram duas bandas ou mais foram purificadas com o kit Illustra GFX (GE Healthcare). As amostras foram enviadas para sequenciamento no Laboratório de Biologia Molecular do Museu Paraense Emílio Goeldi, usando um sequenciador ABI3031. Em todos os casos ambas as fitas (forward e reverse) foram sequenciadas. A qualidade do cromatograma foi verificada com o programa Chromas. As sequências foram editadas usando o programa PreGap e Gap4 do Staden Package (STADEN, 1996). O alinhamento foi feito na ferramenta ClustalW contida no programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). As estimativas de diversidade k , π , h , H_d , foram calculadas no programa DnaSP 5.19 (LIBRADO e ROZAS., 2009). A análise de variância genética entre as populações foi calculada por meio da estatística F_{st} no programa Arlequin (SCHNEIDER et al., 1999). Uma rede de haplótipos foi construída usando o algoritmo median-joining no programa Network (BANDELT et al., 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 44 sequências com um tamanho total de 682pb. Desses 682pb analisados, 39 sítios se mostraram polimórficos; e nas 44 sequências analisadas foram encontrados quatro haplótipos de COI, representando uma diversidade haplotípica H_d de 0,2838. Também obtivemos dados como k , que nos representam um número médio de substituição nucleotídica por sítio; o π representando a diversidade nucleotídica e o h nos indicando o número de haplótipos presentes.

Em relação às populações analisadas, Gurupi foi a população mais diversa ($k=6.667$, $\pi=0.0151$, $h=2$, $H_d=0.667$), apesar de estar representada por três indivíduos. Caxiuanã é a mais bem representada ($n=25$) e a segunda mais diversa ($k=5.013$, $\pi=0.007$, $h=4$, $H_d=0.3$). Mocambo ($n=12$) é a terceira mais diversa ($k=3.106$, $\pi=0.0054$, $h=4$, $H_d=0.45$). Moju foi a menos diversa, onde os quatro indivíduos analisados apresentam o mesmo haplótipo.

O cálculo de F_{st} , que representa a variância genética entre as populações, mostra que Gurupi apresenta os maiores índices de diferenciação, especialmente com relação à Moju ($F_{st} = 0,11$). Porém os valores não significativos pode ser reflexo da baixa amostragem.

O Network de heplótipos revelou a presença de dois grupos principais, distanciados por nove passos mutacionais e compartilhados entre Gurupi, Caxiuanã e Mocambo, sugerindo uma fragmentação mais antiga seguida de expansão e fluxo gênico recente.

4. CONCLUSÕES

De modo geral, nossas análises indicam que, à despeito da fragmentação antropogênica dos habitats florestais, as populações amazônicas de *D. sturtevantii* parecem estar interconectadas. Os dados da rede de haplótipos sugerem uma fragmentação populacional mais antiga seguida de expansão e fluxo gênico recente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDELT, H.J., FORSTER, P., ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Mol. Biol.** vol. 16, 37–48, 1999

FRANKHAM, R., BALLOU J. D., BRISCOE D.A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, SP: SBG, 2008

GASCON, C.; BIERREGAARD, R.O.; LAURANCE, W.F. & MÉRONA, J.R. 2001. Deforestation and forest fragmentation in the Amazon. In: Lessons from Amazonia: the ecology and conservation of a fragmented forest. Bierregaard, R. O.; Gascon, C., Lovejoy, T. E. & Mesquita, R. C. G. (eds.). Yale University Press, New York

HARTL, D.L., CLARK, ANDREW G. **Princípios de Genética de Populações**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2010

IMAZON, 2013. IMAZON. **Pressão humana na floresta Amazônica brasileira**, Belém, 11 out. 2013. Acessado em 11 de out. 2013. Online. Disponível em: <http://www.imazon.org.br/publicacoes/livros/pressao-humana-na-floresta-amazonica-brasileira-1>

LIBRADO, P., ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25, 1451–1452, 2009

MATA RA; MCGEOCH MA; TIDON R., Drosophilid assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the Brazilian Savanna. **Biodiversity and Conservation**, 17:2899-2916, 2008

SCHNEIDER, S., ROESSLI, D., EXCOFFIER, L. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. **Genetics** 152, 1079–1089, 1999

SILVA, JMC; RYLANDS, A B; FONSECA, GAB., The fate of the Amazonian áreas of endemism. **Conservation Biology**, 19(3): 689-69, 2005

SIMON C, FRATI F, BECKENBACH A, CRESPI B, LIU H, FLOOK P., Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann Entomol Soc Am** 87:651-701, 1994

STADEN R., The Staden sequence analysis package. **Mol Biotechnol** 5:233–241, 1996

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol. Biol. Evol.** 28, 2731–2739, 2011

WALLACE, A. R., On the monkeys of the Amazon. *Proceeding Of Zoological Society. London*, 20:107-110, 1852