

# USO DE MICROSSATÉLITES ANCORADOS COMO MARCADORES PARA O ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO CARANGUEJO-UÇÁ

Mendes, David Shannon Fortes<sup>1,\*</sup>; Britto, Fábio Barros<sup>2,\*</sup>; Lima, Paulo Sarmanho Costa<sup>2</sup>; Diniz, Fábio Mendonça<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Aluno de Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal do Piauí,

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Meio Norte

\* Autores tiveram igual participação na realização deste estudo.

Email: [davidfortes@gmail.com](mailto:davidfortes@gmail.com), [fbritto@yahoo.com](mailto:fbritto@yahoo.com)

## RESUMO

O caranguejo-uçá, *Ucides cordatus*, é um crustáceo pertencente à família Ocypodidae e é amplamente distribuído no litoral brasileiro. Possui elevada importância no âmbito ecológico, atuando na aeração dos solos de manguezais e também na ciclagem de nutrientes. Além disto, representa um dos mais importantes recursos dos manguezais, sendo responsável pela sobrevivência de famílias ribeirinhas em comunidades estuarinas. Sua grande distribuição pode levar ao surgimento de estoques geneticamente adaptados a um determinado ambiente que, se não forem manuseados adequadamente, podem desaparecer, levando à perda de biodiversidade. Sendo assim, o conhecimento da variabilidade genética das diferentes populações se torna muito importante para o desenvolvimento de programas de conservação e estratégias de gerenciamento mais eficientes. O presente trabalho teve como objetivos avaliar o potencial dos marcadores de microssatélites ancorados, também conhecidos como ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), para o estudo populacional do caranguejo-uçá. Recentemente os ISSR têm sido utilizados por apresentar boa reprodutibilidade, baixo custo e revelar bom nível de polimorfismo. Assim, foram testados 18 marcadores em caranguejos de diferentes localidades. As PCRs mostraram resultados consistentes para 6 dos 18 *primers*, com bandas multialélicas e polimórficas variando entre 350 a 2000 pares de bases. Foram obtidas entre 8 e 17 bandas por *primer*, resultado este dentro da média de outros trabalhos citados na literatura. Observou-se que o padrão de amplificação para um mesmo *primer* se repete em PCRs posteriores, confirmando a alta reprodutibilidade da técnica em caranguejo-uçá. Concluiu-se, portanto, que marcadores ISSR são viáveis para o estudo genético-populacional de caranguejos de mangue.

**Palavras-chaves:** microssatélites ancorados, caranguejo-uçá, ISSR, marçadores moleculares.

## INTRODUÇÃO

O caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Figura 1), é uma espécie pertencente à família Ocypodidae e é amplamente distribuído no litoral da América. Sua ocorrência já foi registrada desde a Flórida (USA), até o estado de Santa Catarina (Brasil) (Costa, 1972; Melo, 1996). Sua maior abundância no litoral brasileiro é registrada entre as regiões do Amapá e Barra da Timona, na divisa dos estados do Ceará e Piauí (Costa, 1972).

Este crustáceo é muito explorado e possui expressiva importância econômica para as comunidades estuarinas, gerando milhares de empregos. O consumo do caranguejo-uçá nos Estados do Nordeste é muito intenso, chegando a 600.000 indivíduos por mês só no Estado do Ceará (Paiva *et al.*, 1971; IBAMA, 1994). Além disto, possui elevada importância no âmbito ecológico, atuando na aeração dos solos de manguezais e também na ciclagem de nutrientes (Normann & Pennings, 1998). Devido a estas características, o desenvolvimento de estratégias de conservação torna-se fundamental para a manutenção da espécie. Existem poucos trabalhos com o caranguejo-uçá, embora recentemente tenham sido publicados estudos determinando seu tamanho no início da maturidade sexual, assim como a duração da época reprodutiva que é inversamente proporcional à latitude (Pinheiro e Fiscarelli, 2001; Diele, 2000). Estudos desta natureza fornecem dados que podem ser utilizados para a conservação da espécie. Entretanto, a grande distribuição registrada para estes caranguejos pode levar ao surgimento de estoques adaptados a um determinado ambiente, que se não forem manuseados adequadamente, podem desaparecer. Assim, a ocorrência de populações geneticamente distintas pode exigir estratégias de gerenciamento mais específicas.

As análises de DNA realizadas com técnicas de marcadores moleculares têm grande utilidade para os programas de conservação da biodiversidade. Dentre as mais comumente utilizadas pode-se destacar o RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) e Marcadores de Microssatélites Ancorados, também conhecidos como ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Recentemente os ISSR vêm sendo utilizados por apresentar boa reprodutibilidade, baixo custo e revelar bom nível de polimorfismo (Salimath *et al.* 1995). Os primeiros estudos que empregaram marcadores de ISSR foram realizados recentemente, onde foi demonstrada a natureza hipervariável desses marcadores (Zietkiewicz *et al.* 1994; Gupta *et al.* 1994). Os ISSR vêm se mostrando úteis em estudos de estrutura genética de populações, relações filogeográficas e reconstrução filogenética em vários organismos (Zietkiewicz *et al.* 1994; Luque *et al.* 2001; Pharmawati *et al.* 2005; Panarari, 2006).

Assim, o presente trabalho teve como objetivos avaliar o potencial dos marcadores de microssatélites ancorados, para o estudo populacional do caranguejo-uçá. Os testes foram realizados com 18 marcadores em caranguejos do litoral sudeste e nordeste, com posterior análise da reprodutibilidade dos *primers*, polimorfismos de fragmentos, contagem e comparação das bandas obtidas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 5 caranguejos provenientes de manguezais da região sudeste e outros 7 provenientes do nordeste. As amostras de tecido para extração de DNA foram obtidas da musculatura do último pereiópodo (apêndice locomotor), de forma não letal. Logo em seguida, as mesmas foram acondicionadas em tubos individuais, contendo

etanol 100%, onde foram mantidas até os procedimentos posteriores, desenvolvidos no laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia da Embrapa Meio-Norte.

### **Extração de DNA**

Cerca de 25mg de tecido muscular foi digerido, por 4 horas, em Proteinase-K e tampão de extração (13 mL de TE 1X; 1,3 mL de Tris HCL 1M pH8; 650µL de SDS 25%). Posteriormente, o material foi processado de acordo com o método de extração PCI (Sambrook *et al.*, 1989). Moléculas de DNA de alto peso molecular foram isoladas por precipitação com etanol e visualizadas posteriormente em eletroforese com gel de agarose 0,8%.

### **Análise de ISSR**

Foram testados 18 marcadores de microssatélites ancorados, cujos *primers* foram sintetizados pela University of British Columbia, Canadá.

O DNA extraído foi submetido à PCR, sendo a reação realizada em volume final de 20µL na seguinte configuração: tampão 1X [20mM Tris HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1mM DTT; 50% (v/v) glicerol], MgCl<sub>2</sub> variando de 2 a 3,5mM (dependendo do *primer* utilizado), dNTP a 0,8 mM, 0,18 pMol de *primer*, 1U de Taq DNA polimerase e cerca de 30ng de DNA. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Techne Genius, com uma fase inicial de desnaturação a 94 °C, por 1,5 minutos, seguida de 44 ciclos nas seguintes condições: 40 segundos para desnaturação a 94 °C; 1 minuto para anelamento, com a temperatura ajustada de acordo com cada *primer*; 2 minutos para extensão a 72 °C. A extensão final foi realizada a 72 °C por 5 minutos.

Após as reações, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%, a 80V.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 18 marcadores utilizados no trabalho, seis mostraram resultados satisfatórios, com padrão de bandas consistentes (Figura 2). No geral, os *primers* funcionais amplificaram fragmentos variando entre 344 e 2036 pares de bases (Tabela 1). Nestes, foram obtidas entre 8 e 17 bandas, sendo encontradas bandas polimórficas em todos os marcadores (Tabela 1). De acordo com os resultados obtidos para estudos com outros animais (Abbot, 2001; Maltagliati *et al.*, 2006) e algumas plantas (Ajibade *et al.*, 2000; Pharmawati *et al.*, 2005; Hao *et al.*, 2006; Narayanan *et al.*, 2006), estes valores encontram-se dentro de um limite considerado satisfatório para análises de estrutura genético-populacional. Isto mostra que os resultados aqui apresentados são bastante positivos, indicando o potencial destes marcadores para pesquisas sobre a espécie em questão. Além disto, existem poucos estudos sobre a genética do caranguejo-uçá (Oliveira-Neto, 2007) e não há nenhum envolvendo a utilização de ISSR.

Diversos trabalhos vêm mostrando que a técnica de ISSR apresenta boa capacidade de detecção de polimorfismo e maior eficiência que a técnica de RAPD em diferentes organismos (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Luque *et al.*, 2001; Nkongolo *et al.*, 2005; Pharmawati *et al.*, 2005; Panarari, 2006). A técnica de ISSR se assemelha em alguns aspectos ao RAPD diferindo somente nos *primers*, que são projetados a partir de regiões de microssatélites e possuem temperaturas de anelamento superiores aos dos marcadores de RAPD (Wolfe *et al.* 1998). Isto lhes confere um nível mais acentuado de reprodutibilidade. Este fato pôde ser constatado quando o mesmo marcador foi

submetido a duas reações distintas de PCR, utilizando as mesmas configurações (Figura 3).

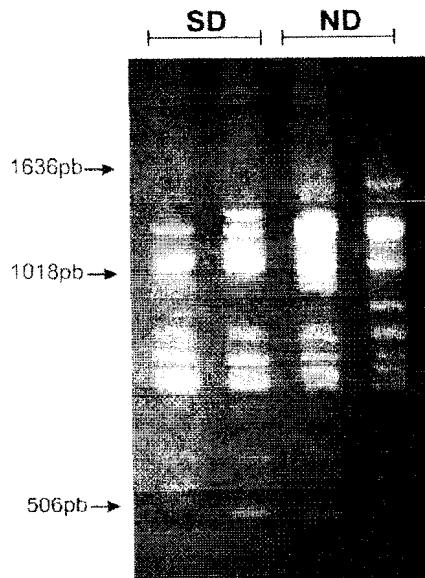
Assim, baseando-se nos trabalhos publicados, nos dados aqui obtidos, no baixo custo e rapidez da técnica, fica claro que os marcadores ISSR apresentam um ótimo potencial para o estudo genético de populações naturais como o caranguejo-uçá.

**Tabela 1.** Padrão dos fragmentos amplificados pelos seis marcadores funcionais testados.

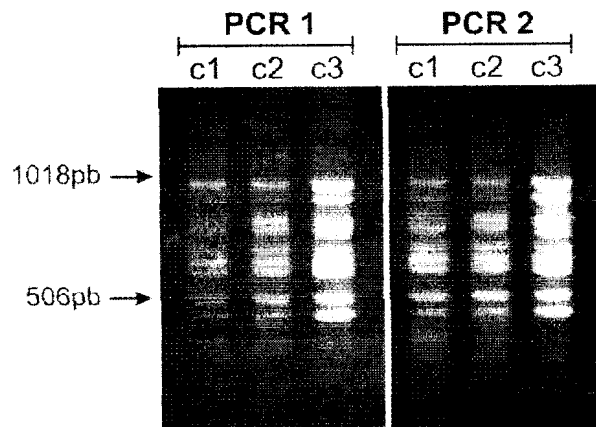
Primers	Varição no comprimento dos fragmentos (em pb)	Número de bandas	Bandas polimórficas
<i>Primer 1</i>	344 - 1018	17	6
<i>Primer 2</i>	396 - 750	11	5
<i>Primer 3</i>	344 - 1000	8	3
<i>Primer 4</i>	500 - 2036	17	4
<i>Primer 5</i>	450 - 1018	12	4
<i>Primer 6</i>	500 - 1400	14	6
<b>Total</b>		<b>79</b>	<b>28</b>
<b>Média</b>		<b>13,17</b>	<b>4,67</b>



**Figura 1.** Caranguejo-uçá (*U. cordatus*).



**Figura 2.** Gel de agarose com fragmentos de DNA (corados com brometo de etídio) amplificados com a técnica de ISSR (*primer 6*). Estão sendo mostrados dois indivíduos do litoral Sudeste (SD) e outros dois do Nordeste (ND). Note a presença de bandas polimórficas entre indivíduos da mesma região e entre regiões.



**Figura 3.** Gel de agarose mostrando os fragmentos de DNA (corados com brometo de etídio), após duas reações em cadeia da polimerase realizadas independentemente (PCR 1 e 2). As reações foram realizadas nas mesmas condições, com os mesmos indivíduos (Caranguejos c1, c2 e c3) e com o mesmo *primer*, mostrando a alta reprodutibilidade do ISSR.

## CONCLUSÃO

Pôde-se concluir que a técnica ISSR é eficiente na identificação de polimorfismos na estrutura genética de *Ucides cordatus* e, portanto, apresenta uma ótima ferramenta para estudos de genética de populações e reconstrução filogenética desta espécie.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio fornecido pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPEPI (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí) e ao Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia, da Embrapa Meio-Norte, pela infraestrutura fornecida para o desenvolvimento deste projeto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbot, P., 2001. Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). **Journal of Insect Sciences**, 1(8): 1-3.
- Ajibade, S.R.; Weeden N.F.; Chite. S.M., 1999. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. **Euphytica** 111: 47-55
- Costa, R.S. 1972. **Fisioecologia do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) – Crustáceo, Decápode do Nordeste brasileiro**. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e Instituto do Biologia Marinha, São Paulo, 121p,
- Diele, K. 2000. Life history and population structure of exploited mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda: Brachyura) in the Caeté estuary, North Brazil. **Boletim Cearense de Agronomia** 20: 1-74.
- Gupta, M.; Chyi Y-S.; Romero-Severson J.; Owen JL. 1994 Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single *primers* of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics** 89, 998-1006.
- Hao, B.; Li, W.; Linchun, M.; Li, Y.; Rui, Z.; Mingxia, T.; Weikai, B. 2006. A study of conservation genticis in *Cupressus chengiana*, an endangered endemic of China, using ISSR markers. **Biochemical Genetics**, 44(1/2): 31-45
- IBAMA, 1994. **Lagosta, Caranguejo-Uçá e Camarão-do-Nordeste. Coleção Meio Ambiente**. Série Estudos – Pesca, v. 10, IBAMA/Brasília. 190 pp.
- Luque C.; Legal L.; Staudter H.; Gers C.; Wink M., 2001. Brief report ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in *Noctuids* (Lepidoptera). **Hereditas** 136: 251-253.
- Maltagliati, F.; Lai, T.; Casu, M.; Valdesalici, S.; Castelli, A. 2006. Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSR). **Biochemical Systematics and Ecology**, 34: 626-634.
- Melo, G. A. S. 1996. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. São Paulo, Plêiade/FAPESP. 604p.
- Narayanan, C.; Dubey, S.; Wali, S.A.; Shukla, N.; Kumar, R.; Mandal, A.K.; Ansari, S.A. 2006. Optimization of DNA extraction for ISSR studies in *Tectona grandis* L.f.

- an important forest tree species. **African Journal of Biotechnology**, 5(13): 1220-1223.
- Nkongolo, K.K.; Michael, P.; Demers, T. 2005. Application of ISSR, RAPD, and cytological markers to the certification of *Picea mariana*, *P. glauca*, and *P. engelmannii* trees, and their putative hybrids. **National Research Council**, 48: 302-311.
- Normann, B.E.; Pennings, S.C. 1998. Fiddler crab – vegetation interactions in hypersaline habitats. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 225: 53-68.
- Oliveira-Neto, J.F.; Boeger, W.A.; Pie, M.R.; Ostrensky, A. Hungria, D.B. 2007. Genetic structure of populations of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) at local and regional scales. **Hydrobiologia**, no prelo.
- Paiva, M.P.; Bezerra, R.C.F.; Fonteles-Filho, A. A. 1971. Tentativa de avaliação dos recursos pesqueiros do nordeste Brasileiro. **Arquivos de Ciências do Mar**. 11:1-43.
- Panarari, R.S. 2006. **Variabilidade Genética, Evidenciada por Marcadores Nucleares e do Genoma Mitocondrial, de Espécies do Gênero Brycon (Characiformes: Characidae) de Três Bacias Hidrográficas**. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 79pp.
- Pharmawati, G.Y.; Patrick, M.F. 2005. Molecular Variation and Fingerprinting of *Leucadendron* Cultivars (Proteaceae) By ISSR Markers. **Annals of Botany** 95: 1163–1170.
- Pinheiro, M.A.A.; Fiscarelli, A. G. 2001. **Manual de apoio à fiscalização do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*)**. 1.ed. Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros do Litoral Sudeste e Sul do Brasil/IBAMA, Itajaí, Brasil, 43 pp.
- Salimath, S.S., A.C. de Oliveira, I.D. Godwin; J.L. Bennetzen. 1995. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. **Genome** 38: 757-763.
- Sambrook J., Fritsch E.F.; Maniatis T. 1989. **Molecular cloning**. A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Wolfe, A.D., Xiang, Q-Y.; Kephart, S.R. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. **Molecular Ecology** 7, 1107-1125.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski; D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20: 176-183.