



# VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES DE *LEPTODACTYLUS LATRANS* (STEFFEN, 1815) DO RIO GRANDE DO SUL.

LEANDRO R. BORGES

Cansian, R. L., STIVANIN, Maieri, Marinho, J. R., Mossi, A. J.

BORGES, R.L. Universidade Regional Integrada Campus de Erechim. Av. Sete de Setembro, 1621, Erechim, 99700 - 000 RS. leandrogonie@hotmail.com,

CANSIAN, R.L. Universidade Regional Integrada Campus de Erechim. Av. Sete de Setembro, 1621, Erechim, 99700 - 000 RS, cansian@uri.com.br

STIVANIN, M. Universidade de Passo Fundo - UPF, Instituto de Ciências Biológicas, Passo Fundo RS. mstiva1@yahoo.com.br

JORGE REPPOLD MARINHO. Universidade Regional Integrada Campus de Erechim. Av. Sete de Setembro, 1621, Erechim, 99700 - 000 RS, jreppold@uricer.edu.br

MOSSI, A.J. Universidade Federal Fronteira Sul. Av. Getúlio Vargas, 609 - 2 andar Chapecó, 89812 - 000. SC. amos-siuffs@gmail.com

## INTRODUÇÃO

As populações de anfíbios foram o foco de numerosos estudos que contribuíram à compreensão geral de fenômenos ecológicos e evolucionários (Newman 1992; Wilbur, 1997; Mcdiarmid e Altig, 1999; Funk *et al.*, 2005).

*Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815), possui ampla distribuição na América do Sul (Loebmann, 2005). Populações padrão, em virtude do quase isolamento e tamanho pequeno, são objeto de extinção por fatores demográficos e habitats efêmeros. Esta afirmativa remete ao modelo de metapopulações onde, subpopulações interconectadas que diferem em tamanho, são objeto de diferentes graus de migração e fluxo gênico, adaptação local, flutuação e persistência temporal (Hanski e Gilpin 1991).

Uma das metodologias mais utilizadas para o estudo de populações é o uso de marcadores, podendo eles ser: morfológicos ou moleculares, sendo os moleculares mais utilizados atualmente. Suas principais características são: o padrão simples e inequívoco de herança, fenótipos identificados com grande exatidão e frequência relativamente alta de cada um dos alelos que lhe são pertinentes. Assim, permitem a identificação e inferências de parentesco, distância genética relativa,

fundadores de novas populações, indivíduos não identificados, estrutura das populações e tamanho populacional efetivo (Sole - Cava, 2001).

## OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo analisar a variabilidade genética entre diferentes populações de *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815) do Rio Grande do Sul.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados quatro indivíduos, de cada população nos municípios de Ijuí, Santana do Livramento, Santa Vitória do Palmar e Torres. As coletas foram realizadas manualmente no período noturno e para a identificação dos mesmos foi utilizado o guia: *Os anfíbios da Região Costeira do Extremo Sul do Brasil* (Loebmann, 2005). O material está depositado na Coleção do Museu Regional do Alto Uruguai (MuRAU) da Universidade Regional Integrada Campus de Erechim.

O material genético foi extraído do tecido animal seguindo o protocolo descrito em Marinho (2003), usando 20 mg de tecido e adicionando 550  $\mu$ l de tampão de lise (156 ml H<sub>2</sub>O destilada; 10 ml Tris HCl 1M, pH 8,0; 0,4

ml EDTA 0,5, pH 8,0; 20 ml SDS 10%; 8ml NaCl 5M; 2 ml - mercapthanol) e 11  $\mu$ l de proteinase K. A mistura foi agitada em vórtex e incubada por 30 minutos a 55°C. Foi adicionado 350  $\mu$ l de NaCl 5M agitado no vórtex e centrifugado por 30 minutos a 13000rpm. 450  $\mu$ l do sobrenadante, que contém o DNA, foi transferido para um novo tubo. Adicionado 1ml de etanol absoluto gelado e para completa precipitação, incubado a - 20°C durante 2 horas. Após foi centrifugado por 30 minutos a 13000rpm, descartado o conteúdo do sobrenadante deramando o conteúdo dos tubos, lavado o pellet com 1ml de etanol 70% centrifugado a 6000rpm por 5 minutos e removido o sobrenadante da forma descrita acima. Foi adicionado 100  $\mu$ l de 1X TE(pH8,0; 98,8 ml H<sub>2</sub>O destilada; 1 ml Tris HCl 1M, pH 8,0; 0,2 ml EDTA 0,5M, pH 8,0), incubado a 37 °C para suspender o pellet e estocado 4°C.

Para amplificação de RAPD foi utilizada a reação descrita por Levi (1993), com algumas modificações: Tampão de reação (50 mM Tris - HCl pH 9,0; 50 mM KCl; 0,5% Triton - X 100), dNTPs (200mM de cada), 0,2 mM de primer, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 80ng de DNA e 1,5 U de Taq DNA polimerase. A seleção de primers revelou que OPA 07, OPB 15, OPF 17, OPH11, OPH 12, OPH 16, OPH 17, OPW 02, OPW 07, OPW 09, OPW 11, OPY 03, OPY 06, OPY 09 e OPY 16. (Operon Technologies) estão entre os que melhor amplificaram as amostras analisadas, avaliando a quantidade de bandas produzidas, a intensidade destas, a sua repetibilidade para visualizar a diferenciação genética entre os indivíduos. A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research INC. O processo de amplificação seguiu o seguinte procedimento: 3 min a 92°C, 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C. Após, 3 min a 72°C e resfriamento a 4°C até a retirada das amostras. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,4% em tampão TBE (trisma, ácido bórico e EDTA) em cuba de eletroforese horizontal. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA de fago Lambda clivado com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI. A visualização dos fragmentos foi realizada com brometo de etídio e a observação feita sob luz ultravioleta.

## RESULTADOS

O número total de bandas obtidas (126) e a quantidade de bandas polimórficas (92) mostrou um alto polimorfismo entre os indivíduos analisados com média superior a 73,1%.

A análise dos géis permitiu a formação de uma matriz binária, onde 0 corresponde a ausência da banda e 1

corresponde a presença da banda. Esta matriz com as diferentes bandas dos primers analisados até o momento permitiu a construção do dendrograma pela análise de agrupamentos, utilizando - se o coeficiente de Jaccard, com auxílio do programa Past. A análise do dendrograma mostra que a similaridade entre os diferentes acessos varia entre 0,50 e 0,86. Houve a tendência de agrupamento dos indivíduos das populações de Ijuí, Santana do Livramento, Santa Vitória do Palmar e Torres classificados satisfatoriamente dentro de sua população de origem.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que todos os indivíduos foram classificados geneticamente dentro de suas populações de origem, indicando maior similaridade intraespecífica. A comparação entre as populações evidenciou um padrão de agrupamento para as populações do centro - oeste do estado, ficando a população de Torres, na planície costeira, isolada das demais. Os padrões de agrupamento obtidos estão relacionados às variações geográficas regionais de topografia e geomorfologia.

## REFERÊNCIAS

- Funk W. C., Greene A.E., Corn, P. S., Allendor F. W. High dispersal in a frog species suggests that it is vulnerable to habitat fragmentation. *Biol Lett* 1 - 4. 2005.
- Hanski, I. e Gilpin, M. Metapopulations dynamics: brief history and conceptual domain. *Biological Journal of the Linnean Society*, 42, 3 - 16. 1991
- Marinho, J.R. *Estudo da Comunidade e do Fluxo Gênico de Roedores Silvestre em um Gradiente Altitudinal de Mata Atlântica na Área de Influência da RST - 453/RS=486 Rota do Sol*. Tese de Doutorado. Porto Alegre, RS:UFRGS, 2003.
- Loebmann, D. *Os anfíbios da Região Costeira do Extremo Sul do Brasil: Guia Ilustrado*. Pelotas: USEB. 2005.
- Mediar mind, R. W., Alting, R. *Tadpoles: The biology of Anuran Larvae*. University of Chicago Press, Chicago. 1999.
- Newmann, R.A. Adaptive plasticity in amphibians metamorphosis. *Bioscience* 42: 671 - 678. 1992.
- Solé - Cava. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In Matioli SR (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto. 2001.
- Wilbur, H. M. Experimental ecology of food webs complex systems in temporary ponds. *Ecology*. 78: 2279 - 2302. 1997.