



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 2 • número 3 • p 6-20

“Impressões digitais moleculares” – um caso de estudo com populações naturais de zooplâncton

Os dafnídeos pertencem ao zooplâncton de água doce e são organismos-modelo importantes em diversas áreas como limnologia, ecotoxicologia, genética ecológica e, recentemente, em genómica. Contudo, as suas relações filogenéticas e a sua taxonomia são ainda bastante controversas, sendo a identificação destes organismos dificultada pela elevada plasticidade fenotípica que apresentam e a existência de fluxo de genes entre espécies, via hibridação e retrocruzamentos. Adicionalmente, os dafnídeos alternam entre reprodução sexuada e assexuada, pelo que coexistem várias linhagens clonais dentro da mesma população. Assim, tem crescido a necessidade da utilização de ferramentas moleculares que permitam explorar a arquitectura genética das populações naturais destes invertebrados. Neste trabalho, a técnica de MSP-PCR (*microsatellite-primed polymerase chain reaction*), utilizada com sucesso na diferenciação de outros organismos, foi aplicada a três populações de *Simocephalus vetulus* com o objectivo de analisar a sua variação genética. O objectivo último consistia na obtenção de perfis moleculares (“impressões digitais”) que permitissem distinguir indivíduos geneticamente distintos. Os resultados obtidos demonstraram a utilidade desta técnica na diferenciação de populações e de linhagens clonais cultivadas em laboratório, revelando contudo uma grande variabilidade associada à técnica e a necessidade de optimização da mesma.

Palavras-chave

Simocephalus vetulus
ferramentas moleculares
genética populacional
variabilidade genética
“impressões digitais moleculares”

Maria Teresa Claro •

Bruno B Castro

Artur Alves

António Correia

Cláudia Loureiro

Fernando Gonçalves

CESAM - Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro.

• mtclaro@gmail.com

ISSN 1647-323X

INTRODUÇÃO

Os organismos da família Daphniidae¹, principalmente os pertencentes ao género *Daphnia*, são o maior componente da comunidade zooplancónica de água doce em todo o mundo (Hebert, 1978b). Pelo facto de apresentarem uma distribuição geográfica ubíqua, representarem espécies chave em cadeias tróficas e ocorrerem em todos os *habitats* de água doce, os dafnídeos tornaram-se organismos-modelo importantes em ecotoxicologia, genética ecológica e genómica (Benzie, 2005; Brede et al., 2006; Castro, 2007; Pereira, 2008). Estes microcrustáceos são relativamente fáceis de manter em laboratório e representam animais experimentais ideais devido ao seu modo principal de reprodução (partenogénese cíclica²) (Brede et al., 2006). O seu ciclo de vida extremamente rápido e a possibilidade de isolar linhagens geneticamente distintas durante várias gerações permitem aos investigadores conduzir experiências e testar hipóteses em ecologia e biologia evolutiva, que seriam logisticamente impossíveis de explorar em organismos mais complexos.

Regra geral, estes organismos alternam entre dois tipos de reprodução: assexuada (partenogénese, ver acima) e sexuada (Hebert, 1978a). Na reprodução sexuada, as fêmeas produzem ovos sexuados que são fertilizados pelo esperma dos machos, dando origem a um ou dois ovos de resistência por fêmea (De Meester et al., 2006). Aquando da ecdise (muda), a mãe liberta esses ovos envoltos por uma estrutura protectora (*ephippium*³). As *ephippia* são resistentes à dessecação, enzimas digestivas, e congelamento, sendo cruciais para assegurar a sobrevivência das populações residentes. Normalmente estes ovos entram em diapausa⁴, mas alguns desenvolvem-se imediatamente, dando origem a novas fêmeas (Hebert, 1978a). Durante a diapausa, estas estruturas de resistência podem afundar, flutuar ou serem transportadas pelo vento para outras zonas do lago, ou sofrerem transporte passivo nas penas, pêlos e estômagos de vertebrados. Este transporte passivo assegura o fluxo de genes entre populações com um grau de isolamento elevado, como é o caso da maioria dos sistemas lênticos (charcos, lagos e albufeiras). Quando as condições são favoráveis, nomeadamente no final do Inverno (com o aumento da temperatura e da duração do dia), dá-se a eclosão das *ephippia* a partir do banco de ovos viáveis existente no fundo dos lagos e albufeiras. Este reservatório de ovos representa um capital genético importante, já que incorpora ovos de resistência produzidos em anos e períodos distintos (Hairston, 1996). Cada ovo de resistência que eclode origina um indivíduo (fêmea) geneticamente único (i.e. uma nova linhagem clonal), uma vez que resulta de reprodução sexuada (Schwartz e Hebert, 1987; De Meester et al., 2006). A ocorrência de gerações formadas por reprodução sexuada e assexuada tem consequências para a sustentação da diversidade genética e para a estrutura genética da população (De Meester et al., 2006).

Os ovos de resistência de *Daphnia* têm tido especial importância, sendo utilizados com sucesso na reconstrução das alterações ocorridas na composição de populações deste género durante períodos de tempo evolutivamente relevantes (Hairston et al., 1999). No início da fase de crescimento de uma população (quando estas são restabelecidas a partir do banco de ovos de resistência), é expectável uma elevada

¹ Família de crustáceos da ordem Cladocera, normalmente designados de “pulgas de água”; este grupo de organismos tipicamente possui uma carapaça cuticular bivalve que envolve o corpo mas não a cabeça, e utilizam o seu 2º par de antenas como principal órgão de locomoção.

² Produção de um organismo a partir de um ovo não fertilizado (reprodução assexuada), em que uma fêmea origina descendência constituída apenas por fêmeas sem contribuição genética de um macho.

³ Estrutura composta pelos ovos de resistência envoltos em várias membranas protectoras.

⁴ Período de dormência no ciclo de vida de um organismo.

diversidade genética; contudo existem diferentes factores que podem produzir um forte impacto na estrutura genética da população, como por exemplo a dominância da reprodução partenogenética na fase subsequente (que causa um decréscimo na diversidade clonal) e a introgressão⁵ (que contribui para a variação genética dentro das populações) (De Meester et al., 2006; Hembre e Megard, 2006). Este fluxo de genes, via hibridação e retrocruzamentos, aliado à plasticidade fenotípica⁶ característica dos dafnídeos, torna especialmente difícil a sua identificação, levando a que as suas relações filogenéticas e a sua taxonomia sejam ainda bastante controversas (Schwenk et al., 2000; Billiones et al., 2004; Benzie, 2005; Petrussek et al., 2008).

Durante a última década, os marcadores moleculares têm proporcionado uma nova base para delimitar espécies e analisar linhagens crípticas⁷, o que tem levado a um progresso significativo na compreensão da diversidade dos cladóceros (Forró et al., 2008). Dentre os cladóceros, os estudos genéticos em *Daphnia* têm sido alvo de grande atenção, apoiando-se em diferentes técnicas, tais como alozimas (Giessler, 1997; Ringelberg et al., 2004), RAPD (Schwenk et al., 2001; Picado et al., 2007), RFLP (Reid et al., 2000; Billiones et al., 2004; Skage et al., 2007), sequenciação de genes mitocondriais (Schwenk et al., 2000; Thielsch et al., 2009), AFLP (Gili et al., 2004), e análise de microsatélites (Thielsch et al., 2009). Estes últimos (microsatélites) assumiram-se nos últimos anos como os marcadores por excelência em estudos de dinâmica populacional e na análise de interações genótipo-ambiente (Conner e Hartl, 2004). Os microsatélites são regiões do genoma compostas por um número variável de nucleótidos⁸ repetidos (VNTRs – *variable number tandem repeats*), existindo uma grande variação do número de unidades repetidas entre indivíduos (Griffiths et al., 1999; Conner e Hartl, 2004). Estas regiões, que são componentes ubíquas de genomas eucarióticos, servem de base à técnica de MSP-PCR⁹ (*microsatellite-primed polymerase chain reaction*), ou MS-PCR, ou ISSR (*inter simple sequence repeats*). Esta apresenta-se como uma técnica simples, onde os *primers*¹⁰ utilizados imitam as regiões referidas (microsatélites), não sendo por isso necessário identificar *a priori* sequências específicas do genoma (Cristescu et al., 2006). Cada produto resultante da amplificação vai derivar de uma região do genoma entre duas destas sequências repetitivas, desde que estas sejam suficientemente próximas para que a amplificação⁸ resulte. Estes produtos são separados em géis de agarose submetidos a uma corrente eléctrica, e, na presença de brometo de etídio, são visualizados sob luz ultravioleta (Karp e Edwards, 1997). A amplificação gera assim padrões de bandas individuais únicos para cada organismo, funcionando como se fossem “impressões digitais” (*fingerprints*) de cada um (Alves et al., 2007).

Esta técnica tem demonstrado ser relativamente robusta e discriminatória noutras espécies (Hering e Nirenberg, 1995; Hantula e Muller, 1997; Bornet e Branchard, 2001; Alves et al., 2007). Diversos autores

⁵ Fluxo de genes entre espécies via cruzamentos híbridos (cruzamento genético entre duas espécies diferentes) e retrocruzamentos (cruzamento genético entre híbrido e espécie parental).

⁶ Capacidade de um organismo de alterar os seus caracteres fenotípicos, como a morfologia ou o comportamento.

⁷ Linhagens de indivíduos morfologicamente idênticos entre si, mas reprodutivamente isolados.

⁸ Componentes estruturais do ADN e ARN que constituem a unidade básica da sequência genética, aos quais se atribuem letras (adenina – A, guanina – G, citosina – C, timina – T, uracilo – U).

⁹ PCR (*polymerase chain reaction*) é um método de amplificação (criação de múltiplas cópias) de ADN, no qual as duas cadeias de ADN se separam (fase de desnaturação), ligando-se a elas os *primers* (ver nota de rodapé seguinte) para a região do genoma em estudo (fase de annealing), os quais iniciam a síntese de uma nova cadeia de ADN a partir de nucleótidos⁹ fornecidos na reacção (fase de extensão). Esta reacção é catalisada pela enzima DNA polimerase.

¹⁰ Segmentos de ácidos nucleicos complementares com a sequência de ADN em estudo, onde a enzima DNA polimerase se vai ligar.

observaram uma eficácia alta desta técnica na detecção de variabilidade genética em outros invertebrados (que não dafnídeos), demonstrando as potencialidades do seu emprego na análise da variação entre espécies, populações, e indivíduos (Reddy et al., 1999; Abbot, 2001; Grasela e McIntosh, 2003; Schulz et al., 2004; Lin et al., 2006; Vijayan et al., 2006).

O objectivo deste trabalho consistiu na aplicação da técnica de MSP-PCR a diferentes populações de um dafnídeo pouco estudado do ponto de vista molecular (*Simocephalus vetulus*), e na análise da reprodutibilidade e capacidade desta ferramenta molecular na diferenciação genética de indivíduos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e manutenção dos organismos

A colheita dos organismos (*Simocephalus vetulus*) foi efectuada por arrasto oblíquo na coluna de água com rede de plâncton (malha variável – 55 a 243 µm) em três locais diferentes: Lagoa de Melides (M), Lagoa de Mira (LM) e Vala da Fervença (VF). Estes três locais representam três populações distintas e, à partida, geneticamente isoladas, apesar de não ser possível descartar algum grau de conectividade entre LM e VF.

No laboratório, as fêmeas ovígeras (contendo ovos assexuados) foram isoladas e individualizadas em frascos de vidro contendo 100 ml de meio de cultura (água reconstituída, moderadamente dura - ver abaixo). Aquando da libertação dos juvenis pela fêmea, foi dado início a culturas de grupo independentes contendo esses juvenis fundadores (já nascidos em laboratório), evitando qualquer mistura de indivíduos de diferentes mães no mesmo frasco. A descendência de cada fêmea original foi manipulada como se tratasse de uma linhagem clonal independente, à qual foi dado um código único, consoante o local de origem (ex: LM1, LM2, VF1, VF2, M1, M2...). Uma vez estabelecida a cultura de grupo fundadora (geração 0), as fêmeas originais foram descartadas. Esta geração reproduziu-se assexuadamente, tendo sido aproveitada cada 3ª ninhada para renovar ciclicamente as gerações. As culturas dos diversos clones foram mantidas em laboratório segundo condições padronizadas, que abaixo se descrevem.



FIGURA 1: Alguns requisitos para o cultivo de *Simocephalus vetulus*: A) cultura de micro-alga verde (alimento para *S. vetulus*); B) frascos de cultura de *S. vetulus* em sala com temperatura e fotoperíodo controlados; C) carregamento dos produtos de PCR de cada indivíduo num gel de agarose.

Para a manutenção das culturas foi usado um meio de cultura sintético (água reconstituída), moderadamente duro (EPA, 2002), que foi aditivado com um suplemento vitamínico, seguindo a receita de Elendt e Bias (1990). Foi igualmente adicionado ao meio de cultura um aditivo orgânico constituído por um

extracto da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (Baird et al., 1989; ver Antunes, 2001). O alimento utilizado na dieta dos indivíduos foi a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*, cultivada em sistema de crescimento contínuo em laboratório (ver Antunes, 2001) (Figura 1A). A renovação do meio de cultura foi feita de 2 em 2 dias, através da transferência dos organismos para recipientes contendo meio de cultura, alimento e extracto frescos. As culturas foram armazenadas em câmaras climáticas com temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e sujeitas a um fotoperíodo de 16 h^{LUZ}:8 h^{ESCURO} (Figura 1B).

Extracção e amplificação de ADN

O método utilizado para a extracção de ADN foi descrito por Schwenk et al. (1998), tendo sofrido pequenas adaptações ao longo do tempo (ver Schwenk et al. (2004) e Brede et al. (2006)). Sucintamente, os indivíduos preservados em etanol foram transferidos para uma solução de lavagem (500 µl de tampão TE¹¹) à temperatura ambiente durante pelo menos 2 h de forma a remover o excesso de etanol, o qual poderia comprometer a extracção de ADN. Após a incubação, cada indivíduo foi transferido para um tubo de reacção contendo 72 µl de uma mistura de tampão H3 e 20 µg de Proteinase K¹², e incubado a 40°C durante pelo menos 6h. De forma a maximizar o processo de extracção, foi adicionado um passo de maceração prévia de cada organismo no tampão de extracção. Após a incubação, foi realizada uma centrifugação a 14000 rpm (rotações por minuto) durante alguns segundos. Para desactivar a Proteinase K, as amostras foram sujeitas a um aquecimento a 90°C durante 12 min. Após uma segunda centrifugação rápida a 14000 rpm, as amostras foram armazenadas a 4°C ou congeladas (conforme a rapidez das análises subsequentes) de modo a manter a integridade do ADN.

Cada reacção de MSP-PCR foi realizada num volume total de 24 µl contendo 2,0 mM MgCl₂, 1X Tampão de PCR, 0,2 mM de dNTP, 0,3 µM de *primer* e 1 unidade de *Taq* ADN polimerase (Go *Taq* Flexi DNA polymerase, PROMEGA). Os parâmetros do termociclador utilizados para a amplificação foram: um período inicial de desnaturação a 95°C durante 120 s; 35 ciclos de 94°C durante 45 s, 50-57°C durante 45 s (a temperatura de *annealing*¹³ foi ajustada conforme o *primer* utilizado em cada amplificação) e 72°C durante 90 s; a amplificação foi terminada com um passo de extensão final a 72°C durante 10 min. Os *primers* utilizados para a discriminação dos genótipos foram escolhidos após a realização de testes preliminares das condições de PCR e reprodutibilidade de vários *primers*: os *primers* (GTG)₅ e (GACA)₄ necessitaram de uma temperatura de *annealing* de 50°C, enquanto que os *primers* (CAG)₆ e (ACC)₆ amplificaram a 57°C.

Os produtos de PCR (ADN amplificado) foram visualizados num gel de agarose a 2 %, após separação por electroforese (80 V) e imersão do gel em brometo de etídio (o qual se liga especificamente ao ADN e é visível sob luz UV) (Figura 1C). Foi utilizado um marcador de peso molecular comercial de 100 bp¹⁴ (100-1500 bp; Vivantis). As imagens (fotografias dos géis) foram capturadas e digitalizadas com um aparelho de aquisição de imagem G:BOX HR (SynGene, USA), usando o software GeneSnap (SynGene®, USA).

¹¹ 10 mM Tris + 1 mM EDTA, pH 8,0 a 25°C

¹² Enzima utilizada para inactivar as nucleases (enzimas capazes de quebrar as ligações entre nucleótidos, afectando a integridade do ADN da amostra) presentes nas amostras

¹³ Ligação por complementaridade dos *primers* à cadeia de ADN; a temperatura neste passo da técnica de PCR representa um passo vital (e que por isso requer afinção prévia) no sucesso e qualidade da amplificação.

¹⁴ *Base pair* (em português, pares de bases), consiste em dois nucleótidos opostos e complementares da cadeia de ADN ligados entre si por ligações de hidrogénio. Os pares de bases são utilizados frequentemente como medida para o tamanho de um fragmento de ADN.

A análise da variabilidade genética entre indivíduos realizou-se através da comparação dos padrões de bandas obtidos. Estes padrões foram convertidos numa matriz binária (1 = presença de banda; 0 = ausência de banda). A partir desta matriz inicial, foram construídas matrizes de similaridade usando o coeficiente de Jaccard¹⁵ (Culley, 2005), o que possibilitou a aplicação de uma análise de classificação donde resultaram dendrogramas que reflectem a arquitectura genética das populações amostradas. Os dendrogramas foram construídos utilizando o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*). Todas as análises foram realizadas por computador através do programa GelCompar II (Applied Maths).

Experiência 1 – Reprodutibilidade da técnica de MSP-PCR

Foi realizada a extracção de ADN em 9 indivíduos da população da Lagoa de Melides (M), abrangendo 3 linhagens clonais hipotéticas (M13, M51 e M67). Cada linhagem clonal era representada por 3 organismos diferentes (mas geneticamente iguais). Para cada organismo, foram realizadas 2 amplificações (usando reagentes diferentes) com cada um dos *primers* acima indicados. Deste modo, foi possível avaliar a reprodutibilidade da técnica entre diferentes amplificações de ADN dos mesmos indivíduos, assim como entre amplificações de indivíduos diferentes com o mesmo genótipo (clones). Esta experiência teve como objectivo estabelecer as bases para futuras aplicações da técnica de MSP-PCR enquanto ferramenta de genotipagem, permitindo avaliar o nível de variabilidade intrínseco da técnica propriamente dita.

Experiência 2 – Arquitectura genética de populações de laboratório

Foi realizada a extracção de ADN a 18 indivíduos (de 18 linhagens clonais hipotéticas) de cada uma das populações (M, LM e VF), de modo a testar a aplicabilidade da técnica e a sua capacidade para reconstruir a arquitectura genética inter- e intra-populações. Para cada organismo, foram realizadas 2 amplificações (usando reagentes diferentes) com cada *primer*, com o intuito de minimizar a incerteza no poder discriminatório desta ferramenta. Nesta experiência, foram apenas utilizados os *primers* (GTG)₅, (CAG)₆ e (ACC)₆, na medida em que o *primer* (GACA)₄ revelou ser pouco fiável e pouco informativo para esta espécie de dafnídeo (Experiência 1).

RESULTADOS

Na Experiência 1, as amplificações de cada indivíduo da espécie *Simocephalus vetulus* da Lagoa de Melides (M), realizadas em duplicado com diferentes reagentes (aqui referidas como PCR 1 e PCR 2), revelaram padrões de bandas (*fingerprints*) complexos. Após separação por electroforese dos fragmentos amplificados com os *primers* (ACC)₆, (CAG)₆, (GTG)₅ e (GACA)₄, surgiram bandas entre os 400 bp e os 1500 bp (Figura 2). Analisando os padrões de bandas obtidos na primeira e segunda amplificação (PCR 1 e PCR 2), foi possível observar que determinadas bandas não foram reprodutíveis entre amplificações. Por exemplo, os fragmentos com ≈700 bp do genótipo M51, amplificados com os *primer* (GACA)₄, surgiram apenas na primeira amplificação – PCR 1 (assinalado com uma seta, Figura 2). Do mesmo modo, pudemos observar a existência de bandas reprodutíveis e não reprodutíveis entre indivíduos do mesmo clone. Por exemplo, nas amplificações de ADN dos clones com o genótipo M13, utilizando o *primer* (GTG)₅, é possível

¹⁵ Coeficiente de Jaccard: $a/(a+b+c)$, em que “a” corresponde ao número de bandas presentes comuns a ambos os indivíduos (X e Y), “b” corresponde ao número de bandas exclusivas do indivíduo Y e “c” ao número de bandas exclusivas do indivíduo X.

observar o aparecimento de uma banda de ≈ 800 bp nos indivíduos 1, 2 e 3 na primeira amplificação (PCR 1) e apenas nos indivíduos 1 e 3 na segunda amplificação (PCR 2) (Figura 2).

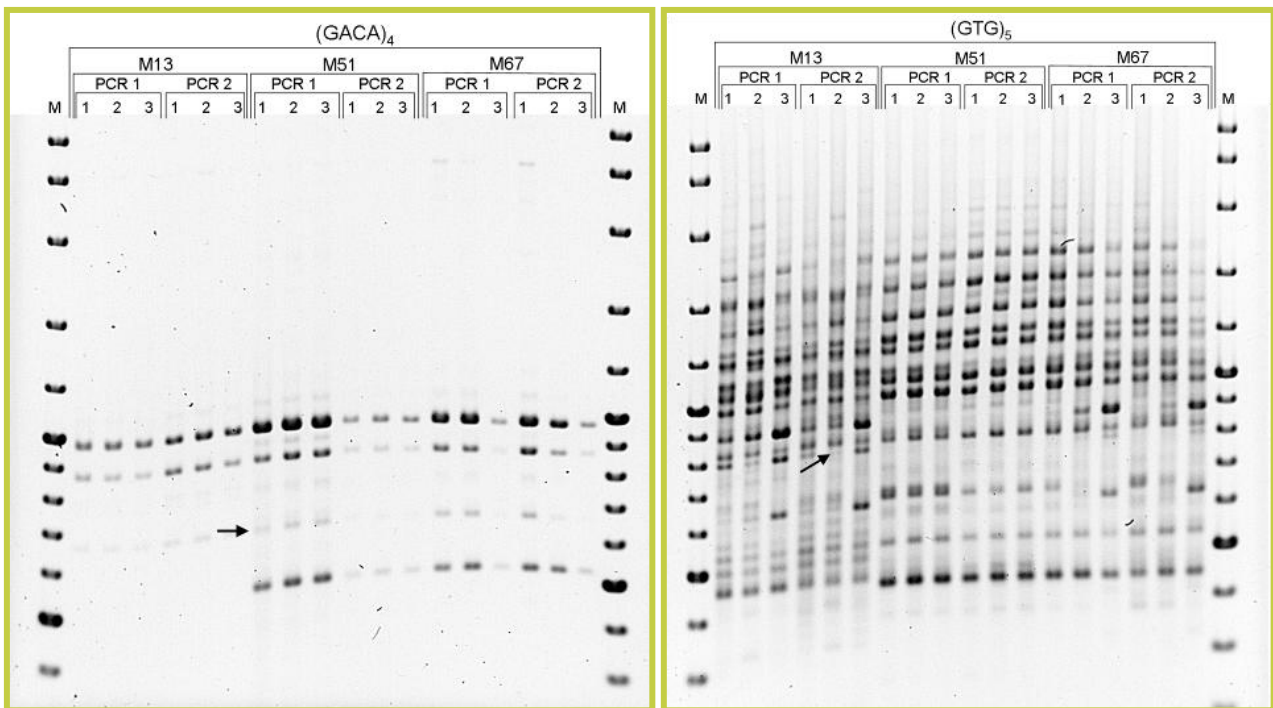


FIGURA 2: Padrão de bandas de amostras amplificadas com os *primers* $(GACA)_4$ e $(GTG)_5$. Como referência dos tamanhos dos fragmentos, é apresentado um marcador de peso molecular (M – bandas intervaladas em 100 bp, começando em 1500 bp). Estão representados grupos de três indivíduos (1, 2 e 3) de três linhagens clonais hipoteticamente distintas (M13, M51 e M67), tendo as amplificações sido feitas em duplicado (PCR 1 e PCR 2).

A partir dos padrões de *fingerprinting*¹⁶, foi construído um dendrograma para os 3 genótipos da Lagoa de Melides (M13, M51 e M67), utilizando os padrões gerados pelos quatro *primers* em duas amplificações (as segundas amplificações distinguem-se das primeiras pelo símbolo (') no código da amostra). Na análise do dendrograma, foi possível distinguir dois grupos principais (divergindo em cerca de 60%), correspondendo um aos indivíduos com o genótipo M13 e outro aos indivíduos com os genótipos M51 e M67 (Figura 3A). Estes dois genótipos separaram-se posteriormente em dois grupos independentes (divergindo em cerca de 40%). Contudo, ao nível de similaridade a que foi possível discriminar as linhagens clonais M51 e M67, os indivíduos com o genótipo M13 foram divididos em dois grupos; estes correspondem às duas amplificações realizadas com estas amostras, o que demonstra como esta técnica se encontra sujeita a grande variabilidade entre reacções. Subindo o grau de similaridade, foi possível observar que o mesmo ocorreu com os indivíduos do genótipo M51 (i.e. inconsistência entre amplificações). Nos indivíduos M67 observou-se a prevalência de variabilidade entre indivíduos sobre a variabilidade entre amplificações, o que levou à separação do indivíduo 3 num grupo diferente dos outros 2 indivíduos da mesma linhagem, de forma consistente entre amplificações (Figura 3A).

De modo a ultrapassar a variabilidade existente entre amplificações, foi construído um dendrograma a partir somente das bandas presentes em ambas as amplificações, excluindo assim da análise todas as bandas

¹⁶ Padrões de bandas exclusivos de cada genótipo, funcionando como “impressões digitais moleculares” únicas.

que não apareceram de forma consistente em ambos os duplicados (Figura 3B). À semelhança do dendrograma anterior, formaram-se inicialmente dois grupos (divergindo em cerca de 50%), os quais distinguem inequivocamente o genótipo M13 dos genótipos M51 e M67. A um nível de similaridade de 60% - 70%, já é possível observar três grupos, correspondendo aos 3 genótipos hipotéticos estudados. Contudo, apesar dos marcadores utilizados terem conseguido discriminar com sucesso os 3 genótipos em estudo, ficou ainda evidente a variabilidade da técnica entre indivíduos (mais notória em M67; Figura 3B). Esta variabilidade está associada à quantidade e qualidade do ADN extraído de cada exemplar e terá de ser tida em conta no futuro, ajustando o nível de corte. No caso de *S. vetulus*, e para este conjunto de *primers* em particular, sob as condições experimentais descritas, o nível de corte de 70% de similaridade parece adequado para a discriminação de genótipos, desde que se tenha o cuidado de minimizar a variação entre ampliações (contabilizando apenas as bandas amplificadas de forma consistente). Deste modo, indivíduos que diverjam em mais do que 30% poderão ser considerados indivíduos geneticamente diferentes, ao passo que indivíduos com similaridade superior a 70% não poderão ser considerados geneticamente diferentes.

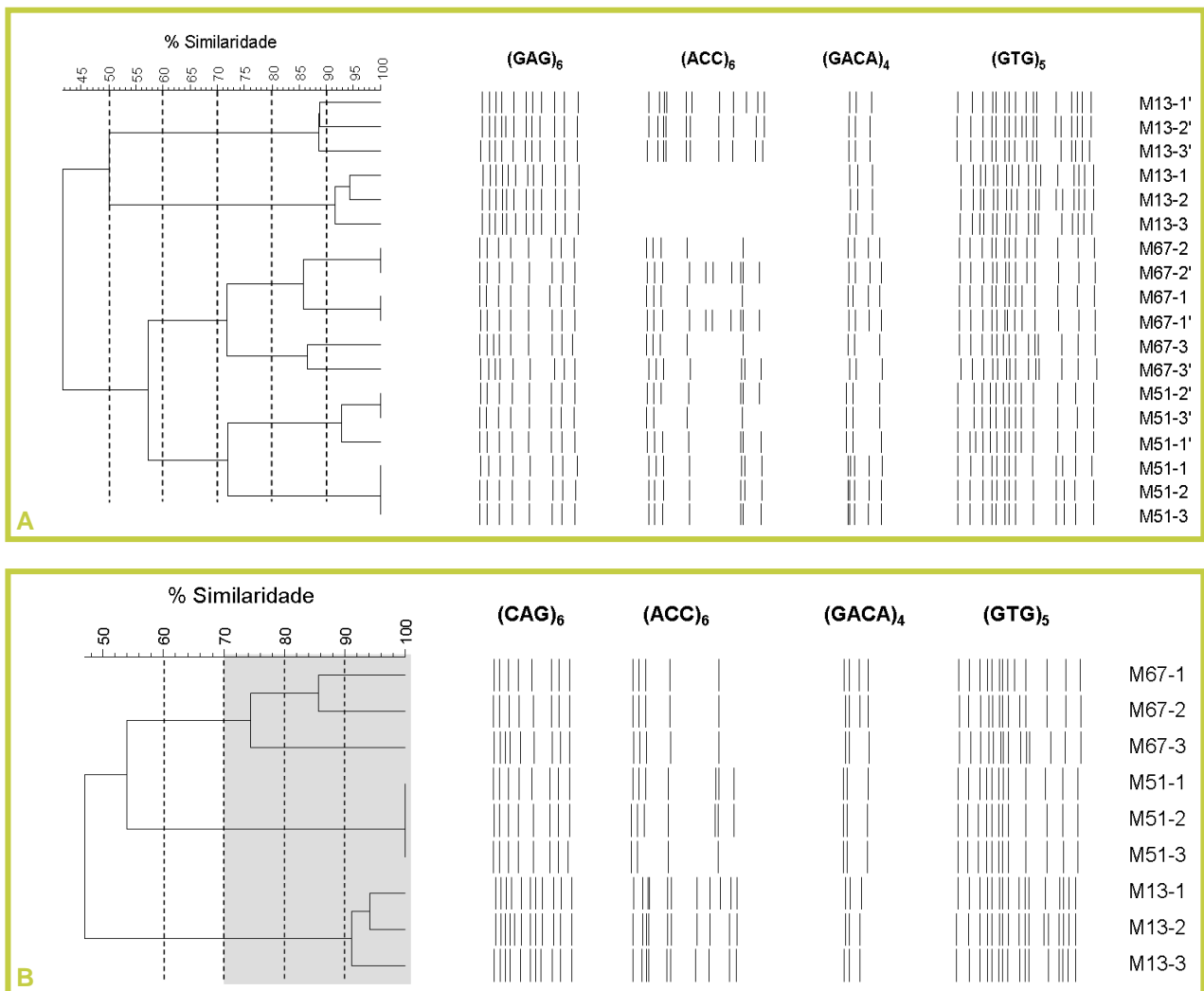


FIGURA 3: Dendrogramas dos padrões de *fingerprinting* de 3 indivíduos de 3 genótipos hipotéticos (M67, M51, e M13) da Lagoa de Melides, utilizando os *primers* (CAG)₆, (ACC)₆, (GACA)₄ e (GTG)₅: A) contabilizando ambas as ampliações para cada indivíduo; B) contabilizando apenas as bandas que apareceram de forma consistente em ambas as ampliações (ver texto). A área cinzenta representa o nível de corte (em termos de similaridade) satisfatório para discriminar as 3 linhagens clonais.

Na Experiência 2, de forma a reduzir a incerteza criada pela grande variabilidade observada entre amplificações da mesma amostra, repetiu-se a abordagem conservadora utilizada na Experiência 1, considerando para efeitos da análise de classificação apenas as bandas amplificadas de forma consistente para cada amostra. Analisando a arquitectura ou estrutura genética das populações de laboratório, foram visíveis três grupos bem distintos, que corresponderam, *grosso modo*, às três populações. Um pequeno grupo de genótipos da Lagoa de Mira (LM) apresentou uma maior similaridade com os genótipos da Lagoa de Melides (M), tendo ficado incluído no mesmo grupo (grupo do meio da Figura 4). Esta constituiu a única falha na resolução dos marcadores moleculares utilizados em termos de discriminação entre populações, na medida em que não é expectável haver fluxo genético entre populações tão distantes. De forma a analisar a arquitectura e diversidade genética dos três locais amostrados, foram construídos dendrogramas para cada população individual (Figura 5).

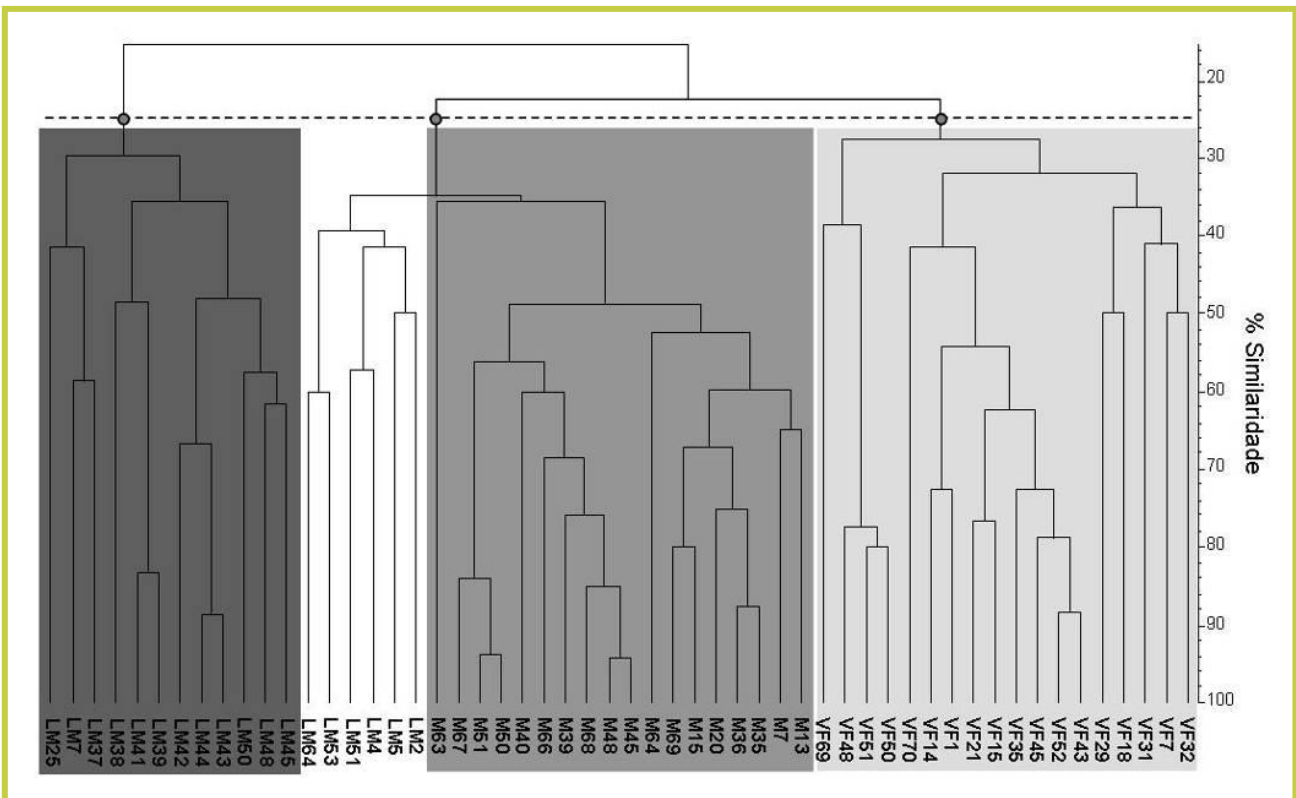


FIGURA 4. Dendrograma dos padrões de *fingerprinting* de diferentes indivíduos da Lagoa de Melides (M), Lagoa de Mira (LM) e Vala da Ferveça (VF), utilizando os *primers* (CAG)₆, (ACC)₆ e (GTG)₅.

O dendrograma para a população da Lagoa de Melides (M – Figura 5A) apresentou uma arquitectura genética mais complexa que a apresentada nos dendrogramas das populações da Lagoa de Mira (LM – Figura 5B) e da Vala da Ferveça (VF – Figura 5C). Os marcadores seleccionados resultaram em perfis com graus de similaridade grande entre diferentes indivíduos amostrados nesta população (M), tendo sido possível distinguir 3 grupos (divergindo acima de 40%), que se decompueram progressivamente em vários grupos muito próximos (Figura 5A). Dado que existe um grau de incerteza associado à técnica propriamente dita, definiram-se vários níveis de corte, em termos de similaridade. Deste modo, foi decomposta a arquitectura genética em cada população, assumindo genótipos hipotéticos para cada nível de similaridade considerado (40%-90%), cujos valores se apresentam na Tabela I. A arquitectura genética mais complexa

da população da Lagoa de Melides (M) levou a uma menor capacidade na diferenciação de genótipos, como consequência de uma elevada similaridade entre indivíduos e reduzida variabilidade genética nesta população. Em contraste, as populações da Lagoa de Mira (LM) e Vala da Fervença (VF) revelaram maior dissimilaridade entre os indivíduos, logo maior variabilidade genética.

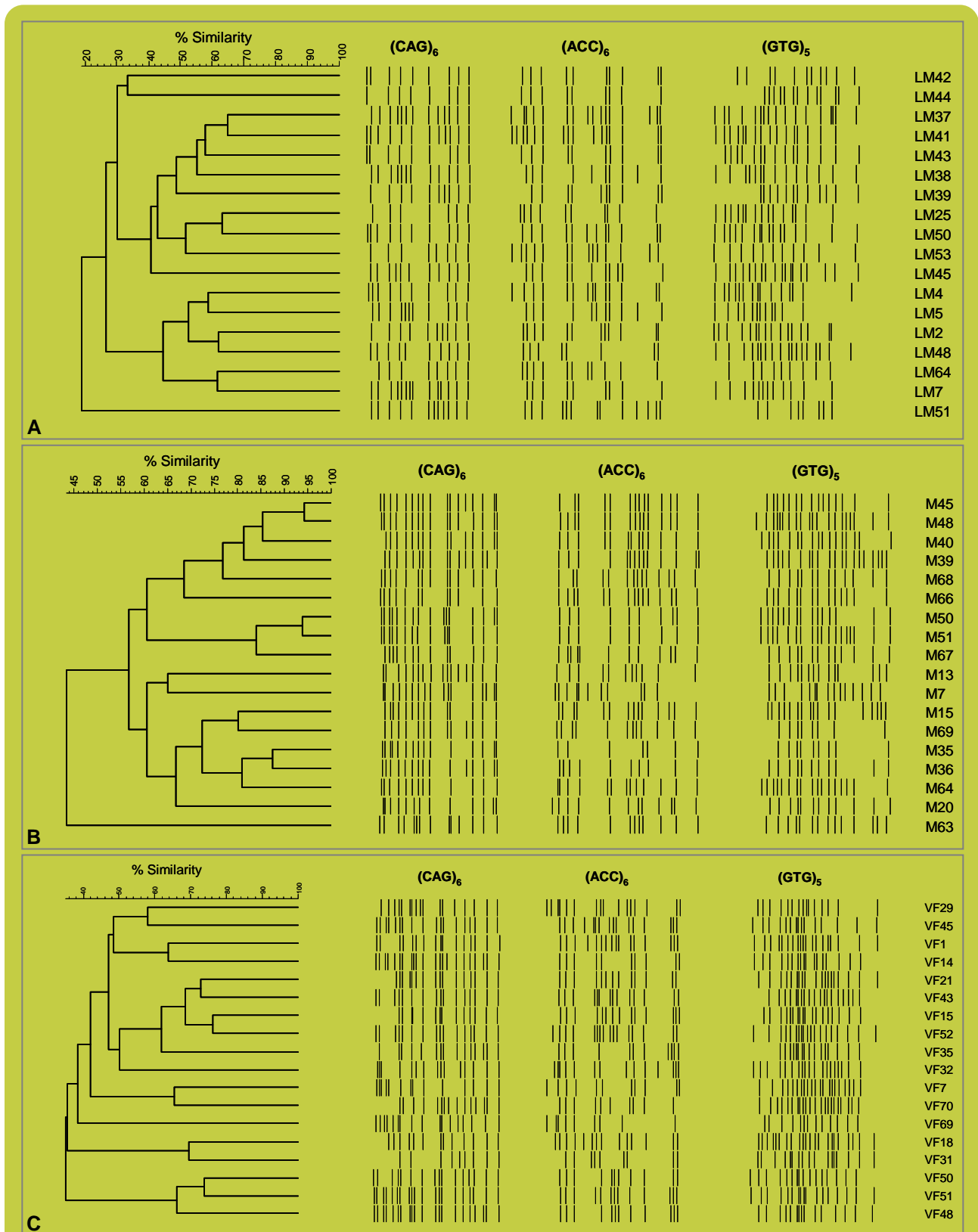


FIGURA 5: Dendrograma dos padrões de *fingerprinting* de 18 indivíduos de 3 populações diferentes, utilizando os primers (CAG)₆, (ACC)₆ e (GTG)₅: A) Lagoa de Melides; B) Lagoa de Mira; C) Vala da Fervença.

Considerando o nível de corte (70%) definido na experiência anterior (que permite abarcar alguma variabilidade intrínseca da técnica usada), foi possível fazer uma análise comparativa das 3 populações. Assim, a população LM foi a mais diversificada com 18 genótipos distintos em 18 possíveis, sendo seguida por VF com 15 genótipos diferentes em 18 possíveis. Na população M, apenas foi possível distinguir 8 genótipos em 18 indivíduos para o nível de corte predefinido.

TABELA I: Número de genótipos hipotéticos obtidos a diferentes níveis de corte de similaridade, para as três populações amostradas (M – Lagoa de Melides; LM – Lagoa de Mira; VF – Va-la da Fervença; n = 18 em cada população).

% Similaridade	M	LM	VF
40	1	5	4
50	2	9	8
60	3	14	9
70	8	18	15
80	11	18	18
90	16	18	18

DISCUSSÃO

Os dendrogramas construídos neste estudo revelaram uma grande variabilidade associada à amplificação (dissimilaridade acentuada entre amplificações diferentes do mesmo indivíduo), assim como alguma variabilidade entre indivíduos (dissimilaridade entre indivíduos com o mesmo genótipo, consistentes entre amplificações). Estas evidências corroboram trabalhos anteriores que mostravam a elevada sensibilidade desta técnica a variações nas condições de reacção (Weising et al., 1995). Efectivamente, a Experiência 1 sugere que a variabilidade associada à amplificação é maior do que a variabilidade entre indivíduos da mesma linhagem. De forma semelhante ao que acontece noutras técnicas, diversos factores da amplificação (por exemplo, a concentração de *primer* e a temperatura de *annealing*) influenciam de forma considerável a qualidade dos padrões de bandas obtidos com a técnica de MSP-PCR (Roux, 1995; Weising et al., 1995). Pequenas variações nestes factores podem levar ao aparecimento de bandas ambíguas (ora são amplificadas, ora não o são), criando dificuldades na análise dos padrões de *fingerprinting* e na discriminação de genótipos baseada nas diferenças entre esses mesmos padrões. Uma forma de contornar a variabilidade associada à amplificação é considerar apenas as bandas que surgem de forma consistente entre amplificações de ADN do mesmo indivíduo. Esta abordagem enfatiza a preocupação e importância de uma optimização prévia da técnica e da obtenção de pelo menos duas amplificações (i.e. reacções em duplicado) com sucesso para cada indivíduo. A optimização prévia da temperatura de *annealing* e o desenho dos *primers* adquirem particular relevo na prevenção de alguns artefactos associados à técnica de PCR (Weising et al., 1995; Roux, 2002). Devido a esta variabilidade intrínseca à técnica, surge a necessidade de serem tomadas algumas medidas de forma a maximizar o nível de confiança na diferenciação de genótipos a partir dos dendrogramas construídos. Uma dessas formas foi a utilizada neste estudo, que passou por uma abordagem conservadora, quer na selecção das bandas a analisar, quer na determinação do nível de corte de similaridade.

A aplicação da técnica às 3 populações distintas (Lagoa de Melides – M, Lagoa de Mira – LM e Vala da Fervença – VF) revelou diferenciação genética entre as três populações amostradas, mesmo entre as populações com algum grau de conectividade (LM e VF). Esta diferenciação vai de encontro à hipótese apresentada por De Meester et al. (2002), a qual sugere que diversos factores cumulativos (como a influência dos genótipos fundadores, o rápido crescimento populacional, a adaptação local e a monopolização dos recursos) levam a uma redução dos níveis de fluxo de genes entre as populações,

acentuando a sua diferenciação genética. Esta hipótese da monopolização tem subjacente um mecanismo de resistência à entrada de novos genótipos (não adaptados) por parte dos genótipos residentes (adaptados àquele habitat específico, e reflexo do *pool* genético fundador). Esta teoria reforça a ideia de que os lagos de água doce se comportam como ilhas do ponto de vista de isolamento genético das populações de dafnídeos que aí habitam.

Na análise dos dendrogramas construídos de forma independente para cada população, e considerando o nível de corte de 70% de similaridade, foi possível distinguir 8, 15 e 18 genótipos (em 18 possíveis) das populações M, VF e LM, respectivamente. Embora a população da Lagoa de Melides (M) apresente um menor número de genótipos, indicando uma menor variabilidade genética, nas populações VF e LM o número de genótipos distinguido revela uma forte diversidade clonal. Tendo em conta que as populações amostradas são populações predominantemente partenogénicas (considerando a altura do ano em que os organismos foram capturados e o facto de em nenhum exemplar capturado se ter observado a presença de ovos sexuais), este grau de diversidade genética em cada população revela uma importância acentuada da fase sexuada e do banco de ovos de resistência na dinâmica populacional (Thielsch et al., 2009). Como tal, parece haver um reduzido efeito da selecção clonal (De Meester et al., 2006; Hembre e Megard, 2006) na diversidade genética. Contudo, as populações foram amostradas a meio da época de crescimento, quando há ainda uma grande contribuição do banco de ovos de resistência. Adicionalmente, deve referir-se que o número de exemplares analisados nas 3 populações foi muito reduzido (apenas 18 indivíduos por população), sendo que ainda assim o elevado grau de diversidade genética observado corrobora as observações em outras populações de dafnídeos (Thielsch et al., 2009).

Os nossos dados demonstram assim a utilidade da técnica de MSP-PCR na diferenciação de linhagens clonais cultivadas em laboratório. Embora outros métodos tenham vindo a ser desenvolvidos ao longo do tempo, a técnica de MSP-PCR apresenta vantagens do ponto de vista logístico e financeiro. Diversos autores demonstraram já a sua capacidade de detecção de polimorfismos genéticos em *taxa* eucarióticos (Reddy et al., 1999; Abbot, 2001) e testaram a sua sensibilidade em comparação com outras técnicas já desenvolvidas (Czembor e Arseniuk, 1999; Meng e Chen, 2001; De León e Jones, 2004). Neste trabalho foram utilizados diversos *primers*, tendo sido escolhidos os três mais informativos para a diferenciação de genótipos nesta espécie de dafnídeos. O aumento do número de marcadores em estudos futuros permitirá obter mais informação e maior poder discriminatório; todavia, será necessário estabelecer um compromisso entre o número de marcadores e a informação que eles proporcionam, uma vez que a análise de um grande número de *primers* torna a técnica mais morosa e dispendiosa.

APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento de ferramentas moleculares nos últimos anos tem sido crucial para a compreensão da arquitectura genética de populações naturais e para o esclarecimento da identidade taxonómica e relações filogenéticas entre organismos de todos os grupos taxonómicos. Esta revolução molecular tem rompido alguns paradigmas, ao mesmo tempo que tem permitido explorar padrões outrora escondidos. No caso concreto da genética populacional, na qual se enquadra o presente estudo, o uso de marcadores genéticos tem permitido explorar padrões e processos de diferenciação genética inter-populacional e intra-populacional (Conner e Hartl, 2004). A sua utilização tem tido importantes implicações tanto em ecologia

como em biologia evolutiva, uma vez que promove o incremento do grau de resolução do nosso conhecimento sobre a composição genética e a rapidez das alterações da sub-estrutura populacional (Balloux e Lugon-Moulin, 2002). Neste tipo de estudos, a aplicação destas ferramentas adquire especial importância em duas situações complementares: i) na análise da estrutura populacional, em amostras de campo; ii) na diferenciação de linhagens de organismos mantidos em laboratório. Nesta última perspectiva, foi aqui utilizada a técnica de MSP-PCR em populações laboratoriais de animais que alternam reprodução sexuada e assexuada, mas perspectivando-se a sua utilização na análise genética de outras populações naturais. Esta e outras técnicas permitem aferir a diversidade genética e os processos ecológicos subjacentes a partir das “impressões digitais moleculares”, únicas de cada indivíduo/genótipo, explorando uma escala mais fina do que os estudos de ecologia clássicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbot P (2001). Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science* 1.8.: 3 pp.
- Alves A, Phillips A, Henriques I, Correia A (2007). Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology* 158: 112-121.
- Antunes S (2001). Variabilidade clonal de respostas crónicas de *Daphnia longispina* a diferentes níveis alimentares. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro, Aveiro, 71 pp
- Baird D, Soares AMVM, Girling A, Barber I, Bradley MC, Calow P (1989). The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects. In: H Lokke, H Tyle, F Bro-Rasmussen (eds.), Proceedings of the first European conference on ecotoxicology, Technical University, Lyngby, Denmark, pp. 144-148.
- Balloux F, Lugon-Moulin N (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155-165.
- Benzie JAH (2005). Cladocera: The Genus *Daphnia* (including *Daphniopsis*). H.J.F. Dumont (ed.): Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World. Kenobi Productions & Backhuys, Ghent and Leiden, 376 pp.
- Billiones R, Brehm M, Klee J, Schwenk K (2004). Genetic identification of *Hyalodaphnia* species and interspecific hybrids. *Hydrobiologia* 526: 43-53.
- Bornet B, Branchard M (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215.
- Brede N, Thielsch A, Sandrock C, Spaak P, Keller B, Streit B, Schwenk K (2006). Microsatellite markers for European *Daphnia*. *Molecular Ecology Notes* 6: 536-539.
- Castro B (2007). Ecologia e seleção de habitat em crustáceos zooplânctónicos de lagos pouco profundos. Dissertação de Doutoramento. Universidade de Aveiro, Aveiro, 168 pp, <http://biblioteca.sinbad.ua.pt/Teses/2007001038>.
- Conner J, Hartl D (2004). A Primer of Ecological Genetics. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Mass.
- Cristescu M, Colbourne J, Radivojac J, Lynch M (2006). A microsatellite-based genetic linkage map of the waterflea *Daphnia pulex*: On the prospect of crustacean genomics. *Genomics* 88: 415-430.
- Culley TM (2005). Population Genetic Analysis of ISSR Data. Disponível online em Julho 2009 em <http://bioweb.ad.uc.edu/faculty/culley/Protocols.htm>.
- Czembor P, Arseniuk E (1999). Study of Genetic Variability Among Monopycnidial and Monopycnidiospore Isolates Derived from Single Pycnidia of *Stagonospora* ssp. and *Septoria tritici* with the use of RAPD-PCR, MP-PCR and rep-PCR Techniques. *Journal of Phytopathology* 147: 539-546.
- De León JH, Jones WA (2004). Detection of DNA Polymorphisms in *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae) by Polymerase Chain Reaction-Based DNA Fingerprinting Methods. *Annals of Entomological Society of America* 97: 574-585.

- De Meester L, Gómez A, Okamura B, Schwenk K (2002). The Monopolization Hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica* 23: 121-135.
- De Meester L, Vanoverbeke J, Gelas KD, Ortells R, Spaak P (2006). Genetic structure of cyclic parthenogenetic zooplankton populations - a conceptual framework. *Archiv Fur Hydrobiologie* 167: 217-244.
- Elendt B-P, Bias W-R (1990). Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Research* 24: 1157-1167.
- EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms.
- Forró L, Korovchinsky NM, Kotov AA, Petrussek A (2008). Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 177-184.
- Giessler S (1997). Analysis of reticulate relationships within the *Daphnia longispina* species complex. Allozyme phenotype and morphology. *Journal of Evolutionary Biology* 10: 87-105.
- Gili M, Monaghan MT, Spaak P (2004). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) reveals species-specific markers in the *Daphnia galeata-hyalina* species complex. *Hydrobiologia* 526: 63-71.
- Grasela JJ, McIntosh AH (2003). Application of inter-simple sequence repeats to insect cell lines: identification at the clonal and tissue-specific level. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 39: 356-363.
- Griffiths A, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC (1999). Modern Genetic Analysis. W.H. Freeman and Company, New York.
- Hairston NG (1996). Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnology and Oceanography* 41: 1087-1092.
- Hairston NG, Lampert W, Caceres C (1999). Rapid evolution revealed by dormant eggs. *Nature* 401: 446.
- Hantula J, Muller MM (1997). Variation within *Gremmeniella abietina* in Finland and other countries as determined by Random Amplified Microsatellites (RAMS). *Mycological Research* 101: 169-175.
- Hebert P (1978a). The Population Biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 53: 387-426.
- Hebert PDN (1978b). The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biological Review* 53: 387-426.
- Hembre L, Megard R (2006). Direct and indirect effects of predation on the genetic structure of a *Daphnia* population. *Journal of Plankton Research* 28: 1129-1141.
- Hering O, Nirenberg HI (1995). Differentiation of *Fusarium sambucinum* Fuckel sensu lato and related species by RAPD PCR. *Mycopathologia* 129: 159-164.
- Karp A, Edwards KJ (1997). DNA markers: a global overview. In: G Caetano-Anollés, PM Gresshoff (eds.), DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews, Wiley-Liss, New York, pp. 1-13.
- Lin H, Hai-yan L, Xiang-Yang Z, Feng Y, Xiang-Dong B, Chong-Bo H (2006). Population Genetic structure and genetic differentiation of *Artemia parthenogenetica* in China. *Journal of Shellfish Research* 25: 999-1005.
- Meng X, Chen W (2001). Applications of AFLP and ISSR techniques in detecting genetic diversity in the soybean brown stem rot pathogen *Phialophora gregata*. *Mycological Research* 105: 936-940.
- Pereira J (2008). Variações populacionais de cladóceros sujeitos a diferentes condições de stress. Dissertação de Dissertação de Doutorado. Universidade de Aveiro, Aveiro, 153 pp, <http://biblioteca.sinbad.ua.pt/teses/2009001285>.
- Petrusek A, Hobaek A, Nilssen JP, Skage M, Cerny M, Brede N, Schwenk K (2008). A taxonomic reappraisal of the European *Daphnia longispina* complex (Crustacea, Cladocera, Anomopoda). *Zoologica Scripta* 37: 507-509.
- Picado A, Chankova S, Fernandes A, Simões F, Leverett D, Johnson I, Hernan R, Pires A, Matos J (2007). Genetic variability in *Daphnia magna* and ecotoxicological evaluation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 406-410.
- Reddy KD, Nagaraju J, Abraham EG (1999). Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. *Heredity* 83: 681-687.
- Reid V, Carvalho G, George D (2000). Molecular genetic analysis of *Daphnia* in the English Lake District: species identity, hybridisation and resting egg banks. *Freshwater Biology* 44: 247-253.
- Ringelberg J, Gool Ev, Brehm M (2004). Density and depth variations of *Daphnia* multilocus genotypes during a summer period in Lake Maarsveen. *Aquatic Ecology* 38: 525-535.
- Roux KH (1995). Optimization and troubleshooting in PCR. *Genome Research* 4: 185-194.
- Roux KH (2002). Single-Step PCR Optimization Using Touchdown and Stepdown PCR Programming. In: B-Y Chen, HW Janes (eds.), PCR Cloning Protocols - 2nd edition, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 31-36.

- Schulz HK, Smietana P, Schulz R (2004). Assessment of DNA variations of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) in Germany and Poland using inter-simple sequences repeats (ISSRS). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 372-373: 387-399.
- Schwartz SS, Hebert PDN (1987). Methods for activation of the resting eggs of *Daphnia*. *Hydrobiologia* 442: 67-73.
- Schwenk K, Sand A, Boersma M, Brehm M, Mader E, Offerhaus D, Spaak P (1998). Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the cladocera. *Aquatic Ecology* 32: 37-51.
- Schwenk K, Posada D, Hebert P (2000). Molecular systematics of European *Hyalodaphnia*: the role of contemporary hybridization in ancient species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267: 1833-1842.
- Schwenk K, Bijl M, Menken S (2001). Experimental interspecific hybridization in *Daphnia*. *Hydrobiologia* 442: 67-73.
- Schwenk K, Juntilla P, Rautio M, Bastiansen F, Knapp A, Dove O, Billiones R, Streit B (2004). Ecological, morphological, and genetic differentiation of *Daphnia* (*Hyalodaphnia*) from the Finnish and Russian subarctic. *Limnology and Oceanography* 49: 532-539.
- Skage M, Hobæk A, Ruthová S, Keller B, Petrusek A, Sed'a J, Spaak P (2007). Intra-specific rDNA-ITS restriction site variation and an improved protocol to distinguish species and hybrids in the *Daphnia longispina* complex. *Hydrobiologia* 594: 19-32.
- Thielsch A, Brede N, Petrusek A, Meester Ld, Schwenk K (2009). Contribution of cyclic parthenogenesis and colonization history to population structure in *Daphnia*. *Molecular Ecology* 18: 1616-1628.
- Vijayan K, Anuradha HJ, Nair CV, Pradeep AR, Awasthi AK, Saratchandra B, Rahman SAS, Singh KC, Chakraborti R, Urs SR (2006). Genetic diversity and differentiation among populations of the Indian eri silkhorm, *Samia cynthia ricini*, revealed by ISSR markers. *Journal of Insect Science* 6: 11 pp.
- Weising K, Atkinson RG, Gardner RC (1995). Genomic Fingerprinting by Microsatellite-primed PCR: A Critical Evaluation. *Genome Research* 4: 249-255.