

Análise genética em *Abudefduf saxatilis* (Perciformes, Pomacentridae) no litoral Nordeste do Brasil e Arquipélago São Pedro e São Paulo

Marcelo Câmara Rodrigues¹ e Wagner Franco Molina²

¹Aluno bolsista PROPESQ/UFRN, ²Professor orientador, Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Resumo

Estudos genéticos em populações geograficamente distintas de *Abudefduf saxatilis*, através de marcadores RAPD, identificaram um nível de variabilidade genética equivalente entre populações insulares do Arquipélago São Pedro e São Paulo (ASPSP) e aquelas do litoral do Rio Grande do Norte e Bahia. Os parâmetros de distância genética e a identidade genética de Nei demonstraram uma maior similaridade entre as populações do litoral, em relação à população do ASPSP. O coeficiente de similaridade de Jaccard apontou três clusters principais para as populações estudadas. As informações obtidas, associadas a estudos prévios de morfometria para as mesmas populações, revelam um padrão coerente de diferenciação genética e morfológica. Os resultados ressaltam a influência da Corrente do Brasil na homogeneização das populações costeiras desta espécie.

Palavras-chave: RAPD, *Abudefduf saxatilis*, variabilidade genética

Abstract

Interpopulational studies in the *Abudefduf saxatilis*, by RAPD markers, identified a similar level of genetic variability between the São Pedro e São Paulo Archipelago (ASPSP) population and those of the coastal regions of Rio Grande do Norte and Bahia. The genetic distance and Nei's genetic identity showed a higher similarity between coastal populations related to the ASPSP. The Jaccard similarity coefficient indicated the presence of three major clusters to studied populations. The obtained data, associated to early morphometric studies to the populations first mentioned demonstrate a coherent pattern to genetic and morphological differentiations. The results point out the marked influence of Brazil Current to the genetic homogenization of the coastal's populations of this species.

Keywords: RAPD, *Abudefduf saxatilis*, genetic variability

Introdução

O componente vertebrado mais importante das comunidades recifais é constituído quase que exclusivamente por meio de um único táxon, os teleósteos Acanthopterygii. Neste grupo, os Perciformes se destacam pelo tamanho, densidade e abundância. Muitos peixes de recifes são pertencentes a um pequeno número de famílias e de gêneros com muitas espécies co-existent (POUGH et al., 2003), das quais se destacam os Pomacentridae.

Entre os teleósteos marinhos, os Pomacentridae constituem uma das famílias com maior diversidade, encontrando-se espalhada por todos os grandes oceanos em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Pertencendo a subfamília Pomacentrinae, a espécie *Abudefduf saxatilis* apresenta a mais ampla distribuição geográfica entre os Pomacentridae, ocupando ambientes rochosos e coralinos de vastas áreas do Atlântico. Nas águas do Indo-Pacífico é substituída por uma forma filogeneticamente próxima, *A. vaigiensis* (ALLEN, 1975).

A detecção da variabilidade genética, por marcadores genéticos, permite acessar informações quanto à estrutura das populações, fluxo gênico, relações filogenéticas, padrões biogeográficos e análises de paternidade e parentesco (FÉRAL, 2002). Os dados gerados através destas marcas genéticas possibilitam a detecção de áreas de endemismo além de ser de grande valia na implementação de ações de conservação e de manejo de espécies.

Entre os marcadores de DNA, aqueles produzidos através da técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), vêm sendo utilizados de forma eficiente na determinação da estrutura de populações naturais. Esta metodologia amplifica aleatoriamente segmentos de DNA, pelo uso de *primers* arbitrários decâmeros. O respectivo procedimento representa uma derivação do método da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que pode ser dividido em três etapas, uma de desnaturação da dupla fita de DNA, uma etapa de hibridização com o *primer* e uma etapa de alongamento da fita (WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990). Marcadores RAPD têm como vantagem o acesso à variabilidade genética de populações sem a necessidade de conhecimento prévio do genoma da espécie (FOO et al., 1995; HOLSINGER et al., 2002).

Diante das características diferenciadas de *A. saxatilis* originadas pela dispersão no ambiente marinho em relação às demais espécies da família, o presente trabalho decorre de um projeto que teve por objetivo analisar a diversidade genética de populações ao longo do litoral Nordeste do Brasil tomando como referenciais, o Estado do Rio Grande do Norte (RN) e Bahia (BA), para comparação com as populações do Arquipélago São Pedro e São Paulo (ASPSP), utilizando a técnica de RAPD, contribuindo para o entendimento dos padrões de dispersão de peixes recifais, na costa e ilhas oceânicas do Brasil.

Material e métodos

Espécimes de *A. saxatilis* foram coletados na ilha do Morro de São Paulo, BA (n=08), no litoral de Nísia Floresta, RN (n=14) e no Arquipélago São Pedro e São Paulo (n=11). Fragmentos do tecido hepático, com cerca de 0,5 cm³, de cada exemplar, foram armazenados em tubos de 1,5 ml, contendo 800 µl de solução de álcool metílico e etílico (1:1), à temperatura de -20°C para posterior extração do DNA total. O procedimento para a extração do DNA foi realizado segundo Sambrook et al., (1989), com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico.

Foram selecionados 20 *primers* decâmeros, os quais passaram por amplificação em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) utilizando o kit Ready To-Go RAPD Analysis Beads, conforme indicações do fabricante (Amersham Pharmacia). Cada reação continha 2,5U d Taq polimerase (PuReTaq[™] DNA Polimerase), 10 mM Tris-HCl (pH 9), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, BSA (albumina bovina), 25 ng/µl de DNA, 10 pmol/ µl de primer RAPD e água milliQ para um volume final de 25 µl. Os parâmetros térmicos da amplificação consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 4 min, seguida por 40 ciclos, cada um com 1 min a 92°C, 1 min e 30 seg a 37°C e 3 min a 72°C.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,4%, coradas com brometo de etídio (10ng/µl) e visualizadas em um trans-iluminador de luz ultra-violeta, após corrida eletroforética (86V por 3 horas). Os géis foram fotodocumentados através do sistema digital Kodak EDAS-290. Os fragmentos de DNA tiveram seus tamanhos estimados pela comparação com o padrão do Ladder Plus 1Kb (Gibco BRL).

Matrizes binárias (0 ou 1, presença ou ausência de bandas) foram geradas para os produtos de amplificação dos *primers*, a partir das quais foram calculadas a distância genética, baseada no padrão de bandas, de acordo com Nei (1978), e o índice de diversidade genética de Shannon, utilizando-se o programa POPGENE 1.31 (YEN et al., 1999).

O índice de diversidade genética de Shannon foi utilizado para quantificar o nível de diversidade genética em populações isoladas e a participação de indivíduos dentro e entre populações. Este índice tem sido útil na análise dos dados de RAPD devido a sua aparente insensibilidade às tendências que poderiam ser introduzidas pela impossibilidade de detecção de indivíduos heterozigotos. Para obter um dendrograma de similaridade genética de Jaccard, utilizou-se o programa computacional NTSYS-PC (ROHLF, 1990).

Resultados

Entre os *primers* testados, três foram selecionados (C06 - 5'-GTCCATGCCA-3'; C05 - 5'-GTGGGCTGAC-3' e D02 - 5'-CGACGCCCTG-3') devido à qualidade das bandas e grau de polimorfismo apresentado.

Os 33 indivíduos de *Abudefduf saxatilis* das populações analisadas (RN, BA e ASPSP) apresentaram um total de 20 bandas, das quais, cinco identificadas, através do *primer* C06 (650pb a 1.650 pb), seis pelo *primer* C05 (350-850 pb) e nove pelo *primer* D02 9 (200- 1200 pb).

As análises, utilizando o índice de diversidade genética de Shannon, indicaram valores de 0,22 para o RN, 0,28 para a BA e 0,24 para o ASPSP, com índice médio para as populações de 0,35.

O número de migrantes por geração (N_m) entre as populações analisadas foi calculado a partir do coeficiente de variação genética de Nei (1978) (G_{st}) obtido para estas populações (G_{st} , 0,26), indicando 1,37 migrantes por geração, calculado a partir do programa POPGENE 1.32 (ROHLF, 1990) pela equação $N_m = 0.5 (1 - G_{st}) / G_{st}$.

Na Figura 1, estão representados os dendrogramas de similaridade genética, utilizando o coeficiente de Jaccard e a distância genética de Nei (1972) para as amostras estudadas.

Discussão

O Oceano Atlântico apresenta um mosaico de ambientes que permite a coexistência de uma incontável variedade de espécies, contudo esta diversidade espacial só é identificada a partir de observações mais detalhadas. Gradientes de salinidade, os tipos de assoalho, a luminosidade, turbidez, aportes diferenciais de águas continentais e seus nutrientes, são alguns dos vários fatores que determinam a diversidade de formas aptas a explorar regiões particulares deste ambiente. Além da diversidade de ambientes costeiros, o Atlântico ainda exhibe, embora em pequeno número, a presença de ambientes insulares que se caracterizam por um relativo isolamento em relação às regiões continentais, sendo desta forma propício ao surgimento de barreiras ao fluxo gênico e eventos de especiação (BRIGGS, 1995; JOYEUX et al., 2001; ROCHA, 2003; FLOETER et al., 2001).

A capacidade de colonizar novos ambientes está diretamente relacionada ao potencial dispersivo das espécies. Nos peixes recifais a capacidade de se distribuir ao longo de grandes áreas está diretamente relacionada à extensão do período pelágico larval de cada espécie (SALE, 1991). Esse mesmo autor considera que o período pelágico larval pode se mostrar ausente, ou

variar de um dia até um ano. Este parâmetro biológico tem influências diversas, sobretudo nos aspectos genéticos das espécies.

Molina e Galetti (2004) demonstraram uma evidente correlação entre a duração da fase larval pelágica e a quantidade de alterações cromossômicas estruturais ocorridas na evolução dos Pomacentridae, inclusive da espécie *A. saxatilis*. Este estudo demonstrou que quanto maior a fase pelágica larval menor será o número de modificações cromossômicas, sobretudo inversões pericêntricas, o principal mecanismo evolutivo de diversificação cariotípica entre os Perciformes.

Os padrões hidrodinâmicos das correntes oceânicas são de grande relevância para o entendimento da dispersão de organismos nos oceanos. Neste aspecto, o Oceano Atlântico é formado por dois grandes giros, o giro do Atlântico Norte e o giro do Atlântico Sul. Este, por sua vez, apresenta a Corrente Sul Equatorial que, ao chegar à costa do Brasil, bifurca-se, formando a corrente das Guianas, no sentido Leste-oeste e a corrente do Brasil, margeando o litoral brasileiro, no sentido Norte-sul (KNOPPERS et al., 2002). A maior similaridade genética entre as populações costeiras do Rio Grande do Norte e da Bahia, em detrimento da população do Arquipélago São Pedro e São Paulo, apóia a idéia de que a Corrente do Brasil represente uma influência marcante na homogeneização das populações costeiras.

Análises morfométricas multivariadas em populações continentais e insulares de *A. saxatilis*, no Atlântico Ocidental, realizadas por Molina et al. (2006), indicaram modificações fenéticas que sugerem subdivisões populacionais entre os diferentes estoques desta espécie, mediadas pela corrente do Brasil e pela capacidade de auto-recrutamento nas ilhas oceânicas. Os dados morfométricos, utilizando as mesmas populações do presente estudo, corroboram com a presente análise molecular, indicando também uma maior similaridade entre os exemplares do Rio Grande do Norte e Bahia do que com aqueles provenientes do Arquipélago de São Pedro e São Paulo.

Dos organismos que vivem associados a ambientes recifais, a família Pomacentridae apresenta grande destaque, apresentando-se bem distribuída ao longo de todos os oceanos tropicais (NELSON, 1994). Nesta família a espécie *Abudefduf saxatilis* merece uma atenção especial, visto que se encontra largamente distribuída (ALLEN, 1975), podendo ser utilizada como um excelente modelo de dispersão para peixes recifais. Apesar de seus padrões de distribuição, esta espécie apresenta um período larval pelágico relativamente curto, com aproximadamente 23 dias (BROTHERS et al., 1983), embora possa ampliar seu potencial dispersivo até 55 dias pela utilização e aderência a detritos flutuantes. Contudo, seu caráter

generalista pode ser um dos principais responsáveis pelo seu sucesso em colonizar novos ambientes.

A variabilidade genética intrapopulacional para *A. saxatilis*, baseada no índice de Shannon, revelou-se baixa nas populações analisadas, mesmo para as populações continentais, diferindo de forma significativa daquelas encontradas para a espécie dulcícola *Astyanax altiparanae* estudada por Prioli et al. (2002). A amostra do ASPSP revelou um nível de variabilidade genética compatível com populações existentes no continente, com efeitos bem maiores. Possivelmente isto se deve a um tamanho populacional insular significativo ou pela manutenção, ainda desconhecida, de algum fluxo gênico com outras ilhas oceânicas do meso-Atlântico.

A distribuição biogeográfica de peixes recifais do Atlântico Sul (JOYEUX et al., 2001), e conseqüente eventos de especiação revela um padrão mediado pela capacidade dispersiva e capacidade colonizadora frente à ação de fatores ecológicos limitantes (temperatura, substrato, entre outros).

Diante dos sucessivos estudos realizados em populações de peixes recifais no Atlântico, tem-se tornado clara a marcante influência das correntes marítimas no estabelecimento e dimensão do fluxo gênico entre as populações distribuídas ao longo da costa e das ilhas oceânicas do Brasil. Assim, longe de revelar um cenário de homogeneidade populacional, a região costeira encontra-se estratificada, pressuposto importante para ações ligadas à conservação de espécies, sobretudo daquelas submetidas à intensa exploração pela pesca.

Estudos complementares utilizando diferentes marcadores genéticos, bem como outras espécies, deste mesmo ambiente serão determinantes no esclarecimento da existência de padrões associados a barreiras ou mecanismos de dispersão, que tenham influenciado historicamente a atual distribuição e evolução das espécies recifais no Atlântico.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Pró-reitoria de Pesquisa e a Universidade Federal do Rio Grande do Norte pelas condições para realização do presente trabalho e ao graduando Allyson Santos de Souza pela edição da figura.

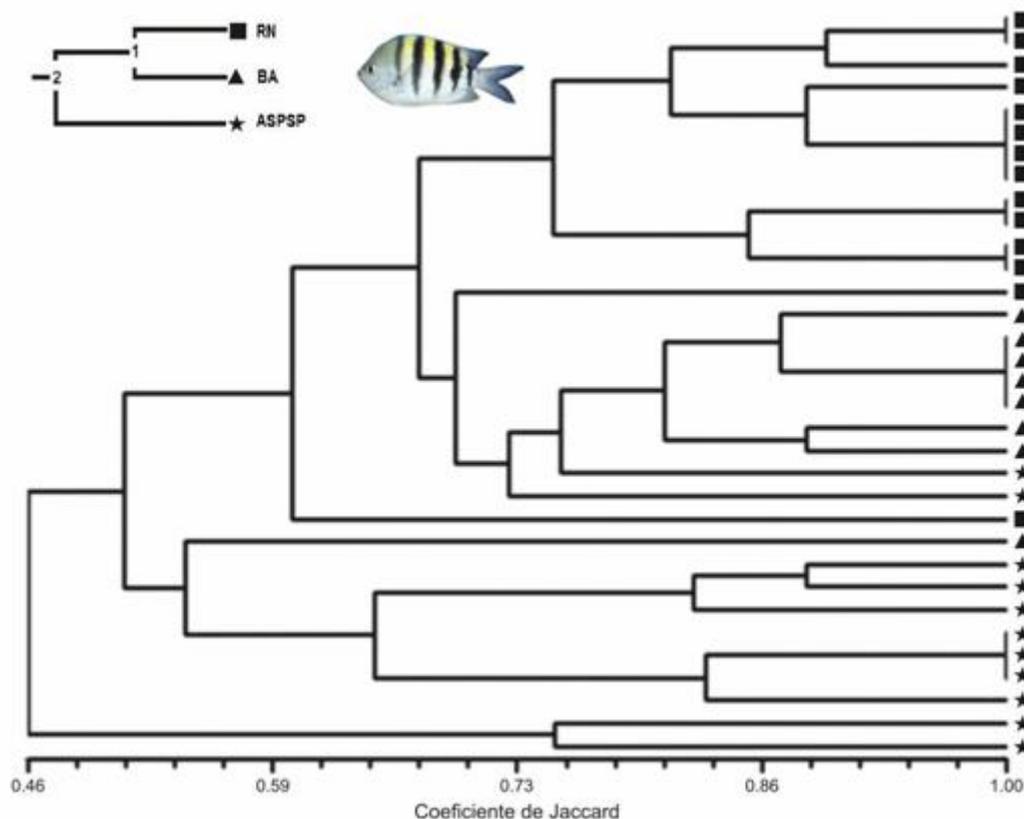


Figura 1 – Dendrograma obtido a partir do coeficiente de similaridade genética de Jaccard entre indivíduos das populações de *A. saxatilis* do Rio Grande do Norte (quadrado), Bahia (triângulo) e Arquipélago de São Paulo e São Pedro (estrela). Em detalhe na parte superior esquerda, o dendrograma da distância genética de Nei (1978) entre as populações e representação do exemplar da espécie.

Referências

- ALLEN, G. R. **Damselfishes of the south seas**. Hong Kong: T. F. H. Publications, 1975.
- BRIGGS, J. C. **Global Biogeography: developments in paleontology and stratigraphy**. v. 14, Amsterdam: Elsevier, 1995.
- BROTHERS, E. B.; WILLIAMS, D. M. C. B.; SALE, P. F. Length of larval life in twelve families of fishes at one Tree Lagoon. Great Barrier Reef, Australia. **Marine Biology**, v. 76, p. 319-324, 1983.
- FERAL, J. P. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 268, p. 121-145, 2002.

FLOETER, S. R.; GUIMARÃES, R. Z. P.; ROCHA, L. A. et al. Geographic variation in reef-fish assemblages along the Brazilian coast. **Global ecology and biogeography**, v. 10, p. 423-431, 2001.

FOO, C. L.; DINESH, K. R.; LIM, T. M. et al. Inheritance of RAPD Markers in the Guppy Fish, *Poecilia reticulata*. **Zoological Science**, v. 12, p. 535-541, 1995.

HOLSINGER, K. E.; LEWIS, P. O.; DEY, D. K. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 157-1164, 2002.

JOYEUX, J. C.; FLOETER, S. R.; FERREIRA, C. E. L. et al. Biogeography of tropical reef fishes: the south Atlantic puzzle. **Journal of Biogeography**, v. 28, p. 831-841, 2001.

KNOPPERS, B.; EKAU, W.; FIGUEIREDO JR., A. G. et al. Zona costeira e plataforma continental do Brasil. In: PEREIRA, R.C., SOARES-GOMES. (Org.). **Biologia marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 353-361, 2002.

MOLINA, W. F.; GALETTI JR., P. M. Karyotypic changes associated to the dispersive potential on Pomacentridae (Pisces, Perciformes). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 309, p. 109-119, 2004.

MOLINA, W. F.; SHIBATTA, O. A.; GALETTI JR., P. M. Multivariate morphological analyses in continental and island populations of *Abudefduf saxatilis* (Linnaeus) (Pomacentridae, Perciformes) of Western Atlantic. **Pan American Journal of Aquatic Sciences**, v. 1, p. 49-56, 2006.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3.ed., New York: John Wiley & Sons Inc, 1994.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 3.ed., São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2003.

PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; JÚLIO JR.; H. F. et al. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 421-430, 2002.

ROCHA, L. A. Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. **Journal of Biogeography**, v. 30, p. 1161-1171, 2003.

ROHLF, J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system NTSYS manual version 1.60**. Exeter software. New York: State University of New York, 1990.

SALE, P. F. **The ecology of fishes on coral reef**. Academic press: California, 1991.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold-Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 653-6535, 1990.

YEN, F. C.; BOYLE, T.; YE, Z. et al. **POPGENE Version 1,31**: Microsoft Windows based freeware for populations genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

Marcelo Câmara Rodrigues

Endereço eletrônico: cr.marcelo@gmail.com

Base de pesquisa: Genética de Recursos Marinhos

Endereço postal: Departamento de Biologia Celular e Genética, Centro de Biociências, 59078-970, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário, Natal/RN – Brasil.