

Análise de similaridade genética entre espécies insulares endêmicas e costeiras do gênero *Stegastes* (Perciformes) através de marcadores moleculares RAPD

Eurico Azevedo Dias Júnior¹, Wagner Franco Molina²

¹Aluno Bolsista CNPq/PIBIC, ²Professor orientador, Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Resumo

Estudos sobre processos especiativos envolvendo a ictiofauna neotropical são escassos, principalmente em importantes ambientes insulares do Atlântico Ocidental. Sendo assim, o presente trabalho se propôs a estabelecer as relações de similaridade genéticas para cinco espécies de Pomacentrídeos do gênero *Stegastes* com distribuição costeira e endêmica para Fernando de Noronha e Atol das Rocas e Arquipélago São Pedro e São Paulo. Os resultados indicam a maior similaridade genética de *S. fuscus* em relação a *S. sanctipauli* e *S. rocasensis*. O grau de similaridade genética entre as espécies insulares parece indicar uma derivação recente entre estas formas.

Palavras-chave: Filogenética, Pomacentridae, RAPD, *Stegastes*

Abstract

Studies on speciation processes involving neotropical ichthyofauna are scarce, mainly those involving important insular environments of the Western Atlantic. This being so, the present work proposes to establish genetic similarity relationships for five species of Pomacentridae of the genus *Stegastes* with coastal and endemic distribution in Fernando de Noronha, Rocas Atol and the São Paulo and São Pedro Archipelagos. The results indicate that the greatest genetic similarity is between *S. fuscus* and *S. sanctipauli* and *S. rocasensis*. The degree of genetic similarity between the insular species seems to suggest a recent ancestral condition between these forms.

Keywords: Phylogenetic, Pomacentridae, RAPD, *Stegastes*

Introdução

Os *Pomacentridae* constituem um grupo com grande número de espécies que participam ativamente das interações ecológicas nos recifes de corais. Os relacionamentos dentro da família foram estabelecidos inicialmente por Allen (1975), e têm recebido acréscimos através de dados de seqüências DNAm_t 12S + 16S e 12S sozinhas (JANG-LIAW *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2004). Essas relações nem sempre são congruentes com a sistemática vigente para o grupo.

Na subfamília *Pomacentrinae*, o gênero *Stegastes* compreende um grupo morfológicamente muito conservativo (Emery, 1972). Algumas espécies apresentam uma origem controvertida como as forma endêmicas *S. rocasensis*, do Atol das Rocas e Fernando de Noronha, *S. sanctipauli*, do Arquipélago São Pedro e São Paulo.

Segundo Emery (1972), a espécie insular *Stegastes rocasensis* provavelmente teria maior similaridade com *S. variabilis*, espécie costeira e amplamente distribuída na costa do nordeste do Brasil. O ponto mais próximo de distribuição de *S. variabilis* se encontra no litoral do Rio Grande do Norte, que dista aproximadamente 267 km de distância do Atol das Rocas.

Lubbock e Edwards (1981) indicam uma proximidade entre as espécies *S. rocasensis* e *S. sanctipauli*, porém, diante dos padrões oceanográficos dominantes, acreditam que ambas as espécies tenham derivado de um estoque continental de *S. variabilis* e desde então evoluído em paralelo. Contudo, Menezes e Figueiredo (1985), apontam *S. fuscus* como aquela que apresenta maior similaridade de colorido e caracteres morfológicos com *S. rocasensis* e *S. sanctipauli*, do que qualquer outra espécie do litoral brasileiro.

Molina (2000), em trabalho realizado através da análise morfométrica das variáveis canônicas livres do tamanho, segundo Reis e colaboradores (1990), ao examinar padrões de similaridade morfológica entre indivíduos, obteve evidências que apontam *Stegastes variabilis* como o mais provável ancestral direto de *Stegastes rocasensis*, contudo, com resultados contraditórios em relação a uma filogenia baseada em caracteres citogenéticos que evidenciam uma maior similaridade com *S. fuscus* (Molina, 2000). A utilização de marcadores moleculares apresenta-se, portanto, de fundamental importância para a elucidação definitiva da origem filogenética das espécies endêmicas de *Stegastes rocasensis* e *Stegastes sanctipauli*.

Um grande número de estudos tem demonstrado o sucesso do uso de marcadores RAPD na obtenção de padrões espécie-específicos em peixes (LIU *et al.*, 1999), na estimativa de relações filogenéticas entre espécies e subespécies (Callejas e Ochando, 1998), além do seu uso clássico na

estimativa de similaridade genética entre populações geograficamente distintas (BIELAWSKI; PUMO, 1997).

A origem controvertida das espécies endêmicas *S. rocasensis* e *S. sanctipauli*, levou-nos a compará-las com outras espécies do gênero, através de marcadores moleculares do tipo RAPD, a fim de identificar o nível de similaridade genética entre estas espécies.

Metodologia

Os espécimes utilizados neste estudo foram coletados em diferentes regiões: *Stegastes variabilis* (Búzios-RN, n=09); *Stegastes fuscus* (Búzios-RN, n=07); *Stegastes sanctipauli* (Arquipélago São Pedro e São Paulo, n=09); *Stegastes rocasensis* (Atol das Rocas, n=05) e *Stegastes pictus* (Ceará, n=03 e Atol das Rocas, n=02). Fragmentos de tecido hepático foram acondicionados em microtubos contendo uma solução fixadora de DNA composta por álcool etílico e álcool metílico na proporção de (1:1), sendo armazenados à temperatura de -20°C para posterior extração do DNA total, de acordo Sambrook *et al.* (1989). Após a extração de DNA, foram testados dezoito *primers*, obtidos da University of British Columbia Biotechnology Laboratory (UBC) and Operon Technologies (OPP) e quatro (OPP-8, ACATCGCCCA; OPP-9, GTGGTCCGCA; UBC-101, GCGCCTGGAG; UBC-174, AACGGGCAGG) foram utilizados para as reações de amplificação de RAPD-PCR.

As amostras foram amplificadas utilizando-se 25ng de DNA por amostra, 1μl de *primer* (na concentração de 100ng/μl), 10,5μl de água livre de nuclease de acordo com o estabelecido pelo fabricante (Promega) e 12,5μl de PCR master mix - kit Promega (50 units/ml *Taq* DNA polimerase, 400μl de cada dNTP, 3mM MgCl₂) fornecendo um volume final de 25μl de solução. Esta solução de amplificação foi acondicionada ao termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.) com cada reação constando de uma etapa inicial de 4 min na temperatura de 94°C; seguido de 45 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 36°C e 2 min a 72°C; seguido por um passo final de 7min a 72°C (Barman *et al.*,2003).

Os produtos de amplificação de cada *primer* foram agrupados em matrizes binárias, onde 0 indica a ausência de banda, enquanto que 1 indica a presença de banda, as quais foram utilizadas para verificar o nível de similaridade genética e as prováveis relações filogenéticas entre as espécies, expresso por meio de um dendrograma de similaridade gerado através do programa

computacional NTSYS (ROHLF, 1990). Para estas análises foram utilizados o coeficiente de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*). As demais, também foi usado o programa Popgene versão 1.31 (YEN *et. al*, 1999), para identificar a identidade e distância genética de Nei(1972) entre as espécies e o número de migrantes (Nm).

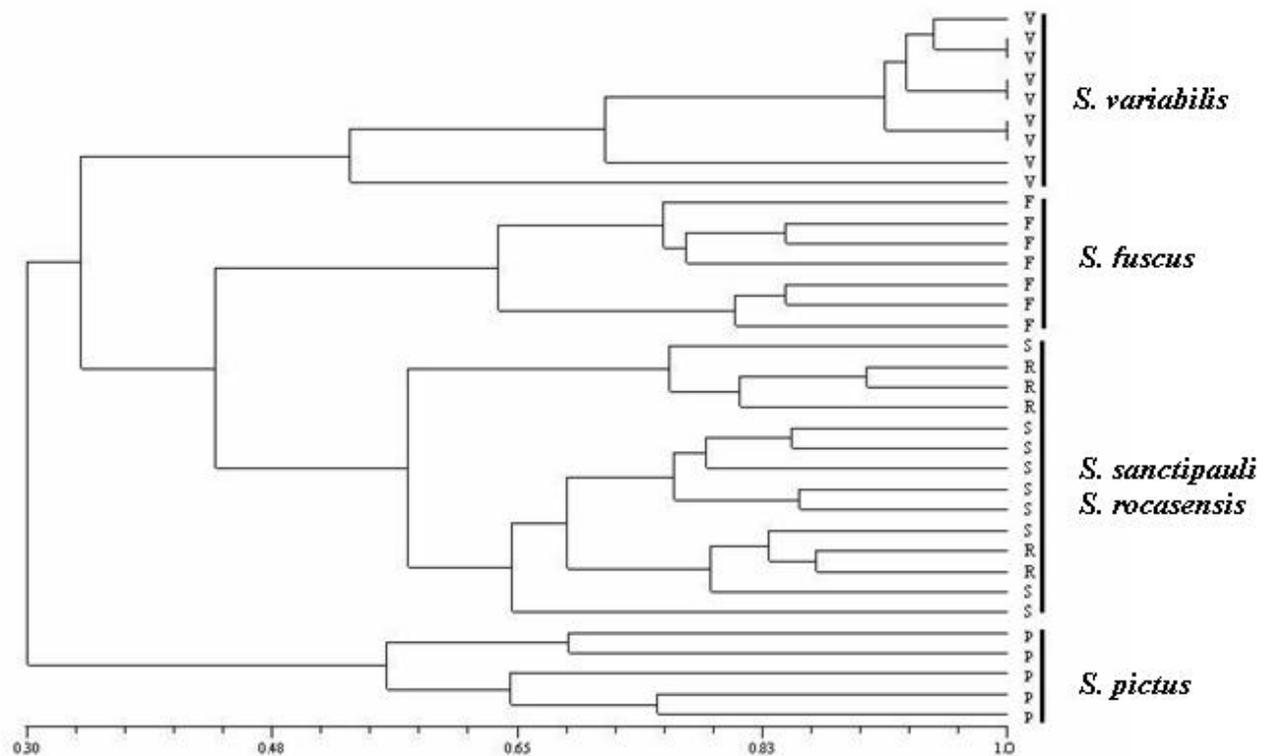


Figura 1 – Dendrograma de similaridade genética entre as espécies de *Stegastes*, baseado no Coeficiente de Jaccard, mostrando a formação de quatro *clusters*.

Resultados

O nível de similaridade genética foi obtido através da amplificação de DNA das espécies, por meio da técnica de RAPD-PCR, utilizando quatro *primers* decâmeros selecionados (C06, C07, D02 e D03). A amplificação das amostras revelou a existência de um grupo de bandas que são compartilhadas pela maioria das espécies e outras bandas espécie-específicas.

O dendrograma gerado pela análise em conjunto dos 4 primers identificou a presença de quatro *clusters*, sendo: um com representantes de *S. variabilis*; um segundo para *S. fuscus*; outro com *S. rocasensis* e *S. sanctipauli* e um quarto para *S. pictus*. Além disso, a análise também aponta uma maior similaridade entre a espécie costeira *S. fuscus* com as duas espécies insulares. Além disso, pode-se ressaltar o alto grau de similaridade entre as duas espécies insulares, de forma que

Espécies	<i>S. variabilis</i>	<i>S. fuscus</i>	<i>S. sanctipauli</i>
<i>S. variabilis</i>	*****	85,10%	76,45%
<i>S. fuscus</i>	16,13%	*****	85,57%
<i>S. sanctipauli</i>	26,86%	15,59%	*****

estas espécies ficaram agrupadas em um mesmo *cluster* (figura 1).

Tabela 1 – Valores encontrados para identidade e distância genética de Nei (1972). Acima da diagonal a identidade genética e abaixo a distância genética.

A estimativa de fluxo gênico entre as espécies foi determinada pelo número de migrantes por geração (Nm). O Nm encontrado entre as espécies, *S. fuscus*, *S. variabilis* e *S. sanctipauli*, utilizado nas análises populacionais foi de 0,57 migrantes por geração, o que demonstra um fluxo gênico incipiente ou inexistente entre as espécies, visto que é necessário pelo menos um migrante por geração para que haja um potencial fluxo entre diferentes populações (CRESPO; SOARES-GOMES, 2002). O cálculo da identidade genética e distância genética de Nei (1972) entre as espécies, revelou que *S. fuscus* tem uma maior identidade genética com *S. sanctipauli* em comparação à *S. variabilis*, o que também se reflete na distância genética apresentada para as espécies (tabela 1).

Discussão

De acordo com Crespo e Soares-Gomes (2002) o processo de especiação é um processo de conversão de variação entre os indivíduos dentro de uma população, em variações entre populações no tempo e no espaço. Geneticamente, este processo pode ocorrer pela ação de seleção natural disruptiva, produzindo divergência na composição genotípica de populações geográficas, que, conseqüentemente, ficam mais homogêneas dentro de cada região enquanto sofrem diferenciação

entre regiões distintas; deriva genética, sob a qual as populações geográficas sofrem perda de variação gênica, mas sendo o processo estocástico, diferentes populações terão diferentes genótipos fixados. O processo depende, no entanto, de que a migração entre as populações seja limitada o suficiente para prevenir a homogeneização devido ao fluxo gênico. Neste caso, o processo pode ser desencadeado pelo isolamento geográfico entre as populações, sendo denominado como alopátrico. Barreiras geográficas como rios e marés funcionam como impedimento ao fluxo gênico (ROCHA, 2003), que pode ser considerado pouco efetivo se for a número inferior a um indivíduo por geração.

Na costa do Brasil, diferentes aspectos ligados à dispersão, migração, variabilidade genética, especiação e evolução de grupos, com populações distribuídas ao longo da costa ou em ilhas oceânicas, ainda não foram quantificados (MOLINA, 2000). Até recentemente, os estudos sobre a biologia e distribuição de espécies no Atlântico Sul apresentavam-se pouco informativos. Somente no final da década de 90, um aumento da exploração e coletas de espécimes resultou na publicação de novas informações sobre a distribuição geográfica de algumas espécies (JOYEUX *et al.*, 2001). Grandes áreas de interesse biogeográfico no Atlântico Sul ainda são muito pouco conhecidas, entre estes ambientes, encontram-se as ilhas oceânicas, com uma fauna recifal de diversidade de espécies reduzida e apresentando efeitos do isolamento (FLOETER; GASPARINI, 2000). Considerando que as ilhas variam de idade de formação, tamanho e distância da costa, estudos comparativos entre suas faunas podem revelar informações consideráveis sobre os padrões de evolução e distribuição das espécies marinhas (ROBERTSON, 2001).

Não está claro em Pomacentridae se o fluxo gênico interpopulacional obedece ao modelo proposto por Wright (1969), onde as populações estariam estratificadas em ilhas reprodutivas, onde os migrantes representariam uma amostra casual do total de espécies, ou o modelo *stepping-stone*, proposto por Kimura (1953), onde existiria um intercâmbio de indivíduos entre populações próximas estando às razões da diferenciação correlacionada positivamente com a distância entre elas.

Dentro dos Pomacentridae, o gênero *Stegastes* é motivo de uma considerável controvérsia sobre a origem das espécies insulares *S. rocasensis*, endêmica do Atol das Rocas e Fernando de Noronha e de *S. sanctipauli*, endêmica do Arquipélago São Pedro São Paulo. *S. variabilis* e *S. fuscus*, tem sido apontadas em diferentes trabalhos como as espécies com maior relação filogenética com as espécies insulares.

Molina (2000) em estudos utilizando dados merísticos e morfométricos através de componentes principais e variáveis canônicas, realizados em *S. fuscus*, *S. variabilis*, *S. rocasensis*, *S. sanctipauli* e *S. pictus*, confirmou esta última como sendo a espécie mais divergente. *S. rocasensis* apresentou-se mais próxima às espécies continentais, enquanto *S. sanctipauli* apresentou-se mais diferenciada. O autor destaca, de forma geral o conservadorismo morfológico entre as espécies, as quais só são facilmente diferenciadas na fase juvenil. Os resultados encontrados por Molina (2000) não invalidam uma colonização simultânea ou em momentos diferentes das duas ilhas por uma espécie costeira, contudo o grau de similaridade entre as espécies insulares torna mais plausível a hipótese de especiações seqüenciais (stepping-stones), a partir de estoques ancestrais de *S. variabilis* do litoral. Primeiro com surgimento de *S. rocasensis* e derivada desta, *S. sanctipauli*, corroborando com a hipótese de Lubbock e Edwards (1981).

Os dados obtidos com uso de marcadores moleculares do tipo RAPD, demonstraram uma maior similaridade genética das espécies insulares *S. rocasensis* e *S. sanctipauli*, com *S. fuscus*, contrapondo-se à hipótese da espécie continental basal ser *S. variabilis* e corroborando a hipótese de Menezes e Figueiredo (1985).

Um aspecto que parece identificado através de similaridades genômicas refere-se ao alto grau de proximidade filogenética entre as duas espécies insulares. Tal fato é diagnosticado pela metodologia empregada através do agrupamento das formas insulares em um mesmo *cluster*, indicando uma divergência aparentemente recente entre estas espécies. O dendrograma gerado através dos índices de similaridade, utilizando-se matrizes conjugadas de quatro *primers* arbitrários está em acordo com os dados encontrados por Molina (2000) que indica uma condição plesiomórfica para *S. pictus*.

Apesar de o presente estudo apontar para uma relação filogenética mais próxima de *S. fuscus* com as espécies insulares *S. sanctipauli* e *S. rocasensis*, assim como um alto nível de similaridade entre estas duas espécies insulares, faz-se necessária à realização de estudos adicionais aumentando o número de marcadores moleculares como o DNAm e microssatélites que permitam inferir com maior clareza o grau de similaridade genética e relações filogenéticas entre estas espécies.

Agradecimentos

Os autores são gratos a SECIRM, pelas facilidades para a coleta de exemplares e permanência no Arquipélago de São Pedro e São Paulo, bem como a UFRN e CNPq pelo suporte financeiro para a execução do trabalho.

Referências

- ALLEN, G.R. **Damselfishes of the South Seas**. Neptune City, NJ: T.F.H. Publications, 1975.
- BARMAN, H.K., GARAT, A., YADAV, B.M., BANERJEE, S., MEHER, P.K., REDDY, P.V.G.K., and JANA, R.K. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. **Aquaculture**, v.217, p. 115-123, 2003.
- BIELAWSKI, J.P. and PUMO, D.E. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. **Heredity**, v.78, p. 32-40, 1997.
- CALLEJAS, C. and OCHANDO, M.D. Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. **Journal of Fish Biology**, v.53, p. 208-215, 1998.
- CRESPO, R.P. e SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002.
- EMERY, A. R. A new specie of damselfish (Pices: Pomacentridae) from the Estern Coast of South America. **Copeia**, v.4, p. 330-335, 1972.
- FLOETER, S.R., and GASPARINI, J.L. The southwestern Atlantic reef fish fauna: composition and zoogeographic patterns. **Journal of Fish Biology**, v. 56, p. 1099-1114, 2000.
- JANG-LIAW, N.-H., TANG, K.L., HUI, C.-F., SHAO, K.-T. Molecular phylogeny of 48 species of damselfishes (Perciformes: Pomacentridae) using 12S mtDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.25, p. 445–454, 2002
- JOYEUX, J.C., FLOETER, S.R., FERREIRA, C.E.L., and GASPARINI, J.L. Biogeography of tropical reef fish: the South Atlantic puzzle. **Journal of Biogeography**, v.28, p. 831-841, 2001.
- KIMURA, M. (1953). “Stepping-stones” model of population. **Annual Report of The National Institute of Genetic**, Japan, v. 3,p. 62-63, 1953.

LIU, Z.J., ARGUE, B.J and DUNHAM, R.A. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. **Aquaculture**, v.174, p. 59-69, 1999.

LUBBOCK, R. and EDWARDS, A. The Fishes of Saint Paul's Rocks. **Journal of Fish Biology**, v.8, p. 135-157, 1981.

MENEZES, N. A. e FIGUEIREDO, J. L. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. V. Teleostei (4)**, São Paulo: Museu de zoologia, Universidade de São Paulo, 1985.

MOLINA, W. F. Análise da diversidade genética na família Pomacentridae (Pisces, Perciformes), utilizando métodos combinados de citogenética, marcadores moleculares e morfometria. **Tese** (doutorado em Genética e Evolução), UFSCar, São Carlos, 2000.

REIS, S.F., PESSOA, L.M. and STRAUSS, R.E. Application of size-free canonical discriminant analysis to studies of geographic differentiation. **Revista Brasileira de Genética**, v.13, n.3, p. 509-520, 1990.

ROBERTSON, D.R. Population maintenance among tropical reef fishes: inferences from small-island endemics. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.98, p.5667-5670, 2001. *Apud*: JOYEUX, J.C., FLOETER, S.R., FERREIRA, C.E.L., and GASPARINE, J.L. Biogeography of tropical reef fish: the South Atlantic puzzle. **Journal of Biogeography**, v. 28, p.831-841, 2001.

ROCHA, L.A. Ecology, the Amazon Berrier, and Speciation in Western Atlantic *Halichoeres* (Labridae). **Tese de doutorado**, University of Florida, Gainesville, 2003.

ROHF, J. **Numerical Taxonomy and multivariata analysis system NTSYS manual version 1.60**, Exeter software New York: State University of New York, 1990.

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

TANG, K.L., MCNYSET, K.M. and HOLCROFT, N.I. The phylogenetic position of five genera (*Acanthochromis*, *Azurina*, *Chrysiptera*, *Dischistodus*, and *Neopomacentrus*) of damselfishes (Perciformes: Pomacentridae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.30, p. 823-828, 2004.

WRIGHT, S. (1969). **Evolution and the genetics of populations. v.2. The theory of gen frequencies.** University of Chicago Press, Chicago. *Apud.* Molina, W. F. Análise da diversidade genética na família Pomacentridae (Pisces, Perciformes), utilizando métodos combinados de citogenética, marcadores moleculares e morfometria. **Tese** (doutorado em Genética e Evolução), UFSCar, São Carlos, 2000.

YEN, F.C.; BOYLE, T.; YEH, Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE Version 1.31: Microsoft Window based freeware for population genetic analysis.** University of Alberta and Center for international Forestry Research, 1999.

Eurico Azevedo Dias Júnior

Endereço Eletrônico: euricoufrn@yahoo.com.br

Base de Pesquisa: Laboratório de Genética de Recursos Marinhos

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