

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**

***Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução***

**Marcadores moleculares na análise de espécies e composição  
populacional de peixes marinhos de recifes de corais  
da Família Pomacanthidae (Perciformes)**

**Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso**

Tese de Doutorado, apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas), área de concentração: Genética e Evolução

**São Carlos**

**2004**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

A257mm

Affonso, Paulo Roberto Antunes de Mello.

Marcadores moleculares na análise de espécies e composição populacional de peixes marinhos de recifes de corais da família Pomacanthidae (Perciformes) / Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

158 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Genética de populações. 2. DNA. 3. RAPD. 4. Microsatélites. 5. Dispersão. I. Título.

CDD: 574.15 (20<sup>a</sup>)

**Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.**

**Orientador**

*Aos meus pais pelo apoio incondicional,  
dedicação e amor dispensados*

*“O que distingue um cientista de um não-cientista é o fato de que o primeiro confessa imediatamente a própria ignorância. De fato, só à base dela é que surge seu desejo de conhecer. Se soubesse tudo não se colocaria nenhuma pergunta, não se daria início à pesquisa nenhuma.”*

*Heinz von Foerster*

*“Frequentemente, as metodologias científicas forneceram exemplos de moralidade científica, de prontidão à mudança, de busca da verdade como fim e não como meio. O homem não é, nem nunca será, o deus diante de quem outro homem deve ajoelhar-se. Nenhum homem, portanto, jamais será onisciente. Isso vale, antes de mais nada, para os cientistas.”*

*Mauro Maldonato*

## **Agradecimentos**

Primeiramente, quero agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela aprovação do projeto e concessão da bolsa, sem a qual esse trabalho não poderia ser realizado;

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução pela oportunidade oferecida;

Ao meu orientador Pedro Manoel Galetti Jr. que, mais uma vez, depositou sua confiança em mim na execução desse projeto, ainda que à distância durante um certo período. Aproveito para reiterar minha admiração e a satisfação pessoal dessa parceria;

Ao professor e amigo Wagner Franco Molina da Universidade Federal do Rio Grande do Norte por ter me recebido tão bem durante minha estadia em seu laboratório, compartilhando não só a sua amizade, mas os ensinamentos e conhecimentos, resultando em inúmeros trabalhos, projetos e lembranças. As palavras seriam poucas para expressar minha gratidão;

Ao professor Francisco de Assis Maia-Lima, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, que juntamente com o Prof. Wagner, foi o responsável pelo acolhimento caloroso em Natal e por me mostrar o melhor da cultura potiguar. Em pouco tempo, se tornou a minha referência familiar a milhares de quilômetros do meu lar original. Todo o meu respeito e admiração;

À minha família que sempre me apoiou, incentivou, fortaleceu e ajudou, mesmo que muitas vezes com o coração apertado quando eu tinha

que participar de expedições, mergulhos e outras “viagens”. Espero um dia retribuir tudo o que vocês fizeram e fazem por mim;

A todos, absolutamente todos, os colegas e amigos que fiz durante cerca de dois anos que permaneci em Natal. Todos vocês são especiais e inesquecíveis, mas prefiro não correr o risco de enumerá-los e deixar alguém de fora, o que seria injusto. Porém devo destacar os membros do “quarteto fantástico”: Delanne, Themis e Gustavo, amigos de profissão e coração – a saudade é imensa!

Também quero agradecer aos amigos que compartilharam comigo o esforço nas coletas, vibrando quando ela era bem sucedida e se desesperando quando aquele parou quase foi pego, mas fugiu...;

Mais antigos, mas não menos queridos, agradeço aos colegas da Universidade Federal de São Carlos pelo convívio, pela ajuda no laboratório, pelos conselhos, puxões de orelha, incentivos e desabafos, em especial ao quarteto Terumi, Ka, Pat e Celinha;

À amiga, irmã e colega Deborinha, membro principal da minha família São Carlense. Passamos juntos por tantas coisas que só serviram para mostrar o valor de uma amizade profunda e sincera. Conte sempre comigo;

À super Lelê, amiga de todas as horas, seja no laboratório, nas baladas, nas crises, nas viagens, que como se não bastasse toda a ajuda dispensada, ainda me proporcionou uma estadia maravilhosa em Bonito;

Ao amigo e colega Mercival por me ajudar nas análises dos microssatélites, géis e afins e pelas discussões teóricas e enriquecedoras;

Ao também colega e amigo Vitor que, mesmo não estando mais em nosso laboratório, teve um papel essencial nas minhas análises de RAPD e na elaboração dos dendrogramas. Estou devendo essa, Vitinho;

Aos colegas e novos amigos mais recentes do laboratório de citogenética que tive o prazer de conviver após minha chegada de Natal, como Eli, Elô, Marc, Wellington, Priscila, Marilena, Carol, Michelle, Allyson entre outros que junto com os mais “velhinhos” (Carol Garcia e cia.) tornam o ambiente de trabalho prazeroso e também divertido;

Aos amigos Luciano e Heloisa que me acompanham há muito tempo e se tornaram meus irmãos e companheiros de muitos mergulhos;

À amiga de ontem, hoje e amanhã, Ritinha, pela ajuda e amizade inquestionáveis, estando perto ou longe, concordando ou não (geralmente não) com as minhas idéias e atos, mas sempre ao meu lado;

Às super eficientes secretárias do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da UFSCar, Rose, Tati e Rejane, por tudo o que fizeram por mim e pela paciência com os meus pedidos “pra ontem”;

Aos membros da banca examinadora (Prof. Dr. Wagner Franco Molina - UFRN, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Luciana de Almeida Regitano - UFSCar, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lurdes Foresti de Almeida-Toledo - USP e Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito - UFSCar) pela apreciação desse trabalho;

E, por fim, ao Vitor Hugo Miguez, uma pessoa realmente especial que se tornou, em pouco tempo, imprescindível no meu caminhar e que, junto à sua família, tem me ajudado a não perder o rumo. Você sabe o que eu sinto...

## Sumário

<b>Resumo</b>	i
<b>Abstract</b>	ii
<b>1 Introdução</b>	1
1.1 <i>Diversidade e padrões de distribuição de peixes recifais</i>	2
1.2 <i>Dispersão e composição populacional de peixes marinhos</i>	9
1.3 <i>Marcadores moleculares de DNA</i>	15
1.4 <i>As famílias Pomacanthidae e Chaetodontidae</i>	20
<b>2 Justificativa e Objetivos</b>	27
<b>3 Material e Métodos</b>	29
3.1 <i>Material</i>	30
3.2 <i>Métodos</i>	35
3.2.1 <i>Extração de DNA</i>	35
3.2.2 <i>Obtenção de padrões multilocus de RAPD</i>	35
3.2.3 <i>Análise eletroforética de RAPD</i>	39
3.2.4 <i>Análises estatísticas de RAPD</i>	39
3.2.5 <i>PIMA (PCR-based Isolation of Microsatellite Arrays)</i>	42
3.2.5.1 <i>Amplificação de fragmentos do tipo RAPD</i>	42
3.2.5.2 <i>Purificação do DNA</i>	43
3.2.5.3 <i>Ligação do DNA purificado com o plasmídeo</i>	44
3.2.5.4 <i>Transformação</i>	44
3.2.5.5 <i>Seleção dos clones candidatos a microssatélites</i>	46
3.2.5.6 <i>Mini-preparação</i>	47
3.2.5.7 <i>Seqüenciamento das amostras</i>	48
3.2.5.8 <i>Delineamento de primers das seqüências flanqueadoras e identificação de locos microssatélites polimórficos</i>	49

3.2.5.9	<i>Avaliação do polimorfismo populacional por microssatélites</i>	51
3.2.6	<i>Análises estatísticas de loco microssatélite</i>	52
<b>4.</b>	<b>Resultados</b>	53
4.1	<i>Relações intra-específicas</i>	54
4.1.1	<i>Holacanthus ciliaris</i>	54
4.1.2	<i>Holacanthus tricolor</i>	59
4.1.3	<i>Pomacanthus arcuatus</i>	62
4.1.4	<i>Pomacanthus paru</i>	66
4.1.5	<i>Centropyge aurantonotus</i>	71
4.1.6	<i>Chaetodon striatus</i>	74
4.2	<i>Relações interespecíficas</i>	80
4.3	<i>Ensaio da metodologia PIMA</i>	83
4.3.1	<i>Pomacanthus paru</i>	83
4.3.2	<i>Holacanthus ciliaris</i>	90
4.4	<i>Análise populacional em P. paru com o loco Pp02</i>	92
<b>5.</b>	<b>Discussão</b>	95
5.1	<i>Estudos da variabilidade genética em Pomacanthidae e Chaetodontidae por RAPD</i>	96
5.1.1	<i>Análises populacionais das espécies de Pomacanthidae e Chaetodontidae do litoral Brasileiro</i>	99
5.1.2	<i>Análises Interespecíficas</i>	108
5.2	<i>Isolamento e análise populacional por microssatélites</i>	112
<b>6</b>	<b>Conclusões</b>	117
<b>7</b>	<b>Referências bibliográficas</b>	119
<b>8</b>	<b>Apêndice</b>	138

## Resumo

A costa brasileira apresenta cerca de 8.000 Km de extensão. Ao longo do litoral, diversos ecossistemas marinhos podem ser encontrados e determinam uma ictiofauna rica tanto em diversidade quanto quantidade de espécies. Os ambientes recifais são caracterizados como os maiores responsáveis por tal abundância. Paradoxalmente, estudos genéticos que procurem caracterizar as muitas de suas espécies e populações são praticamente ausentes no Brasil. Com base nessas premissas, esse trabalho teve como objetivos básicos analisar a estrutura populacional e a relação entre espécies de peixes marinhos em uma família de Perciformes comum nos recifes e importante para aquarioria – Pomacanthidae. As espécies selecionadas foram *Centropyge aurantonotus*, *Holacanthus ciliaris*, *H. tricolor*, *Pomacanthus arcuatus* e *P. paru*, com ocorrência ao longo de quase todo o litoral do Brasil, além de uma espécie adicional da família Chaetodontidae, intimamente relacionada com a enfocada nesse trabalho - *Chaetodon striatus*. Para tal, marcadores moleculares a partir da análise do DNA genômico por RAPD e microssatélites foram adotados. Os resultados obtidos com as análises por RAPD, a partir de um conjunto de *primers*, indicam que as espécies dessas famílias apresentam alta variabilidade genética, com diferenças interespecíficas e interpopulacionais. Marcas específicas foram detectadas em todas as espécies, úteis para a identificação e estabelecimento das relações filogenéticas das espécies. O dendrograma obtido permitiu distinguir cada espécie, revelando que aquelas do mesmo gênero estão intimamente relacionadas. Embora os valores de fluxo gênico e de identidade genética tenham sido relativamente altos nas comparações interpopulacionais, indícios de estruturação ao longo da Província do Brasil foram detectados, particularmente se considerarmos os valores de  $\phi_{st}$ . As espécies mais conspícuas ao longo do litoral, formando populações de distribuição mais ampla, foram as que apresentaram maior similaridade genética entre as regiões. Animais de isolados oceânicos não se mostraram tão diferenciados de populações costeiras, mas apresentaram variabilidade reduzida. A prospecção de microssatélites nas espécies *P. paru* e *H. ciliaris*, pelo método PIMA (*PCR isolation of microsatellite arrays*) permitiu a seleção de alguns locos microssatélites, informativos para abordagens populacionais. Os *primers* das regiões flangeadoras desses locos foram desenhados e foi verificado que um deles, denominado Pp02, é polimórfico e está presente nas espécies de *Pomacanthus* e *Holacanthus*. A análise populacional desse loco em *P. paru* revelou índices significativos de  $F_{st}$  e de diferenciação genética, condizentes com estruturação populacional. Esses dados, até então inéditos, são importantes para o manejo de conservação desses animais comercialmente explorados e permitem inferir padrões de dispersão e composição populacional das espécies recifais da Província Brasileira

## **Abstract**

The Brazilian coast extends over nearly 8,000km. Along the coastline, several marine ecosystems can be found and determine a rich ichthyofauna, regarding both diversity and number of species. The reef sites are characterized as the main reason for such abundance. As a paradox, genetic studies aiming to characterize the several species and populations from this environment are nearly absent in Brazil. Based on these statements, the major goals of the present work were to analyze the population structure and the relationship among marine fish species from a Perciform family, common at coral reefs and important for aquarium trade – Pomacanthidae. The selected species were *Centropyge aurantonotus*, *Holacanthus ciliaris*, *H. tricolor*, *Pomacanthus arcuatus* and *P. paru*, distributed over nearly all the Brazilian shore, besides another species from the family Chaetodontidae, closely related to that focused in this work - *Chaetodon striatus*. For that, molecular markers obtained from analyses of genomic DNA by RAPD and microsatellites were adopted. The results based on RAPD profiles, from a set of primers, indicate that species from both families show a high genetic variability, with inter-specific and inter-population differences. Specific marks were found in all species, useful for the establishment of phylogenetic relationships and taxonomical discrimination. The dendrogram generated allowed to distinguish each species, revealing that those from a same genus are more closely related. Albeit the values of gene flow and genetic identity were relatively high after inter-population comparisons, indications of structuring along the Brazilian Province were detected, particularly if we consider  $\phi_{st}$  values. The most conspicuous species along the coast, composing widely distributed populations, tended to exhibit greater genetic similarities among samples. Animals from oceanic isolates were not quite differentiated from inshore populations, but showed decreased variability. The isolation and characterization of microsatellites in the species *P. paru* and *H. ciliaris*, according to PIMA (PCR isolation of microsatellite arrays) methodology, allowed us to select several microsatellite loci, useful for population approaches. Primers flanking such regions were designed and it was verified that one locus, called Pp02 was polymorphic and it is present in *Pomacanthus* and *Holacanthus* representatives. The population analyses of the locus Pp02 in *P. paru* revealed significant values of  $F_{st}$  and genetic differentiation, in agreement with population structure hypothesis. These data, described for the first time, are useful for the conservation management of such exploited animals and for the inferences of dispersal and population composition of reef species from the Brazilian Province.

# 1. Introdução



Casal de *Holacanthus ciliaris* em recife de coral

### *1.1 Diversidade e padrões de distribuição de peixes recifais*

Os recifes de corais representam para os oceanos o mesmo que as florestas tropicais para as comunidades terrestres em termos de biodiversidade (Ray, 1988). São eles os responsáveis pela manutenção de uma porção significativa dos recursos pesqueiros dos países tropicais, incluindo o Brasil (Polunin & Roberts, 1996, Molina, 2000), pois constituem áreas de alta produtividade primária nas quais, freqüentemente, existem mares tropicais estéreis (Lowe-McConnel, 1999).

Reconhecidamente, os ambiente recifais compõem o ecossistema marinho de maior complexidade e riqueza ictiofaunística. Aparentemente, a radiação dos peixes recifais ocorreu em conjunto com a dispersão dos corais (Paxton, 1995). As faunas de peixes mais ricas do mundo são encontradas no Oceano Pacífico, podendo incluir, por exemplo, mais de 1000 espécies, distribuídas em 241 famílias, só nas águas de Nova Guiné. O Atlântico, um oceano bem mais jovem, possui uma ictiofauna menos variada concentrada na costa oriental do continente Americano entre as isotermas de 20°C. Algumas regiões, como o Caribe, apresentam inúmeras espécies relacionadas com as do Pacífico Oriental, separadas pela formação relativamente recente do istmo do Panamá (Sale, 1991, Lowe-McConnel, 1999, Cox & Moore, 2000).

Várias hipóteses são elaboradas para explicar a ictiofauna tão diversificada encontrada nas zonas recifais. Sugere-se que a predação em áreas associadas aos recifes exerce um papel fundamental na diversidade de peixes, servindo de refúgio para espécimes jovens, garantindo o

recrutamento dos indivíduos na fase adulta e mantendo assim os altos níveis de densidade populacional. Tanto que recifes com escassez de ambientes não-recifais ao redor costumam ter menor riqueza de espécies (Ayal & Safriel, 1982). Além disso, os recifes oferecem uma enorme variedade de nichos ecológicos, talvez mais que qualquer outro biótopo (Lowe-McConnell, 1999). Mesmo assim, há muita sobreposição na utilização de recursos e muitos casos conhecidos de espécies de recifes com requisitos ecológicos quase idênticos. O recrutamento estocástico, onde espécies de um grupo particular com requisitos comparáveis têm acesso a um determinado recife após a fase larval pelágica e a partilha de recursos são hipóteses elaboradas para explicar tais evidências (Sale, 1977, 1978).

De qualquer modo, a fixação dessa diversidade parece ter sido alcançada pelo período relativamente longo da existência dos recifes atuais, há cerca de 50 milhões de anos ou mais, no início do Terciário com muitos remontando ao Eoceno (Paxton, 1995, Bellwood, 1996).

Porém, os gradientes de diversidade marinha nos recifes de corais, claramente detectados, parecem ter uma origem comparativamente recente (Cox & Moore, 2000).

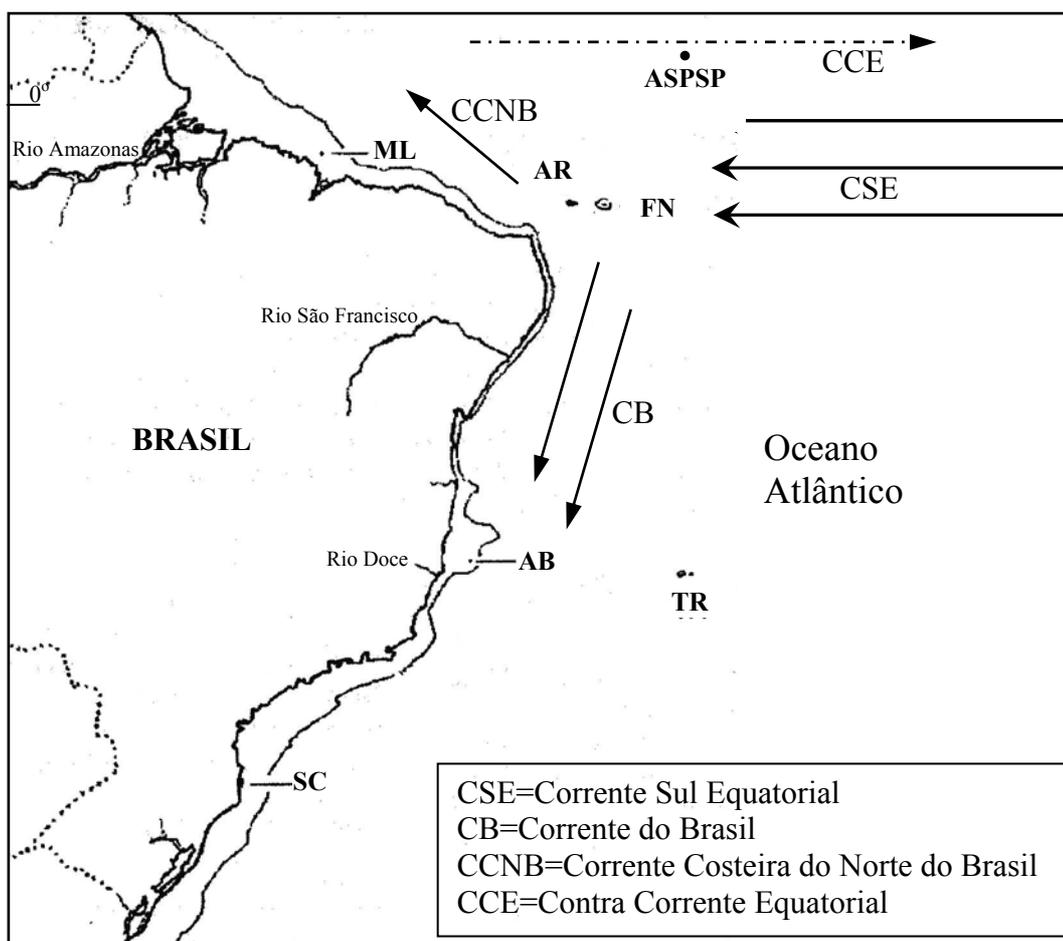
Adicionalmente, as áreas recifais não são homogêneas nem constantes, compondo um ambiente extremamente fragmentado, com uma série de habitats distintos por vários fatores físicos altamente mutáveis. Todas essas características são resultantes de um equilíbrio entre crescimento ativo, mortalidade contínua, erosão e atividades tectônicas, tornando os recifes efêmeros no tempo geológico. (Sale, 1991). A mutabilidade e a complexidade estrutural dos recifes devem ser consideradas quando

procuramos entender a biologia e ecologia dos peixes recifais, altamente especializados (Leis, 1991). O grau de especialização dos peixes nesse ambiente é normalmente explicado por essa diversificação de nichos e por processos coevolutivos entre espécies que interagiram por espaço ou recursos alimentares (Molina, 2000).

Na costa do Brasil (com cerca de 8.000km), entre as muitas de suas macro e micropartições ambientais, as zonas recifais se destacam, agregando uma rica ictiofauna de relevância ecológica e econômica. Elas constituem uma formação que abrange 3.000km do Nordeste ao Sudeste do Brasil. Essa faixa de distribuição está situada dentro da Província Brasileira, que se inicia no delta do Rio Orinoco (Venezuela), inclui toda a costa Nordeste da América do Sul, bem como as ilhas oceânicas de Fernando de Noronha, Atol das Rocas, Arquipélago de São Pedro e São Paulo e Trindade, e termina no Sul de Cabo Frio (Briggs, 1974, Vazzoler *et al.*, 1999). Recentemente, esses limites foram estendidos até o litoral de Santa Catarina (Floeter *et al.*, 2001). Dos pontos oceânicos citados, alguns merecem maior destaque pelas peculiaridades apresentadas.

O Atol das Rocas constitui o único atol do Atlântico Sul, localizado a 267km da costa do Brasil, separado por profundidades de até 3.000m. É composto por um anel de recifes ao redor de uma rasa laguna interna. Essa formação, na verdade, é o topo de uma montanha submersa. Mais a Nordeste, está Fernando de Noronha, representando a única massa de terra diretamente entre o Atol e a costa Africana, já que as ilhas de Ascensão e Santa Helena estão a Sudeste. Nessa região, o fluxo principal de correntes segue, com origem na costa da África, em direção ao continente Sul-americano, passando diretamente na região de Atol das

Rocas e São Pedro e São Paulo. Essa é uma corrente constante e relativamente quente que, ao encontrar a costa Nordeste do Brasil (na altura do Cabo de São Roque), divide-se, formando a corrente do Brasil em direção Sul, e a corrente Costeira do Norte do Brasil, em direção oposta à anterior (Edwards & Lubbock, 1983, Sales, 1992, Vazzoler *et al.*, 1999) (figura 1).



**Figura 1:** Mapa da costa brasileira, indicando os limites de distribuição das áreas recifais desde Parcel Manuel Luiz/MA (ML) até Santa Catarina (SC), complexos insulares (ASPSP=Arquipélago de São Pedro e São Paulo, FN=Fernando de Noronha, AR=Atol das Rocas, TR=Trindade, AB=Abrolhos) e as principais correntes marítimas do Atlântico Sul

O Arquipélago de São Pedro e São Paulo constitui um remoto grupo de ilhotas logo acima da linha do Equador, situadas sobre a cordilheira

Meso-Atlântica. O ponto mais próximo do continente Americano é a costa do Rio Grande do Norte, compreendendo uma distância de 1.010km em mar aberto. Juntamente com as Ilhas de Ascensão e Santa Helena são as únicas ilhas tropicais sobre a cordilheira Meso-Atlântica, porém são diferenciadas dessas últimas por representarem um deslocamento de placas tectônicas que se elevaram até o nível do mar, e não o resultado de uma erupção vulcânica. Sua fauna é especialmente interessante pelo grau de isolamento geográfico, visto que os grandes espaços oceânicos atuam como fortes barreiras a novas colonizações. Sua diversidade de espécies é a menor já encontrada em ilhas tropicais. Um total de 60 espécies de peixes foi descrito na área, a maioria costeira. Surpreendentemente, embora sob efeito da corrente Sul-Equatorial, a fauna predominante pertence à Província Brasileira, com muitas espécies anti-atlânticas e poucas típicas da costa Africana. Ainda, devido ao isolamento populacional, o grau de endemismo é elevado em relação a outros complexos insulares, a exemplo das espécies *Stegastes sanctipauli* (Pomacentridae) e *Chaetodon obliquus* (Chaetodontidae), além de ocorrência de albinismos e padrões de coloração aberrantes em algumas espécies (Edwards & Lubbock, 1983, Luiz Júnior, 2003) (ver item 1.4).

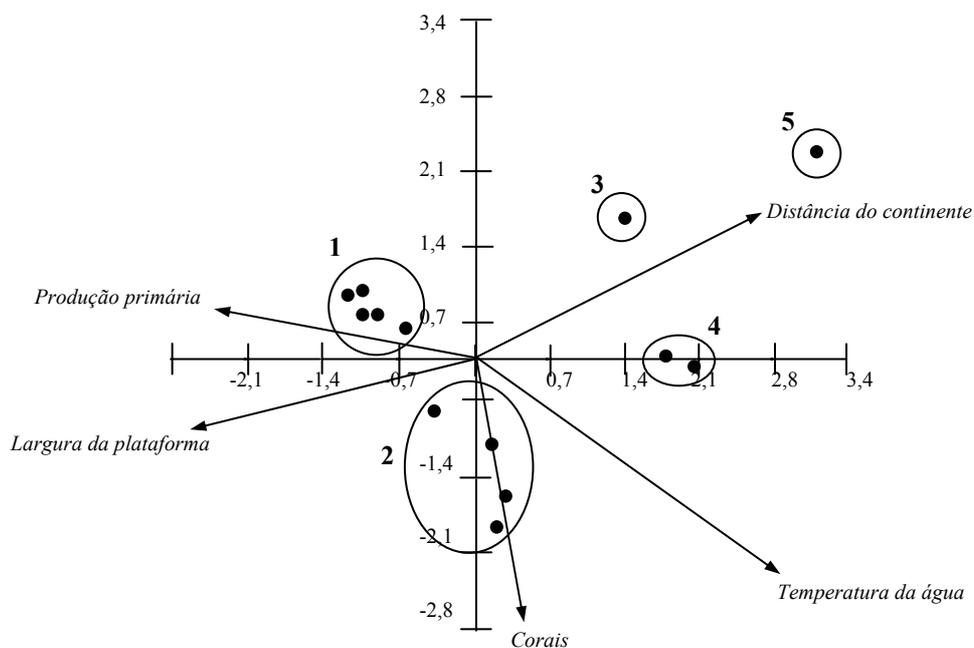
Na região costeira da Província Brasileira, já foram realizados vários levantamentos de ictiofauna recifal, sobretudo envolvendo o litoral Nordeste (Koike & Guedes, 1981, Rosa *et al.*, 1997, Rocha *et al.*, 1998). Esses estudos têm revelado uma alta diversidade desse grupo de peixes. Por exemplo, na costa da Paraíba foram identificadas 157 espécies, distribuídas em 59 famílias, das quais 69 delas nunca haviam sido formalmente registradas para a localidade e quatro representavam

novas espécies (Rocha *et al.*, 1998). Atualmente, um grande número de espécies endêmicas do Brasil é assinalado, determinando uma ictiofauna mais diferenciada e não uma simples continuidade da Província Caribenha, como pressuposto (Floeter & Gasparini, 2001). Estudos recentes indicam que a biogeografia de peixes de recifes do Atlântico Sul é muito mais complexa do que se imaginava, seguindo um padrão fragmentado de distribuição resultante, aparentemente, de eventos de especiação alopátrica e da interação entre capacidade dispersiva e processos ecológicos (Joyeux *et al.*, 2001).

Em análises recentes da ictiofauna de ambientes recifais ou rochosos do Brasil (Floeter & Gasparini, 2000, Floeter *et al.*, 2001, Joyeux *et al.*, 2001), foi verificada uma variação geográfica nas assembléias de peixes de recifes ao longo da costa, determinando cinco grandes agrupamentos ambientais:

1. litoral Sul e Sudeste (das ilhas de Guarapari - ES até Santa Catarina);
2. litoral Nordeste (do Parcel Manoel Luís – MA até Arquipélago de Abrolhos –BA);
3. Ilhas Oceânicas I: Trindade
4. Ilhas Oceânicas II: Atol das Rocas e Fernando de Noronha
5. Ilhas Oceânicas III: Arquipélago de São Pedro e São Paulo

Os três últimos grupos se caracterizam pela baixa produtividade primária, estando distintos entre si e dos demais pontos litorâneos. Esse estudo revelou que a variação na composição das espécies de peixes estava fortemente correlacionada com algumas variáveis ambientais comuns, conforme demonstrado na figura 2.



**Figura 2** (extraída e adaptada de Floeter *et al.*, 2001): Diagrama por ordenação CCA com sítios recifais (pontos) e variáveis ambientais (setas). O tamanho da seta indica sua importância relativa. Sítios 1 – litoral Sul e Sudeste, 2 – litoral Nordeste, 3 – Trindade, 4 – Atol das Rocas e Fernando de Noronha e 5 – Arquipélago de São Pedro e São Paulo

Ainda assim, ao contrário da ictiofauna recifal do Atlântico Norte, os peixes recifais da costa brasileira são pouco conhecidos sob diversos parâmetros. Isso tem determinado a dificuldade em se compreender a biogeografia, padrões de distribuição e composição populacional da ictiofauna do Atlântico tropical, especialmente do Atlântico Sul (Sale, 1991). Conseqüentemente, medidas de manejo para exploração racional e conservação dos estoques naturais ficam comprometidas. Essa situação ainda é agravada pela dificuldade, no ambiente marinho, em se avaliar a dispersão dos organismos, processos de fluxo gênico e especiação, justificando o emprego de análises mais detalhadas, incluindo genéticas, nessas espécies.

## 1.2 Dispersão e composição populacional de peixes marinhos

A estrutura genética das populações marinhas reflete a interação histórica e contemporânea entre uma série de processos ecológicos, demográficos, comportamentais, genéticos, oceanográficos, climáticos e tectônicos (revisados em Benzie, 1999). Os efeitos combinados desses mecanismos, atuando em escalas temporal e espacial, determinam as taxas e padrões de dispersão de zigotos, larvas e adultos. São esses movimentos, aliados à sobrevivência e sucesso reprodutivo dos imigrantes que, por sua vez, controlam a escala em que processos casuais (i.e. deriva genética) e deterministas (i.e. seleção natural) levarão à formação ou erosão da estrutura genética dentro e entre grupos de indivíduos (Grosberg & Cunningham, 2001).

Os níveis de variação genética interpopulacional de peixes marinhos são, em geral, inferiores aos encontrados em peixes dulcícolas. Esse fato parece estar associado às estruturas das populações das espécies marinhas, onde o fluxo gênico é menos restrito e a formação de barreiras geográficas é bem inferior à detectada em águas continentais. Com isso, têm-se grandes populações em ambiente marinho e uma maior tendência de homogeneização genética entre elas (Lacson, 1992, Ward *et al.*, 1994, Levy & Cassano, 1994).

Essa especulação é reforçada pelo padrão entre a grande maioria de peixes marinhos, especialmente os associados a recifes, do desenvolvimento de estágios larvais pelágicos (Smith, 1982, Wellington & Victor 1989). Além da relação com a biomassa e o fluxo de energia no ambiente marinho (Leis, 1991), a fase pelágica exerce influência sobre a distribuição das espécies, permitindo que elas colonizem áreas distantes

do local de origem dos parentais, não sendo rara a presença de estágios iniciais de várias espécies costeiras no meio dos Oceanos Atlântico e Pacífico (Scheltema, 1986).

Embora essa estratégia pareça representar uma adaptação vantajosa para espécies de habitats espacialmente limitados e sujeitos a extinções locais e à grande pressão predatória como os recifes (Levinton, 1995), a natureza das forças evolutivas responsáveis pela fixação de uma fase larval planctônica ou pelágica, normalmente oceânica, nesses animais permanece questionável. Além disso, a maioria das pesquisas sobre o estágio pelágico de peixes recifais foi realizada no Oceano Pacífico e a extrapolação dos achados entre as diferentes regiões pode ser errônea (Victor, 1991, Leis, 1991).

Bonhomme & Planes (2000) revisaram os argumentos evolutivos para explicar a manutenção desse padrão de distribuição em peixes coralinos. Eles afirmam que nenhuma das hipóteses até então elaboradas é capaz de prever totalmente a fixação da dispersão das espécies por larvas planctônicas e que, ao lado de eventos em larga escala, outros menores devem atuar, de modos diferentes sobre o intervalo pelágico, o que é refletido na taxas de migração e colonização.

Sabe-se hoje que o ambiente pelágico é absolutamente estruturado e os peixes recifais que ocupam esse meio não são uniformes nas suas interações com ele. Foi verificada que a duração da fase pelágica é espécie-dependente e provavelmente flexível, podendo variar de 9 a mais de 100 dias, o que algumas vezes implica na estruturação genética das populações de certas espécies (Leis, 1991).

Contribuindo para a complexidade do modelo, a maioria das características dos estágios pelágicos é investigada de forma generalizada por famílias de peixes, já que a identificação das espécies nessa fase é extremamente difícil (Leis, 1991). Assim, diferenças interespecíficas importantes podem ser mascaradas ou subestimadas. Por exemplo, análises em espécies de Chaetodontidae e Pomacentridae revelaram uma grande variação nos padrões de capacidade de natação, contribuindo para fluxos gênicos distintos dentro das populações e espécies (Stobutzki, 1998). Essa é uma das muitas evidências de que um papel comportamental das larvas, principalmente no final da fase pelágica, pode influenciar diretamente as taxas de dispersão e distribuição dos indivíduos (Leis, 1991, Danilowicz & Sale, 1999). Já foi demonstrado que as larvas de alguns peixes recifais podem retardar seu período pelágico até o assentamento, conseqüentemente permitindo que se dispersem mais amplamente que os invertebrados (de migração passiva) e alterem o fluxo gênico entre as localidades (Doherty *et al.*, 1995). Além desse fator, outros aspectos também vão influenciar a composição das populações de peixes coralinos, tais como local e época de desova dos adultos, condições hidrográficas (altamente variáveis), topografia do recife, padrões de distribuição vertical das larvas na massa d'água e história biogeográfica (ver Leis, 1991, Waters *et al.*, 2000).

O conjunto desses dados levou os primeiros geneticistas à predição de que os organismos marinhos com ampla distribuição exibiriam pouca estruturação genética ao longo de suas áreas de ocorrência, favorecidos pela grande capacidade de dispersão (Lacson, 1992). As taxas de fluxo gênico podem assim ser elevadas, inibindo diferenciações genéticas

locais (Levinton, 1995, Warner, 1997). Vários estudos genéticos em peixes e invertebrados marinhos sugerem que larvas amplamente dispersas são capazes de manter a coesão genética por longas distâncias (até 1.800km) (Aurelle *et al.*, 2003, Rocha *et al.*, 2002). Paralelamente, as populações costumam apresentar uma alta variabilidade genética, muitas vezes superior à variação interpopulacional, como detectado em espécies de diferentes famílias de peixes marinhos (Waples, 1998, Gold & Turner, 2002, Aurelle *et al.*, 2003).

No entanto, explicações envolvendo panmixia por grandes áreas devem ser interpretadas com cautela por uma série de razões (Grosberg & Cunningham, 2001, Fraser *et al.*, 2004):

1) A extensão da amostragem pode não revelar a princípio a diferenciação genética entre os estoques;

2) Contradição entre alguns trabalhos que, baseados em estudos por alozimas apontavam homogeneidade genética, e após o uso de marcadores de DNA foram capazes de detectar estruturação genética;

3) As relações entre dispersão e estrutura populacional requerem modelos indiretos de estimativa de fluxo gênico, baseados em premissas nem sempre realistas. Teorias fundamentadas em equilíbrio populacional são desafiadas por alguns exemplos surpreendentes de uniformidade genética em espécies com larvas demersais de baixo potencial dispersivo, contradizendo o modelo clássico de isolamento por distância. Nesses casos, hipóteses alternativas fora do equilíbrio devem ser consideradas. Por exemplo, na anêmona *Urticina equus* é proposto que um evento vicariante subdividiu recentemente populações até então panmíticas e que divergências decorrentes de efeitos de deriva podem não ter tido

tempo suficiente de se acumularem a níveis detectáveis (Solé-Cava *et al.*, 1994).

Eventos vicariantes não são raros no ambiente marinho e são capazes de alterar drasticamente os padrões genéticos das espécies, a exemplo do observado em fenômenos recentes ou mais antigos como o soerguimento do istmo do Panamá (Lessios, 1998).

Ao mesmo tempo, algumas espécies com grande capacidade de dispersão podem apresentar populações geneticamente diferenciadas ou únicas de acordo com os padrões de distribuição, como por exemplo, aquelas que se reproduzem em lagoas de atóis (Planes *et al.*, 1998).

De fato, conforme os estudos com marcadores genéticos são implementados em espécies marinhas têm sido possível detectar níveis elevados de variação e estruturação populacional e a presença de estoques naturais diferenciados em peixes desse ambiente (Tringali & Bert, 1996, Carvalho & Hauser, 1998, DeWoody & Avise, 2000, Gold & Turner, 2002).

Por exemplo, em espécies recifais do Golfo do México foi detectada uma fragmentação genética das populações, as quais podiam diferir dentro de alguns quilômetros de distância, devido, aparentemente, ao papel da seleção natural sobre as larvas e efeitos de deriva (Larson & Julian, 1999).

Outro estudo realizado em várias espécies de Perciformes do Caribe por Shulman & Bermingham (1995) ainda revelou parâmetros genéticos que não se adequavam à distribuição das populações, aos ciclos biológicos das espécies e nem ao padrão de correntes marítimas da área

estudada, indicando a participação de eventos biogeográficos remotos na constituição genética atual dessas espécies.

Igualmente, outros trabalhos destacam, entre os eventos já citados envolvidos na capacidade de dispersão das espécies marinhas, os aspectos filogeográficos, como proposto para o gênero *Amphiprion* (Pomacentridae). Nas espécies desse grupo, é sugerido que alterações históricas no nível do mar seriam responsáveis pela dispersão e estrutura genética dos indivíduos, revelando um sistema multifatorial na composição das populações atuais, aplicável a diversos organismos marinhos (Nelson *et al.*, 2000). Na espécie *Coris julis* (Labridae), análises genéticas com microssatélites e comparações com dados de DNA mitocondrial também relacionam dados biogeográficos com os padrões encontrados (Aurelle *et al.*, 2003).

A dificuldade em se encontrar um padrão consistente com o isolamento por distância em grandes escalas pode então ser devida a uma ruptura histórica da estruturação genética, causada por eventos como as glaciações do Pleistoceno, produzindo múltiplas barreiras à dispersão (Hellberg, 1995). Por sua vez, Hilbish (1996) ainda argumenta que muitas espécies marinhas de ampla dispersão, previamente consideradas desestruturadas, estão, na verdade, subdivididas em grupos geneticamente discretos. Essas populações diferenciadas seriam, portanto, um reflexo da interação de pressões seletivas locais com histórias evolutivas distintas. De fato, algumas evidências de fragmentações populacionais em espécies marinhas estão diretamente relacionadas com forças seletivas, limitando a ampla dispersão dos organismos. Essa hipótese tem sido utilizada, por exemplo, para explicar

diferenças interpopulacionais em *Dicentrarchus labrax* do Leste e Oeste do Mediterrâneo (Bahri-Sfar *et al.*, 2000). Na costa do Brasil, propostas similares foram elaboradas a partir da diferenciação entre populações do Nordeste e Sudeste de várias espécies de invertebrados, sugerindo que a região de Cabo Frio (23° S), pela ocorrência da ressurgência, represente uma forte barreira ambiental à dispersão (Silva, 1992, Maggioni *et al.*, 2003).

Em suma, os exemplos citados indicam que, mesmo quando há uma relação significativa entre a magnitude de subdivisão genética e distância geográfica, processos históricos e/ou vicariantes podem contribuir para o padrão espacial de estruturação populacional das espécies marinhas (Grosberg & Cunningham, 2001).

### **1.3 Marcadores moleculares de DNA**

A diversidade biológica envolve não somente a riqueza de espécies, mas a variação genética intra-específica, cujo conhecimento é essencial para a conservação e a utilização dos recursos genéticos naturais (Taberlet, 1998).

No ambiente marinho, o conceito de estoque é fundamental para a pesca e para o manejo de espécies ameaçadas. Somente a partir do entendimento da estrutura dos estoques, e de suas diferenças, podem ser designadas medidas apropriadas de manejo, sejam conservacionistas ou exploratórias (Begg & Waldman, 1999). Para obter tais informações sobre os estoques naturais é defendido o emprego de análises genéticas comparativas, uma abordagem ainda subestimada entre os peixes (Cagigas *et al.*, 1999, Waldman, 1999).

Diferentes metodologias podem ser adotadas e elas devem ser baseadas na eficiência esperada dentro de um problema específico, preferencialmente à aparente sofisticação do método em si (Burton, 1996). Nesse sentido podem ser destacadas as análises por RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) e de locos microssatélites (Shaklee & Bentzen, 1998, Sunnucks, 2000). Todos esses procedimentos são baseados no desenvolvimento da técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR), a qual representou um avanço sem igual para os estudos genéticos entre os seres vivos (Saiki *et al.*, 1988).

A utilização de um único *primer* curto (cerca de 10pb) de seqüência arbitrária para reações de amplificação por PCR, capaz de gerar um padrão de bandas normalmente polimórfico e informativo, constituiu um advento importante para a análise genética das populações e espécies (Wright, 1993). Essa metodologia, denominada RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) apresenta uma série de benefícios relacionados ao baixo custo, rapidez e, principalmente, por dispensar o conhecimento prévio das seqüências gênicas dos indivíduos, o que amplia de forma infinita as possibilidades de estudos de variabilidade genética dos organismos (Dinesh *et al.*, 1993, Fairbanks *et al.*, 1993). Em peixes, o procedimento de RAPD tem sido usado de forma extensiva fornecendo dados sobre diversidade e diferenciações populacionais (Mamuris *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 1999, Koh *et al.*, 1999), incluindo alguns casos de distinção interespecífica (Bardaki & Skibinski, 1994, Takagi & Taniguchi, 1995, Callejas *et al.*, 1998, Hatanaka & Galetti, 2003) e relações sistemáticas (Lehmann *et al.*, 2000). Em peixes neotropicais, os marcadores de RAPD têm sido úteis no manejo de espécies em

localidades sob ação antrópica, relacionando-se os dados de variabilidade genética com parâmetros ambientais (Sanchez, 2002, Wasko & Galetti, 2002, Hatanaka & Galetti, 2003) e identificando estruturação de populações (Prioli *et al.*, 2002, Leuzzi *et al.*, 2004).

Freqüentemente, mesmo espécies oceânicas, reconhecidas pela capacidade migratória e de dispersão, têm revelado a presença de estoques diferenciados a partir de estudos de RAPD, indicando que o fluxo gênico pode ser restrito, ao contrário da visão tradicional sobre a composição populacional dos animais desse ambiente (Gomes *et al.*, 1998, Chow *et al.*, 2000). A desvantagem desse método está limitada à dominância exercida pelos alelos presentes, alterando as estimativas de heterozigose, muito embora simplifiquem os cálculos de distância genética pela comparação entre presença e ausência de bandas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Já os microssatélites são seqüências simples de DNA formadas por até 8 nucleotídeos (de acordo com a maioria dos autores) repetidas em tandem, encontradas em todos os organismos e organelas atualmente conhecidos (Chambers & MacAvoy, 2000). Eles possuem uma série de características responsáveis pela eficiência dessa classe de DNA repetitivo nos estudos populacionais (Ryskov, 1999), com destaque para: (1) abundância e grande dispersão no genoma da maioria das espécies, facilitando a detecção de diferentes microssatélites e aumentando a probabilidade de encontrar sítios informativos para o propósito da análise; (2) co-dominância de alelos levando à identificação clara de heterozigotos; e (3) fragmentos curtos, não ultrapassando em média os 300pb (desse modo, elimina-se o inconveniente quanto ao limite de

amplificação por PCR e as chances de ocorrência de alelos nulos são diminuídas). Esses fatores, combinados ao multialelismo dos microssatélites, os colocam como o marcador molecular com maior conteúdo de informação de polimorfismo (O'Reilly & Wright, 1995, Ferreira & Grattapaglia, 1998), o que está relacionado à ocorrência de eventos de deleção, inserção e/ou duplicações no conjunto de repetições (Brohede & Ellegren, 1999). Adicionalmente, quanto maior o número de repetições de uma seqüência microssatélite, mais elevada é a taxa de mutação por *slippage*. Quando esse fenômeno ocorre, verifica-se uma tendência à expansão de microssatélites curtos e de encurtamento de seqüências longas, contribuindo assim como uma fonte adicional de variação (Lai & Sun, 2003).

O emprego de marcadores populacionais sensíveis, como os microssatélites, contribui sobremaneira para a detecção de estruturação genética populacional em peixes marinhos, já que eles geralmente apresentam diferenças restritas às frequências gênicas, e não à presença de alelos únicos para as populações como em muitas espécies continentais (Tringali & Bert, 1996). Além disso, os estudos indicam que os microssatélites são mais abundantes e maiores em vertebrados pecilotérmicos que nos animais de sangue quente (ver Chambers & MacAvoy, 2000), facilitando o uso desses marcadores nesses grupos. Ainda, dados comparativos entre diversos marcadores moleculares têm demonstrado que os microssatélites são capazes de fornecer uma informação genética mais detalhada que os demais métodos disponíveis (Bártfai *et al.*, 2003, Alarcón *et al.*, 2004). No caso das espécies marinhas, os microssatélites têm permitido uma análise mais fina da

variabilidade genética, revelando níveis de estruturação populacional até então subestimados (De Leon *et al.*, 1997, Shaw *et al.*, 1999, DeWoody & Avise, 2000), dados sobre sucesso reprodutivo (Colbourne *et al.*, 1996) e para melhoramento genético daquelas de interesse comercial (Perez-Enriquez *et al.*, 1999). Recentemente, o uso de microssatélites tem permitido verificar, como na espécie de salmonídeo *Salvelinus fontinalis*, que a estrutura populacional pode ser influenciada pela dispersão tanto através de tamanhos populacionais desiguais, como por fluxo gênico assimétrico e comportamento social da espécie (Fraser *et al.*, 2004).

A grande limitação do uso de marcadores do tipo microssatélite em espécies neotropicais é a escassez de seqüências disponíveis para a maioria dos grupos, de diferentes ordens, já que esses locos normalmente são espécie-específicos. Dessa forma, várias metodologias costumam ser adotadas para a obtenção de seqüências curtas de repetição e de suas regiões flaqueadoras que permitirão o delineamento de *primers* específicos para os estudos populacionais com esses marcadores (Zane *et al.*, 2003). Uma delas, denominada PIMA (*PCR-based Isolation of Microsatellite Arrays*), envolve a utilização da técnica de RAPD como base para a geração de inúmeros fragmentos do genoma da espécie em questão e posterior isolamento e caracterização das seqüências flaqueadoras de microssatélites. Esse método, além de eficaz, é vantajoso pela redução nos custos e no tempo de trabalho quando comparado a metodologias mais tradicionais, como o estabelecimento de bibliotecas genômicas totais, e requer pequenas quantidades de DNA (Lunt *et al.*, 1999). Essa metodologia foi adotada, por exemplo, em

várias espécies de Cipriniformes (Hsu *et al.*, 2004) e em peixes neotropicais do gênero *Prochilodus* (Hatanaka *et al.*, 2002), gerando a identificação de locos de microssatélites altamente polimórficos, muitos dos quais passíveis de amplificação interespecíficas dentro dos respectivos grupos.

Considerando as diferentes abordagens, pode-se concluir que esses marcadores são úteis para avaliação de estoques naturais ou cultivados de inúmeras espécies, direcionando medidas de manejo apropriadas para a manutenção da variação genética e dos níveis de heterozigosidade (Ferguson *et al.*, 1995, Colbourne *et al.*, 1996, Agnèse *et al.*, 1999). Sob o ponto de vista aplicado, os dados advindos podem servir ainda para seleção de reprodutores em criações comerciais (O'Reilly & Wright, 1995, De Leon *et al.*, 1998), além de possibilitar o estabelecimento de mapas genéticos e de QTLs (locos de caracteres quantitativos) (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Assim, os dados moleculares assumem importante papel no avanço do melhoramento genético das espécies aquáticas, na sua maioria ainda em processo inicial de domesticação (Gjedrem, 2000).

#### **1.4 As famílias Pomacanthidae e Chaetodontidae**

As famílias Pomacanthidae e Chaetodontidae pertencem à ordem Perciformes, a maior dentre os Teleósteos atuais com cerca de 9000 espécies, compreendendo 50% dos peixes conhecidos (Nelson, 1994). Os representantes dessa ordem são os mais abundantes nos recifes de corais.

Nove gêneros e mais de 80 espécies distribuídas pelos Oceanos Atlântico, Índico e Pacífico compõem os pomacantídeos (Chung & Woo,

1998). Elas podem ser reconhecidas facilmente pela presença de um forte espinho no ângulo do pré-opérculo (Johnson & Gill, 1995).

Os integrantes da família Pomacanthidae, popularmente conhecidos como peixes-anjos, são dotados de cores exuberantes e facilmente adaptáveis ao cativeiro (Menezes & Figueiredo, 1985). Por isso, grande parte das espécies é abordada em artigos para aquariofilia, estando entre os habitantes mais apreciados em aquários e gerando um comércio altamente lucrativo (Mills, 1993, Fenner, 1996). Por exemplo, Chapman *et al.* (1997) atestam que a comercialização de peixes ornamentais é o segmento de maior crescimento da aquicultura norte-americana, onde os peixes marinhos representam 20,2% do total negociado.

Para sustentar tal comércio, onde um único exemplar pode chegar a valer U\$ 150,00, esses peixes são retirados em larga escala dos seus habitats naturais, enquanto a reprodução em cativeiro permanece em caráter experimental (Almada-Villela, 1995). Algumas espécies já começam a sofrer os efeitos dessa atividade, como por exemplo no litoral capixaba, onde as populações vêm decrescendo rapidamente, particularmente em *Centropyge aurantonotus* e *Holacanthus ciliaris* (Floeter & Gasparini, 1999).

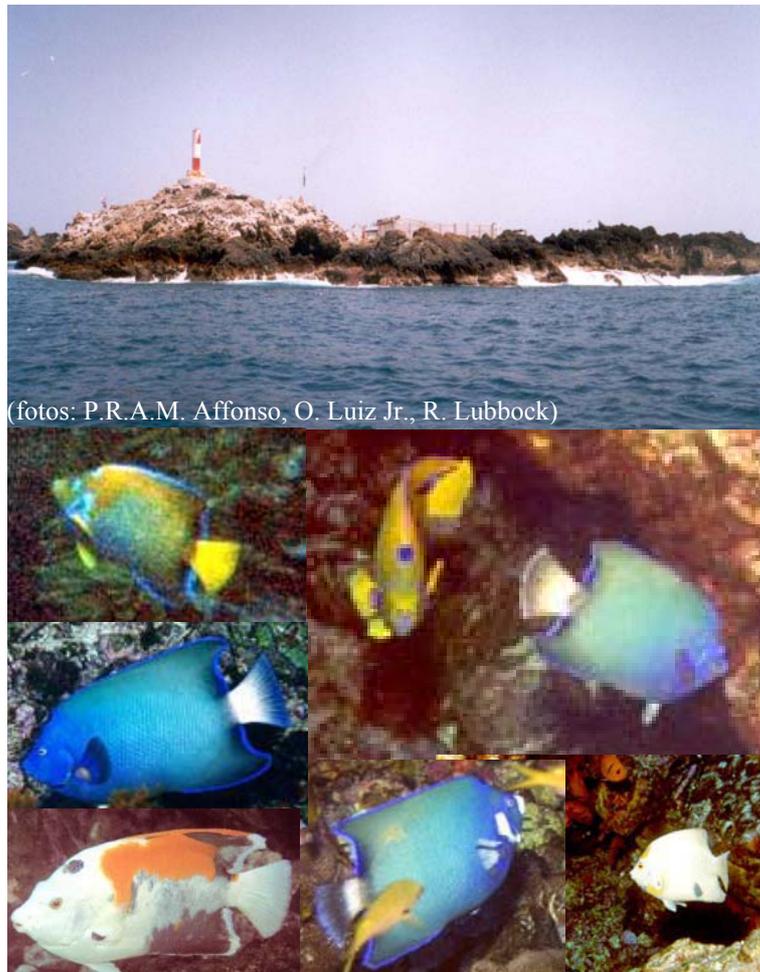
As cinco espécies de Pomacanthidae registradas na costa do Brasil - *Centropyge aurantonotus*, *Holacanthus ciliaris*, *H. tricolor*, *Pomacanthus arcuatus* e *P. paru* (figura 3) - estão distribuídas, ainda que de forma descontínua, por regiões de fundos rochosos e coralinos desde a América do Norte até o Sudeste/Sul brasileiro, além das ilhas oceânicas (Robins *et al.*, 1986, Rocha *et al.*, 1998). Todas elas são comercialmente exploradas na aquariofilia visando tanto o mercado

interno como externo, onde podem atingir valores representativos. Usualmente, essas espécies são dotadas de grandes diferenças ontogenéticas no padrão de coloração, totalmente distintos entre jovens e adultos (Menezes & Figueiredo, 1985, Humann, 1999).



**Figura 3:** Espécies de Pomacanthidae da costa do Brasil: *Holacanthus ciliaris* (a,b), *H. tricolor* (c,d), *Pomacanthus arcuatus* (e,f), *P. paru* (g,h) e *Centropyge aurantonotus* (i). Notar as diferenças de coloração entre indivíduos jovens (à esquerda) e adultos (à direita) nos gêneros *Holacanthus* e *Pomacanthus*.

Os pomacantídeos, assim como muitos outros peixes de recifes, são caracterizados por hermafroditismo seqüencial do tipo protógino, iniciando sua primeira maturação sexual como fêmeas e então mudam para o sexo oposto (Bauer & Bauer, 1981, Polunin & Roberts, 1996).



**Figura 4:** Colomorfos de *H. ciliaris* do Arquipélago de São Pedro e São Paulo. No alto, vista parcial do Arquipélago

O comportamento de acasalamento entre as distintas espécies de pomacantídeos ainda pode diferir entre si e mesmo entre populações, sendo mais comum a presença de haréns com um macho dominante, como em *Holacanthus* e *Centropyge* (Sakai & Kohda, 1997), ou a formação de pares, como em *Pomacanthus* (Moyer *et al.*, 1983). Além disso, a formação de híbridos naturais entre espécies de Pomacanthidae é claramente detectada,

sendo essa uma das famílias com maior ocorrência desse fenômeno. Nas espécies do Atlântico, são bem conhecidos casos de cruzamentos interespecíficos entre *H. ciliaris* e *H. bermudensis* do Mar do Caribe, cujos produtos de cruzamento foram, por muito tempo, erroneamente reconhecidos como uma nova espécie – *H. isabellita*. Evidências similares são indicadas entre *P. paru* e *P. arcuatus*, além de outros exemplos bem caracterizados entre espécies naturais do Mar Vermelho e Oceano Pacífico (ver Pyle & Randall, 1994).

A família Chaetodontidae reúne também um grande número de espécies associadas a recifes tropicais de todo o mundo e compartilha uma série de características com os pomacantídeos (Bauchot *et al.*, 1988), os quais foram separados dos Chaetodontidae em 1972 após revisão de Burgess, com base em diferenças morfológicas, ósseas e de desenvolvimento larval. No litoral brasileiro são encontradas pelo menos sete espécies dessa família, popularmente conhecidas como peixes-borboleta (Rocha *et al.*, 1998, Nelson, 1994), sendo algumas delas endêmicas da Província Brasileira, como *Chaetodon obliquus*, uma das espécies recifais brasileiras representadas na lista de fauna ameaçada de extinção. A espécie *Chaetodon striatus*, por sua vez, é a mais abundante do Atlântico Sul, habitando tanto áreas recifais como baías e costões rochosos (Menezes & Figueiredo, 1985). Assim como os peixes-anjos, os representantes dessa família são apreciados no comércio aquariófilo, embora com menor valor de mercado, determinando a captura de exemplares para povoar sistemas artificiais (Mills, 1993).

Ambas famílias seguem o padrão comum aos peixes recifais, produzindo ovos e larvas flutuantes de distribuição pelágica, embora os adultos apresentem baixa vagilidade. Comparativamente às demais espécies, os peixes

das famílias Chaetodontidae e Pomacanthidae apresentam um período pelágico razoavelmente curto, na maioria inferior a 40 dias (Victor, 1991). No entanto, para a maior parte das espécies dessas famílias não é conhecido o período dos estágios pelágicos e de dispersão, particularmente daquelas do Atlântico. Além disso, análises do comportamento natatório em algumas das espécies recifais brasileiras como *C. striatus*, demonstraram que o comportamento dos indivíduos ao final do estágio larval é capaz de exercer uma forte influência na duração da fase pelágica e, conseqüentemente, nos modelos de dispersão (Stobutzki, 1998).

Em Pomacanthidae, estudos de dispersão foram realizados pela análise da relação entre distribuição de certas espécies do Indo-Pacífico e a duração de estágio larval (Thresher & Brothers, 1985). Os autores não encontraram evidências que as correlacionem e concluem que a duração da larva e o tamanho dos adultos não ditam as taxas de dispersão, colonização e intercâmbio gênico das espécies abordadas e eventos históricos podem ser predominantes nesse processo, reforçando a necessidade de análises genéticas.

Estudos por marcadores genéticos em Pomacanthidae e Chaetodontidae ainda são escassos. De fato, a ictiofauna do Atlântico Sul é uma das mais desconhecidas e comparações interoceânicas têm sido ignoradas (Floeter & Gasparini, 2000).

Alguns dados citogenéticos são fornecidos para as famílias Pomacanthidae e Chaetodontidae, a partir dos estudos de Arai & Inoue (1975), Affonso (2000), Affonso & Galetti (*in press*), Affonso *et al.* (2001) e Affonso *et al.* (2002). Os primeiros caracterizaram o cariótipo de algumas espécies dessas

famílias de ocorrência no Oceano Pacífico, na costa do Japão. Todas apresentam número e fórmulas cromossômicas associadas à ancestralidade em Perciformes ( $2n=48$  cromossomos acrocêntricos). Affonso (2000), Affonso *et al.* (2001) e Affonso *et al.* (2002), ao analisarem por técnicas de coloração convencional e diferencial os cromossomos das espécies de Pomacanthidae e Chaetodontidae da costa brasileira e do Pacífico, revelaram um padrão mais diversificado: certas espécies mostraram-se altamente conservadas do ponto de vista citogenético (*Holacanthus ciliaris*, *H. tricolor*, *Centropyge ferrugatus*, *Chaetodon striatus*) enquanto outras eram mais diferenciadas (*Pomacanthus paru* e *P. arcuatus*), incluindo exemplos de elevado grau de divergência como no caso de *Centropyge aurantonotus*, envolvendo uma série de rearranjos cromossômicos – inversões, adição de heterocromatina e dispersão de cístrons ribossômicos. Demonstra-se assim que, mesmo em um grupo monofilético como o estudado, situações diversificadas podem estar presentes entre as espécies.

Chung & Woo (1998) analisaram enzimaticamente 31 espécies de Pomacanthidae e detectaram altos níveis de heterozigosidade. O alto nível de variabilidade genética encontrado foi relacionado com o grau de especialização das espécies da família, de acordo com a teoria na qual teleósteos marinhos especializados apresentam maior variação intraespecífica (Smith & Fujio, 1982). Nesse trabalho também foram inferidas as relações filogenéticas das espécies da família, revelando uma grande proximidade entre os gêneros *Pomacanthus* e *Holacanthus*, enquanto *Centropyge* pareceu ser o grupo mais divergente e variável dentro de Pomacanthidae.

## 2 Justificativa e Objetivos

Embora os recifes de corais representem o ecossistema marinho responsável pela maior diversidade de ictiofauna, compondo um ambiente altamente complexo, ainda são poucas as informações de aspectos genéticos das espécies de peixes que aí vivem. Isso se torna especialmente aplicável para a costa sul do Oceano Atlântico. O panorama se agrava conforme tais ambientes são degradados e as espécies comprometidas, seja pela poluição dos mares ou pela exploração irracional dos recursos naturais. Além disso, devido ao modo de dispersão na fase inicial do ciclo de vida da maioria das espécies recifais, a caracterização das populações, e mesmo de espécies, como entidades discretas dentro da faixa de distribuição é limitada e dependente de evidências indiretas.

Vale ainda ressaltar que os representantes desse grupo possuem grande valor econômico na aquariofilia e alguns já sofrem efeitos desse comércio devido à retirada de exemplares da natureza.

Com base nessas considerações, o presente trabalho visou analisar, através de diferentes marcadores moleculares, as espécies de Pomacanthidae do litoral brasileiro, a saber *Centropyge aurantonotus*, *Holacanthus ciliaris*, *H. tricolor*, *Pomacanthus arcuatus* e *P. paru* e uma espécie de Chaetodontidae, *Chaetodon striatus*, para fins comparativos.

A partir de amostras de DNA extraído de animais coletados ao longo das costas Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil, além de ilhas oceânicas, foram utilizadas as seguintes abordagens:

1. Análise dos indivíduos por PCR com uso de *primers* de seqüência arbitrária (RAPD);
2. Isolamento e caracterização de locos microssatélites nas espécies de Pomacanthidae mais representativas (*P. paru* e *H. ciliaris*);
3. Análise dos indivíduos por PCR com uso de *primers* de microssatélites, identificados pela metodologia do PIMA, no caso, envolvendo a espécie *P. paru*;
4. Cálculos da distância genética, freqüência alélica e fluxo gênico entre os indivíduos de cada população e entre as populações, além de valores de diversidade genética com elaboração de dendrogramas mostrando relações interindividuais, interpopulacionais e/ou interespecíficas e de variação entre as populações através da análise de variância molecular (AMOVA). No caso dos microssatélites, avaliação da adequação do loco identificado na análise populacional e o grau de diferenciação genética entre as populações pela comparação entre heterozigosidade observada e esperada e índice  $F_{st}$ .

Esses dados são discutidos frente às características biológicas das espécies procurando correlacionar os resultados com padrões de dispersão, fatores biogeográficos e fluxo gênico nos ambientes recifais da Província Brasileira. Além disso, são fornecidas informações úteis para o manejo e conservação dos estoques naturais desse grupo de peixes marinhos, altamente suscetíveis às ações antrópicas mencionadas anteriormente.

### *3. Material e Métodos*



**Visão panorâmica do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (1°04'S/29°24'W)**

### 3.1 Material

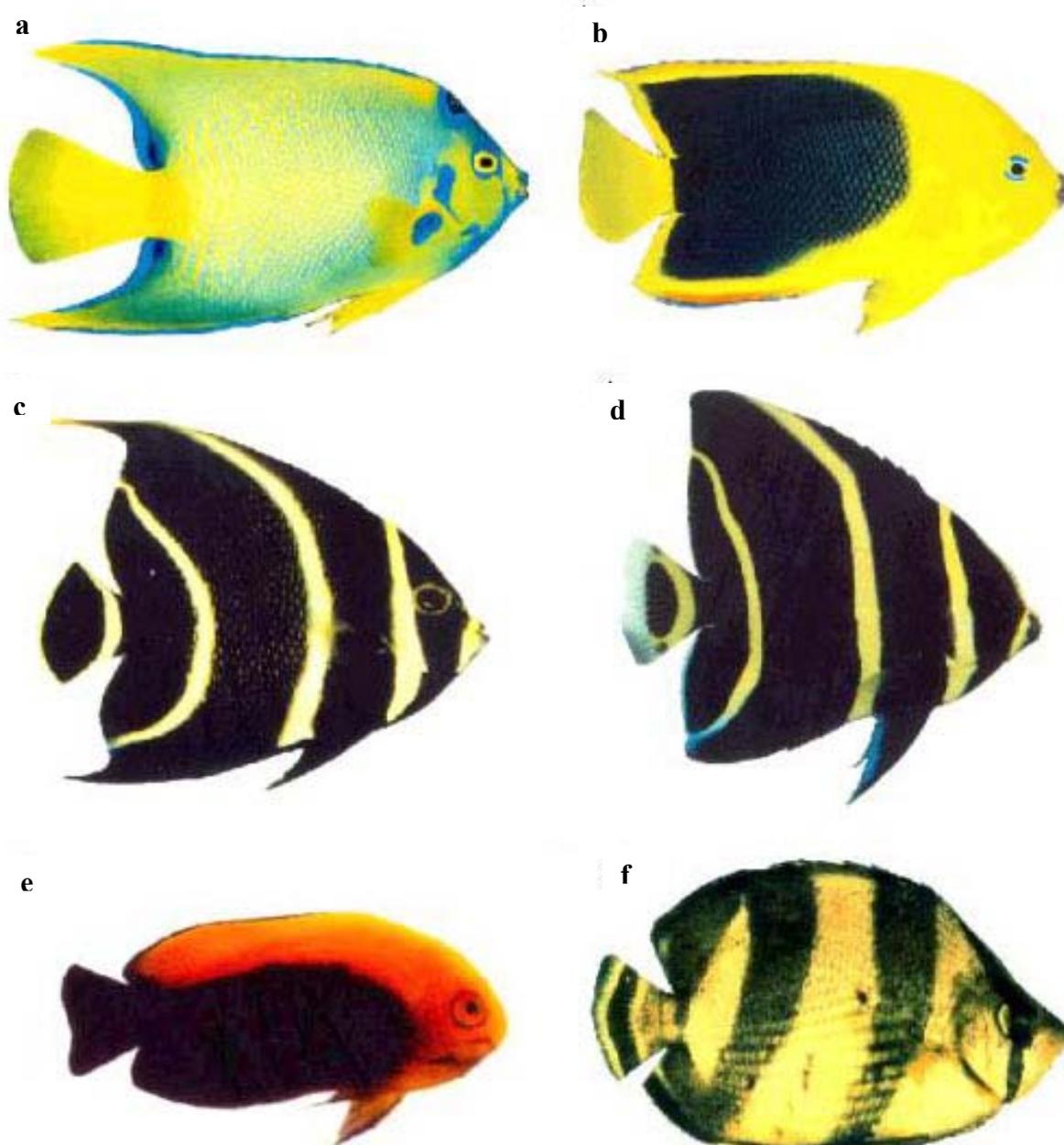
Na figura 5 estão representadas as espécies de Pomacanthidae e Chaetodontidae analisadas nesse trabalho: *Holacanthus ciliaris*, *H. tricolor*, *Pomacanthus paru*, *P. arcuatus*, *Centropyge aurantonotus* e *Chaetodon striatus*.

Foram obtidos, entre os períodos de março de 2000 a setembro de 2004, 29 exemplares de *H. ciliaris*, 15 de *H. tricolor*, 66 de *P. paru*, 15 de *P. arcuatus* e 11 de *C. aurantonotus*, além de 58 indivíduos de *C. striatus* distribuídos em diversos pontos da costa Brasileira, com maior destaque para o litoral Nordeste. Também foram coletadas amostras do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, após expedições realizadas durante janeiro e fevereiro de 2002, abrangendo assim as diferentes regiões de distribuição da ictiofauna recifal (ver tabela 1 e mapa da figura 6).

**Tabela 1:** Dados sobre números de indivíduos coletados de cada espécie analisada de Pomacanthidae e Chaetodontidae ao longo da costa do Brasil

Espécie	Local de coleta											Total
	SC	SP	RJ	ES	BA	AL	PE	PB	RN	CE	ASPSP	
<i>H. ciliaris</i>	1	-	-	1	5	-	4	-	1	13	4	29
<i>H. tricolor</i>	-	-	2	4	7	-	-	-	-	2	-	15
<i>P. arcuatus</i>	-	-	1	-	8	2	-	-	-	4	-	15
<i>P. paru</i>	1	1	15	-	10	3	4	-	27	5	-	66
<i>C. aurantonotus</i>	-	-	2	9	-	-	-	-	-	-	-	11
<i>C. striatus</i>	-	-	21	-	5	-	-	1	31	-	-	58

\* Os locais de coleta estão representados pela sigla do estado onde se situam os municípios amostrados, sendo ASPSP correspondente ao Arquipélago de São Pedro e São Paulo



(fotos: P.R.A.M. Affonso)

**Figura 5:** Exemplos coletados das espécies *Holacanthus ciliaris* (a), *H. tricolor* (b), *Pomacanthus paru* (c), *P. arcuatus* (d), *Centropyge aurantonotus* (e) e *Chaetodon striatus* (f)

A fim de tornar a amostragem mais representativa, refletindo de forma mais fidedigna as populações de cada região, foram consideradas as características biogeográficas, ecológicas e parâmetros físico-químicos de cada localidade. Os dados utilizados nesse procedimento foram baseados e fundamentados em trabalhos recentes de biogeografia de espécies recifais brasileiras (Vazzoler *et al.*, 1999, Floeter & Gasparini, 2000,). De acordo com esses autores, as distintas regiões da costa brasileira podem ser separadas com acentuado grau de confiabilidade, influenciando a distribuição dos peixes recifais dentro da Província Brasileira, onde Nordeste, Sudeste e ilhas oceânicas formariam grupos distintos tanto por caracteres ambientais como ictiofaunísticos (ver figura 2 do item 1.1).

A principal barreira responsável pelas diferenciações entre o Nordeste e o Sudeste seria a ressurgência ao Norte do Estado do Rio de Janeiro, trazendo à superfície águas mais frias e de alta produtividade. Já as ilhas oceânicas seriam separadas da costa e também entre si por estarem altamente isoladas por profundidades de até 4.000m em mar aberto. Esses fatores seriam limitantes para a dispersão de espécies bentônicas e especializadas como os peixes recifais, a despeito da fase pelágica inicial de desenvolvimento (Joyex *et al.*, 2001 e Floeter *et al.*, 2001).

Além disso, sabe-se que a corrente Sul-Equatorial se divide ao encontrar a costa do Rio Grande do Norte, originando um ramo ao Norte (corrente Costeira do Norte do Brasil - CCNB) e outro em direção Sul, a Corrente do Brasil - CB. Enquanto a CCNB passa pela costa do Ceará, Piauí, Maranhão até encontrar a barreira da descarga do Rio Amazonas, a CB atravessa todo o restante da costa Nordestina e a região Sudeste até o Sul do Brasil. Assim, espera-se que animais de dispersão planctônica, situados acima do Rio Grande

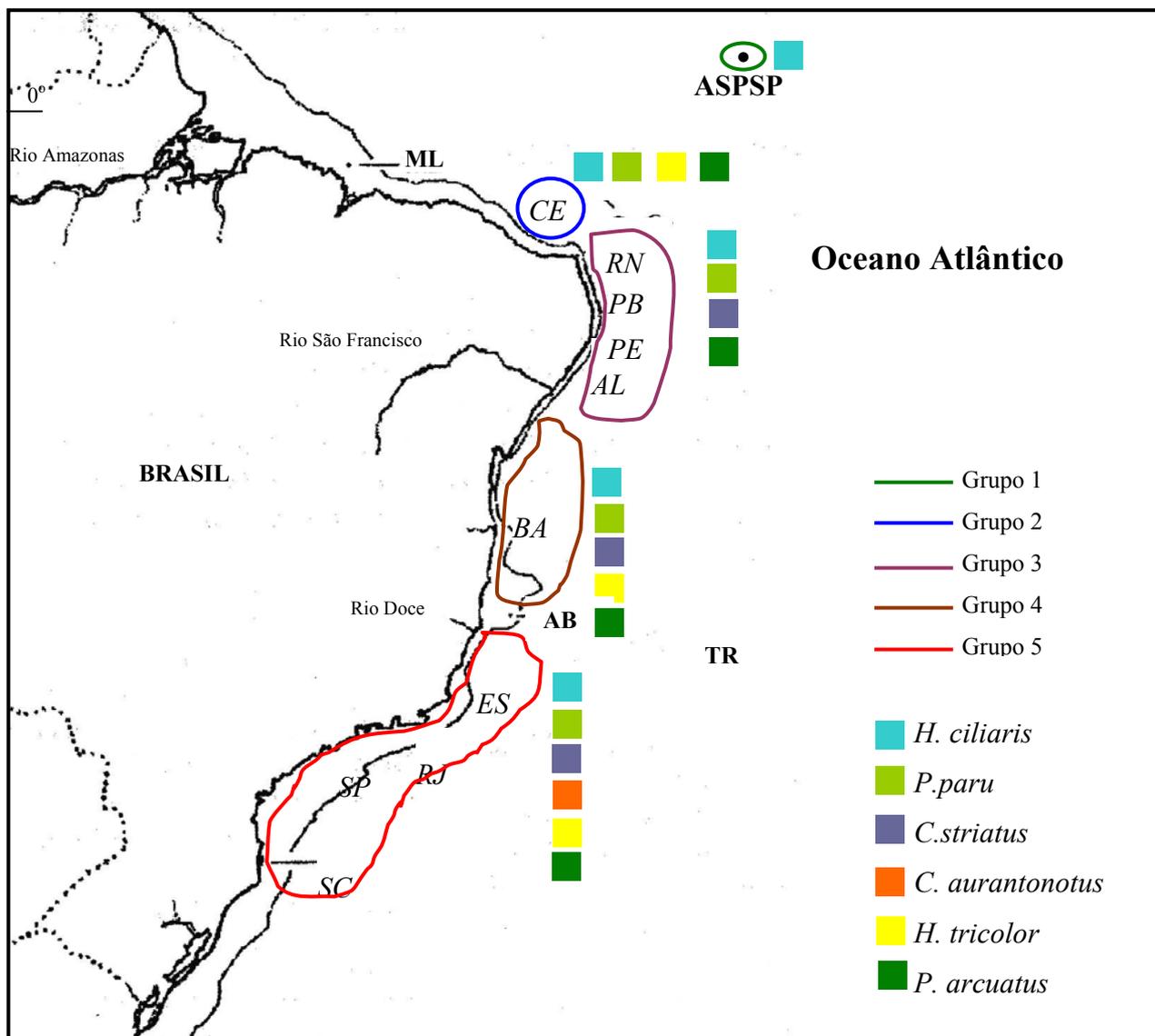
do Norte tenham pouco sucesso de colonizarem áreas ao Sul, pela ação das correntes marítimas. Assim, justifica-se que as amostras do Ceará fossem tratadas *a priori* como um grupo à parte dentro da região Nordeste.

Ainda, os animais da Bahia também foram separados dos demais coletados na região Nordeste pois entre o litoral baiano e as demais localidades nordestinas aqui amostradas há a influência da descarga do rio São Francisco, o qual pode atuar como uma barreira em potencial para a dispersão de espécies estritamente recifais.

A grande extensão do litoral da Bahia, se comparado aos demais estados no Nordeste, também contribui para a discriminação dos animais coletados na Bahia. Se eles fossem incluídos ao lado das demais amostras da costa nordestina, seria considerada para as análises uma população distribuída por mais de 2.000km, em contraste com os demais grupamentos que não costumam ultrapassar os 1.000km de extensão.

Portanto, com base nessas premissas, cinco grupos de pontos de coleta foram delimitados, sendo eles denominados: 1 – Ceará, 2 – Nordeste (engloba os estados compreendidos entre Rio Grande do Norte e Alagoas), 3 – Bahia, 4 – Sudeste (do sul do Espírito Santo até o norte de Santa Catarina) e 5 –ASPSP (Arquipélago de São Pedro e São Paulo) (figura 6).

Além do incremento no número de exemplares adquiridos em cada região, espera-se que as amostras reflitam com maior precisão as populações efetivas das espécies analisadas, seguindo uma tendência já verificada quanto à distribuição das espécies recifais na Província Brasileira (vide item 2.1 da introdução). Desse modo, as análises populacionais foram baseadas nesses grupos de localidades ora apresentados.



**Figura 6:** Locais de coleta de cada uma das espécies analisadas de Pomacanthidae e Chaetodontidae ao longo do litoral brasileiro. As localidades estão representadas pelas respectivas siglas dos estados amostrados, sendo ASPSP referente ao Arquipélago de São Pedro e São Paulo

## 3.2 Métodos

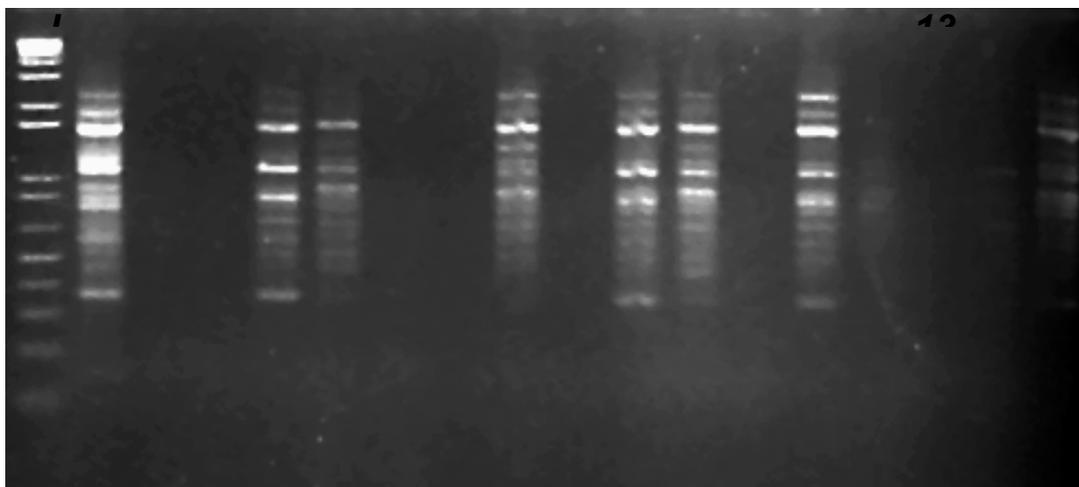
### 3.2.1 Extração de DNA

As amostras de DNA dos animais coletados foram obtidas pelo aproveitamento do tecido hepático e/ou de fragmentos de nadadeira, fixados em metanol e etanol (1:1). A extração de DNA foi baseada na metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989), com algumas modificações. Nesse processo, porções maceradas em nitrogênio líquido do tecido fixado foram submetidas a uma solução de lise (NaCl 0,4M, EDTA 0,1M, Proteinase K 100µg/ml, SDS 0,1%), posterior purificação do DNA com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e precipitação com etanol absoluto, além de tratamento com RNase (100µg/ml). Após diluição em TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM), o DNA foi mantido a -20° C.

### 3.2.2 Obtenção de padrões multilocus de RAPD

Primeiramente, buscou-se otimizar a reação de RAPD, para a obtenção de um padrão fidedigno de bandas, evitando a presença daquelas expúrias, mantendo um número de bandas que se adequasse às análises propostas. Para isso, utilizou-se uma amostra de DNA de um dos representantes de Pomacanthidae (*Holacanthus ciliaris*) e um dos *primers* decâmeros de RAPD. Foram realizados diferentes testes, variando a concentração de cloreto de magnésio (1,5 a 5mM), DNA molde (25 a 100ng) e *primers* (50 e 100ng), em diferentes combinações, buscando um perfil de bandas nítidas, além de controles negativos para verificar contaminações. Dessa forma, a amostra de número 13 foi eleita como ideal (ver figura 7), sendo composta por 100ng de DNA molde, 50ng de *primer* e a menor concentração de cloreto de magnésio (1,5mM). No entanto, concentrações de DNA molde em torno de 25-50ng

também se mostraram adequadas para a análise em espécies como *P. paru* e *P. arcuatus*.



**Figura 7:** Gel de agarose (1,4%) corado com brometo de etídio revelando os perfis de amplificação por RAPD com a utilização do *primer* B-09 (5'-CCCGCTACAC-3'), a partir de uma amostra de DNA de *Holacanthus ciliaris*, com diferentes concentrações dos componentes da reação. A amostra de número 13 foi eleita como a ideal para a reação apresentando um padrão múltiplo de bandas nítidas (L = marcador de peso molecular de 1Kb)

Após a padronização da reação de RAPD, foram testados os padrões de bandas gerados pelos *primers* adquiridos (*Gibco BRL e Operon Technologies Inc.*). Foram inicialmente selecionados na literatura, *primers* de RAPD que já haviam sido testados e tenham gerado um número satisfatório de bandas, conhecidamente polimórficas para uma série de espécies de Perciformes, além de outros organismos aquáticos como os descritos por Koh *et al.* (1999), Mamuris *et al.* (1998) e Tassanakajon *et al.* (1997). Dos 28 *primers* testados listados abaixo, nove apresentaram um número razoável de bandas, a maioria polimórfica. Destes, seis foram utilizados nas análises do presente estudo,

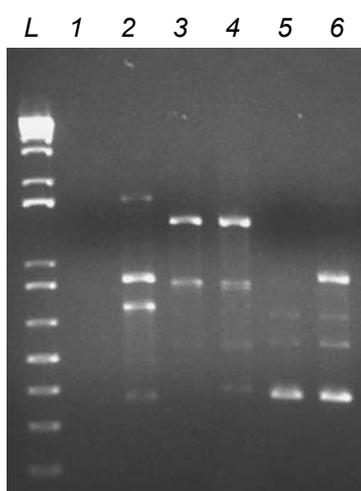
devido à repetibilidade e padrão nítido de bandas (em negrito), sendo que alguns outros foram também empregados na metodologia PIMA:

*Primer B-07* = 5' GTG AGG CGT C 3'  
*Primer B-08* = 5' CAT TCG AGC C 3'  
*Primer B-09* = 5' CCC GCT ACA C 3'  
*Primer B-10* = 5' CAC AGG CGG A 3'  
*Primer B-11* = 5' AAC GCG TCG G 3'  
*Primer B-12* = 5' GTA GCA CTC C 3'  
*Primer C-01* = 5' TCG GCA CGC A 3'  
*Primer C-02* = 5' CTG ATA CGC C 3'  
*Primer C-03* = 5' GTG TCT CAG G 3'  
*Primer C-04* = 5' CCC CGG TAA C 3'  
*Primer C-05* = 5' GTG GGC TGA C 3'  
*Primer C-06* = 5' GTC CAT GCC A 3'  
*Primer C-07* = 5' ACA TCG CCC A 3'  
*Primer C-08* = 5' GTG GTC CGC A 3'  
*Primer C-09* = 5' TCC CGC CTA C 3'  
*Primer C-10* = 5' GCG CCT GGA G 3'  
*Primer C-11* = 5' AAC GGG CAG G 3'  
*Primer C-12* = 5' GGC TGC GGT A 3'  
*Primer D-01* = 5' GCG GAG GTC C 3'  
*Primer D-02* = 5' CGA CGC CCT G 3'  
*Primer D-03* = 5' GCG TCG AGG G 3'  
*Primer D-04* = 5' AAT CGC GGT G 3'  
*Primer D-05* = 5' AGG GGT CTT G 3'  
*Primer D-06* = 5' GAA ACG GGT G 3'  
*Primer D-07* = 5' GTG ACG TAG G 3'  
*Primer OPP-13* = 5' GGA GTG CCT C 3'  
*Primer OPP-18* = 5' GGC TTG GCC T 3'  
*Primer OPP-19* = 5' GGG AAG GAC A 3'

Paralelamente, também foi testado, após otimização das concentrações de cloreto de magnésio, *primer* e DNA, o *Kit* para PCR *Master Mix* (Promega),

seguindo as recomendações do fabricante. Ainda, utilizando-se o *Kit* PCR *Master Mix* (Promega) na reação de RAPD (concentrações finais de 2,5U/ml Taq polimerase, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 50-100ng de DNA, 100ng *primer*, 200μM dNTP) foi possível obter um padrão adequado de bandas para o *primer* testado (*primer* B-09) em diferentes espécies de Pomacanthidae (figura 8). Nesse ensaio pode-se observar um perfil de bandas diferenciado para cada espécie, bem como a presença de polimorfismos intra-específicos, indicativos da variabilidade genética existente nas populações.

O programa de amplificação incluiu 40 ciclos com desnaturação inicial a 94° C por 4 minutos e posteriormente a 92° C por 1 minuto, anelamento a 37° C por 1<sub>1/2</sub> minuto e extensão a 72° C por 3 minutos em termociclador modelo MJ Research PT 100, de acordo com Hatanaka e Galleti, 2003.



**Figura 8:** Gel de agarose (1,4%) corado com brometo de etídio revelando os padrões de amplificação por RAPD com o *kit* PCR *Master Mix* e o *primer* B-09 em amostras de *H. ciliaris* (1,2), *P. arcuatus* (3,4) e *C. aurantonotus* (5,6). L = marcador de 1Kb

### 3.2.3 Análise eletroforética de RAPD

Os produtos de amplificação (10µl) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,4%) corado com brometo de etídio submerso em tampão Tris-Borato-EDTA, durante aproximadamente 3 horas a uma voltagem média de 85V. Sob luz ultravioleta, os géis foram diretamente visualizados, digitalizados e analisados através do *Electrophoresis Documentation and Analysis System* (Edas 290 - Kodak). Os pesos moleculares dos fragmentos foram estimados, mediante comparação com um marcador de peso molecular de 1kb (DNA plus – Gibco BRL).

Os produtos amplificados dos *primers* testados nas diferentes espécies foram selecionados a partir de padrões de intensidade e reprodutibilidade, com a detecção de diferenças interindividuais e de algumas marcas espécie-específicas. Cada banda foi nomeada de acordo com o *primer* utilizado, seguido pelo número representando a ordem em que o fragmento era visualizado no gel, a partir da banda de maior peso molecular para aquela mais leve (por exemplo, C5-1, indica a banda de menor migração no gel de agarose identificada com o *primer* C-05).

### 3.2.4 Análises estatísticas de RAPD

A partir da observação das imagens dos géis de RAPD, avaliou-se o padrão de bandas geradas, no qual era atribuído o valor 1 ou 0 para a presença ou ausência do fragmento, respectivamente. Para tal, assumiu-se que alelos de diferentes locos não migram para a mesma posição no gel e que cada banda (“alelo”) representa um loco Mendeliano com características dominantes e em equilíbrio, com um alelo nulo recessivo não visível (Lynch & Milligan, 1994). Assim, com a utilização do programa NTSYS versão 1.7 (*Numerical*

*and Multivariate Analysis System*) (Rohlf, 1993), foram construídas matrizes de similaridade, adotando-se o coeficiente de Jaccard (1901) como a seguir:

$J = a/a+b+c$ , onde **a** corresponde ao número de concordâncias positivas entre dois indivíduos **x** e **y**; **b** ao número total de características únicas presentes no indivíduo **x**; e **c** ao número total de características únicas presentes em **y**.

As matrizes de similaridade foram construídas separadamente para cada *primer* e para cada espécie, considerando todos os indivíduos das diversas localidades, calculando os respectivos coeficientes de variação (mais detalhados no próximo item).

Análises de grupamento também foram realizadas por UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Average*) (Sneath & Sokai, 1973), disponível no programa NTSYS versão 1.7 e 2.0 (Rohlf, 1993). Valores de *bootstrap* foram obtidos pelo uso do programa WINBOOT (Yap & Nelson, 1996).

As frequências gênicas para cada loco (=banda) selecionado foram calculadas pelo programa computacional POPGEN 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). Por esse programa também são fornecidos valores de diversidade genética, heterozigosidade, porcentagem de locos polimórficos e estimativas de fluxo gênico. Ainda foram construídos dendrogramas baseados nos valores de identidade e distância genética de Nei (1978) entre as localidades amostradas de cada espécie.

No caso das espécies com amostras mais representativas como *P. paru*, *C. striatus* e *H. ciliaris*, uma matriz de dados binários foi construída considerando o perfil de RAPD como um haplótipo. A partir dessa matriz de dados, uma matriz de distância foi calculada entre todos os padrões de RAPD para cada espécie, usando a distância Euclideana (Excoffier *et al.*, 1992) pelo

programa ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000). Através desse programa, as matrizes de distância foram submetidas à análise da variância molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) para estimar a variação entre as populações. Essa análise fornece os valores de  $\phi_{st}$ , análogo ao  $F_{st}$  de Wright (1978), o qual representa uma medida do grau de diferenciação genética ou de subdivisão interpopulacional (Slatkin, 1993). Segundo Wright (1978), valores entre 0 e 0,05 indicam *pouca* diferenciação genética, entre 0,05 e 0,15 indicam uma diferenciação *moderada*, entre 0,15 e 0,25, uma *alta* diferenciação e valores acima de 0,25 representariam uma diferenciação genética *muito alta*.

Para testar se os valores de  $\phi_{st}$  e dos componentes da variância são significativamente diferentes de zero e não foram gerados ao acaso, os dados de AMOVA foram submetidos a um procedimento não paramétrico, envolvendo 10.000 permutações independentes. O valor de P obtido nesse teste com o programa ARLEQUIN representa a probabilidade de se obter, nessas simulações, valores de  $\phi_{st}$  e de variância maiores ou iguais àqueles observados pelo acaso dentro da hipótese nula (Excoffier *et al.*, 1992). Foram considerados significativos valores de  $P < 0,05$ .

Com os resultados da AMOVA, foram calculados os números médios de migrantes por geração ( $N_m$ ) de cada espécie, segundo a equação  $N_m = 0,25(1/F_{st} - 1)$ , usando  $\phi_{st}$  como um análogo ao  $F_{st}$  (Wright, 1951) para comparações com os valores de  $N_m$  obtidos pelo programa POPGEN 1.31.

Os resultados obtidos por essas abordagens estão separados por espécie e descritos no item 4. Avaliações intrapopulacionais foram realizadas nas três espécies de maior representatividade, seja pela abundância na costa e/ou

importância econômica, a saber *Holacanthus ciliaris*, *Pomacanthus paru* e *Chaetodon striatus*.

### 3.2.5 PIMA (PCR-based Isolation of Microsatellite Arrays)

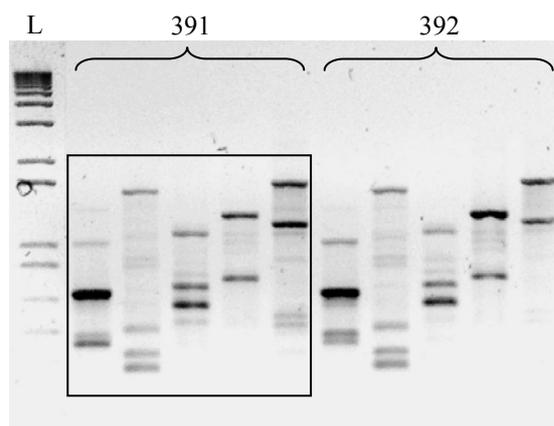
Esse método, descrito por Lunt *et al.* (1999), foi o escolhido para iniciar as análises de microssatélites em algumas das espécies aqui estudadas. Ele reúne uma série de vantagens que facilitam a localização das seqüências flanqueadoras dessa classe de DNA repetitivo e tem se mostrado eficiente na prospecção de microssatélites em diversos organismos. Além disso, a técnica do PIMA é baseada na metodologia de RAPD também desenvolvida no presente trabalho.

#### 3.2.5.1 Amplificação de fragmentos do tipo RAPD

Amostras de dois indivíduos de *Pomacanthus paru* originários de Alagoas foram amplificadas com onze *primers* de RAPD (B-07, B-08, B-09, B-10, C-05, C-10, D-02, D-03, OPP-13, OPP-18, OPP-19) conforme descrito no item 3.2.2 com a finalidade de obtenção de diversos fragmentos de DNA oriundos do genoma total da espécie.

O mesmo procedimento foi realizado em dois indivíduos de *Holacanthus ciliaris*, um proveniente do Ceará e outro do Espírito Santo, porém envolvendo doze *primers* decâmeros de seqüência arbitrária (B-07, B-08, B-09, B-10, B-11, C-05, C-10, D-02, D-03, OPP-13, OPP-18, OPP-19).

Dessa forma, a presença de inúmeras seqüências aleatórias permite a seleção de alguns fragmentos que, muito provavelmente, conterão seqüências microssatélites. Por exemplo, no caso de *P. paru*, foi eleita a amostra 391 por apresentar mais bandas no gel de agarose 1,4% (figura 9).



**Figura 9:** Gel de agarose (1,4%) corado com brometo de etídio revelando os perfis de amplificação por RAPD a partir de duas amostras de *Pomacanthus paru* (391 e 392) com a utilização de cinco dos 11 *primers* empregados (B7, C5, C10, D2 e D3, respectivamente).

### 3.2.5.2 Purificação do DNA

Foram utilizados os kits *Wizard® SV Gel and PCR Clean up System* (*Promega*) para a limpeza do DNA amplificado no item anterior. Inicialmente, os 40µl restantes do produto de amplificação de PCR de cada *primer* foram reunidos em um único tubo de 0,5ml. A mini-coluna SV foi colocada sobre o tubo coletor e o volume final obtido (não ultrapassando os 350µl) foi transferido para a mini-coluna SV junto com o mesmo volume da solução de ligação à membrana. Deve-se aguardar um minuto à temperatura ambiente para a retenção do DNA na membrana e, em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000g por um minuto. Para descartar o sobrenadante, a mini-coluna deve ser removida e logo depois recolocada dando prosseguimento à limpeza da amostra. Foram adicionados 700µl da solução de lavagem e, novamente, o material foi centrifugado por um minuto a 10.000g. O sobrenadante foi descartado e a lavagem repetida com o mesmo volume da solução. Após a fixação e lavagem do DNA na membrana, o tubo coletor foi descartado e a mini-coluna colocada sobre um tubo limpo de 1,5ml. Foram

adicionados 50µl de água livre de nucleases diretamente no centro da mini-coluna e deixado à temperatura ambiente por um minuto para a eluição da amostra. Para recolher o DNA diluído, a mini-coluna foi centrifugada por um minuto a 10.000g. O DNA purificado foi estocado a -20°C para posterior utilização.

### 3.2.5.3 *Ligação do DNA purificado com o plasmídeo*

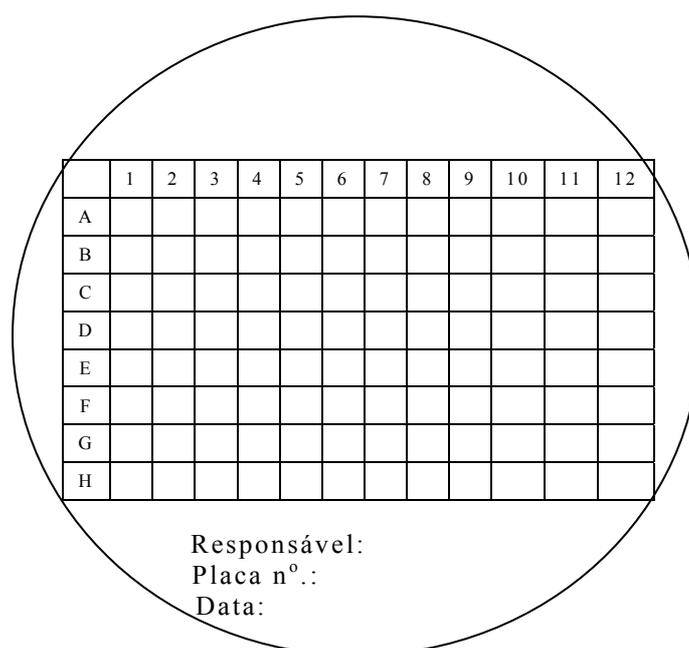
A ligação foi feita utilizando o *Kit pGEM-T® Easy Vector System I* com o plasmídeo pUC18 como vetor (50ng) em um volume final de reação de 10µl, seguindo as especificações do fabricante. O programa de ligação consiste na incubação das amostras a 4°C *overnight* em termociclador modelo *MJ Research PT 100*.

### 3.2.5.4 *Transformação*

Para a clonagem dos fragmentos amplificados pelo RAPD foram utilizados 2µl do produto da ligação e 200µl de bactérias *E. coli* DH5α competentes que foram mantidas em gelo até seu descongelamento. Deve-se misturar a solução gentilmente por causa da sensibilidade da membrana bacteriana e deixá-la no gelo por 20 minutos. Decorrido o tempo de resfriamento, as amostras foram colocadas no banho-maria a 42°C por exatos 45 segundos para a penetração dos plasmídios recombinantes nas células de *E. coli* DH5α competentes. As células foram transferidas imediatamente para o gelo, onde permaneceram por dois minutos. Em seguida, 950µl de meio LB líquido foram adicionados e as células foram incubadas a 37°C durante uma hora e meia a 250 rpm para proliferação de curto tempo. Nesse tempo deve-se montar duas placas de meio

de cultura LB para a clonagem bacteriana dos fragmentos amplificados. Em 20ml de meio LB com ágar derretido foram adicionados 20 $\mu$ l de ampicilina (100mg/ml) para cada placa e vertidos em placas de Petri autoclavadas. Após a solidificação do meio de cultura, aproximadamente 15 minutos antes do término da cultura, foram espalhados de forma homogênea 50 $\mu$ l de X-Gal e 100 $\mu$ l de IPTG com uma alça de Henle para a visualização das colônias recombinantes. Depois de decorrido o tempo de cultivo, foram pipetados 200 $\mu$ l da cultura e plaqueados homogeneamente com a alça de Henle. Em seguida, o líquido restante foi centrifugado brevemente e descartado o sobrenadante, permanecendo cerca de 150 $\mu$ l de resíduo. Após homogeneização, as bactérias concentradas foram aplicadas na outra placa de cultura. As duas placas foram incubadas a 37°C *overnight*.

Noventa e seis colônias brancas (clones recombinantes) entre as colônias azuis (clones não recombinantes) foram selecionadas e cultivadas em meio LB líquido em *megaplate* e em placa de Petri em meio LB sólido, demarcando os 96 clones, como esquematizado nas figuras 10 e 11.



**Figura 10:** Placa de repicagem de bactérias recombinantes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Figura 11:** *Megaplate* de cultivo de bactérias recombinantes

As placas de repicagem e *megaplate* foram incubadas a 37°C *overnight* e esta última em *shaker* com 250 rpm.

### 3.2.5.5 Seleção dos clones candidatos a microssatélites

A partir das bactérias recombinantes crescidas na *megaplate* foram repicadas 96 amostras em uma placa de PCR com numeração correspondente às colônias selecionadas.

As ampliações por PCR continham tampão de reação 1x (50mM KCl, 10mM Tris pH8,3), 125µM de cada dNTP, 50-100ng de três *primers* (GT<sub>n</sub> 5' TGTGGCGGCCGCTGTGTGTGTGTGTGTG 3'; M13F 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'; M13R 5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,0U de Taq DNA polimerase (Gibco BRL) e água deionizada q.s.p. 20µl. Posteriormente, as bactérias são “carimbadas” com o uso de um repicador nos tubos contendo os componentes da PCR, os quais são então levados ao termociclador. O programa de amplificação inclui 40 ciclos com desnaturação inicial a 95° C por 4 minutos e posteriormente a 95° C por 40 segundos, anelamento a 55° C por 40 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto e um ciclo de extensão final de 72° C por 5 minutos em termociclador modelo *MJ Research PT 100*, de acordo com Hatanaka (2000). Foram utilizados 10µl do produto da amplificação para a visualização em gel de

agarose 1% e, assim, selecionados os clones candidatos a conter uma seqüência de microssatélite.

A escolha dos clones requer as seguintes características: devem ter duas bandas – uma referente ao fragmento inserido (superior) e a outra (inferior) ao microssatélite, não devendo ultrapassar os 1.600pb para que todo o inserto possa ser seqüenciado posteriormente.

### 3.2.5.6 *Mini-preparação*

Os clones numerados da placa de repicagem correspondente aos selecionados no item anterior foram cultivados em 5ml de meio líquido LB com 5µl de ampicilina (100mg/ml), a 37°C *overnight* com agitação a 250rpm.

Após o período de crescimento dos clones recombinantes, foram aliqüotados 750µl de cada amostra e 250µl de glicerol autoclavado em tubos estéreis de 1,5ml para estocar as prováveis seqüências microssatélites da espécie estudada. Esse procedimento requer o uso de fluxo para impedir qualquer contaminação.

O volume restante da amostra de cada clone selecionado (4,25ml) foi utilizado na recuperação dos insertos amplificados. Em outro tubo de 2,0ml foram colocados 1,5ml de cultura, centrifugados por 30 segundos e descartado o sobrenadante para concentrar o material. Esse passo deve ser repetido até que todas amostras tenham sido centrifugadas. Ao *pellet* de bactéria foi acrescentado 400µl da solução I resfriada (400µl Ribonuclease 20µg/ml, Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M, água q.s.p. 20ml) e homogeneizado com o vórtex até o completo desprendimento do *pellet* da parede do tubo. Em seqüência, foram adicionados 400µl da solução II (NaOH 1M, SDS 10% e água q.s.p. 20ml) a

qual foi homogeneizada vertendo o tubo até que se tornasse viscosa em consequência da solubilização do DNA. E finalmente foram adicionados 400µl da solução III (Acetato de Potássio 5M, 2,87ml ácido acético e água q.s.p. 25ml) e novamente o material foi homogeneizado vertendo-se o tubo. Para separar o DNA solúvel, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 16.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 700µl de isopropanol 100% e foi deixado na bancada por 10 minutos à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de precipitação do DNA, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 16.000rpm e descartado o sobrenadante. Para a lavagem do DNA extraído foram acrescentados 200µl de etanol 70%, centrifugado por cinco minutos e descartado o sobrenadante. Imediatamente após, foram adicionados 200µl de etanol 100%, centrifugado e descartado o sobrenadante, restando o *pellet* limpo e desidratado. O DNA foi seco em estufa a 37°C por aproximadamente uma hora e eluído em 20µl de água autoclavada. A quantificação do DNA (10µl) foi realizada em gel de agarose 1% para a seleção das amostras que apresentassem concentração  $\geq$  a 200ng.

### 3.2.5.7 Sequenciamento das amostras

As amostras com concentrações adequadas obtidas no passo anterior foram seqüenciadas de acordo com o método de Sanger (1977), utilizando-se o *Kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Pharmacia Biotech). Para isso, realizou-se uma reação de PCR contendo 2µl de tampão *Save Money* (Tris 200mM, pH9.0, MgCl<sub>2</sub> 5mM), 2µl de *premix* ETdye, 5pmol de cada *primer* (M13F e M13R), cerca de 500ng do DNA molde e água para um volume final de 10µl. O programa envolveu 2 minutos de desnaturação inicial

a uma temperatura de 96°C, seguido por 35 ciclos de desnaturação (25 seg. a 96°C), hibridação (30 seg. a 50°C) e extensão (1 minuto a 60°C). O DNA foi precipitado em 1/10 do volume de acetato de sódio/EDTA e 40µl de etanol 95%. A solução foi homogeneizada em vórtex, transferida para tubo de 1,5ml e mantida em temperatura ambiente por 20 minutos. Após centrifugação por 15 minutos a 13.000rpm, o sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 150 µl de etanol 70% para nova centrifugação e descarte de sobrenadante. Após evaporação dos resíduos de etanol e água, foram adicionados 3µl de tampão de corrida. O produto foi analisado em seqüenciador automático *ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems Inc.)*.

#### ***3.2.5.8 Delineamento de primers das seqüências flanqueadoras e identificação de locos microssatélites polimórficos***

Posteriormente, as seqüências obtidas foram analisadas individualmente através do programa *Gene Runner* versão 3.05 para a identificação de locos de microssatélites. Para isso, foram utilizados como parâmetro, os critérios estabelecidos por Stalling *et al.* (1991), Estroup *et al.* (1993) e Tassanakajon *et al.* (1998) sobre o isolamento e caracterização de marcadores microssatélites. Segundo esses autores, uma determinada seqüência é considerada microssatélite quando o número de unidades de repetição for maior que 10 para mononucleotídeos, 6 para dinucleotídeos, 4 para trinucleotídeos e 3 para tetranucleotídeos, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos.

Quando algum fragmento das seqüências obtidas se adequava a esses critérios, *primers* das regiões flanqueadoras *upstream* e *downstream* ao loco

de microssatélite eram delineados, também com auxílio do programa *Gene Runner* versão 3.05. Nesse caso, objetivou-se obter um fragmento amplificado de no máximo 200 pb, utilizando *primers* com ausência de homologia entre si, evitando assim a formação de grampos ou dímeros, e com temperatura de *melting* um pouco acima dos 55° C, como corriqueiramente empregado em estudos de microssatélites. Ainda, os oligonucleotídeos eleitos devem ter pelo menos 20 pb a fim de se obter uma alta especificidade para o loco de interesse.

Os *primers* das regiões flanqueadoras aos locos de microssatélites são então empregados em reações de PCR em um grupo de indivíduos para verificar o padrão de amplificação do loco de microssatélite e seu caráter polimórfico. Essa reação deve ser otimizada visando um padrão nítido de bandas, condizente com o tamanho de fragmento esperado pelos dados da seqüência, livre de bandas expúrias e com alta repetibilidade.

Inicialmente, são feitos testes considerando como base uma reação contendo tampão de reação 1x (50mM KCl, 10mM Tris pH8,3), 125µM de cada dNTP, 100ng de DNA molde, 100ng de cada primer flanqueador, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,0U de Taq DNA polimerase (*Gibco BRL*) e água deionizada q.s.p. 25µl. O programa de amplificação inicialmente testado envolveu um passo inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e uma extensão final por 20 minutos a 72°C em termociclador *MJ Research PT 100* e se mostrou adequado (ver item 4.4).

Os produtos amplificados são visualizados em gel de agarose 1000 (*Life Technologies*) a 2,5%, corado com brometo de etídio, durante, no mínimo, 3h a 90v. Normalmente, a utilização desse tipo de gel era suficiente para

verificar se um determinado loco de microssatélite era polimórfico ou não. Contudo, géis de poliacrilamida também foram utilizados para certificar se um loco previamente considerado monomórfico, realmente não apresentava alelos variáveis não detectados pela pequena amplitude de variação no tamanho da repetição. Nesses casos, as amostras de PCR eram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 7% não-desnaturante durante cerca de 1h e 30 minutos a 55W. Posteriormente, o gel era corado com nitrato de prata por 30 min. (1,5g de nitrato de prata, 2,0ml de formaldeído 37% e água destilada q.s.p. 1,5l) para detecção das bandas (Comincinis *et al.*, 1995).

### 3.2.5.9 Avaliação do polimorfismo populacional por microssatélites

O loco de microssatélite que se mostrasse polimórfico e capaz de ser amplificado em todos os indivíduos da espécie selecionada era selecionado para análise populacional. Para isso, um dos *primers* da seqüência flanqueadora, preferencialmente o *forward*, deve ser marcado com um composto fluorescente para corrida em gel de sequenciamento e identificação dos respectivos alelos presentes em cada indivíduo amostrado.

Após amplificação via PCR de todos os indivíduos da espécie-alvo do loco de microssatélite, usando um dos *primers* marcados, as amostras eram preparadas para sequenciamento, realizado em seqüenciador automático *ABI Prism 377 DNA Sequencer – PE Biosystems* com uso de *primers* marcados juntamente com o uso do kit *Genescan<sup>TM</sup> – 350 ROX<sup>TM</sup> Size Standard – Applied Biosystems*, através do programa *GENOTYPER v. 2.1 (Applied Biosystems)*. Logo anteriormente à confecção do gel de sequenciamento, as amostras são desnaturadas por 5 min. a 96° C e colocadas no gelo.

### 3.2.6 Análises estatísticas de loco microssatélite

Após identificação dos alelos presentes nos indivíduos analisados em relação ao loco de microssatélite identificado (no caso, referente ao loco Pp02 na espécie *P. paru*), foram realizadas as análises estatísticas a seguir.

Inicialmente, verificou-se se os locos analisados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, comparando os valores esperados e observados de heterozigosidade, através do teste exato de Fisher, bem como se havia algum déficit de heterozigotos, relacionado com a presença de alelos nulos. Ambas estimativas, realizadas com a utilização do programa GENEPOP v. 1.2 (Raymond & Rousset, 1995), são essenciais para a avaliação da utilidade e da eficácia do loco de microssatélite na avaliação das populações.

A diferenciação entre as populações, tanto genética quanto genotípica, também foi realizada através do programa GENEPOP, considerando cada par de populações. Foi considerada uma diferenciação inter-populacional significativa se  $P < 0,05$ .

Paralelamente, a estatística F de Weir & Cockerham (1984) foi aplicada nas amostras, para estimativas dos valores do índice de fixação  $F_{st}$  (índice comparativo entre heterozigosidade observada e esperada) e a respectiva probabilidade, assumindo que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e também considerando diferenciações significativas em comparações par a par a 5%. Nesse tipo de análise, foi empregado o programa FSTAT (Goudet, 2001).

Todos os testes realizados por ambos programas envolveram 10.000 randomizações, conforme utilizado na maioria dos trabalhos de genética de populações.

## 4. Resultados

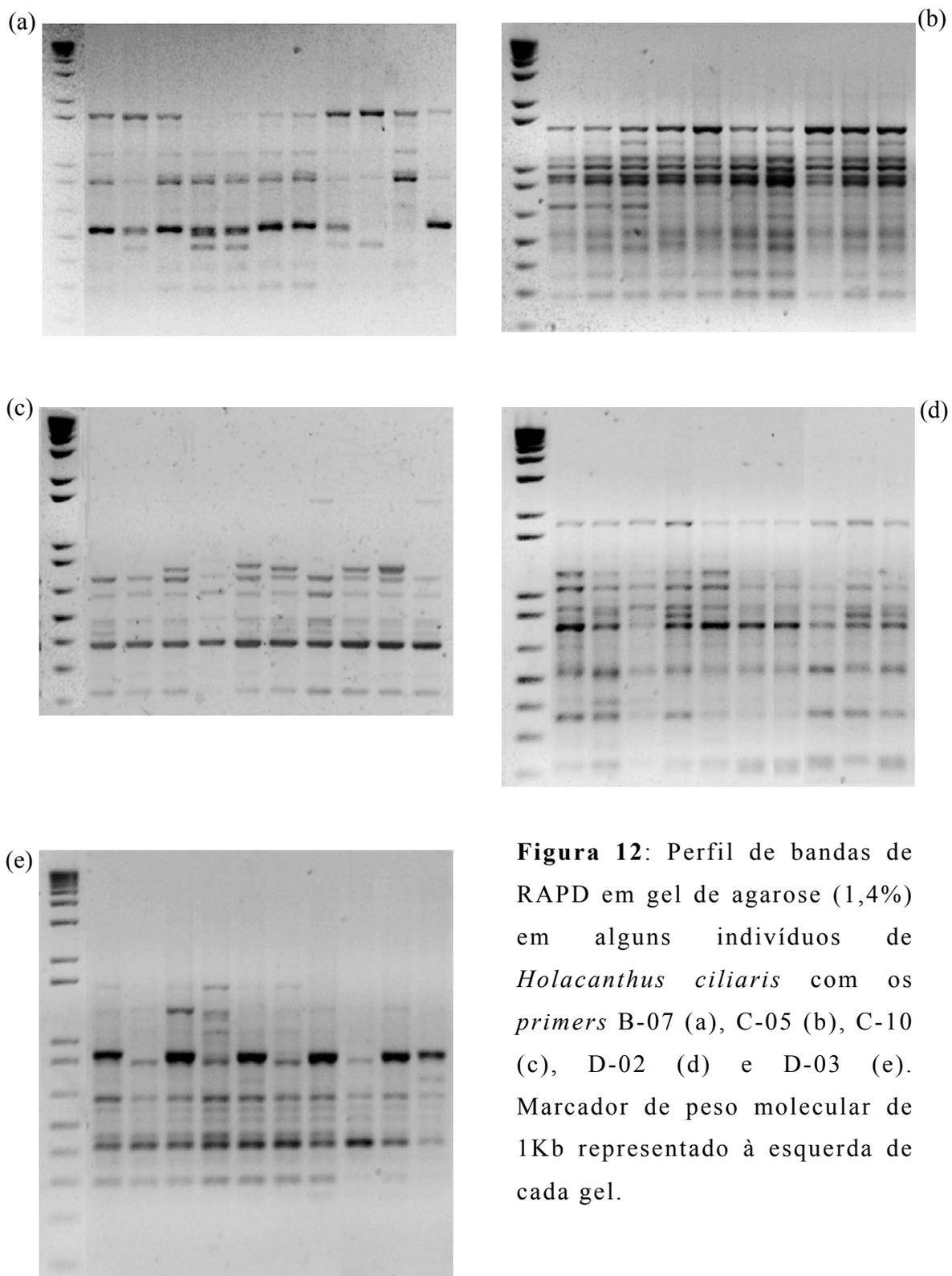


Casal de *Chaetodon striatus* em recife de coral

## 4.1 Relações intra-específicas

### 4.1.1 *Holacanthus ciliaris*

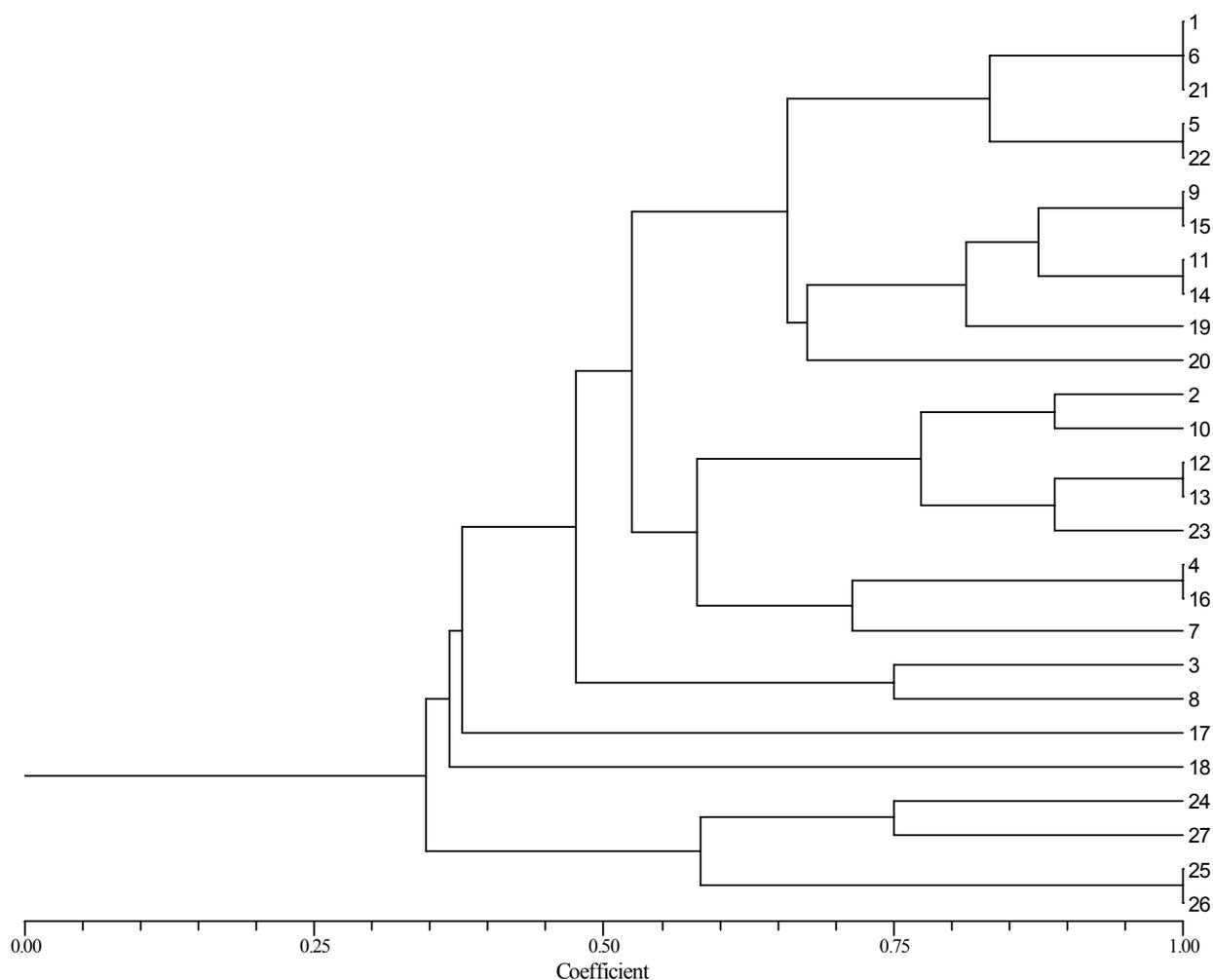
A partir dos padrões de amplificação obtidos para os exemplares de *H. ciliaris* do litoral Nordeste e Sudeste do Brasil, e da população altamente isolada do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (figura 12) foram identificados 59 alelos (=bandas), com polimorfismos variáveis e tamanhos entre 1.650 e 120 pb. Os estudos foram divididos em duas etapas. Primeiramente, foram estimados os valores de frequências gênicas, diversidade gênica e percentual de locos polimórficos para cada região (tabela 2). Verificou-se que a população da Bahia apresenta a maior diversidade intrapopulacional, enquanto os animais do Arquipélago de São Pedro e São Paulo mostraram-se menos polimórficos (19,7% de diversidade genética e 47,5% de locos polimórficos). As demais apresentaram valores similares de diversidade genética, mas com algumas diferenças no número de locos variáveis. Os dendrogramas baseados nos valores de similaridade de Jaccard para cada *primer* não agruparam os indivíduos de uma mesma região (figura 13). Posteriormente, os indivíduos de cada população foram analisados conjuntamente, somando-se todos os *primers*. Nessa abordagem, marcas espécie-específicas foram detectadas, bem como alelos com frequências significativamente diferenciadas entre as regiões (tabela 3). O dendrograma resultante dos valores de identidade e distância genética (tabela 4) mostrou que as populações do Sudeste e do ASPSP são mais diferenciadas das outras populações do Nordeste (figura 14). Os dados da AMOVA mostraram uma estruturação genética moderada, mas significativa ( $P < 0,05$ ) (tabela 5).



**Tabela 2:** Valores médios de diversidade gênica ( $h$ ) das populações de *H. ciliaris* (segundo Nei,1973); com respectivos valores de desvio-padrão e percentual de locos polimórficos

localidade*	média de $h$	desvio-padrão de $h$	% locos polimórficos
Ceará (13)	0,2567	0,2093	66,1
Nordeste (5)	0,2269	0,2236	54,24
Bahia (5)	0,3089	0,2058	72,88
Sudeste (2)	0,2387	0,2064	57,63
ASPSP (4)	0,1972	0,2190	47,46

\* O número em parênteses representa o tamanho amostral em cada região



**Figura 13:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard com um dos *primers* utilizados, no caso B-07, em indivíduos de *H. ciliaris* (1-11 = pop. Ceará, 12-15, 26 = pop. Nordeste, 16-20 = pop. Bahia, 21, 27 = pop. Sudeste e 22-25 = Arquipélago de São Pedro e São Paulo). Os demais dendrogramas gerados com outros *primers* podem ser visualizados no item 8

**Tabela 3:** Valores de frequências gênicas em *H. ciliaris*, considerando todas as localidades amostradas; teste de homogeneidade ( $\chi^2$ ); valores de diversidade gênica = h (Nei,1973) e estimativa de fluxo gênico = Nm (McDermott & McDonald, 1993)

<b>Alelo</b>	<b>Freq. gênica total</b>	<b><math>\chi^2/P</math></b>	<b>h</b>	<b>Nm</b>
B7-1	0,4938	4,323/0,364	0,4999	3,1699
B7-2	0,2265	4,832/0,305	0,3504	1,4221
B7-3**	0,6473	11,568/0,02**	0,4566	1,1875
B7-4	0,3185	2,112/0,714	0,4341	5,2304
B7-5	0,7420	6,28/0,179	0,3829	0,9058
B7-6**	0,8829	15,760/0,003**	0,2068	0,3632
B7-7	0,1635	0,8/0,938	0,2736	8,5971
B7-8	0,1857	0,651/0,957	0,3025	8,5630
B7-9	0,2029	5,213/0,266	0,3234	1,7302
B7-10**	0,6109	12,250/0,016**	0,4754	0,3544
C5-1**	0,8869	16,743/0,002**	0,2007	0,3452
C5-2	0,5424	7,115/0,130	0,4964	0,7810
C5-3**	0,7740	15,566/0,004**	0,3499	0,2943
C5-4**	0,8540	11,765/0,019**	0,2494	0,5240
C5-5**	0,8540	11,765/0,019**	0,2494	0,5240
C5-6**	0,9434	17,239/0,002**	0,1067	0,2589
C5-7**	0,4992	10,921/0,027**	0,5	0,3911
C5-8	0,3048	4,336/0,362	0,4238	1,4881
C5-9**	0,8540	11,765/0,019**	0,2494	0,5240
C5-10**	0,7974	12,220/0,016**	0,3231	0,6523
C5-11	0,6664	5,475/0,242	0,4446	0,9146
C5-12**	0,9434	17,239/0,002**	0,1067	0,2589
C10-1	0,1166	4,775/0,311	0,2061	2,5444
C10-2	0,1161	4,543/0,337	0,2052	2,1804
C10-3	0,3452	1,246/0,870	0,4521	11,2458
C10-4**	0,9434	17,239/0,002**	0,1067	0,2589
C10-5**	0,8540	11,765/0,019**	0,2494	0,5240
C10-6**	0,8540	11,765/0,019**	0,2494	0,5240
C10-7	0,2350	2,048/0,727	0,3595	0,7390
C10-8*	1,0	0,0/1,0	0,0	-
C10-9	0,1826	1,979/0,740	0,2985	5,6525
C10-10	0,6544	8,907/0,063	0,4523	0,5697
C10-11**	0,4494	9,784/0,044**	0,4949	0,5449
D2-1	0,6983	6,457/0,167	0,4214	0,9224
D2-2	0,3671	5,956/0,202	0,4647	1,1595
D2-3	0,6664	7,970/0,093	0,4446	0,7466
D2-4**	0,7043	21,431/0,000**	0,4166	0,2729
D2-5	0,3912	9,454/0,051	0,4763	0,9115
D2-6	0,5974	5,402/0,248	0,4810	1,5081
D2-7**	0,5642	10,134/0,038**	0,4918	0,6536
D2-8**	0,7766	14,713/0,005**	0,3470	0,6523
D2-9	0,2475	3,113/0,539	0,3725	3,9309
D2-10	0,7498	6,315/0,177	0,3752	0,8921
D2-11	0,1387	4,067/0,397	0,2389	2,4167
D2-12	0,8067	5,877/0,208	0,3119	1,0929
D2-13	0,4442	8,266/0,082	0,4938	1,0746
D3-1	0,3240	2,631/0,621	0,4381	2,7107
D3-2	0,3473	1,544/0,819	0,4534	3,7834
D3-3	0,3756	1,081/0,897	0,4691	7,2681
D3-4	0,1707	5,705/0,222	0,2832	2,0889
D3-5	0,3406	9,481/0,5	0,4492	0,3299
D3-6	0,5982	4,009/0,405	0,4807	1,6343

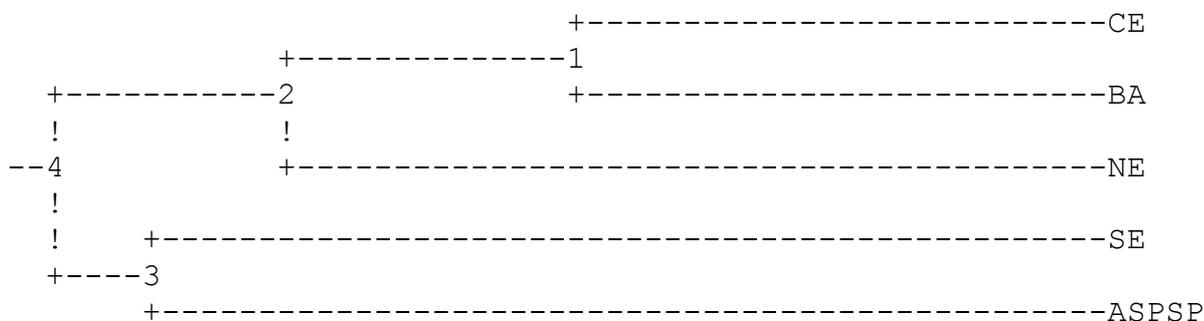
D3-7	0,1112	2,526/0,640	0,1976	2,4010
D3-8**	0,9307	13,647/0,008**	0,1290	0,4575
D3-9**	0,6907	12,211/0,016**	0,4273	0,7370
D3-10	0,4329	3,913/0,418	0,4910	1,8623
D3-11	0,5170	4,678/0,322	0,4994	1,5698
D3-12*	1,0	0,0/1,0	0,0	-
D3-13	0,6322	2,654/0,617	0,4651	2,1551
<b>Média/desvio padrão de h</b>			0,3491/0,1343	
<b>Média de Nm</b>			0,9703	

\*marcas específicas para a espécie

\*\*alelos com frequências significativamente diferentes entre as localidades

**Tabela 4:** Valores de identidade (acima da diagonal) e distância (abaixo da diagonal) genética de Nei (1978) entre as localidades amostradas para *H. ciliaris*

Localidade	CE	NE	BA	SE	ASPSP
CE	****	0,8987	0,9028	0,7946	0,8057
NE	0,1068	****	0,8095	0,8161	0,8409
BA	0,1022	0,2114	****	0,8486	0,7966
SE	0,2299	0,2033	0,1642	****	0,8308
ASPSP	0,2161	0,1733	0,2274	0,1853	****



**Figura 14:** Dendrograma baseado nos valores de distância genética de Nei (1978) para as populações de *H. ciliaris*

**Tabela 5:** Análise da variância molecular (AMOVA) em *H. ciliaris*. O valor de P foi obtido a partir de 10.000 permutações e o de fluxo gênico (Nm), a partir da equação de Wright (1951) com base no valor de  $\phi_{st}$

Interpopulacional	Intrapopulacional	Estatística $\phi$	Nm
13,24 %	86,76 %	$\phi_{st} = 0,13238$	1,6385
<b>Valor de P = 0,00337 (P&lt;0,05)</b>			

#### 4.1.2 *Holacanthus tricolor*

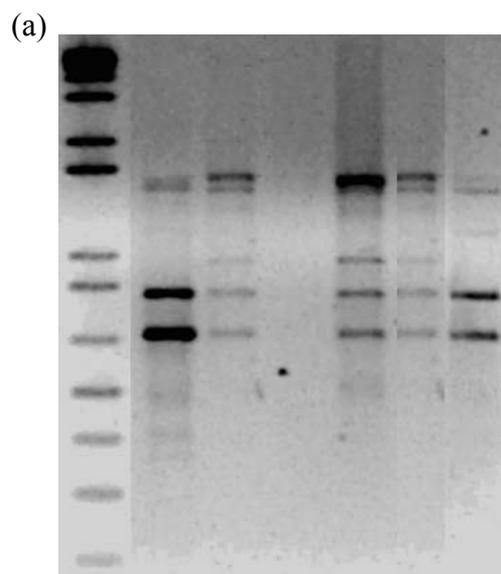
Os padrões de amplificação em alguns indivíduos coletados dessa espécie no Nordeste e Sudeste do Brasil estão demonstrados na figura 15.

Devido ao número reduzido de exemplares dentro de cada localidade, não foram realizadas análises intrapopulacionais. Os dados foram agrupados para cada região e os *primers* analisados em conjunto para a realização de comparações entre as populações.

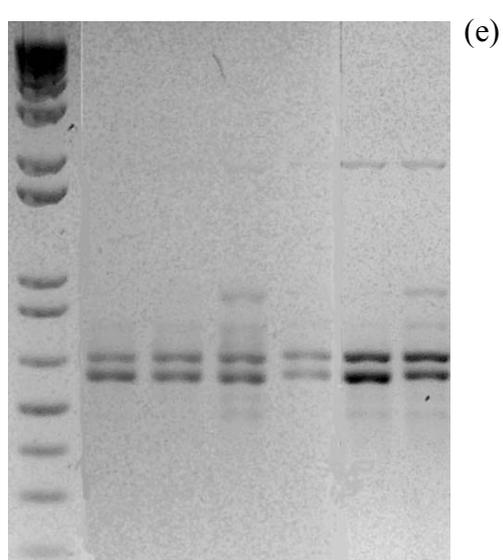
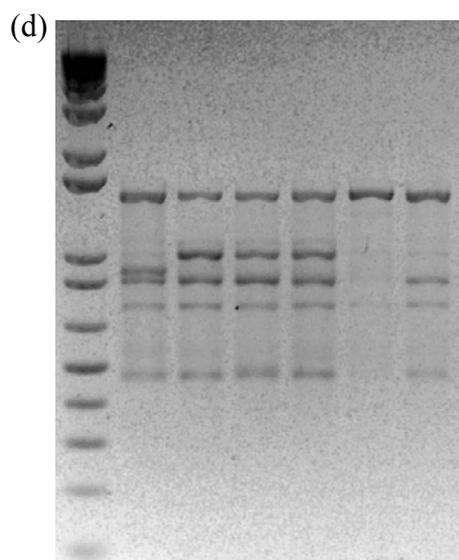
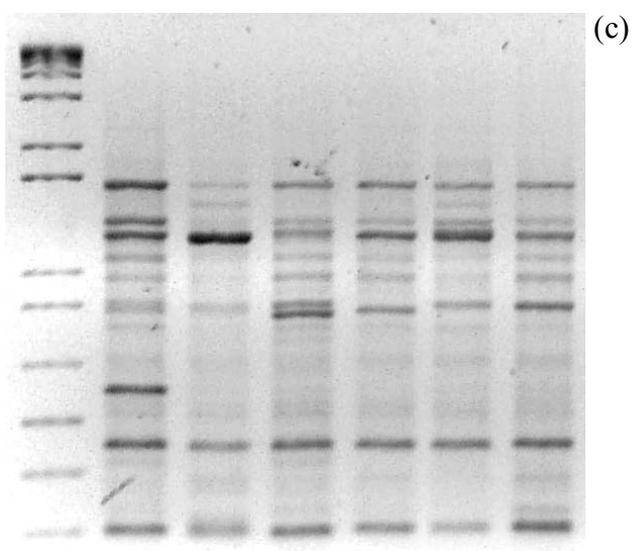
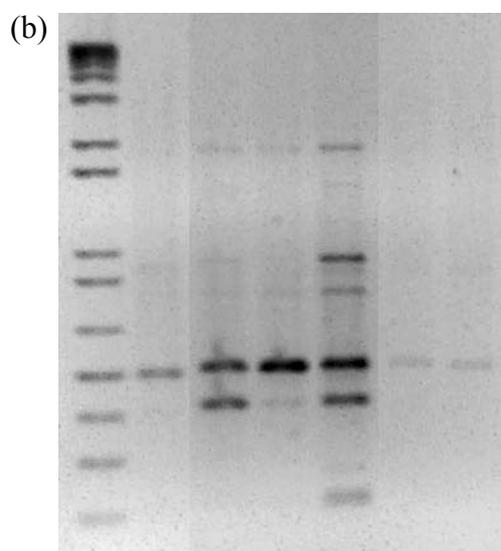
O valor de diversidade genética foi inferior ao da espécie anterior, mas o fluxo gênico também foi reduzido entre as localidades (tabela 6). Dentre os 45 alelos (entre 1.800 e 150pb), verificou-se um grande número de bandas comuns a todas as populações, demonstrando que marcadores específicos foram encontrados com os *primers* utilizados. Somente uma banda, obtida com o *primer* D-03, apresentou diferenças significativas entre as regiões (tabela 6). Isso pode estar relacionado ao pequeno número amostral para essa espécie ou refletir uma menor variação genética.

A distância genética, conforme demonstrada na tabela 7, e o dendrograma baseado nesses valores, revelaram que os indivíduos do Ceará estão mais diferenciados dos demais (figura 16).

Porém, comparações interpopulacionais ficam prejudicadas nessa espécie pela pequena quantidade de indivíduos analisados. Os dados de RAPD parecem ser mais úteis nessa espécie para comparações interespecíficas e estimativas da diversidade genética total, conforme abordado mais adiante no presente trabalho.



**Figura 15:** Perfil de bandas de RAPD em gel de agarose (1,4%) em alguns indivíduos de *Holacanthus tricolor* com os primers B-07 (a), C-05 (b), C-10 (c), D-02 (d) e D-03 (e). Marcador de peso molecular de 1Kb representado à esquerda de cada gel



**Tabela 6:** Valores de freqüências gênicas em *H. tricolor*, considerando todas as localidades amostradas; teste de homogeneidade ( $\chi^2$ ); valores de diversidade gênica = h (Nei,1973) e estimativa de fluxo gênico = Nm (McDermott & McDonald, 1993).

<b>Alelo</b>	<b>Freq. gênica total</b>	<b><math>\chi^2</math>/P</b>	<b>h</b>	<b>Nm</b>
B7-1*	1,0	0,0/1,0	0,0	0,0
B7-2*	1,0	0,0/1,0	0,0	0,0
B7-3	0,7500	4,0/0,135	0,3750	0,0
B7-4	0,3170	0,619/0,734	0,4330	0,2798
B7-5*	1,0	0,0/1,0	0,0	0,0
B7-6*	1,0	0,0/1,0	0,0	0,0
B7-7	0,3170	0,619/0,734	0,4330	0,2798
B7-8	0,3170	0,619/0,734	0,4330	0,2798
C5-1*	1,0	0,0/1,0	0,0	0,0
C5-2	0,5323	1,004/0,605	0,4979	0,1096
C5-3	0,1355	0,179/0,914	0,2343	0,1605
C5-4	0,8750	8,0/0,018	0,2188	0,0
C5-5	0,8750	8,0/0,018	0,2188	0,0
C5-6	0,8750	8,0/0,018	0,2188	0,0
C10-1	0,3022	0,495/0,781	0,4217	0,2620
C10-2	0,2136	0,310/0,856	0,3359	0,2191
C10-3	0,4073	0,785/0,675	0,4828	0,2845
C10-4*	1,0	0,0/1,0	0,0	0,0
C10-5*	1,0	0,0/1,0	0,0	0,0
C10-6	0,2136	0,310/0,856	0,3359	0,2191
D2-1	0,3170	1,237/0,266	0,4330	2,0490
D2-2	0,1376	0,425/0,514	0,2667	1,0245
D2-3	0,1376	0,425/0,514	0,2667	1,0245
D2-4	0,0653	0,186/0,666	0,1282	3,3371
D2-5	0,3170	1,237/0,265	0,4330	2,0490
D2-6*	1,0	0,0/1,0	0,0	0,0
D2-7	0,3170	1,237/0,266	0,4330	2,0490
D2-8	0,2273	0,751/0,386	0,3513	2,1921
D3-1*	1,0	0,0/1,0	0,0	0,0
D3-2	0,1573	0,218/0,897	0,2651	0,1816
D3-3	0,5072	1,201/0,548	0,4999	0,2774
D3-4*	1,0	0,0/1,0	0,0	0,0
D3-5*	1,0	0,0/1,0	0,0	0,0
D3-6	0,5072	1,201/0,548	0,4999	0,2794
D3-7*	1,0	0,0/1,0	0,0	0,0
D3-8	0,2511	0,391/0,822	0,3760	0,2426
D3-9	0,3623	0,663/0,718	0,4621	0,2798
D3-10*	1,0	0,0/1,0	0,0	0,0
D3-11	0,0747	0,094/0,954	0,1382	0,1007
D3-12	0,8571	7,0/ 0,3	0,2449	0,0
D3-13*	1,0	0,0/1,0	0,0	0,0
D3-14	0,1573	0,218/0,897	0,2651	0,1816
D3-15	0,5072	1,201/0,548	0,4999	0,2774
D3-16	0,3623	0,663/0,718	0,4621	0,2798
D3-17**	0,8571	7,0/0,030**	0,2449	0,0
<b>Média/desvio padrão de h</b>			0,2424/0,1897	
<b>Média de Nm</b>			0,0911	

\*marcas específicas para a espécie

\*\*alelo com freqüência significativamente diferente entre as localidades

**Tabela 7:** Valores de identidade (acima da diagonal) e distância (abaixo da diagonal) genética de Nei (1978) entre as localidades amostradas para *H. tricolor*.

<b>Localidade*</b>	<b>CE (2)</b>	<b>BA (7)</b>	<b>SE (6)</b>
<b>CE</b>	****	0,7718	0,4678
<b>BA</b>	0,2590	****	0,8161
<b>SE</b>	0,7598	0,2032	****

\* O número em parênteses representa o tamanho amostral em cada região

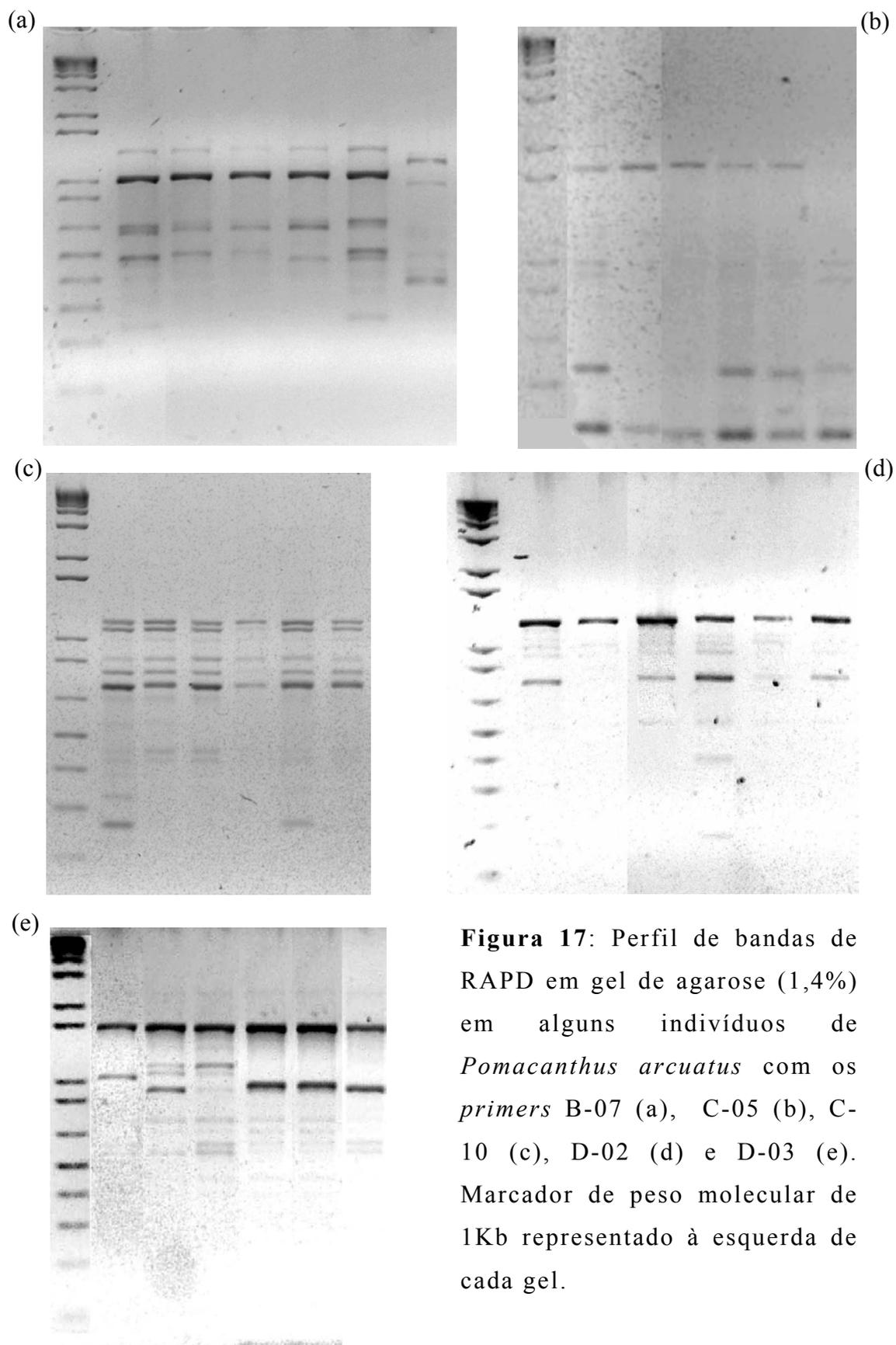


**Figura 16:** Dendrograma baseado nos valores de distância genética de Nei (1978) para as populações de *H. tricolor*

#### 4.1.3 *Pomacanthus arcuatus*

Na figura 17, estão demonstrados os padrões de amplificação em indivíduos coletados no Nordeste e Sudeste do Brasil com os cinco *primers* empregados nessa espécie no presente estudo. Os fragmentos obtidos tinham tamanhos variáveis, entre 1.700 e 200pb.

Um sexto *primer* (B-12) também foi analisado nessa espécie (dados não mostrados). Porém, embora incluído na presente análise, ele não se mostrou eficiente nas demais espécies, fornecendo um padrão pobre de bandas. Dessa forma, todas as abordagens comparativas entre as espécies selecionadas contaram apenas com dados dos cinco *primers* restantes.



As análises efetuadas dos padrões de amplificação reunindo os *primers* selecionados, através do programa POPGENE 1.31, por sua vez, revelaram uma diversidade genética (média) intra-específica de 31,42%, considerando-se as freqüências gênicas de cada “alelo” detectado na espécie. De um total de 58 alelos, quatro apresentaram diferenças significativas entre os indivíduos, enquanto oito indicaram ser espécie-específicos. Também foi possível estimar o fluxo gênico entre as localidades para cada alelo, determinando um valor médio de cerca de 0,24 (tabela 8).

Um dendrograma a partir dos valores de identidade e distância genética de Nei (1978) (tabela 9) também foi elaborado, onde é possível conferir que as quatro localidades foram separadas, sendo que a população denominada Nordeste e Bahia ficaram mais relacionadas, enquanto representantes do Sudeste e do litoral Cearense apresentaram uma menor identidade com os demais (figura 18).

**Tabela 8:** Valores de freqüências gênicas em *P. arcuatus*, considerando todas as localidades amostradas; teste de homogeneidade ( $\chi^2$ ); valores de diversidade gênica = h (Nei,1973) e estimativa de fluxo gênico = Nm (McDermott & McDonald, 1993).

Alelo	Freq. gênica total	$\chi^2/P$	h	Nm
D2-1*	1,0000	0,000/1,000	0,0000	-
D2-2	0,2257	4,610/0,203	0,3495	0,1371
D2-3	0,2793	3,813/0,282	0,4026	0,3229
D2-4**	0,7723	7,836/0,049**	0,3517	0,1715
D2-5	0,2793	3,813/0,282	0,4026	0,3229
D2-6	0,4757	6,822/0,078	0,4988	0,1152
D2-7**	0,3333	12,000/0,007**	0,4444	0,0000
D2-8	0,0903	0,851/0,837	0,1643	3,6387
D3-1*	1,0000	0,000/1,000	0,0000	-
D3-2	0,0903	0,851/0,837	0,1643	3,6387
D3-3	0,1362	0,393/0,942	0,2353	4,8345
D3-4	0,1725	5,482/0,139	0,2855	0,1697
D3-5	0,3307	2,818/0,420	0,4426	0,3306
D3-6	0,3314	2,867/0,412	0,4431	0,3941

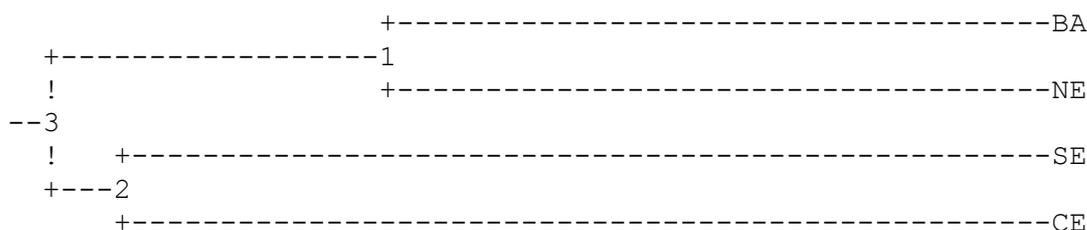
D3-7	0,3549	4,396/0,222	0,4579	0,2696
D3-8	0,3029	5,532/0,137	0,4223	0,2032
D3-9	0,4140	3,624/0,305	0,4852	0,3392
C5-1	0,5439	2,028/0,566	0,4962	0,7949
C5-2	0,1960	1,541/0,673	0,3152	1,5720
C5-3**	0,3403	7,920/0,047**	0,4490	0,0948
C5-4	0,4757	6,822/0,077	0,4988	0,1152
C5-5**	0,2500	12,000/0,007**	0,3750	0,0000
C5-6	0,6882	3,883/0,274	0,4292	0,5806
C10-1*	1,0000	0,000/1,000	0,0000	-
C10-2	0,7515	2,380/0,497	0,3734	0,8240
C10-3	0,4182	3,919/0,270	0,4866	0,1759
C10-4	0,8429	5,872/0,117	0,2649	0,2761
C10-5*	1,0000	0,000/1,000	0,0000	-
C10-6*	1,0000	0,000/1,000	0,0000	-
C10-7	0,3071	3,191/0,363	0,4256	0,5393
C10-8	0,1252	1,031/0,794	0,2191	2,2910
C10-9	0,2042	1,847/0,604	0,3250	1,1472
C10-10	0,2349	4,067/0,254	0,3594	0,2480
C10-11	0,3014	2,887/0,409	0,4211	0,3406
B7-1	0,7551	7,570/0,056	0,3699	0,1498
B7-2*	1,0000	0,000/1,000	0,0000	-
B7-3	0,3368	2,805/0,422	0,4480	0,3369
B7-4*	1,0000	0,000/1,000	0,0000	-
B7-5	0,5314	3,231/0,357	0,4980	0,4247
B7-6	0,3678	4,312/0,229	0,4650	0,2559
B7-7	0,1838	2,251/0,521	0,3000	1,1472
B7-8	0,1127	1,270/1,705	0,2000	2,2910
B12-1	0,6097	3,923/0,269	0,4759	0,1715
B12-2	0,4286	7,000/0,072	0,4898	0,0000
B12-3	0,4286	7,000/0,072	0,4898	0,0000
B12-4*	1,0000	0,000/1,000	0,0000	-
B12-5	0,2648	1,112/0,774	0,3894	1,6535
B12-6	0,2265	4,636/0,200	0,3504	0,1550
B12-7	0,7526	3,069/0,381	0,3724	0,4880
B12-8	0,2857	7,000/0,072	0,4082	0,0000
B12-9	0,7143	7,000/0,072	0,4082	0,0000
<b>Média/desvio padrão de h</b>				0,3142/0,1745
<b>Média de Nm</b>				0,2399

\*bandas específicas para a espécie, presentes em todos os indivíduos independentemente do local de origem

\*\*alelos que exibiram frequências significativamente diferentes entre as localidades

**Tabela 9:** Valores de identidade (acima da diagonal) e distância (abaixo da diagonal) genética de Nei (1978) entre as localidades amostradas para *P. arcuatus*..

Localidade	BA (8)	NE (2)	SE (1)	CE (4)
BA	****	0,7906	0,6991	0,7668
NE	0,2350	****	0,4706	0,6532
SE	0,3579	0,3868	****	0,7006
CE	0,2655	0,3898	0,3275	****



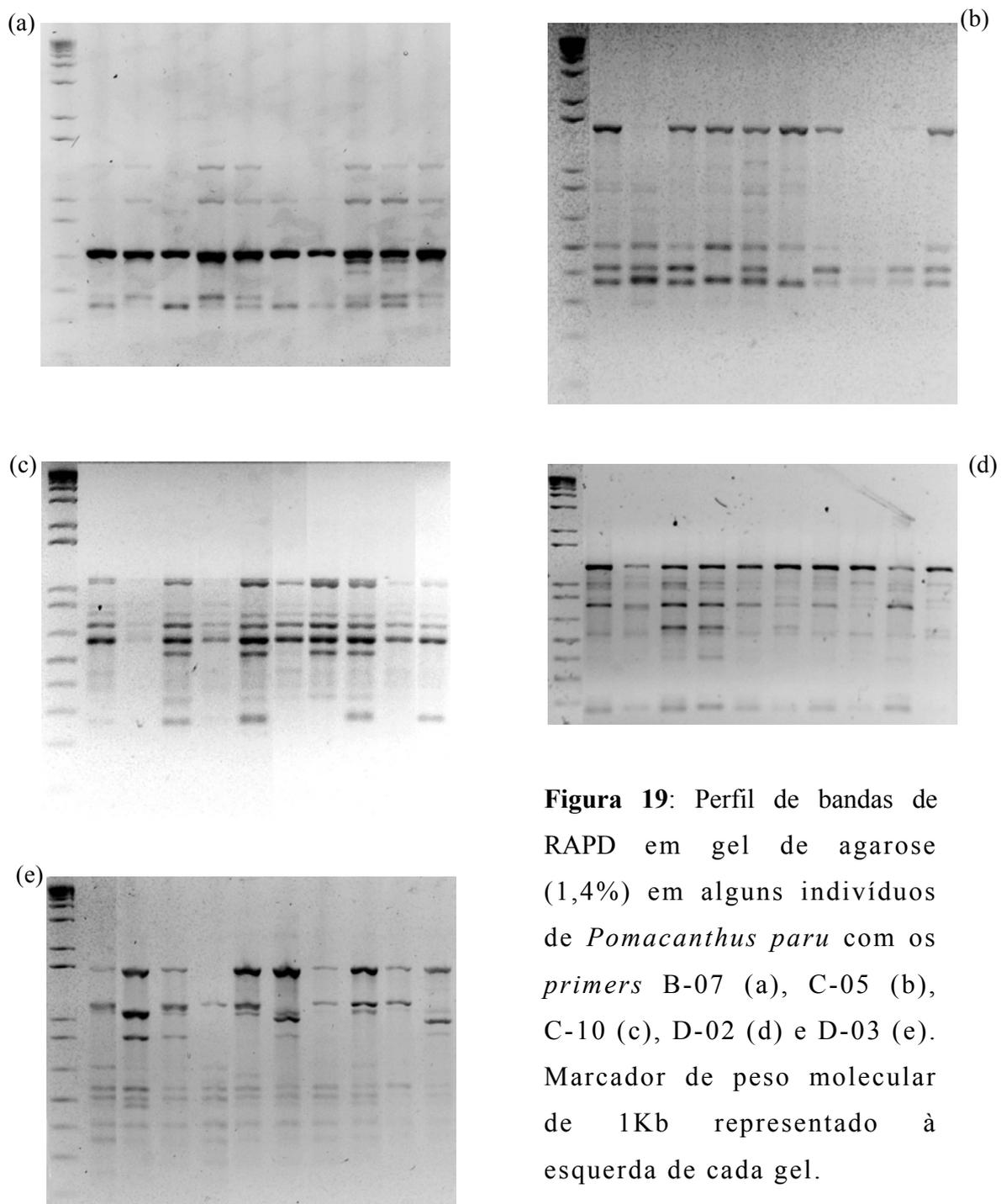
**Figura 18:** Dendrograma baseado nos valores de distância genética de Nei (1978) para as populações de *P. arcuatus*

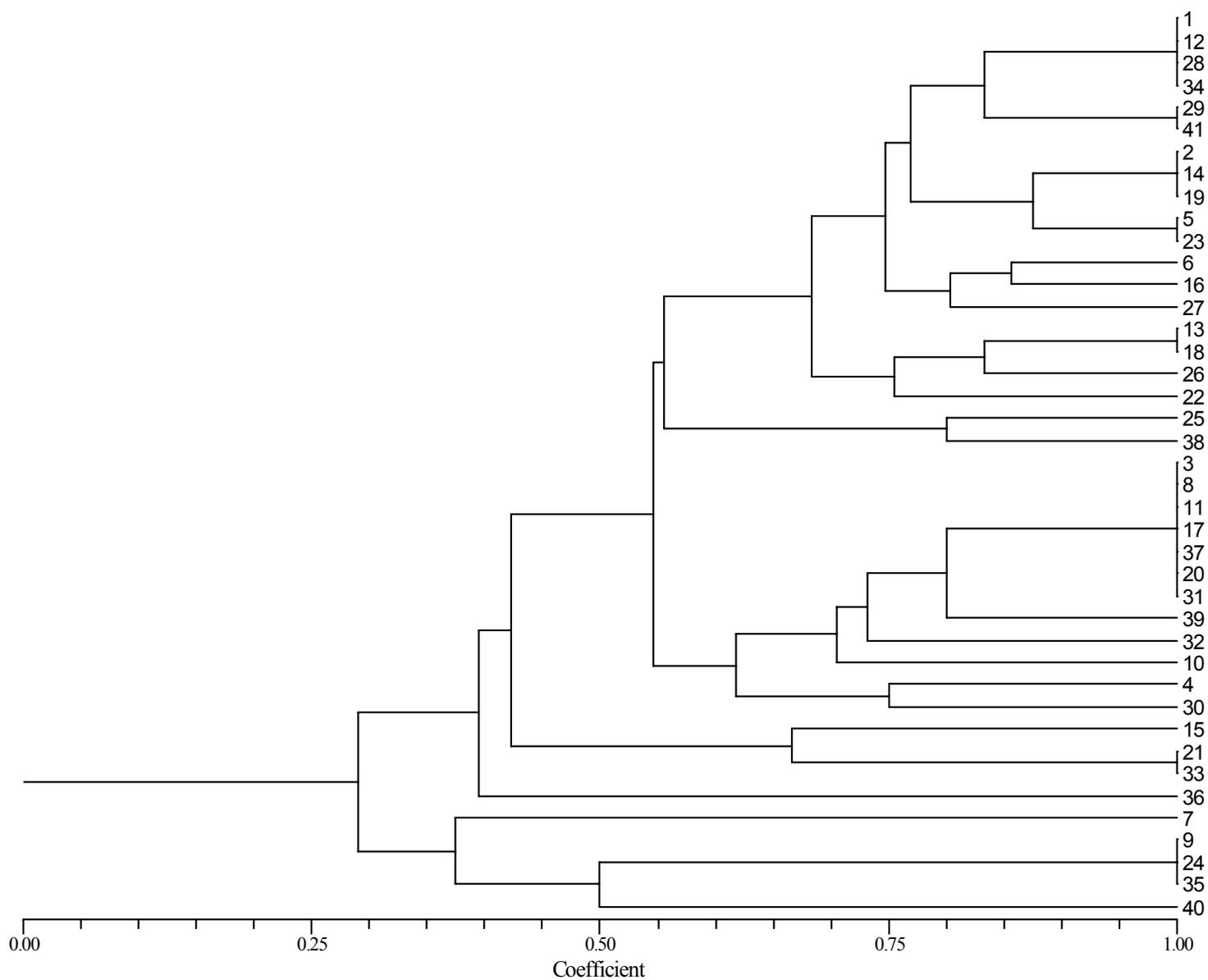
#### 4.1.4 *Pomacanthus paru*

Igualmente ao detalhado na espécie *H. ciliaris*, os números amostrais em *P. paru* permitiram que as análises fossem realizadas tanto entre como dentro das populações, conforme disposto a seguir.

Informações de um total de 45 locos (variando entre 1.500 e 250pb) foram obtidas pelos perfis de amplificação de RAPD-PCR com os *primers* selecionados (figura 19).

Inicialmente, foram estimados os valores de similaridade de Jaccard para cada *primer* considerando todos os indivíduos coletados. Esses dados foram utilizados para gerar dendrogramas por UPGMA e um exemplo está representado na figura 20. É possível verificar que não foram formados grupamentos para cada localidade, indicando que as populações não podem ser diferenciadas por cada *primer* isoladamente. Já as análises intrapopulacionais revelaram que a população denominada Nordeste possui uma diversidade genética superior às demais e um maior número de locos polimórficos (tabela 10).





**Figura 20:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard, no caso com o *primer* C-05, em indivíduos de *P. paru* (1-9, 20-30 = pop. Nordeste, 10-18 = pop. Bahia e 19, 31-40 =pop. Sudeste). Os demais dendrogramas gerados com outros *primers* podem ser visualizados no item 8

Quando os dados foram agrupados para comparações interpopulacionais, detectou-se um pequeno número de marcas espécie-específicas (duas apenas), ao lado de um grande número de alelos com frequências significativamente distintas (10 bandas) (tabela 11). Ainda assim, a variação presente não foi suficiente para separar de modo confiável as três populações analisadas (figura 21), exibindo valores de identidade genética muito próximos entre si (tabela 12). Igualmente, os resultados da AMOVA revelaram um baixo nível de diferenciação genética entre as populações dessa espécie, com um valor de  $\phi_{st}$  menor que 0,1 ( $P < 0,05$ ) (tabela 13).

**Tabela 10:** Valores médios de diversidade gênica ( $h$ ) das populações de *P. paru* (segundo Nei,1973); com respectivos valores de desvio-padrão e percentual de locos polimórficos

localidade*	média de $h$	desvio-padrão de $h$	% locos polimórficos
Nordeste (34)	0,3478	0,1521	91,11
Bahia (10)	0,2724	0,2114	68,89
Sudeste (17)	0,2769	0,1891	80,0

\* O número em parênteses representa o tamanho amostral em cada região

**Tabela 11:** Valores de frequências gênicas em *P. paru*, considerando todas as localidades amostradas; teste de homogeneidade ( $\chi^2$ ); valores de diversidade gênica =  $h$  (Nei,1973) e estimativa de fluxo gênico =  $Nm$  (McDermott & McDonald, 1993).

Alelo	Freq. gênica total	$\chi^2/P$	$h$	$Nm$
B7-1	0,3006	2,277/0,320	0,4205	10,9221
B7-2	0,5329	1,611/0,447	0,4978	7,9869
B7-3*	1,0	0,0/1,0	0,0	-
B7-4	0,1567	5,391/0,067	0,2644	4,7815
B7-5	0,0867	3,751/0,153	0,1583	8,1760
B7-6	0,4003	0,723/0,697	0,4801	30,6701
B7-7**	0,8361	5,971/0,05**	0,2741	1,9542
C5-1	0,5644	0,902/0,637	0,4917	15,4563
C5-2	0,1032	0,281/0,869	0,1851	57,5080

C5-3	0,1887	0,070/0,965	0,3061	295,2880
C5-4	0,2898	1,550/0,461	0,4116	8,7414
C5-5	0,1186	1,410/0,494	0,2090	12,8110
C5-6	0,5951	1,154/0,562	0,4819	13,3288
C5-7	0,4490	2,232/0,327	0,4948	6,3842
C5-8	0,8085	3,203/0,201	0,3097	3,6904
C10-1	0,3215	2,417/0,299	0,4366	4,2973
C10-2	0,6780	4,851/0,088	0,4367	2,2537
C10-3	0,3155	0,900/0,637	0,4319	15,0842
C10-4**	0,6193	6,334/0,042**	0,4715	1,4702
C10-5	0,8042	3,446/0,178	0,3150	2,7911
C10-6**	0,9304	12,594/0,002**	0,1296	1,2343
C10-7	0,3678	3,490/1,175	0,4650	4,2505
C10-8	0,3219	2,417/0,299	0,4366	4,2973
C10-9**	0,5038	10,574/0,05**	0,5	0,6756
C10-10	0,2840	2,555/0,279	0,4067	4,4506
C10-11	0,3749	0,639/0,726	0,4687	20,4339
D2-1*	1,0	0,0/1,0	0,0	-
D2-2	0,1790	4,558/0,102	0,2939	3,5109
D2-3**	0,4383	15,437/0,000**	0,4924	0,4716
D2-4	0,2618	2,470/0,291	0,3865	5,3090
D2-5	0,5806	0,345/0,842	0,4870	44,5240
D2-6	0,1868	1,605/0,448	0,3038	11,2071
D2-7**	0,2417	6,117/0,047**	0,3665	1,9855
D2-8	0,0839	3,010/0,222	0,1537	4,4171
D2-9	0,1504	4,033/0,133	0,2555	3,7482
D3-1**	0,7588	9,778/0,007**	0,3660	0,9685
D3-2	0,0571	3,954/0,138	0,1076	6,0663
D3-3	0,8050	5,533/0,171	0,3140	3,1358
D3-4	0,3976	0,887/0,642	0,4790	19,3511
D3-5	0,1731	0,129/0,937	0,2863	149,6544
D3-6	0,1594	1,105/0,575	0,2680	14,6615
D3-7**	0,4803	10,967/0,004**	0,4992	0,7701
D3-8**	0,7588	9,778/0,007**	0,3660	0,9685
D3-9	0,3922	4,029/0,133	0,4767	4,0764
D3-10**	0,4253	14,107/0,000**	0,4888	0,4708

**Média/desvio padrão de h** 0,3528/0,1379

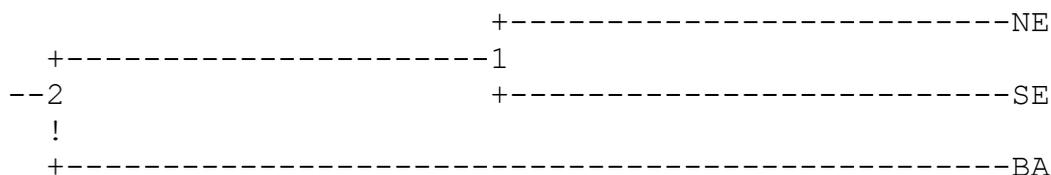
**Média de Nm** 3,0718

\*bandas específicas para a espécie, presentes em todos os indivíduos independentemente do local de origem

\*\*alelos que exibiram frequências significativamente diferentes entre as localidades

**Tabela 12:** Valores de identidade (acima da diagonal) e distância (abaixo da diagonal) genética de Nei (1978) entre as localidades amostradas para *P. paru*.

<b>Localidade</b>	<b>NE</b>	<b>BA</b>	<b>SE</b>
<b>NE</b>	****	0,9256	0,9452
<b>BA</b>	0,0773	****	0,8755
<b>SE</b>	0,0564	0,1330	****



**Figura 21:** Dendrograma baseado nos valores de distância genética de Nei (1978) para as populações de *P. paru*; pop.1=Nordeste, pop.2=Bahia e pop.3=Sudeste.

**Tabela 13:** Análise da variância molecular (AMOVA) em *P. paru*. O valor de P foi obtido a partir de 10.000 permutações e o de fluxo gênico (Nm), a partir da equação de Wright (1951) com base no valor de  $\phi_{st}$

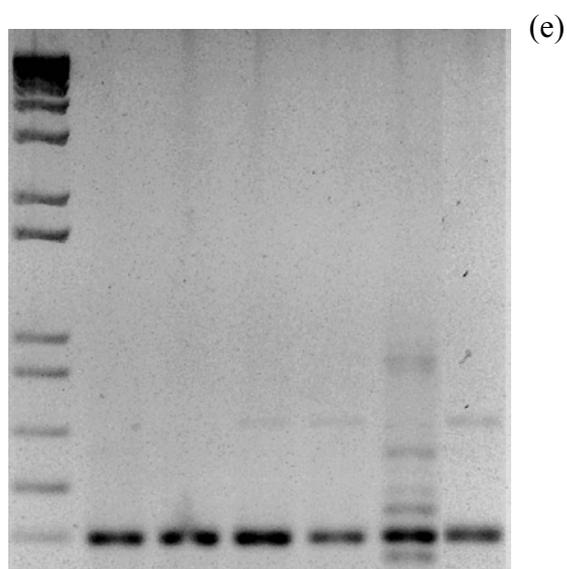
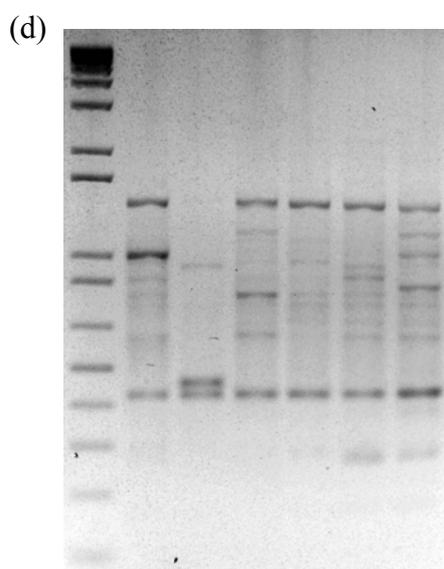
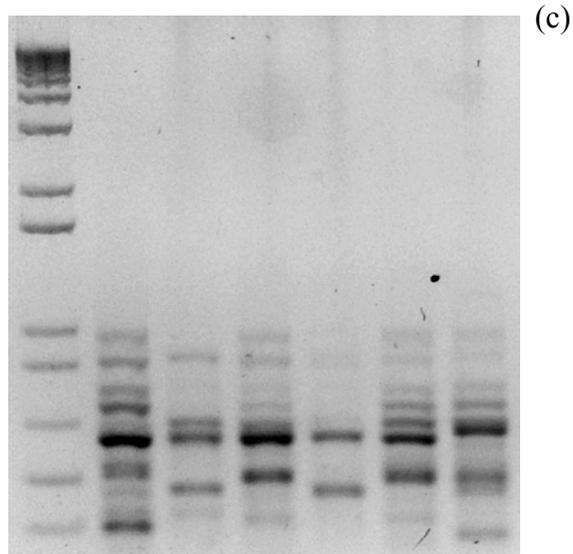
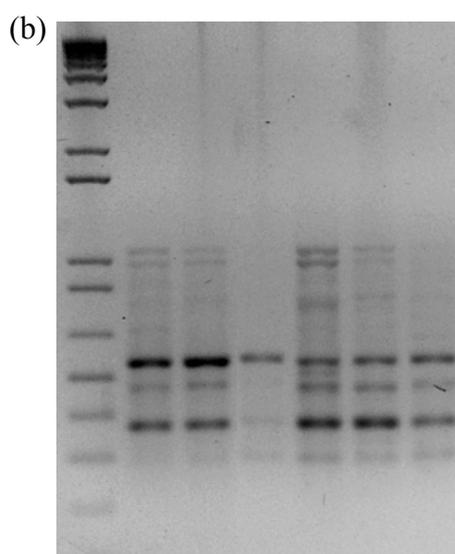
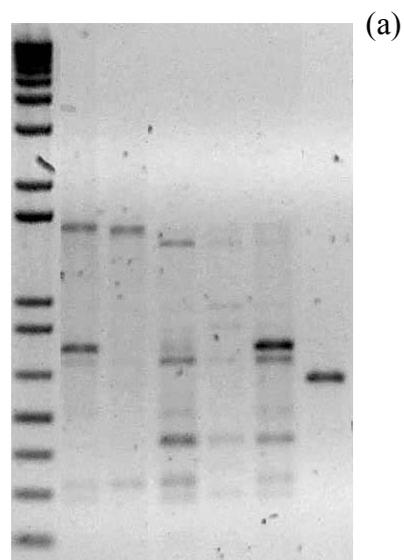
Interpopulacional	Intrapopulacional	Estatística $\phi$	Nm
9,00 %	91,00 %	$\phi_{st} = 0,08996$	2,5290
<b>Valor de P = 0,00337 (P&lt;0,05)</b>			

#### 4.1.5 *Centropyge aurantonotus*

Os padrões de amplificação em indivíduos de *C. aurantonotus* coletados no Sudeste do Brasil com os cinco *primers* empregados no presente estudo estão demonstrados na figura 22. Embora realizadas as mesmas análises que as conduzidas nas espécies anteriores, o objetivo principal foi estimar a variação genética dos indivíduos, já que análises populacionais ficam prejudicadas, tanto pela dificuldade de amostragem (considerada uma espécie rara) como pela sua distribuição restrita, com populações mais conspícuas concentradas na região Sudeste do Brasil, aparentemente relacionada com águas mais

profundas e frias. Mesmo assim, alguns achados interessantes são indicados nessa espécie.

**Figura 22:** Perfil de bandas de RAPD em gel de agarose (1,4%) em alguns indivíduos de *Centropyge aurantonotus* com os primers B-07 (a), C-05 (b), C-10 (c), D-02 (d) e D-03 (e). Marcador de peso molecular de 1Kb representado à esquerda de cada gel.



Um total de 46 bandas foi identificado com tamanho entre 1.600 e 200pb, das quais, cerca de 87% mostraram-se polimórficas. Alguns alelos estavam presentes em todos os espécimes, mas como eles foram agrupados em uma única população, não é possível dizer se eles constituem marcadores espécie-específicos ou não.

As populações de *C. aurantonotus* do litoral capixaba e fluminense estão entre as que parecem sofrer o maior impacto de sobrepesca para o comércio aquariófilo. Ainda assim, os níveis de diversidade genética (tabela 14) detectados no presente estudo revelaram que eles não são tão diferenciados dos encontrados em populações específicas das demais espécies. Deve-se considerar que a distribuição mais restrita também pode influenciar esse resultado e, talvez, uma estruturação populacional pode estar presente mesmo dentro de uma única região como a estudada. Porém, o reduzido número de indivíduos analisados (12) e a ausência de locos com freqüências significativamente distintas restringem maiores considerações.

**Tabela 14:** Valores de freqüências gênicas em *C. aurantonotus*, considerando todas as localidades amostradas; teste de homogeneidade ( $\chi^2$ ); valores de diversidade gênica = h (Nei,1973).

Alelo	Freq. gênica total	h
B7-1	0,1835	0,2997
B7-2	0,0871	0,1591
B7-3	0,1835	0,2997
B7-4	0,2929	0,4142
B7-5	0,0871	0,1591
B7-6	0,2929	0,4142
B7-7	0,4226	0,4880
B7-8	0,4226	0,4880
C5-1	0,5286	0,4984
C5-2	0,3333	0,4444
C5-3	0,1181	0,2083
C5-4*	1,0	0,0
C5-5	0,5286	0,4984

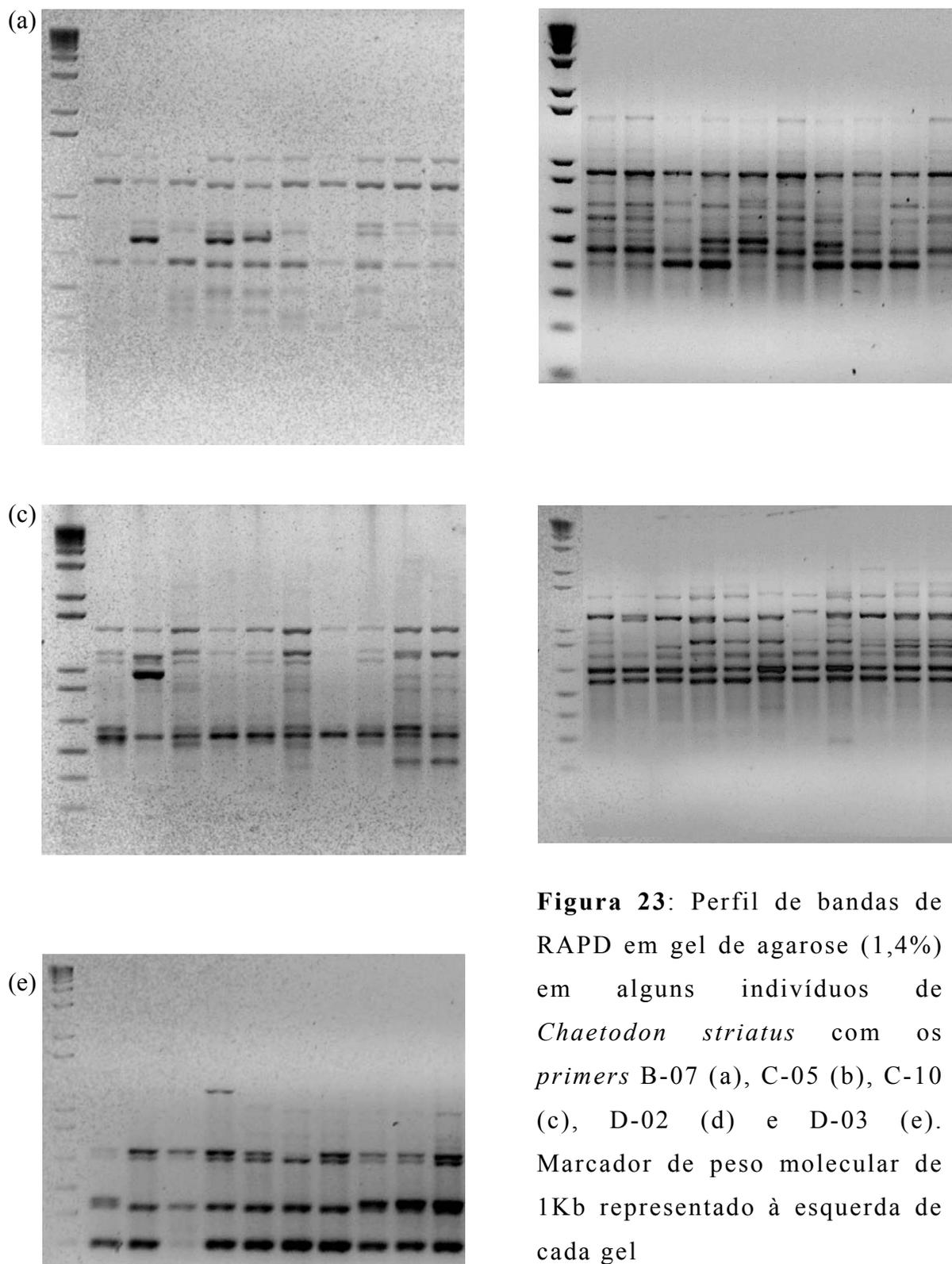
C5-6*	1,0	0,0
C5-7	0,6667	0,4444
C10-1	0,3333	0,4444
C10-2*	1,0	0,0
C10-3	0,2546	0,3796
C10-4	0,3333	0,4444
C10-5	0,2546	0,3796
C10-6	1,0	0,0
C10-7	0,5286	0,4984
C10-8	0,2546	0,3796
C10-9	0,1815	0,2997
C10-10	0,1181	0,2083
C10-11	0,1181	0,2083
D2-1	0,5286	0,4984
D2-2	0,1181	0,2083
D2-3	0,0572	0,1078
D2-4	0,0572	0,1078
D2-5	0,1835	0,2997
D2-6	0,1181	0,2083
D2-7	0,1835	0,2997
D2-8	0,6667	0,4444
D2-9	0,3333	0,4444
D2-10	0,1181	0,2083
D2-11	0,0572	0,1078
D2-12*	1,0	0,0
D2-13	0,2546	0,3796
D3-1	0,7181	0,2083
D3-2	0,3333	0,4444
D3-3	0,1181	0,2083
D3-4	0,1181	0,2083
D3-5	0,0572	0,1078
D3-6	1,0	0,0
D3-7	0,0572	0,1078
<b>Média/desvio padrão de h</b>		<b>0,2752/0,1658</b>
<b>Porcentagem de locos polimórficos</b>		<b>86,96%</b>

\* bandas presentes em todos os indivíduos analisados

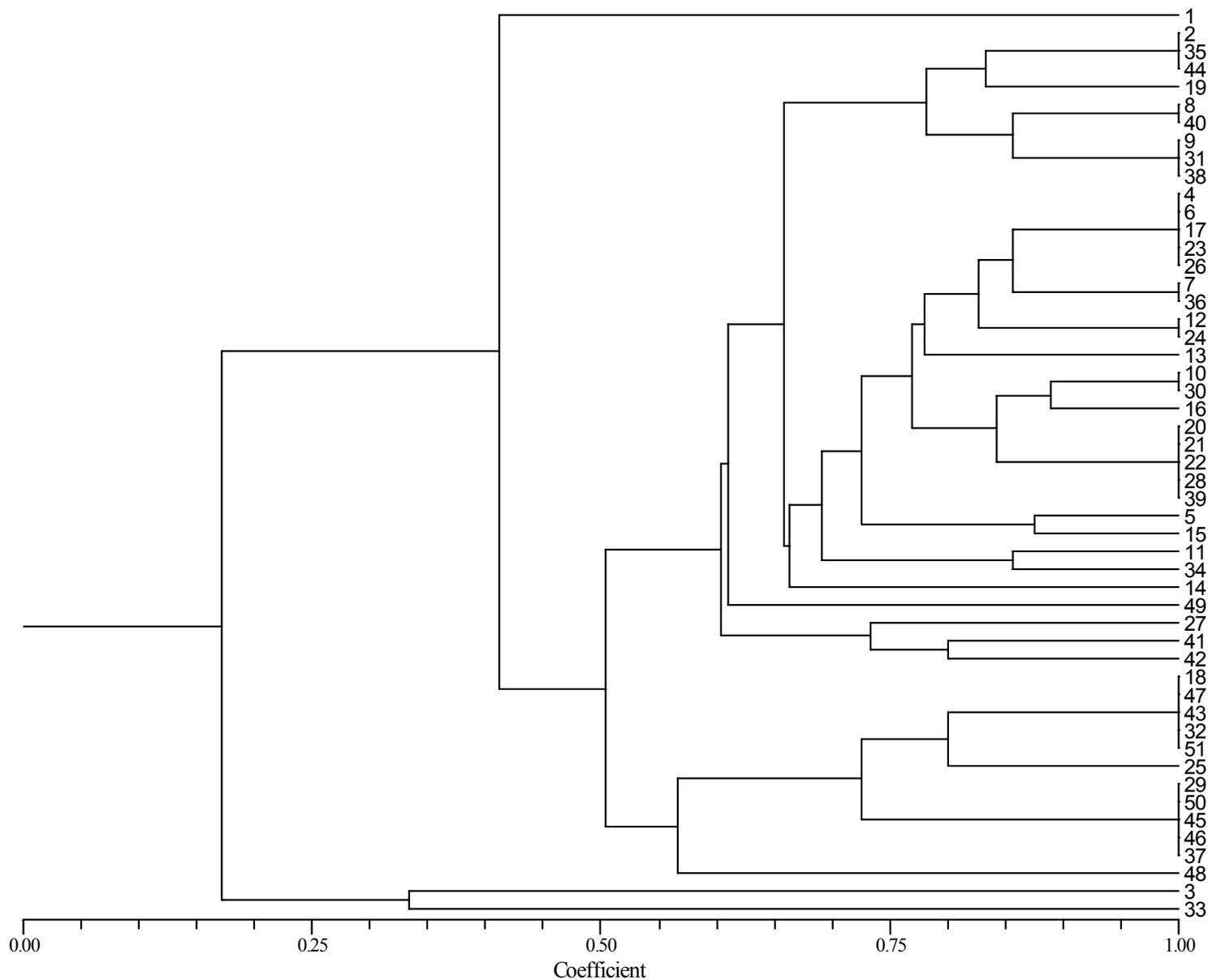
#### 4.1.6 *Chaetodon striatus*

Os dados reunidos a partir dos perfis de RAPD-PCR (figura 23) com os cinco *primers* selecionados permitiram a identificação de 50 bandas úteis para as análises propostas, entre 1.500 e 100pb.

Também foi possível avaliar a variação inter e intrapopulacional de *C. striatus*. A análise dos dendrogramas baseados nos índices de similaridade de Jaccard com cada *primer*, igualmente às demais espécies, não separou os indivíduos de cada população (figura 24).



**Figura 23:** Perfil de bandas de RAPD em gel de agarose (1,4%) em alguns indivíduos de *Chaetodon striatus* com os primers B-07 (a), C-05 (b), C-10 (c), D-02 (d) e D-03 (e). Marcador de peso molecular de 1Kb representado à esquerda de cada gel



**Figura 24:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard, no caso com o *primer* D-02, em indivíduos de *C. striatus* (1-21, 45-46 = pop. Nordeste, 22-25 = pop. Bahia e 26-44, 47-51 = pop. Sudeste). Os demais dendrogramas gerados com outros *primers* podem ser visualizados no item 8

Somando os resultados de cada *primer* nas comparações intrapopulacionais, verificou-se que a população da Bahia apresentou menor diversidade genética (tabela 15). Essa evidência parece ser um reflexo do pequeno número de indivíduos analisados dentro dessa população se comparados com as outras localidades. Por outro lado, a população denominada Nordeste apresentou o maior índice de locos polimórficos.

As análises interpopulacionais (tabela 16) revelaram uma variabilidade genética média em torno de 32% com um alto fluxo gênico. Isso indica que a variação intrapopulacional não é muito diferenciada da interpopulacional, novamente apontando para uma ausência de estruturação genética entre as populações. Ainda assim, locos com frequências significativamente diferenciadas entre si foram encontrados.

Da mesma forma, os índices de identidade e distância genética mostraram que as três populações são muito similares (tabela 18). Conseqüentemente, o dendrograma gerado a partir desses dados não pode ser considerado consistente (figura 25). O valor de  $\phi_{st}$  fornecido pela AMOVA confirmou as evidências supracitadas, indicando uma baixa estruturação populacional nessa espécie, significativamente atestada (tabela 18).

**Tabela 15:** Valores médios de diversidade gênica ( $h$ ) das populações de *C. striatus* (segundo Nei,1973); com respectivos valores de desvio-padrão e percentual de locos polimórficos

<b>Localidade*</b>	<b>Média de h</b>	<b>Desvio-padrão de h</b>	<b>% locos polimórficos</b>
<b>Nordeste</b> (32)	0,3478	0,1521	91,11
<b>Bahia</b> (5)	0,2724	0,2114	68,89
<b>Sudeste</b> (21)	0,2769	0,1891	80,0

\* O número em parênteses representa o tamanho amostral em cada região

**Tabela 16:** Valores de freqüências gênicas em *C striatus*, considerando todas as localidades amostradas; teste de homogeneidade ( $\chi^2$ ); valores de diversidade gênica = h (Nei,1973) e estimativa de fluxo gênico = Nm (McDermott & McDonald, 1993)

Alelo	Freq. gênica total	$\chi^2/P$	h	Nm
B7-1**	0,4143	6,322/0,042**	0,4853	0,8296
B7-2	0,6345	2,534/0,282	0,4638	2,2652
B7-3	0,2866	2,780/0,249	0,4089	6,2567
B7-4	0,3299	2,033/0,362	0,4422	9,3686
B7-5	0,1849	0,749/0,687	0,3015	19,3342
B7-6	0,5035	4,669/0,097	0,5	1,2121
B7-7	0,1969	0,261/0,877	0,3163	35,1542
B7-8	0,1107	0,371/0,831	0,1968	72,8899
B7-9	0,1980	0,8/0,670	0,3176	25,3673
C5-1**	0,5975	8,581/0,014**	0,4810	1,0842
C5-2	0,2041	5,892/0,052	0,3248	2,4825
C5-3	0,8980	5,345/0,069	0,1833	3,0
C5-4	0,3820	1,198/0,549	0,4721	15,6855
C5-5**	0,9087	7,136/0,028**	0,1659	2,6041
C5-6	0,2861	0,130/0,937	0,4085	242,8927
C5-7	0,3300	0,030/0,985	0,4422	296,9477
C5-8	0,3199	1,549/0,461	0,4351	7,4120
C5-9	0,6531	4,864/0,0888	0,4531	5,5
C5-10**	0,8301	11,244/0,004**	0,2821	1,8223
C10-1	0,5265	4,066/0,131	0,4986	1,3738
C10-2	0,4857	0,152/0,927	0,4996	195,9454
C10-3	0,2359	2,166/0,338	0,3605	4,7179
C10-4	0,2314	0,305/0,858	0,3557	63,3547
C10-5	0,2093	2,201/0,333	0,3310	11,5420
C10-6	0,2050	0,179/0,914	0,3259	50,5790
C10-7	0,4509	0,903/0,637	0,4952	14,7876
C10-8*	1,0	0,0/1,0	0,0	-
C10-9	0,3793	0,506/0,776	0,4708	24,1255
C10-10	0,1107	2,505/0,286	0,1969	5,4700
C10-11	0,0982	1,733/0,420	0,1772	7,4651
C10-12	0,0748	0,825/0,662	0,1384	12,8368
D2-1	0,1162	1,589/0,452	0,2054	7,2749
D2-2	0,4628	5,159/0,076	0,4972	6,0176
D2-3	0,6730	2,478/0,290	0,4402	2,6462
D2-4	0,1151	0,590/0,745	0,2036	53,0132
D2-5**	0,3075	7,250/0,027**	0,4259	3,1254
D2-6	0,0929	0,445/0,801	0,1686	13,3838
D2-7**	0,5904	10,107/0,006**	0,4837	2,0190
D2-8	0,7729	2,113/0,348	0,3510	3,8027
D2-9	0,0409	2,089/0,352	0,0784	8,6093
D2-10*	1,0	0,0/1,0	0,0	-
D2-11	0,0198	0,101/0,951	0,0389	65,1566
D2-12	0,0299	0,225/0,893	0,0581	39,0903
D3-1	0,1720	2,463/0,292	0,2849	8,9279
D3-2	0,0827	3,175/0,204	0,1516	9,4650
D3-3	0,9001	5,345/0,069	0,1799	3,1471
D3-4	0,6111	4,770/0,092	0,4753	1,6157
D3-5	0,4297	0,352/0,839	0,4901	59,8678

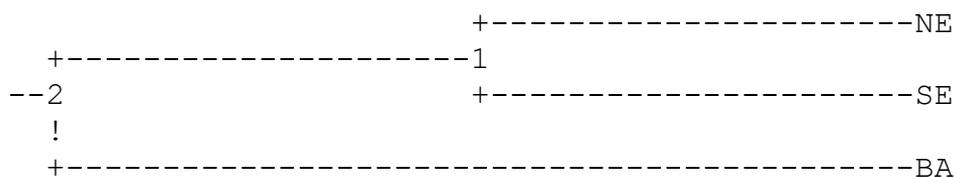
D3-6**	0,8754	10,929/0,004**	0,2182	1,6803
D3-7	0,7474	3,618/0,164	0,3776	2,7333
<b>Média/desvio padrão de h</b>				0,3212/0,1509
<b>Média de Nm</b>				4,2360

\*bandas específicas para a espécie, presentes em todos os indivíduos independentemente do local de origem

\*\*alelos que exibiram frequências significativamente diferentes entre as localidades

**Tabela 17:** Valores de identidade e distância (acima e abaixo da diagonal, respectivamente) genética de Nei (1978) entre as populações de *C. striatus*

<b>Localidade</b>	<b>NE</b>	<b>BA</b>	<b>SE</b>
<b>NE</b>	****	0,9538	0,9700
<b>BA</b>	0,0473	****	0,9324
<b>SE</b>	0,0305	0,0700	****



**Figura 25:** Dendrograma baseado na distância genética (Nei, 1978) entre as populações de *C. striatus*

**Tabela 18:** Análise da variância molecular (AMOVA) em *C. striatus*. O valor de P foi obtido a partir de 10.000 permutações e o de fluxo gênico (Nm), a partir da equação de Wright (1951) com base no valor de  $\phi_{st}$

<b>Interpopulacional</b>	<b>Intrapopulacional</b>	<b>Estatística <math>\phi</math></b>	<b>Nm</b>
4,09 %	95,91 %	$\phi_{st} = 0,02782$	8,7363
<b>Valor de P = 0,00337 (P&lt;0,05)</b>			

#### 4.2 Relações interespecíficas

Nas tabelas 19 e 20, estão compilados os dados sobre coeficientes médios de similaridade e de variação (obtidos a partir dos valores médios dos coeficientes de Jaccard, segundo a fórmula: desvio padrão/similaridade média\*100), número de locos polimórficos e valores médios de heterozigidade obtidos para cada espécie analisada com os cinco *primers* em comum. Esses dados permitem avaliar comparativamente os níveis de diversidade genética entre os representantes das duas famílias estudadas.

É possível afirmar que as espécies do gênero *Holacanthus* são as que apresentam maior similaridade genética, muito embora tenham tido as populações mais diferenciadas entre si, um indicativo de maior estruturação genética nos representantes desse gênero. As demais espécies apresentaram valores de similaridade pouco distintos, entre 50 e 55%, não havendo uma clara relação com o status filogenético. O coeficiente de variação em *C. aurantonotus* e *P. arcuatus* foi superior ao valor de similaridade média, o que possivelmente foi decorrente de uma amostra reduzida de indivíduos, prejudicando os dados estatísticos. Porém, vale ressaltar que, em *C. aurantonotus*, apenas uma população foi analisada, ao contrário das demais. Ainda assim, ela apresentou uma variabilidade genética similar ao conjunto de populações que representavam as outras espécies, apontando-a como uma espécie de alto polimorfismo molecular. Diferenças relacionadas com o número de marcas específicas e de frequências alélicas significativamente distintas também são encontradas, como abordado nos itens anteriores. Desse modo, pode-se observar que um mesmo *primer* seguiu um comportamento diferenciado para cada espécie, onde alguns deles se mostraram mais eficazes

na detecção de marcadores para uma espécie em particular, enquanto outros foram mais eficientes na determinação de diferenças interpopulacionais.

**Tabela 19:** Coeficientes de similaridade de Jaccard (J) e de variação (CV), expressos em porcentagem para cada *primer* utilizado nas reações de RAPD-PCR, considerando todos os indivíduos.

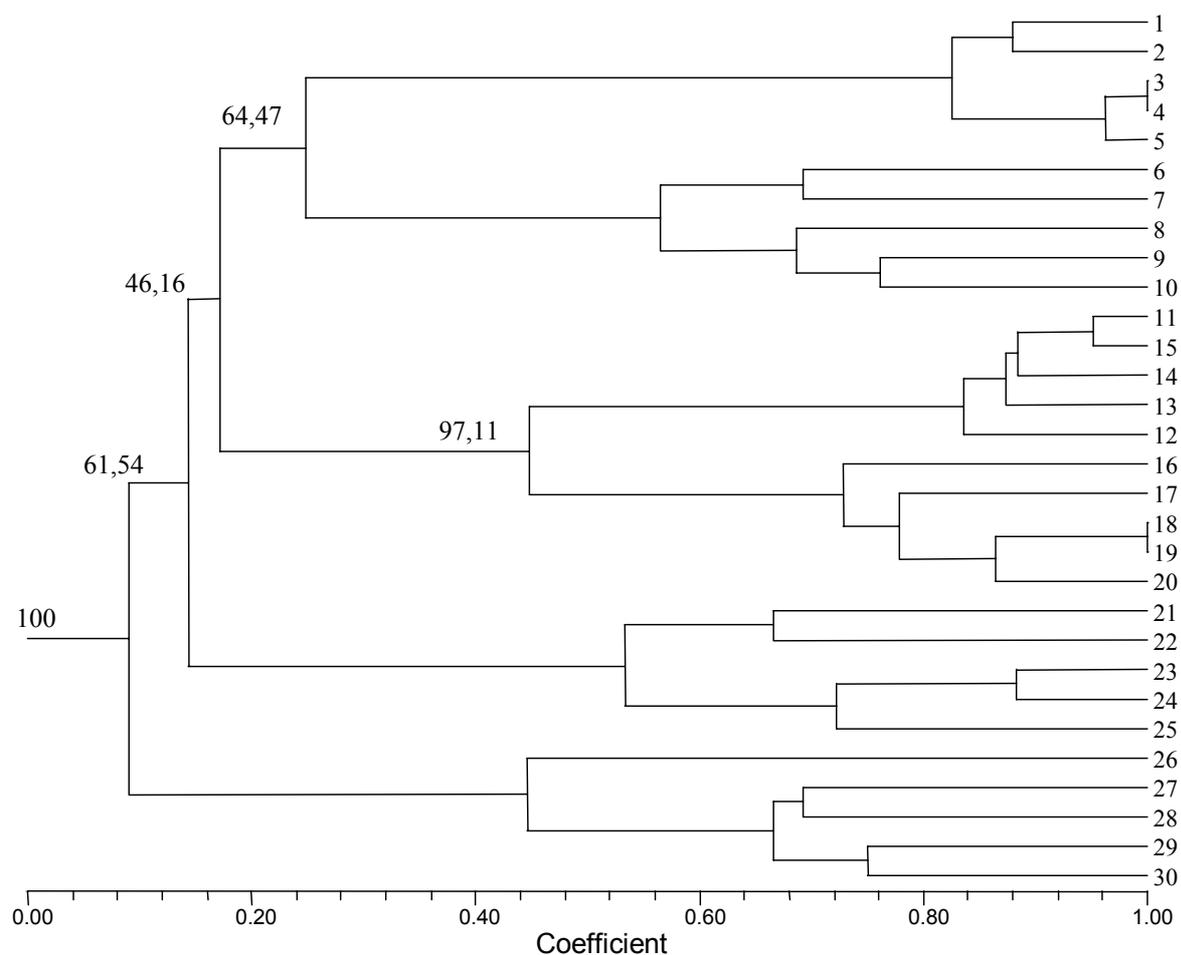
Espécie	B-07		C-05		C-10		D-02		D-03		Valores médios (J/CV)
	J	CV									
<i>H.ciliaris</i>	54,0	42,6	76,3	30,7	64,8	32,1	60,2	43,9	58,6	44,2	<b>62,8/38,5</b>
<i>H. tricolor</i>	79,5	25,0	77,8	31,6	68,4	39,0	37,3	58,9	74,2	27,2	<b>67,4/36,3</b>
<i>P. arcuatus</i>	57,3	54,4	42,9	84,7	68,7	30,3	46,9	51,1	37,5	57,4	<b>50,7/55,6</b>
<i>P. paru</i>	63,3	36,5	55,3	42,8	56,9	33,2	47,6	49,7	56,6	40,3	<b>56,0/39,3</b>
<i>C. aurantonotus</i>	23,1	100	74,8	25,7	56,6	46,9	50,8	49,3	62,4	53,9	<b>53,5/55,1</b>
<i>C.striatus</i>	41,0	67,0	64,5	29,1	46,3	55,4	60,5	35,5	71,8	27,5	<b>56,8/42,9</b>

**Tabela 20:** Valores médios de heterozigose e número de locos polimórficos, expressos em porcentagem, obtidos a partir do conjunto de cinco *primers* de RAPD testados, considerando todos os indivíduos das espécies de Pomacanthidae e Chaetodontidae analisadas.

Espécie	B-07+C-05+C-10+D-02+D-03	
	Heterozigose	locos polimórficos
<i>H.ciliaris</i>	34,9	95,0
<i>H. tricolor</i>	24,2	68,9
<i>P. arcuatus</i>	31,4	81,1
<i>P. paru</i>	35,2	95,5
<i>C. aurantonotus</i>	27,5	87,0
<i>C.striatus</i>	32,1	96,0

Adicionalmente, reações de RAPD foram conduzidas com os *primers* acima citados em cinco indivíduos de cada uma das seis espécies ora analisadas para uma abordagem interespecífica. A partir dos produtos amplificados foram construídas matrizes de similaridade e um dendrograma por UPGMA agrupando as informações dos cinco *primers*, revelando assim as relações genéticas entre as espécies (figura 26). Nessa análise foi possível separar as

seis espécies selecionadas. Além disso, foi possível verificar que, de um modo geral, espécies do mesmo gênero, especialmente *P. paru* e *P. arcuatus*, estavam mais intimamente relacionadas.



**Figura 26:** Dendrograma por UPGMA obtido com os cinco *primers* selecionados nas espécies *Holacanthus ciliaris* (1 a 5), *H. tricolor* (6 a 10), *Pomacanthus arcuatus* (11 a 15), *P. paru* (16 a 20), *Centropyge aurantonotus* (21 a 25) e *Chaetodon striatus* (26 a 30). Os valores de *bootstrap* estão mostrados em cada ramo

### 4.3 Ensaio da metodologia PIMA

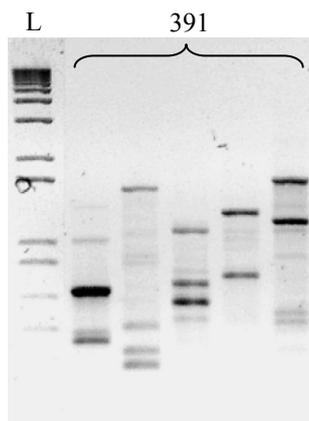
A obtenção de seqüências de microssatélites pela técnica do PIMA é facilitada pela presença de milhares de fragmentos de DNA oriundos do genoma total passíveis de conterem segmentos repetitivos que identificam o indivíduo dentro da população (Lunt *et al.*, 1999)..

A grande quantidade de informações geradas está relacionada à utilização da técnica de RAPD como base para o desenvolvimento dessa metodologia, a qual tem sido amplamente utilizada em estudos de prospecção de locos microssatélites de diversos organismos.

#### 4.3.1 *Pomacanthus paru*

A escolha da espécie *Pomacanthus paru* para iniciar a padronização do método PIMA é justificada pela representatividade da amostra dessa espécie e, principalmente, por sua importância econômica e ecológica entre os peixes de recifes de corais de ocorrência no litoral brasileiro.

Dessa forma, a partir da amplificação de diversos fragmentos aleatórios via RAPD (figura 27), foi feita a clonagem conjunta dos cinco produtos de amplificação obtidos da amostra 391 (origem: Maceió/AL) e, posteriormente, de produtos obtidos com o emprego de mais seis *primers* de seqüência arbitrária (B-08, B-09, B-10, OPP-13, OPP-18 e OPP-19) sobre o DNA do mesmo indivíduo já citado que, embora não utilizados na análise populacional por RAPD, mostraram-se apropriados para os objetivos da presente metodologia (dados não mostrados).

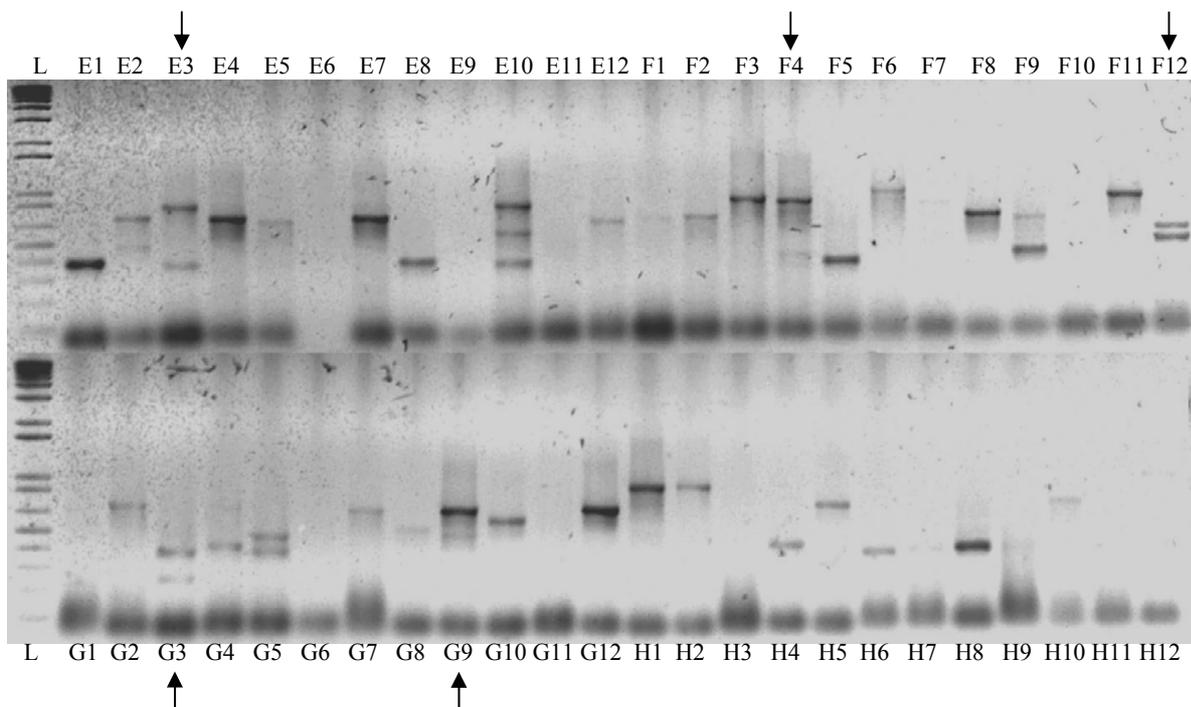


**Figura 27:** Gel de agarose (1,4%) corado com brometo de etídio revelando os perfis de amplificação por RAPD da amostra 391 de *P. paru* com a utilização dos *primers* B-07, C-05, C-10, D-02 e D-03, respectivamente.

A partir das placas de cultura com colônias brancas e azuis, foram escolhidos, aleatoriamente, os clones recombinantes positivos para dar prosseguimento à obtenção das seqüências de microssatélites em *P. paru*.

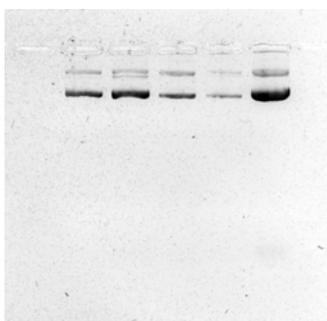
Baseado nos resultados da PCR das amostras, adotou-se o critério de escolha baseado nas seguintes características: presença de duas bandas e estas apresentarem menos de 1.600pb. É conveniente que a banda inferior seja da mesma intensidade que a banda superior. Portanto, os clones recombinantes selecionados foram: E3, F4, F12, G3 e G9 como mostra a figura 28.

Além desses, vários outros clones foram escolhidos para a análise de sequenciamento a partir de novas placas- A1, B8, B12, C8, E11, G1 e G10.



**Figura 28:** Gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio revelando os perfis de amplificação por PCR dos 48 clones recombinantes positivos com a utilização do *pool* de *primers* escolhidos anteriormente. Os clones candidatos a conterem microssatélites estão assinalados com setas.

A extração de DNA dos clones escolhidos foi realizada por meio de mini-preparações objetivando amostras com concentrações em torno de 200 $\eta$ g/ $\mu$ l ou superiores. O resultado dessas preparações está representado na figura 29.



**Figura 29:** Amostras de DNA obtidas a partir de mini-preparações de cinco dos clones selecionados, respectivamente E3, F4, F12, G3 e G9.

Os clones que obtiveram as concentrações de DNA ideais foram submetidos ao sequenciamento para confirmação da presença de microssatélites.

A análise das seqüências de plasmídeos contendo insertos do DNA de *P. paru* revelou a presença de vários locos microssatélites, conforme listado na tabela 21. Nem todos os locos identificados apresentavam seqüências perfeitas, havendo substituição de uma das bases originais por outra em uma das unidades de repetição.

**Tabela 21:** Locos de microssatélites identificados em *P. paru*

<b>Loco</b>	<b>Nome do loco</b>	<b>Perfeito</b>
CA <sub>(7)</sub>	Pp01	não
GT <sub>(10)</sub>	Pp02	sim
TG <sub>(6)</sub>	Pp03	sim
CTG <sub>(4)</sub>	Pp04	sim
GGAT <sub>(3)</sub>	Pp05	sim
TC <sub>(6)</sub>	Pp06	não
ATT <sub>(4)</sub>	Pp07	não

O delineamento de *primers* específicos para as regiões flangeadoras, dos locos perfeitos e um dos imperfeitos (Pp01) identificados em *P. paru* foi realizado, obedecendo aos critérios comentados no item 3.2.5.8 sobre as características composicionais e termodinâmicas dos oligonucleotídeos, buscando uma alta especificidade na amplificação do fragmento de interesse. Desse modo, a seqüência amplificada com o par de *primers* construído deve ter cerca de 120 pares de bases para o loco Pp01, cerca de 160pb para o loco Pp02, 190pb para o loco Pp03, 120pb para o loco Pp04 e cerca de 100pb para o loco Pp05.

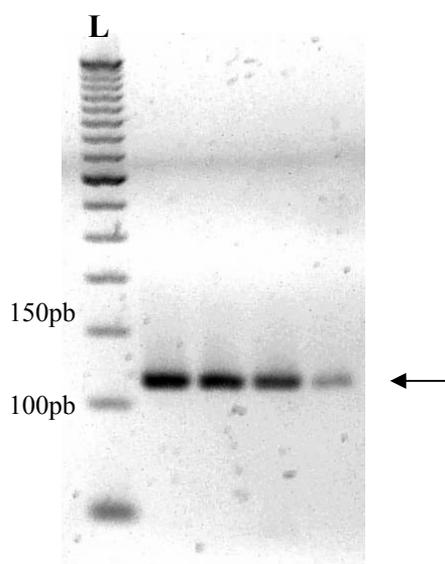
Esses *primers* foram testados em diversas reações de PCR com variações nas temperaturas de anelamento e nas concentrações de cloreto de magnésio a fim de se obter o padrão adequado de amplificação para avaliação do

comportamento de cada loco entre os indivíduos selecionados. A partir da otimização da reação e da identificação do nível de polimorfismo do loco, as análises populacionais podem ser realizadas com a utilização de oligonucleotídeos marcados com o composto fluorescente NED em géis de sequenciamento.

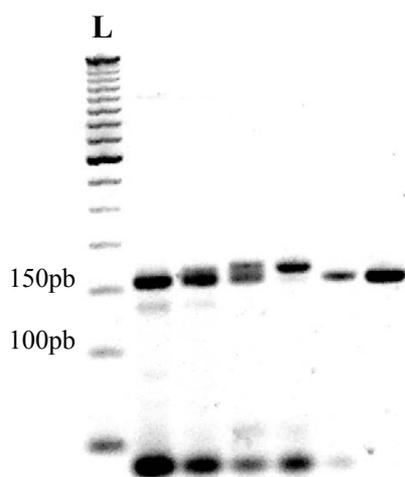
Observou-se que um padrão satisfatório de amplificação dos respectivos locos foi obtido com uma temperatura de anelamento de 56°C e 1,5mM de cloreto de magnésio. Para uma melhor observação dos diferentes alelos possivelmente presentes, a eletroforese dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose 1000 (*Life Technologies*) a 2,5%, corado com brometo de etídio, durante, no mínimo, 3h a 90v. Além disso, aqueles locos monomórficos em agarose foram também avaliados em gel de poliacrilamida, mais resolutivo para a separação de alelos, o qual confirmou todas as observações prévias feitas em géis de agarose, como a seguir.

Verificou-se que os locos Pp01, Pp03, Pp04 e Pp05 são monomórficos, apresentando um único alelo, dentro dos limites de tamanho esperado para o fragmento flanqueado pelos *primers*. Já o loco Pp02, embora testado em poucos animais nessa fase inicial, mostrou-se polimórfico, mas com alelos de acordo com o tamanho esperado para o loco em questão, girando em torno de 150-160 pb (figuras 30 a 32). Assim, o loco Pp02 aparece como um forte candidato às análises populacionais propostas nesse grupo de peixes e oligonucleotídeos marcados foram providenciados para a amplificação via PCR desse loco nas amostras de DNA de *P. paru* para imediata avaliação do polimorfismo apresentado entre e dentro das populações (ver item 4.5). Paralelamente, os *primers* delineados para o loco Pp02 de *P. paru* também foram testados nas espécies correlatas para verificar a sua utilidade nos

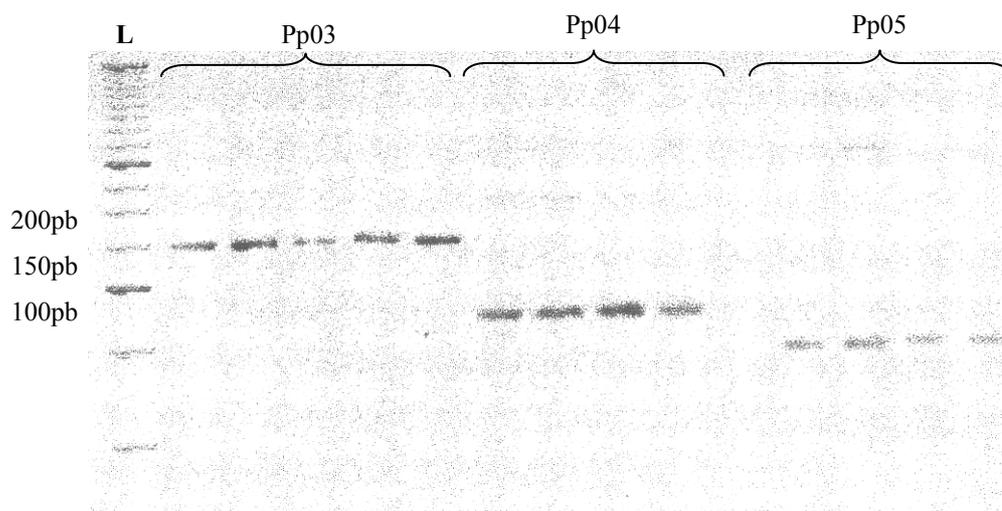
estudos populacionais não só da espécie original, mas do grupo como um todo.



**Figura 30:** Perfil de amplificação do loco Pp01 em alguns indivíduos de *P. paru* de diferentes localidades em gel de agarose 1000 a 2,5%, corado com brometo de etídio. A seta indica o alelo com cerca de 120 pb. L = marcador de peso molecular de 50 pb.



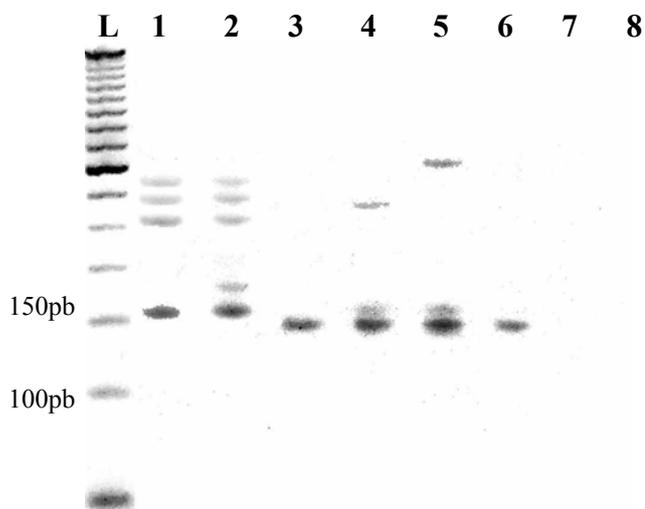
**Figura 31:** Perfil de amplificação do loco Pp02 em indivíduos de *P. paru* de diferentes localidades em gel de agarose 1000 a 2,5%, corado com brometo de etídio, revelando o polimorfismo alélico. A seta indica o alelo com cerca de 160 pb. L = marcador de peso molecular de 50 pb.



**Figura 32:** Perfil de amplificação dos locos Pp03, Pp04 e Pp05 em indivíduos de *P. paru* de diferentes origens em gel de agarose 1000 a 2,5%, corado com brometo de etídio, L = marcador de peso molecular de 50pb.

Foi verificado que os *primers* do loco Pp02 foram capazes de amplificar o loco de microssatélite nas espécies *P. arcuatus*, *H. ciliaris* e *H. tricolor*, mas não em *C. aurantonotus* (figura 33). O perfil de amplificação foi diferenciado entre as espécies com resultados positivos. A espécie *P. arcuatus*, provavelmente devido ao estreito relacionamento filogenético, apresentou um padrão bem similar ao de *P. paru*, tendo inclusive a presença de algumas bandas expúrias.

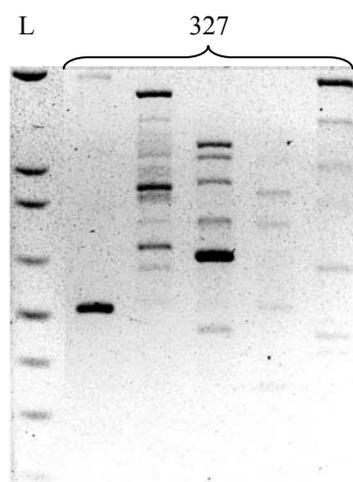
Por sua vez, as espécies do gênero *Holacanthus* apresentaram um padrão semelhante entre si, mas distinto daquele observado em *Pomacanthus*, gerando um fragmento sutilmente menor. Aparentemente, embora o número de espécimes utilizados nessa reação seja pequeno, o loco Pp02 também parece apresentar algum grau de polimorfismo nessas espécies.



**Figura 33:** Perfil de amplificação do loco Pp02 em gel de agarose a 2,5%, corado com brometo de etídio, nas demais espécies de Pomacanthidae analisadas (1-2: *P. arcuatus*, 3-4: *H. ciliaris*, 5-6: *H. tricolor*, 7-8: *C. aurantonotus*). L = marcador de peso molecular de 50 pb.

#### 4.3.2 *Holacanthus ciliaris*

Similarmente ao descrito para *P. paru*, os produtos de RAPD-PCR obtidos com os 12 *primers* selecionados daquele indivíduo que apresentou o maior número de bandas nítidas foram purificados e ligados em plasmídeos (p. ex.: figura 34).



**Figura 34:** Gel de agarose (1,4%) corado com brometo de etídio revelando os perfis de amplificação por RAPD-PCR da amostra 327 de *H. ciliaris* com a utilização de cinco dos 12 *primers* testados



Além disso, a maioria apresentava seqüências imperfeitas, com substituições dentre das unidades de repetição ou não poderiam ser utilizadas para análises populacionais, como a repetição envolvendo mononucleotídeos – loco Hc05.

**Tabela 22:** Locos de microssatélites identificados em *H. ciliaris*

<b>Loco</b>	<b>Nome do loco</b>	<b>Perfeito</b>
CT <sup>(21)</sup>	Hc01	Sim
GT <sup>(6)</sup>	Hc02	Não
AGA <sup>(4)</sup>	Hc03	Não
GCA <sup>(5)</sup>	Hc04	Não
G <sup>(31)</sup>	Hc05	Sim

A seqüência de microssatélite identificada em *H. ciliaris* mais promissora para análises de polimorfismo envolve 31 repetições do dinucleotídeo CT (loco Hc01). Infelizmente, esse loco microssatélite estava situado no início do fragmento, muito próximo à seqüência do plasmídeo no qual estava inserido. Dessa forma, não foi possível delinear *primers* flanqueadores a esse loco a fim de testar a sua amplificação e nível de polimorfismo intra-específico.

#### 4.4 Análise populacional em *P. paru* com o loco Pp02

A avaliação do polimorfismo dos indivíduos de *P. paru* em relação ao loco de microssatélite foi realizada com a utilização dos *primers* flanqueadores marcados pelo composto fluorescente NED. Os produtos amplificados foram analisados em géis de sequenciamento e os alelos eram diferenciados por tamanho.

A partir da análise de 53 indivíduos de *P. paru* distribuídos em três localidades distintas (30 da população denominada Nordeste, 10 da Bahia e 13 da região Sudeste), foi possível identificar 10 alelos, diferenciados pelo número de bases, como a seguir: 154, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180

e 182. O alelo com 166pb foi o mais freqüente, presente em 40 indivíduos, seja em homozigose ou heterozigose. Além disso, um alto número de heterozigotos foi encontrado, representando 69,8% das amostras (37 indivíduos distribuídos entre as diferentes localidades).

O uso do teste exato de Fisher para verificar se as populações analisadas estão em equilíbrio e se há déficit de heterozigotos revelou que não há evidências de perda de variabilidade genética, já que o loco analisado estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não apresentava déficit de heterozigose, apresentando valores superiores a 0,05. Esses valores foram encontrados considerando as populações isoladamente ou em conjunto (tabela 23). Dessa forma, demonstra-se que o loco Pp02 é extremamente adequado para análises populacionais, com ausência de alelos nulos e permitindo assumir o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Tabela 23:** Valores de probabilidade para desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (PHW) e déficit de heterozigotos (PDH) das três populações de *P. paru* analisadas com o loco Pp02 ( $P > 0,05$ )

<b>População</b>	<b>PHW</b>	<b>PDH</b>
Nordeste	0,6774	0,8297
Bahia	0,1371	0,1483
Sudeste	0,9622	0,8510
Todas	0,5710	0,6244

A partir de então, as análises populacionais foram realizadas usando os programas GENEPOP e FSTAT, conforme descrito na seção 3.2.4.

Os valores de diferenciação genética e genotípica comparando as populações par a par, revelaram que as três populações estão significativamente bem diferenciadas (valores de probabilidade bem inferiores a 0,05), conforme demonstrado nas tabelas 24 e 25.

**Tabela 24:** Valores de probabilidade (P) e erro-padrão (EP) obtidos para a diferenciação genética de cada par de populações de *P. paru*, analisadas com o loco Pp02, onde NE = pop. Nordeste, BA = pop. Bahia e SE = pop. Sudeste

<b>Pares de populações</b>	<b>P</b>	<b>EP</b>
NE x BA	0,00072	0,00022
NE x SE	0,01276	0,00199
BA x SE	0,00455	0,00091

**Tabela 25:** Valores de probabilidade (P) e erro-padrão (EP) obtidos para a diferenciação genotípica de cada par de populações de *P. paru*, analisadas com o loco Pp02, onde NE = pop. Nordeste, BA = pop. Bahia e SE = pop. Sudeste

<b>Pares de populações</b>	<b>P</b>	<b>EP</b>
NE x BA	0,00762	0,00089
NE x SE	0,01203	0,00140
BA x SE	0,00455	0,00057

Por sua vez, a diferenciação genética entre os pares de populações estimada pelo índice de fixação  $F_{st}$  (Weir & Cockerham, 1984) também demonstrou que as populações analisadas de *P. paru* com o loco Pp02 são significativamente diferenciadas, já que valores positivos de  $F_{st}$  foram obtidos com probabilidade inferior a 0,05 ( $P < 0,05$ ) (tabelas 26 e 27).

**Tabela 26:** Valores estimados de  $F_{st}$  obtidos através da comparação entre heterozigosidade observada e esperada das populações analisadas de *P. paru* com o loco Pp02

<b>Populações</b>	<b>Nordeste</b>	<b>Bahia</b>	<b>Sudeste</b>
<b>Nordeste</b>	0,0		
<b>Bahia</b>	0,0846	0,0	
<b>Sudeste</b>	0,0217	0,0505	0,0

**Tabela 27:** Valores de probabilidade (P) para o índice  $F_{st}$  obtido nas comparações par a par entre as populações de *P. paru* com o loco Pp02

<b>Populações</b>	<b>Nordeste</b>	<b>Bahia</b>	<b>Sudeste</b>
<b>Nordeste</b>	-		
<b>Bahia</b>	0,01667	-	
<b>Sudeste</b>	0,03333	0,01667	-

## *5. Discussão*



*Praia Azeda em Búzios, RJ*

### *5.1 Estudos da variabilidade genética em Pomacanthidae e Chaetodontidae por RAPD*

Os resultados obtidos nas análises por RAPD indicam alguns fatos interessantes no que diz respeito à estrutura genética de populações de peixes recifais brasileiros, informação até então inédita.

Esses dados, além de contribuírem para a elucidação dos padrões genéticos entre os representantes de Pomacanthidae e Chaetodontidae do Atlântico Sul, auxiliam no entendimento da estruturação populacional de peixes recifais da Província Brasileira, caracterizada por uma distribuição fragmentada de espécies, revelando um cenário complexo e mais diferenciado da ictiofauna recifal Caribenha que o previsto até então (Joyeux *et al.*, 2001).

Em geral, os valores de diversidade genética e, particularmente, o número de locos polimórficos observados nas espécies aqui analisadas foram altos. Isso pode ser observado mesmo entre indivíduos de uma mesma localidade. A grande maioria dos trabalhos realizados, por exemplo, em peixes de água doce, costuma revelar uma menor distância genética intrapopulacional (Wasko & Galetti, 2002, Sanches, 2002, Hatanaka e Galetti, 2003).

Essa constatação, além de corroborar a eficácia do método empregado no acesso à variabilidade genética das espécies (Koh *et al.*, 1999, Dinesh *et al.*, 1993), demonstra que as espécies marinhas associadas aos recifes costumam se caracterizar por uma alta variabilidade genética (Smith & Fujio, 1982). Embora, alguns autores correlacionem a maior variação genética com o grau de especialização das espécies recifais (*Ibid.*, 1982, Chung & Woo, 1998 entre outros), deve-se considerar também que os altos índices de variabilidade intra-específica desses organismos podem refletir a presença de populações

diferenciadas, com distintas histórias evolutivas e conseqüentes divergências genéticas. A não detecção dessas diferenças *a priori* no ambiente marinho pode levar ao agrupamento de estoques diferenciados nas análises, partindo do pressuposto que as espécies formam grandes populações panmíticas e exibem elevado fluxo gênico. No entanto, atualmente, é cada vez maior o número de trabalhos que revelam a existência de barreiras migratórias, muitas vezes não identificadas, entre organismos marinhos, aparentemente de grande capacidade dispersiva, que levam à separação genética das populações dentro de poucas dezenas de quilômetros (Solé-Cava *et al.*, 1992, Silva, 2002, Maggioni *et al.*, 2003). Porém, uma discussão mais detalhada desses aspectos é fornecida mais adiante nas análises interpopulacionais e interespecíficas.

De um modo geral, vários autores têm proposto que os níveis de variação genética intra-específica de organismos marinhos são superiores aos organismos dulcícolas e terrestres (DeWoody & Avise, 2000). Estudos por RAPD em outras espécies de Teleósteos desse ambiente também têm levado a sugestões similares (Chow *et al.*, 2000).

As espécies analisadas sofrem grande pressão de pesca devido ao alto valor como peixes ornamentais, sendo *H. ciliaris*, *C. aurantonotus* e *P. paru* as mais procuradas no comércio aquariófilo. As duas primeiras, por apresentarem maior valor comercial, já se encontram na lista de espécies ameaçadas do litoral Sudeste e medidas de controle na captura de exemplares começam a ser delineadas (Floeter & Gasparini, 1999). Sabe-se que a exploração desordenada dos recursos pesqueiros pode levar uma determinada espécie à extinção, ainda que local, ou a sofrer sérios efeitos da diminuição da variabilidade genética, levando à depressão endogâmica e possível perda

da capacidade adaptativa. Dessa forma, o monitoramento regular da variação genética de espécies ou populações de risco é imprescindível para evitar que tais prejuízos ocorram e a diversidade seja drasticamente reduzida (Ward & Grewe, 1995).

Atualmente, o termo unidade evolutivamente significativa (Ryder, 1986) é usado para definir subgrupos de populações, separados geograficamente, historicamente ou ecologicamente, que representam uma importante fração da biodiversidade e devem ser preservados (Eizirik, 1996). No entanto, para que um programa de conservação possa ser eficientemente conduzido, o conhecimento da estrutura genética dos estoques faz-se necessário (Ferguson *et al.*, 1995), a exemplo do que já vem sendo realizado em algumas espécies de peixes de água doce neotropicais (Wasko & Galetti, 2002, Prioli *et al.*, 2002, Hatanaka & Galetti, 2003, Leuzzi *et al.*, 2004).

No presente trabalho, os valores de diversidade genética das diferentes espécies não indicam que a variabilidade genética esteja sendo efetivamente perdida, visto que não foi verificada uma forte relação entre espécies com maior pressão de sobrepesca e alto índice de similaridade. Por exemplo, a detecção de uma grande diversidade genética na espécie *C. aurantonotus*, detectável mesmo a partir de poucos indivíduos oriundos de locais impactados, sugere que a ação antrópica parece não ter afetado a constituição genética na espécie, por enquanto. Porém, pela ausência de dados prévios, não é possível afirmar se houve ou não alguma perda de diversidade em relação a períodos anteriores. Alternativamente, os dados apresentados nessa espécie podem refletir a ocorrência de um acentuado *turnover*, onde indivíduos de diferentes origens tenham colonizado a área estudada. Sabe-se que entre os

peixes recifais a competição por espaço e nicho exerce uma grande pressão seletiva e costuma impedir o recrutamento e a colonização do habitat recifal por novos indivíduos (Sale, 1978, Scheltema, 1986, Sale, 1992). Considerando que os indivíduos de *C. aurantonotus* da região amostrada estão sofrendo um grande esforço de pesca, é possível que isso tenha favorecido o assentamento de juvenis em fase final de estágio pelágico para a região, dispersos a partir de outras localidades, garantindo o sucesso de novas colonizações. No entanto, a deficiência do número amostral e a ausência de dados comparativos de outros pontos da costa a fim de verificar se as populações são diferenciadas, restringem maiores considerações. Além disso, vários estudos genéticos em espécies ameaçadas cujas reduções populacionais tenham ocorrido em períodos relativamente curtos, envolvendo poucas décadas, revelaram que os efeitos na variabilidade genética costumam ser inexpressivos ou ausentes (Salgueiro *et al.*, 2003, Alarcón *et al.*, 2004, Borrell *et al.*, 2004). De qualquer modo, os dados disponíveis podem servir para comparações futuras, visando estimar, ao decorrer do tempo, o grau de polimorfismo presente nas populações.

### ***5.1.1 Análises populacionais das espécies de Pomacanthidae e Chaetodontidae do litoral Brasileiro***

Se a variação genética costuma ser elevada em peixes marinhos, a estruturação populacional costuma ser incipiente na maioria das espécies (Ward *et al.*, 1994, Waples, 1998). Talvez, a própria diversidade alélica determine a dificuldade em separar geneticamente as populações ou estoques desses organismos. Esse parece ter sido o caso da maioria das espécies aqui

analisadas. Nos representantes das famílias estudadas que permitiram uma abordagem intra e interpopulacional, pelo maior número de indivíduos amostrados (*H. ciliaris*, *P. paru* e *C. striatus*), a análise de cada *primer* separadamente para a elaboração de dendrogramas de similaridade não foi capaz de gerar grupamentos entre as localidades amostradas. Possivelmente, isso ocorreu porque as diferenças genéticas entre os indivíduos de uma mesma localidade eram tão acentuadas quanto entre indivíduos de outros pontos. De fato, as análises por AMOVA revelaram que a maior parte da variabilidade genética estava dentro das populações. Dendrogramas mais consistentes foram obtidos quando os *primers* foram analisados conjuntamente e os indivíduos de cada população agrupados, revelando a importância de um alto número de locos polimórficos para acessar, de forma mais sensível e precisa, a estrutura genética das populações.

Além disso, ao se analisar as frequências alélicas, foram encontradas diferenças significativas entre os animais, na maioria das espécies, mesmo naquelas de amostragem reduzida como *P. arcuatus*. Essa constatação demonstra a importância de se realizar diferentes testes e de se empregar metodologias estatísticas distintas para a caracterização genética de populações naturais (Cagigas *et al.*, 1999, Waldman, 1999). Esse resultado também mostrou que as diferenças interpopulacionais de peixes marinhos estão mais relacionadas a diferenças nas frequências gênicas do que a perfis únicos para cada população (ver Tringali & Bert, 1996).

De um modo geral, considerando índices de similaridade, diversidade genética e frequência de alelos, pode-se observar uma tendência de separação entre animais do Sudeste e as demais regiões, bem como uma maior

diferenciação nos animais do litoral Cearense. Porém, futuras análises envolvendo um maior número de indivíduos são necessárias para confirmar tais indicações.

As espécies de Pomacanthidae, assim como a grande maioria dos peixes recifais, apresentam uma fase inicial de desenvolvimento pelágica (Sale, 1991). Esse estágio é normalmente relacionado com a capacidade de dispersão das espécies, já que os adultos apresentam hábitos bentônicos e pouca vagilidade (Levinton, 1995). As larvas, no entanto, ocupando o plâncton, podem ser difundidas para localidades distantes dos parentais e colonizar novas áreas a partir da ação de correntes marítimas e de algum papel comportamental (Victor, 1991, Leis, 1991).

Na costa do Nordeste, há duas correntes de maior influência: uma em direção ao litoral Sul (corrente do Brasil) e outra que segue em sentido contrário, ao Norte do continente Americano (corrente Costeira do Norte do Brasil), determinando uma bifurcação na altura do Cabo de São Roque (Edwards & Lubbock, 1983) (ver figura 1). Dessa forma, peixes que vivem acima dessa região (i.e. Ceará) devem ter poucas chances de entrar em contato com populações de outras localidades abaixo desse ponto, pois é pouco provável que as larvas consigam vencer a força das correntes e migrarem em sentido contrário. Uma observação similar é indicada em estudos preliminares de RAPD em outra espécie recifal - *Abudefduf saxatilis* (Pomacentridae) (Molina, 2000), sendo que essa apresenta um período pelágico consideravelmente maior que as espécies da família Pomacanthidae (Victor, 1991).

No entanto, essa pode não ser a única explicação para tal diferenciação. Outros estudos genético-populacionais em peixes do Atlântico não conseguiram encontrar uma total correlação entre padrão de correntes e diferenças entre populações, e eventos históricos poderiam ter um papel importante nesse processo (Shulman & Bermingham, 1995, Grosberg & Cunningham, 2001).

Já as diferenças genéticas apontadas entre populações do Sudeste e Nordeste no presente trabalho podem revelar que outros fatores ambientais influenciam a estruturação genética das espécies. Essas duas regiões apresentam distintos parâmetros geográficos, físicos e biológicos. Enquanto o litoral Nordestino apresenta temperatura de água mais elevada, muita diversidade de corais e maior largura de plataforma continental, o Sudeste se caracteriza por águas frias, alta produtividade primária e menor distância de plataforma (Floeter *et al.*, 2001). Essas características são responsáveis pela variação geográfica nas assembléias de peixes recifais (Floeter & Gasparini, 2000, Floeter *et al.*, 2001) e pode-se esperar que elas envolvam também os caracteres genéticos das espécies.

Diferentes pressões seletivas, específicas de cada um desses ambientes poderiam determinar a fixação de diferentes combinações alélicas nas populações de cada região. Assim seria explicado como animais de regiões tão próximas e sob o mesmo regime de correntes (ou seja, fatores favoráveis ao intercâmbio genético) poderiam ser subdivididas e exibirem fluxo gênico mais restrito que o esperado. Esse argumento tem sido corriqueiramente usado entre diversos exemplos de diferenciação genética intra-específica de amplitude restrita em espécies associadas aos recifes, sugerindo que pressões

seletivas locais determinariam a ocorrência de processos adaptativos finos, específicos para cada população (Hilbish, 1996, Grosberg & Cunningham, 2001).

Novamente, essa suposição não exclui a possibilidade de que eventos vicariantes ao longo da história evolutiva das espécies recifais brasileiras tenham desempenhado um papel de destaque na sua constituição genética, refletida nos padrões atualmente detectados.

Sabe-se que a faixa costeira do Brasil apresentou uma tendência ao rebaixamento durante o Cretáceo que durou até o início do Terciário, quando o continente elevou-se e o mar regressou, caracterizando uma grande expansão continental. No princípio do Pleistoceno, o continente novamente abaixou e o mar transgrediu, sofrendo uma elevação escalonada, dominante por todo o Quaternário (Kegel, 1957). Eventos oceanográficos históricos (1-5 MA) parecem ter determinado um regime de isolamento sobre algumas populações de peixes migradores no litoral brasileiro (Goodbred & Graves, 1996) assim como no Pacífico (Stepien & Rosenblatt, 1996), revelando a ação dessas modificações ambientais sobre os processos evolutivos e biogeográficos em populações marinhas do Atlântico Ocidental e do Pacífico Oriental.

Todas essas fortes modificações costeiras ocorridas desde o Cretáceo, alterando os perfis do talude continental, possibilitaram a formação de microhabitats diversos durante a história dessa região. Possivelmente, durante os processos regressivos, estrangulamentos populacionais seqüenciais foram gerados pela perda de habitats, podendo determinar estruturação populacional, além de processos especiativos, pela ação combinada de deriva e endocruzamento.

Certos autores ressaltam que, apesar das mudanças ocorridas no Pleistoceno, elas não necessariamente aumentaram a razão de especiação e extinção em invertebrados e peixes (Sinclair, 1988). Contudo, peixes do gênero *Thunnus*, caracteristicamente migradores e de distribuição inter-oceânica, assim como espécies recifais do Caribe e do Golfo da Califórnia parecem ter sofrido radiação Pleistocênica, sugerindo que as alterações ocorridas nesse período foram suficientemente drásticas para afetar, em menor ou maior grau, espécies com diferentes capacidades dispersivas (Ward, 1995, Present, 1987, Shulman & Bermingham, 1995).

Sugere-se que a composição populacional dos peixes recifais do Atlântico Sul seja um reflexo multifatorial de eventos históricos, combinados a características geográficas e ambientais da costa do Brasil e peculiaridades biológicas das espécies em questão, uma situação cada vez mais freqüentemente encontrada entre peixes recifais (Nelson *et al.*, 2000).

Essas observações estão de acordo com as variações ecológicas apresentadas entre elas, e ao regime de correntes, diferenciado na costa do Ceará. Ambos fatores podem estar influenciando a colonização e o fluxo gênico de indivíduos dessas distintas regiões, seguindo um padrão também verificado através de estudos biogeográficos envolvendo a distribuição de assembléias de peixes recifais do Atlântico Sul (Floeter *et al.*, 1999, Joyeux *et al.*, 2001).

Interessantemente, as espécies com menor variabilidade genética foram as que permitiram uma melhor discriminação entre as populações (*H. ciliaris* e *H. tricolor*, por exemplo), sugerindo uma maior variação inter-populacional e levando à inferência de que elas sejam geneticamente diferenciadas.

Em *H. ciliaris*, verificou-se ainda que indivíduos do Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP) não estão muito distanciados daqueles do litoral, o que a princípio indica que algum fluxo gênico entre esse isolado populacional e animais da costa está presente. Similarmente, Bacurau (2003) também não conseguiu diferenciar, através de marcadores de RAPD, os indivíduos de outro peixe recifal, *Myripristis jacobus* (família Holocentridae), localizados no mesmo arquipélago, daqueles de distribuição na plataforma continental. No entanto, evidências morfológicas apontam que a população de *H. ciliaris* do ASPSP é particular pela existência de vários colormorfos. Argumenta-se que essa particularidade seja decorrente de um elevado grau de endogamia nessa população que, devido ao isolamento geográfico, recebe um pequeno número de intercruzantes de outras regiões, com um elevado índice de auto-recrutamento (Edwards & Lubbock, 1983, Luiz-Júnior, 2003). Esse evento é conhecido em algumas espécies de peixes recifais de ilhas oceânicas e pode ter determinado o surgimento dessas formas aberrantes (Swearer *et al.*, 1999, Jones *et al.*, 1999, Robertson, 2001). No presente trabalho não foram encontradas diferenças significativas entre alelos dessa população e as demais, mas a diversidade genética detectada foi inferior às observadas nas amostras de regiões costeiras. Sugere-se assim, que *H. ciliaris* do ASPSP não apresente um perfil diferenciado de alelos dos animais de outras localidades, mas sim um maior grau de similaridade, corroborando os indícios de endogamia. Variações no padrão de coloração já foram descritas para outra espécie de *Holacanthus* – *H. tricolor*, com casos de melanismo (Colin, 1982) e algumas diferenças entre populações caribenhas e brasileiras. Porém, as análises genéticas a partir de alozimas também não revelaram grandes diferenças entre elas (Chung & Woo, 1998).

De qualquer modo, a sugestão de menor variabilidade genética nos indivíduos, provavelmente endogâmicos, de *H. ciliaris* do ASPSP, torna essa população ainda mais susceptível às atividades de coleta para fins comerciais, podendo potencializar a perda de variação genética. Embora isolados, a peculiaridade de cores apresentada pelos animais dessa região tem atraído a captura de exemplares para aquarofilia (Luiz-Júnior, 2003), colocando-os em risco de extinção. De fato, o único exemplo de extinção registrado em peixes recifais envolve uma espécie insular endêmica (Roberts & Hawkins, 1999).

Por sua vez, as análises realizadas em espécies com populações mais conspícuas no litoral Brasileiro, particularmente *P. paru* e *C. striatus*, indicaram que elas apresentam uma variabilidade genética intrapopulacional particularmente alta. Um fluxo gênico elevado ( $Nm$ ) também foi estimado nessas espécies, independente do cálculo de  $Nm$  adotado, embora valores distintos tenham sido obtidos de acordo com a fórmula empregada. Os índices de identidade genética entre as populações dessas espécies citadas foram ainda muito próximos, comprometendo a confiabilidade dos dendrogramas gerados e agrupando populações de regiões distantes. Esse resultado indica que elas não formam populações estruturadas, não sendo possível diferenciar geneticamente cada região. Nesse caso, essas espécies poderiam ser incluídas dentre os inúmeros exemplos de espécies marinhas de dispersão planctônica que formam grandes populações, pouco diferenciadas entre si (Lacson, 1992, Ward *et al.*, 1994, Levy & Cassano, 1994). Essa indicação é particularmente fortalecida em *C. striatus*, a qual apresentou os maiores valores de  $Nm$  e de similaridade genética entre as populações, mesmo entre aquelas mais distantes. De fato, análises do estágio larval dessa espécie na costa brasileira demonstraram que as larvas apresentam uma capacidade natatória

diferenciada, capaz de influenciar o seu potencial dispersivo (usualmente em torno dos 50 dias) (Stobutzki, 1998) e uma maior plasticidade na preferência por substratos e de padrões alimentares (Ferreira *et al.*, 2001). Ambos fatores podem favorecer a ampla dispersão e o sucesso dessa espécie em distintos habitats ao longo da costa e conseqüente homogeneização das populações. Corroborando essa sugestão, sabe-se que a espécie *C. striatus* é uma das mais amplamente distribuídas na Província Brasileira, encontrada em toda a costa e em quase todas as ilhas oceânicas e até mesmo na costa Oeste da África (Floeter *et al.*, 2001). Evidências similares têm sido observadas em relação ao padrão genético e adaptação a diferentes substratos em peixes recifais brasileiros, como os do gênero *Acanthurus* (Rocha *et al.*, 2002).

Complementando os dados obtidos a partir dos marcadores de RAPD, foram realizadas análises da variância molecular (AMOVA) nas espécies com maior número amostral, *H. ciliaris*, *P. paru* e *C. striatus*. Os índices de  $\phi_{st}$  fornecidos nessa análise são extremamente úteis para a evidenciação de estruturação populacional e não assumem previamente que as populações estão em equilíbrio (Excoffier *et al.*, 1992, Hartl & Clark, 1997). Por essas razões, os dados de AMOVA são comumente empregados em estudos de RAPD e considerados os melhores parâmetros de análise populacional já que, especialmente em organismos marinhos, hipóteses evolutivas fora do equilíbrio algumas vezes devem ser elaboradas (Bouzat, 2001, Grosberg & Cunningham, 2001).

Os valores obtidos pela AMOVA nas espécies supracitadas evidenciaram que, como indicado nas demais análises, *H. ciliaris* apresenta uma estruturação genética moderada, mas significativa, sendo possível afirmar que ela compõe populações geneticamente distintas. Observou-se também que a

estruturação populacional é baixa na espécie *P. paru* e, de modo mais significativo, em *C. striatus*.

No entanto, deve-se considerar que a diferença no número de indivíduos analisados entre as localidades das espécies em questão pode determinar algum ruído na análise populacional e que marcadores moleculares mais sensíveis podem revelar um eventual grau de estruturação populacional, como discutido mais adiante.

Ainda, uma ressalva deve ser feita quanto ao uso do termo população ou estoque no presente trabalho. Esse termo é usado, não no sentido estrito, representando um conjunto particular de indivíduos, morfologicamente e/ou geneticamente distintos dos demais, panmíticos entre si e com fluxo gênico restrito a outros grupos (Begg & Waldman, 1999), mas como referência ao local de origem. Isso porque não há estudos, até então, que limitem as espécies analisadas em termos populacionais na costa do Brasil e dados sobre migração e dispersão são ausentes. É possível, a partir dos dados ora apresentados e daqueles gerados em análises futuras, que esses grupos amostrados possam vir a ser propriamente tratados como populações discretas e, portanto, unidades evolutivas únicas.

### **5.1.2 Análises Interespecíficas**

Os perfis de bandas obtidos por RAPD com os *primers* selecionados revelaram, além da variabilidade genética entre os indivíduos, um grande número de marcas espécie-específicas. Esses locos são altamente informativos para a discriminação de espécies aparentadas e mesmo para inferências filogenéticas, caracterizando a técnica de RAPD como um método eficiente

para avaliação das relações interespecíficas, conforme sugerido por diversos autores (Callejas *et al.*, 1998, Lehmann *et al.*, 2000 entre outros). Deve-se ressaltar ainda que o grande número de bandas diagnósticas identificado parece também estar relacionado com o tamanho amostral reduzido de algumas espécies como *P. arcuatus* e *H. tricolor*. É provável assim, que o número real de marcas espécie-específicas seja menor se mais indivíduos de distintas localidades sejam avaliados.

Para analisar as relações entre as espécies de Pomacanthidae e Chaetodontidae da costa do Brasil, foram considerados os índices médios de similaridade, os valores de diversidade genética e de locos polimórficos em cada espécie com cinco diferentes *primers* e construído um dendrograma a partir do conjunto de valores de similaridade de Jaccard de cada *primer* em cinco indivíduos de cada uma das seis espécies.

Observou-se que todos esses parâmetros são úteis para discriminar os representantes das duas famílias de peixes recifais analisadas.

Quanto à diversidade genética, as espécies do gênero *Holacanthus* foram as que apresentaram a maior similaridade genética intra-específica, enquanto as demais apresentaram valores médios, em torno de 50-55%. É bem provável que a presença de animais menos polimórficos do isolado populacional de ASPSP, no caso de *H. ciliaris*, e o pequeno número amostral de *H. tricolor* sejam parcialmente responsáveis por essa observação.

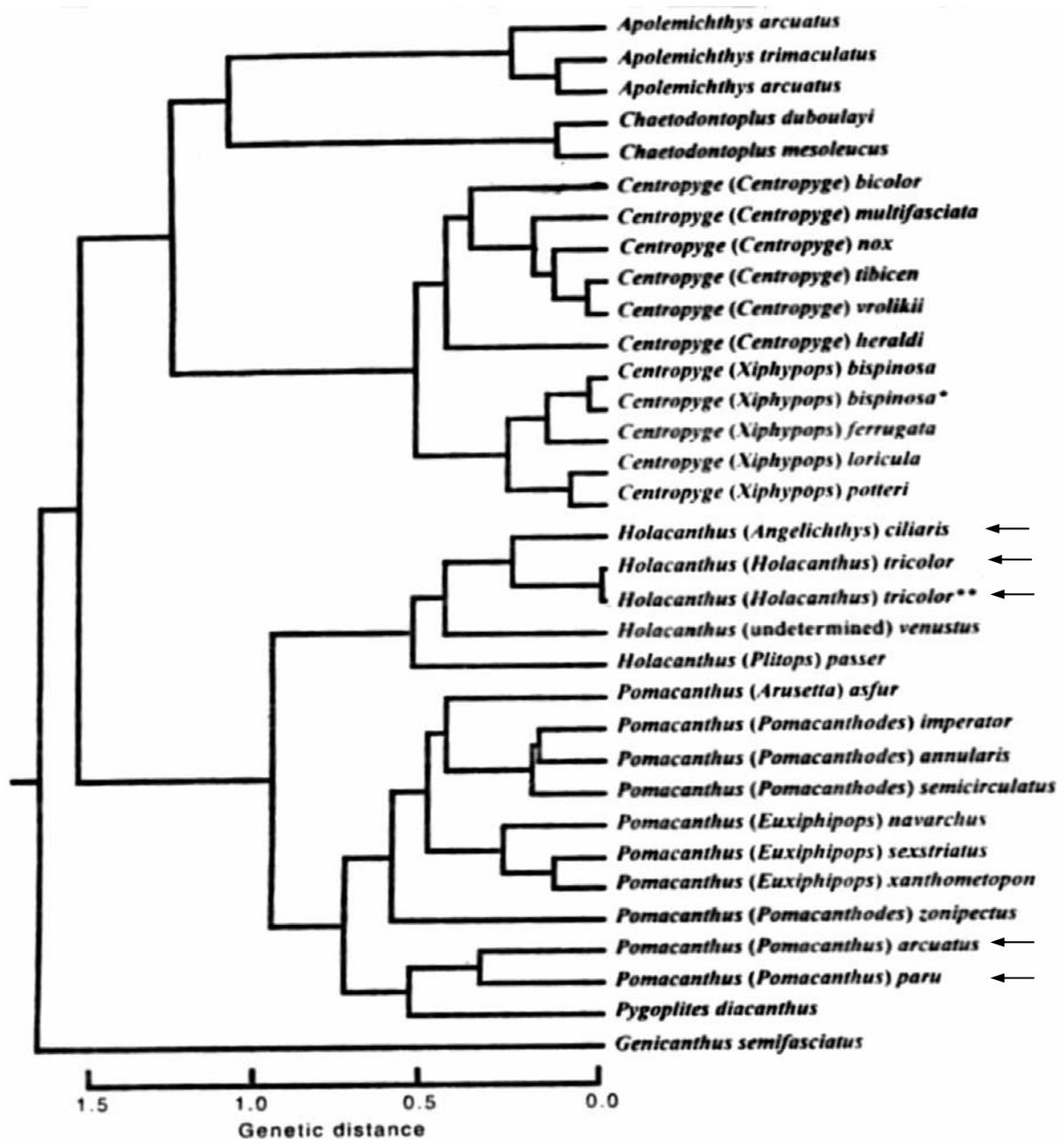
Surpreendentemente, uma das espécies com maior variabilidade genética dentre as estudadas foi *C. aurantonotus*, embora ela seja considerada rara e que, como exposto anteriormente, vem tendo suas populações comprometidas pelo comércio de peixes ornamentais (Floeter & Gasparini, 1999). É dito que *C. aurantonotus* se caracteriza por uma alta variabilidade genética porque, ao

contrário das demais espécies analisadas, ela é representada por uma única população da região Sudeste e, ainda assim, apresentou valores similares ou mesmo superiores àqueles detectados nas populações conjuntas dos outros representantes. A presença de tal variação concorda com estudos por alozimas em outras espécies desse gênero (Chung & Woo, 1998). Se considerarmos que o grau de especialização (Smith & Fujio, 1982) e o pequeno tamanho corporal de teleósteos marinhos (Mitton & Lewis, 1989) estão relacionados à maior variabilidade genética, *C. aurantonotus* ficaria como um grupo mais especializado dentro da família. Essa observação é corroborada por estudos taxonômicos que consideram que o menor porte é uma característica derivada dos Pomacanthidae; as espécies do gênero *Centropyge* são conhecidas como peixes-anjos pigmeus, não ultrapassando em média os 8cm de comprimento (Nelson, 1994, Bauchot *et al.*, 1988). Estudos citogenéticos também demonstraram que o padrão cariotípico dessa espécie diverge dos demais pomacantídeos analisados até o momento, sugerindo a ocorrência de uma série de rearranjos cromossômicos e confirmando o caráter derivado de *C. aurantonotus* (Affonso & Galetti, *in press*).

O dendrograma gerado ao reunir os dados de RAPD ainda permitiu separar cada espécie e indicar as relações entre elas. Pode-se observar que as espécies do mesmo gênero estão mais relacionadas, como previamente sugerido por análises cromossômicas (Affonso *et al.*, 2001, Affonso *et al.*, 2002) e enzimáticas (Chung & Woo, 1998). De fato, o dendrograma obtido demonstrara uma grande concordância com a análise filética com alozimas (ver figura 36).

Em relação aos padrões citogenéticos dos Pomacanthidae, a técnica de RAPD também se mostrou mais eficaz na discriminação das espécies

selecionadas, pois análises cariotípicas não permitiram distinguir espécies congêneras como *H. tricolor* e *H. ciliaris* ou *P. arcuatus* e *P. paru* (Affonso *et al.* 2001, Affonso *et al.*, 2002).



**Figura 36:** Dendrograma de 31 espécies de Pomacanthidae baseado em análise por UPGMA dos dados de distância genética, corrigidos para amostras pequenas (extraído de Chung & Woo, 1998). As setas indicam as espécies em comum com o presente trabalho.

## 5.2 Isolamento e análise populacional por microssatélites

Os microssatélites são, indiscutivelmente, os marcadores mais utilizados para abordagens populacionais devido ao alto grau de polimorfismo, caráter co-dominante, abundância no genoma dos eucariotos e à conseqüente eficiência na detecção de diferenças genéticas sutis (O'Reilly & Wright, 1995, Ferreira & Grattapaglia, 1998, Chambers & MacAvoy, 2000, Zane *et al.*, 2003). Em peixes, os microssatélites têm permitido avaliar a composição genética de diversas espécies, revelando estruturação populacional, níveis de diversidade e diferenças entre estoques.

O maior inconveniente do uso desse marcador é o alto grau de especificidade que ele apresenta, exigindo o conhecimento das seqüências flanqueadoras dos microssatélites para a realização da análise. Infelizmente, essas informações estão ausentes na grande maioria das espécies tropicais, especialmente daquelas de ambientes marinhos. Dessa forma, é necessário, em um primeiro momento, o isolamento e a caracterização das seqüências de microssatélites na espécie alvo para o delineamento de *primers* específicos.

Esse processo pode ser realizado de várias maneiras, a maioria envolvendo metodologias dispendiosas e complexas como a construção de bibliotecas genômicas (revisadas em O'Connell *et al.*, 1998 e Zane *et al.*, 2003). Visando contornar esses inconvenientes, um método alternativo, simples e eficiente, denominado PIMA (*PCR isolation of microsatellite arrays*) foi desenvolvido (Lunt *et al.*, 1999). A base dessa técnica é o RAPD, que segundo os autores, usualmente amplifica seqüências repetitivas, favorecendo o isolamento dos microssatélites.

Considerando que o RAPD constitui uma das metodologias adotadas no presente trabalho e a ausência de informações das seqüências de microssatélites nas espécies analisadas, o método PIMA foi apropriadamente eleito para o isolamento de microssatélites, úteis às análises populacionais propostas. Os resultados obtidos são altamente promissores e permitiram a indicação e a identificação desses marcadores, demonstrando a eficácia do procedimento adotado. Como essa técnica requer maior tempo e custo que o RAPD, a análise de microssatélites a partir do isolamento dos mesmos foi concentrada nas espécies de maior representatividade e/ou com grande relevância ecológica e econômica, como *P. paru* e *H. ciliaris*.

Dentre os locos de microssatélite caracterizados, o denominado Pp02, formado pela repetição em tandem de dinucleotídeos GT e isolado da espécie *P. paru*, mostrou-se extremamente adequado para as análises propostas. Além do elevado polimorfismo alélico, a análise desse loco demonstrou a ausência de alelos nulos e que os alelos estavam distribuídos dentro das expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Conseqüentemente, a diversidade genética dessa espécie pode ser acessada usando um marcador populacional adicional ao RAPD.

As análises de diferenciação populacional de *P. paru* da costa brasileira através da avaliação do polimorfismo do loco Pp02 revelaram que, independentemente do método estatístico empregado, as populações dessa espécie estão significativamente estruturadas.

O fato das três populações, distribuídas pelas regiões aqui denominadas Nordeste, Bahia e Sudeste, serem diferenciadas entre si, demonstra que há restrições à dispersão e, conseqüentemente, ao fluxo gênico. Embora preliminar, devido ao baixo número de locos analisados, esse resultado

comprova a reconhecida eficácia dos microssatélites para a realização de uma análise genética fina, capaz de revelar uma estruturação genética previamente obscurecida. Vários trabalhos em espécies aquáticas indicam que os níveis de diferenciação por microssatélites são usualmente superiores aos detectados por outros marcadores, como, por exemplo, o RAPD (Bártfai *et al.*, 2003) ou alozimas (Grewe & Hampton, 1998, Reilly *et al.*, 1999). De fato, em alguns casos, o grau de divergência de locos de microssatélites entre as populações pode chegar até quatro vezes mais que o apresentado por análises de DNA mitocondrial, como encontrado na espécie *Sciaenops ocellatus* (Scianidae) do Golfo do México (Gold & Turner, 2002).

O maior polimorfismo detectado normalmente pelos microssatélites tem sido útil para confirmar indícios de estruturação genética previamente identificados (Bártfai *et al.*, 2003, Maggioni *et al.*, 2003, Borrell *et al.*, 2004). No presente trabalho, as análises por RAPD indicaram uma fraca estruturação genética em *P. paru*, enquanto a análise do loco Pp02 confirmou que as populações analisadas são distintas entre si. Analogamente, estudos históricos desenvolvidos em outros organismos marinhos, como camarões da família Penaeidae, têm demonstrado que populações aparentemente homogêneas e de grande potencial dispersivo estão limitadas por barreiras biogeográficas, hidrográficas, ambientais ou comportamentais e encontram-se geneticamente diferenciadas (ver Maggioni *et al.*, 2003, Borrell *et al.*, 2004).

Considerando as evidências de estruturação populacional em *P. paru*, verifica-se que, apesar da grande capacidade de dispersão apresentada pela espécie, uma série de fatores deve estar impedindo o amplo fluxo gênico entre as populações. Talvez o principal deles, seja a barreira ambiental exercida pela ressurgência na região de Cabo Frio (23° S), no Estado do Rio de

Janeiro. Nessa região, águas profundas do Atlântico Central atingem a superfície, determinando uma mudança significativa dos parâmetros oceanográficos e de produtividade na região Sudeste-Sul (Vazzoler *et al.*, 1999, MMA, 2003) que provavelmente limitam a dispersão de organismos aquáticos entre o Norte-Nordeste e Sudeste-Sul. Evidências similares foram identificadas em outras espécies aquáticas, como no camarão *Litopenaeus schmitti* (Maggioni *et al.*, 2003) e no mexilhão *Perna perna* (Solé-Cava *et al.*, 1992, Silva, 2002). Quanto às diferenças entre a população da Bahia em relação às demais localidades no Nordeste é possível que um conjunto de parâmetros ambientais (descarga de águas continentais e sedimentos de sistemas hidrográficos como o rio Doce, extensão de plataforma, etc.) exerça uma pressão seletiva diferenciada entre as regiões. Argumentos similares foram utilizados para explicar a variação geográfica nas assembleias de peixes recifais da costa brasileira (Floeter & Gasparini, 2000, Floeter *et al.*, 2001, Joyeux *et al.*, 2001). Além desses fatores, eventos históricos podem também ter um papel importante na estruturação populacional, como descrito em várias espécies marinhas (Bahri-Sfar *et al.*, 2000, Aurelle *et al.*, 2003, Barrell *et al.*, 2004).

Verifica-se, também, que as estimativas de fluxo gênico ( $Nm$ ) muitas vezes não predizem o intercâmbio genético real entre as populações, merecendo cautela na utilização de tais valores nas análises populacionais de organismos aquáticos. Como encontrado no presente trabalho, os valores de  $Nm$  podem indicar um elevado fluxo gênico entre as populações, enquanto análises mais refinadas, como o uso dos índices  $F_{st}$  e  $\phi_{st}$ , demonstram que elas podem estar estruturadas e com dispersão limitada. Isso se deve ao fato de que as estimativas de  $Nm$  não levam em consideração a história evolutiva das

espécies, refletindo apenas o momento atual Assim, conforme sugerido por diversos autores, elas não são adequadas para avaliar a estruturação populacional de organismos marinhos, nos quais os fatores biogeográficos costumam desempenhar um papel relevante na constituição genética (Grosberg & Cunningham, 2001).

Contudo, sabe-se que as hipóteses aqui elaboradas não podem ser aplicadas indiscriminadamente a outras espécies de peixes recifais, pois vários casos de homogeneidade genética interpopulacional são descritos, os quais parecem estar fortemente relacionados a peculiaridades espécie-específicas de cada organismo. Por exemplo, entre representantes da família Acanthuridae do Atlântico, as análises genéticas não evidenciaram diferenciação entre as populações, mesmo entre grandes distâncias e barreiras geográficas como a descarga do rio Amazonas. Aparentemente, algumas espécies dessa família (intimamente relacionadas ao ambiente recifal e de distribuição geográfica similar aos Pomacanthidae) são capazes de utilizar diferentes substratos, além de apresentaram uma fase pelágica relativamente maior (Rocha *et al.*, 2002). Da mesma forma, análises por microssatélites em *Lutjanus campechanus* (Lutjanidae) do Golfo do México revelaram que a maior parte da variação genética estava dentro das populações e não entre elas (Gold *et al.*, 2001).

Adicionalmente, verificou-se que o loco Pp02 pode ser amplificado nas outras espécies dos gêneros *Pomacanthus* e *Holacanthus*, caracterizando-o como um marcador útil aos estudos populacionais em Pomacanthidae. De fato, embora os microssatélites sejam caracterizados por um alto grau de especificidade, ampliações inter-específicas são descritas, com vários exemplos em espécies aquáticas (Hatanaka *et al.*, 2002, Hsu *et al.*, 2004). Porém, a extensão da identificação de um mesmo loco de microssatélite em

outras espécies além da originalmente caracterizada é usualmente restrita, geralmente a nível intragenérico. No presente trabalho, resultados positivos foram obtidos em quase todas as espécies de Pomacanthidae selecionadas, com exceção de *C. aurantonotus*. Essa evidência vem corroborar a maior distância genética dessa espécie em relação às demais, já previamente indicada por dados citogenéticos (Affonso & Galetti, *in press*), novamente posicionando o gênero *Centropyge* como um grupo de maior divergência dentro da família. Nesse sentido, também parece adequado afirmar que as espécies dos gêneros *Holacanthus* e *Pomacanthus*, embora apresentem diferenças detectáveis, formariam grupos filogeneticamente próximos, seja pelos dados do loco de microssatélites, caracteres cromossômicos ou padrões enzimáticos (Affonso, 2000, Chung & Woo, 1998).

Por fim, são fornecidas as primeiras informações sobre seqüências de microssatélites em espécies recifais do Atlântico Sul.

## **6. Conclusões**

Os dados apresentados a partir do uso de marcadores moleculares nas espécies de peixes recifais das famílias Pomacanthidae e Chaetodontidae selecionadas permitem afirmar que:

1. As técnicas utilizadas foram eficientes no acesso à diversidade genética das espécies dessas famílias ao longo da costa brasileira, gerando resultados promissores, capazes de inferir os níveis de variação genética intra-específica, intrapopulacional e interpopulacional, as relações entre as espécies, além de tornarem disponíveis informações inéditas sobre peixes recifais brasileiros, com especial destaque para a caracterização de seqüências de microssatélites;

2. Todas as espécies analisadas apresentam alta variabilidade genética intra-específica e intrapopulacional, corroborando o padrão geralmente encontrado em peixes e outros organismos marinhos. Exceções são provavelmente decorrentes do pequeno número amostral ou da presença de estoques endogâmicos como os de *Holacanthus ciliaris* do Arquipélago de São Pedro e São Paulo;
3. Também seguindo uma tendência de espécies amplamente distribuídas e de dispersão pelágica, os níveis de diferenciação interpopulacional costumam ser incipientes, embora evidências preliminares de estruturação populacional tenham sido detectadas pelas análises de AMOVA, no caso do RAPD, e pelos índices  $F_{st}$  e de diferenciação genética e genotípica, no caso de microssatélite;
4. Apesar, ou talvez em função, da atividade extrativista intensa, a espécie *Centropyge aurantonotus* não parece apresentar, ainda, efeitos na diminuição da variabilidade genética e aparece como um grupo divergente dentro da família;
5. A metodologia PIMA adotada nesse trabalho mostrou-se eficiente no isolamento de locos microssatélites das espécies mais representativas (*H. ciliaris* e *P. paru*), corroborando sua utilidade para a prospecção, de forma rápida e relativamente pouco dispendiosa, dessas seqüências em peixes;
6. Espera-se que o isolamento e caracterização de um maior número de locos de microssatélites revelem de forma significativa a composição genética das populações das espécies aqui selecionadas, visto que esses marcadores costumam ser os mais eficientes na detecção de estrutura populacional, a exemplo do detectado com o loco Pp02 em *P. paru*.

## 7. Referências Bibliográficas



**Baía de Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ**

- Affonso, P. R. A. M. 2000. *Caracterização citogenética de peixes de recifes de corais da família Pomacanthidae (Perciformes)*. Dissertação de mestrado. Departamento de Genética e Evolução – UFSCar, São Carlos/SP. 143p.
- Affonso, P. R. A. M., Guedes, W., Pauls, E. & Galetti Jr., P. M. 2001. Cytogenetic analysis of coral reef fishes from Brazil (families Pomacanthidae and Chaetodontidae). *Cytologia*. 66: 379-384.
- Affonso, P. R. A. M., Guedes, W., Pauls, E. & Galetti Jr., P. M. 2002. Close karyotypical relationship between two species of marine angelfishes from South Atlantic: *Pomacanthus arcuatus* and *P. paru* (Perciformes, Pomacanthidae). *Caryologia*. 55 (4): 323-329.
- Agnèse, J.-F., Adépo-Gourène, B., Owino, J., Pouyaud, L. & Aman, R. 1999. Genetic characterization of a pure relict population of *Oreochromis esculentus*, an endangered tilapia. *Journal of Fish Biology*. 54: 1119-1123.
- Alarcón, J. A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E. & Alvarez, M. C. 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 230: 65-80.
- Almada-Villela, P. C. 1995. Endangered species. In: Paxton, J. R. & Eschemeyer, W. N. (ed.). *Encyclopedia of Fishes*. Academic Press Inc. San Diego, USA. 240p.
- Arai, R. & Inoue, M. 1975. Chromosomes of nine species of Chaetodontidae and one species of Scorpidae from Japan. *Bulletin of National Science Museum of Tokyo, Ser. A (Zoology)*. 1: 217-224.
- Aurelle, D., Guillemaud, T., Afonso, P., Morato, T., Wirtz, P., Santos, R. S. & Cancela, M. L. 2003. Genetic studies of *Coris julis* (Osteichthyes, Perciformes, Labridae) evolutionary history and dispersal abilities. *C. R. Biologies*. 326: 771-785.
- Ayal, Y. & Safriel, U. N. 1982. Species diversity of the coral reef-a note on the role of predation and of adjacent habitats. *Bulletin of Marine Science*. 32 (3): 787-790.

- Bacurau, T. O. F. 2003. *Análise genética de populações e espécies das famílias Holocentridae e Priacanthidae (Pisces) no litoral Nordeste do Brasil e Arquipélago de São Pedro e São Paulo*. Dissertação de mestrado. Centro de Biociências – UFRN. Natal/RN. 85p.
- Bahri-Sfar, L., Lemaire, C., Hassine, O. K. B. & Bonhomme, F. 2000. Fragmentation of sea bass populations in the western and eastern Mediterranean as revealed by microsatélites polymorphism. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267: 929-935.
- Bardaki, F. & Skibinski, D. O. F. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity.* 73: 117-123.
- Bártfai, R., Egedi, S., Yue, G. H., Kovács, B., Urbányi, B., Tamás, G., Horváth, L. & Orbán, L. 2003. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture.* 219: 157-167.
- Bauchot R., Ridet J. M. & Bauchot M. L. 1988. Biology of the butterflyfishes. In: Motta, P.J. (ed.) *The butterflyfishes success on the coral reef*. Ann. Arbor., Michigan, pp. 205-19.
- Bauer, J. A. & Bauer, S. E. 1981. Reproductive biology of pigmy angelfishes of the genus *Centropyge* (Pomacanthidae). *Bulletin of Marine Science.* 31 (3): 495-513.
- Begg, G. A. & Waldman, J. R. 1999. An holistic approach to fish stock identification. *Fisheries Research.* 43: 35-44.
- Bellwood, D. R. 1996. The Eocene fishes of Monte Bolca: the earliest coral reef fish assemblage. *Coral Reefs.* 15:11-19.
- Benzie, J. A. H. 1999. Genetic structure of coral reefs organisms: ghosts of dispersal past. *Amer. Zool.* 39:131-145.
- Benzie, J. A. H. & Williams, S. T. 1995. Gene flow among giant clam (*Tridacna gigas*) populations in the Pacific does not parallel ocean circulation. *Marine Biology.* 123: 781-787.
- Bonhomme, F. & Planes, S. 2000. Some evolutionary arguments about what maintains the pelagic interval in reef fishes. *Environmental Biology of Fishes.* 59 (4): 365-383.

- Borrell, Y., Spinosa, G., Romo, J., Blanco, G., Vázquez, E. & Sánchez, J. A. 2004. DNA microsatellite variability and genetic differentiation among natural populations of the Cuban white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Marine Biology*. 144: 327-333.
- Bouzat, J. L. 2001. The population genetic structure of the Greater Rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape. *Biological Conservation*. 99: 277-284.
- Briggs, J.C. 1974. *Marine Zoogeography*. New York, McGraw-Hill Book Co., 475p.
- Brohede, J. & Ellegren, H. 1999. Microsatellite evolution: polarity of substitution within repeats and neutrality of flanking sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences*. 266: 825-833.
- Brooker, A. L., Cook, D., Bentzen, P., Wright, J. M. & Doyle, R. W. 1994. Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. *Canadian Journal of Fish Aquatic Sciences*. 51: 1959-1966.
- Burton, R. S. 1996. Molecular tools in marine ecology. *Journal of Experimental Biology and Ecology*. 200: 85-101.
- Cagigas, M. E., Vazquez, E., Blanco, G. & Sanchez, J. A. 1999. Combined assessment of genetic variability in populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) based on allozymes, microsatellites, and RAPD markers. *Marine Biotechnology*. 1 (3): 286-296.
- Callejas, C. & Ochando, M. D. 1998. Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. *Journal of Fish Biology*. 53: 208-215.
- Carvalho, G. R. & Hauser, L. 1998. Advances in the molecular analysis of fish population structure. *Italian Journal of Zoology*. 65 (suppl. S): 21-33.
- Chambers, G. K. & MacAvoy, E. S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 126: 455-476.
- Chapman, F. A., Fitz-Coy, S. A., Thunberg, E. M., Adams, C. M. 1997. United States of America trade in ornamental fish. *Journal of the World Aquaculture Society*. 28 (1): 1-10.

- Chow, S., Okamoto, H., Miyabe, N., Hiramatsu, K. & Barut, N. 2000. Genetic divergence between Atlantic and Indo-Pacific stocks of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and admixture around South Africa. *Molecular Ecology*. 9 920: 221-227.
- Chung, K. C. & Woo, N. Y. S. 1998. Phylogenetic relationships of the Pomacanthidae (Pisces: Teleostei) inferred from allozyme variation. *Journal of Zoology*. 246: 215-231.
- Colbourne, J. K., Neff, B. D., Wright, J. M. & Gross, M. R. 1996. DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)<sub>n</sub> microsatellites and its potential for assessment of mating success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 53 (2): 342-349.
- Colin, P. L. 1982. Melanism in the Rock Beauty, *Holacanthus tricolor*, (Pisces: Pomacanthidae) in Puerto Rico. *Bulletin of Marine Science*. 32 (2): 800-802.
- Comincini *et al.* 1995. *J. Animal Breed. Genet.* 112: 415-420.
- Cox, C. B. & Moore, P. D. 2000. *Biogeography. An ecological and evolutionary approach.* (6<sup>a</sup> Ed.). Balckwell Science Ltd.USA. 298p
- Danilowicz, B. S. & Sale, P. F. 1999. Modelling settlement in open populations of reef fishes. *Ecological Modelling*. 121: 261-276.
- De Leon, F. J G., Chikhi, L. & Bonhomme, F. 1997. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Molecular Ecology*. 6 (1): 51-62.
- De Leon, F. J G., Canonne, M., Quillet, E., Bonhomme, F. & Chatain, B. 1998. The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*. 159 (3-4): 303-316.
- DeWoody, J. A. & Avise, J. C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*. 56 (3): 461-473.

- Dinesh, K. R., Lin, T. M., Chua, K. L. *et al.* 1993. RAPD analysis: an efficient method of DNA fingerprinting in fishes. *Zoological Science*. 10: 849-854.
- Doherty, P. J., Planes, S. & Mather, P. 1995. Gene flow and larval duration in seven species of fish from the Great Barrier Reef. *Ecology*. 76 (8): 2373-2391.
- Edwards, A. & Lubbock, R. 1983. Marine zoogeography of St. Paul's Rocks. *Journal of Biogeography*. 10: 65-72.
- Eizirik, E. 1996. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. *Brazilian Journal of Genetics (supplement)*. 19 (4): 23-29.
- Estroup, A., Solignac, M., Harry, M. & Cornut, J. M. 1993. Characterization of (GT)<sub>n</sub> and (CT)<sub>n</sub> microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*. 21: 1427-1431.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA data. *Genetics*. 131: 479-491.
- Fairbanks, D. J., Waldrigues, A., Ruas, C. F. *et al.* 1993. Efficient characterization of biological diversity using field DNA extraction and random amplified polymorphic DNA markers. *Brazilian Journal of Genetics*. 16 (1): 11-22.
- Fenner, R. 1996. The french angelfish, *Pomacanthus paru*. *Tropical Fish Hobbyist*. 44 (8): 32-38.
- Ferguson, A., Taggart, J. B., Prodöhl, P. A. *et al.* 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology*. 47 (Suppl. A):103-126.
- Ferreira, B. P., Maida, M. & Souza, A. E. T. 1995. Levantamento inicial das comunidades de peixes recifais da região de Tamandaré – PE. *Boletim Técnico Científico CEPENE*. 3 (1): 211-230.

- Ferreira, C.E.L., Gonçalves, J.E.A. & Coutinho, R. 2001. Community structure of fishes and the habitat complexity on a tropical rocky shore. *Environmental Biology of Fishes*. 61: 353-369.
- Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3<sup>a</sup> ed. EMBRAPA-CENARGEN. Brasília. 220p.
- Floeter, S. R. & Gasparini, J. L. 1999. Peixes recifais no Estado do Espírito Santo: Ameaças do comércio aquariófilo. In: *XIII Encontro Brasileiro de Ictiologia*. São Carlos, SP, Brasil. p. 450.
- Floeter, S. R. & Gasparini, J. L. 2000. The Southwestern Atlantic reef fish fauna: composition and zoogeographic patterns. *Journal of Fish Biology*. 56: 1099-1114.
- Floeter, S. R. & Gasparini, J. L. 2001. Brazilian endemic reef fishes. *Coral Reefs*. 19: 292.
- Floeter, S. R., Guimarães, R. Z. P., Rocha, L. A., Ferreira, C. E. L., Rangel, C. A. & Gasparini, J. L. 2001. Geographic variation in reef-fish assemblages along the Brazilian coast. *Global Ecology & Biogeography*. 10: 423-431.
- Fraser, D. J., Lippé, C. & Bernatchez, L. 2004. Consequences of unequal population size, asymmetric gene flow and sex-biased dispersal on population structure in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Molecular Ecology*. 13: 67-80.
- Gold, J. R. & Turner, T. F. 2002. Population structure of red drum (*Sciaenops ocellatus*) in the northern Gulf of Mexico, as inferred from variation in nuclear-encoded microsatellite. *Marine Biology*. 140: 249-265.
- Gold, J. R., Pak, E. & Richardson, L. R. 2001. Microsatellite variation among red snapper (*Lutjanus campechanus*) from the gulf of Mexico. *Marine Biotechnology*. 3: 293-304.
- Gomes, C., Dales, R. B. G. & Oxenford, H. A. 1998. The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flyingfish, *Hirundichthys affinis* in the central western Atlantic. *Molecular Ecology*. 7 (8): 1029-1039.

- Gjedrem, T. 2000. Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquaculture Research*. 31 (1): 25-33.
- Goodbred, C. O. & Graves, J. E. 1996. Genetic relationships among geographically isolated populations of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Marine and Freshwater Research*. 47: 347-355.
- Goudet, I. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em <http://www.unil.ch/izea/software/fstast.html>
- Grewe, P & Hampton, J. 1998. An assessment of bigeye (*Thunnus obesus*) population structure in the Pacific Ocean, based on mitochondrial DNA and DNA microsatellite analysis. Marine Research. Forum Fisheries Agency and Pelagic Fisheries research Program, Joint Institute of Marine and Atmospheric Research, University of Hawaii, South Pacific Commission & National Marine Fisheries Service US. CSIRO, Australia. 29p.
- Grosberg, R. K. & Cunningham, C. W. 2001. Genetic structure in the sea. From populations to communities. In: Bertness, M. D., Gaines, S. & Hay, M. E., Eds.) *Marine Community Ecology*. Sinauer Associates. Sunderland, MA, pp. 61-84.
- Hartl, D. L. & Clark, A. G. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3a. Ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 542 p.
- Hatanaka, T. 2000. *Estudos de marcadores cromossômicos e moleculares no peixe Prochilodus marggravii (Prochilodontidae), uma espécie de interesse econômico no rio São Francisco*. Tese de Doutorado. Departamento de Genética e Evolução – UFSCar, São Carlos/SP. 148p.
- Hatanaka, T. & Galetti Jr., P. M. 2003. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and Molecular Biology*. 26 (1): 19-25.

- Hatanaka, T., Henrique-Silva, F. & Galetti Jr., P. R. A. M. 2002. A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. *Animal Cytogenetics and Comparative Mapping*. 98: 308-310.
- Hellberg, M. E. 1995. Stepping-stone gene flow in the solitary coral *Balanophyllia elegans*: Equilibrium and nonequilibrium at different spatial scales. *Marine Biology*. 123: 573-581.
- Hilbish, T. J. 1996. Population genetics of marine species: the interaction of natural selection and historically differentiated populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 200: 67-83.
- Hsu, K-C., Wang, J-P., Chen, X-L. & Chiang, T-Y. 2004. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Acrossocheilus paradoxus* (Cyprinidae) using PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Conservation Genetics*. 5: 113-115.
- Humann, P. *Reef Fish Identification. Florida, Caribbean, Bahamas*. Deloach, N. (Ed.). New World Publications, Inc. Florida, USA. 396p.
- Jaccard, P. 1901. Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 37: 547-579.
- Johnson, G. D. & Gill, A. C. 1995. Perches and their allies. In: Paxton, J. R. & Eschemeyer, W. N. (ed.). *Encyclopedia of Fishes*. Academic Press Inc. San Diego, USA. 240p.
- Jones, G. P., Milicich, M. J., Emslie, M. J. & Nunow, C. 1999. Self-recruitment in a coral reef fish population. *Nature*. 402: 802-804.
- Joyeux, J-C., Floeter, S. R., Ferreira, C. E. L. & Gasparini, J. L. 2001. Biogeography of tropical reef fishes: the South Atlantic puzzle. *Journal of Biogeography*. 28: 831-841.
- Kegel, W. 1957. Contribuição ao estudo da bacia costeira do Rio Grande do Norte. Bol. Divisão de Geologia e Mineralogia, DNPM, Rio de Janeiro, n.170. pp. 55-104. In: *Estudos de Paleontologia Potiguar*. Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Coleção Mossoroense, v. 167. 292p. 1981.

- Koh, T. L., Khoo, G., Fan, L. Q., Phang, V. P. E. 1999. Genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of *Discus* (*Symphysodon* spp.) as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Aquaculture*. 173: 485-497.
- Koike, J. & Guedes, D.S. 1981. Peixes dos arrecifes de Pernambuco e Estados vizinhos. *Anais do III Encontro de Zoologia do Nordeste*. Recife-PE.
- Lacson, J. M. 1992. Minimal genetic variation among samples of six species of coral reef fishes collected at La Parguera, Puerto Rico, and Discovery Bay, Jamaica. *Marine Biology*. 112: 327-331.
- Lai, Y. & Sun, F. 2003. The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Molecular Biology and Evolution*. 20 (12): 2123-2131.
- Larson, R. J. & Julian, R. M. 1999. Spatial and temporal genetic patchiness in marine populations and their implications for fisheries management. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports*. 40: 94-99.
- Lehmann, D., Hettwer, H. & Taraschewski, H. 2000. RAPD-PCR investigations of systematic relationships among four species of eels (Teleostei; Anguillidae), particularly *Anguilla anguilla* and *A. rostrata*. *Marine Biology*. 137 (2): 195-204.
- Leis, J, M. 1991. The pelagic stage of reef fishes: the larval biology of coral reef fishes. In: Sale, P. F. (ed.), *The Ecology of fishes on coral reefs*. Academic Press, California, pp. 183-227.
- Lessios, H. A. 1998. the first stage of speciation as seen in organisms separated by the isthmus of Panama. In: Howard, D. J. & Berlocher, S. H. (Ed.) *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, Oxford, p. 186-201.
- Leuzzi, M. S. P., Almeida, F. S., Orsi, M. L. & Sodr , L. M. K. 2004. Analysis of genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema river, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 27 (3): 355-362.

- Levinton, J. S. 1995. *Marine biology: function, biodiversity, ecology*. 1<sup>a</sup> Ed. Oxford University Press, New York. 420p.
- Levy, J. A. & Cassano, V. P. F. 1994. Biochemical-genetic comparison of *Cynoscion jamaicensis* and *Cynoscion striatus* (Teleostei: Perciformes: Scianidae) in South Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 107 B (4): 515-517.
- Liu, Z. J., Li, P., Argue, B. J. & Dunham, R. A. 1999. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. *Aquaculture*. 174: 59-68.
- Lowe-McConnell, R. H. 1999. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. Edusp, São Paulo, SP. 535p.
- Luiz-Júnior, O. J. 2003. Colour morphs in a queen angelfish *Holacanthus ciliaris* (Perciformes: Pomacanthidae) population of St. Paul's Rocks, NE Brazil. *Tropical Fish Hobbyist*. 51 (5): 82-90.
- Lunt, D. H., Hutchinson, W. F. & Carvalho, G. R. 1999. An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Molecular Ecology*. 8: 891-894.
- Lynch, M. 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*. 7 (5): 478-484.
- Lynch, M. & Milligan, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*. 3: 91-99.
- Maggioli, R., Rogers, A. D. & Maclean, N. 2003. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda, Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. *Molecular Ecology*. 12: 3213-3217.
- Mamuris, Z., Apostolodis, A. P., Theodorou, A. J. & Triantaphyllidis, C. 1998. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to evaluate intraspecific genetic variation in red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Biology*. 132: 171-178.
- Mayr, E. 1963. *Animal species and evolution*. Harvard University Press, Cambridge. 797p.

- McDermott, J. M. & McDonald, B. A. 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Annual Review of Phytopathology*. 31: 353-373.
- Menezes, N. A. & Figueiredo, J. L. 1985. *Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil V. Teleostei (4)*. São Paulo, 105p.
- Mills, D. 1993. *Aquarium fish*. Dorling Kindersley Book. Londres, UK. 304p.
- Mitton, J. B. & Lewis Jr., W. M. 1989. Relationships between genetic variability and life-history features of bony fishes. *Evolution*. 43 (8): 1712-1723.
- Molina, W. F. 2000. *Análise da diversidade genética na família Pomacentridae (Pisces, Perciformes), utilizando métodos combinados de citogenética, marcadores moleculares e morfometria*. Tese de Doutorado. Departamento de Genética e Evolução – UFSCar, São Carlos/SP.
- Moyer, J. T., Thresher, R. E. & Colin, P. L. 1983. Courtship, spawning and inferred social organization of American angelfishes (Genera *Pomacanthus*, *Holacanthus* and *Centropyge*; Pomacanthidae). *Environmental Biology of Fishes*. 9 (1): 25-39.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 106: 283-292.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- Nei, M. & Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 5269-5273.
- Nelson, J. S. 1994. *Fishes of the world*. 3a Ed. New York, John Willey & Sons, Inc. 600p.
- Nelson, J. S., Hoddell, R. J., Chou, L. M., Chan, W. K. & Phang, V. P .E. 2000. Phylogeographic structure of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, explained by sea level changes on the Sunda shelf. *Marine Biology*. 137: 727-736.
- O'Connell, M., Dillon, M. C. & Wright, J. M. 1998. Development of primers for polymorphic microsatellite loci in the Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). *Mol. Ecol*. 7: 357-363.

- O'Reilly, P. & Wright, J. M. 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *Journal of Fish Biology*. 47 (Suppl. A): 29-55.
- Paxton, J. R. 1995. Habitats and adaptations. In: Paxton, J. R. & Eschemeyer, W. N. (ed.). *Encyclopedia of Fishes*. Academic Press Inc. San Diego, USA. 240p.
- Perez-Enriquez, R., Takagi, M. & Taniguchi, N. 1999. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite markers. *Aquaculture*. 173: 413-423.
- Planes, S., Romans, P., Lecomte-Finiger, R. 1998. Genetic evidence of closed life cycles for some coral reef fishes within Taiaro lagoon (Tuamotu Archipelago, French Polynesia). *Coral Reefs*. 17 (1): 9-14.
- Polunin, N. V. C. & Roberts, C. M. 1996. *Reef Fisheries*. Londres. 477p.
- Present, T.M.C. 1987. Genetic differentiation of disjunct Golfo of California and Pacific outer coast populations of *Hypsoblennius jenkinsi*. *Copeia*. 4: 1010-1024.
- Prioli, S. M. A. P., Prioli, A. J., Julio Jr., H. F., Pavanelli, C. S., Oliveira, A. V., Carrer, H., Carraro, D. M. & Prioli, L. M. 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.* 25: 421-430
- Pyle, R. L. & Randall, J. E. 1994. A review of hybridization in marine angelfishes (Perciformes: Pomacanthidae). *Environmental Biology of Fishes*. 41: 127-145.
- Ray, G. C. 1988. Ecological diversity in coastal zones and oceans. In: Wilson, E. O. (ed.) *Biodiversity*. National Academic Press, Washington, D.C. p. 36-50.
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.3): population genetics software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity*. 86: 248-249.
- Reilly, A., Elliot, N. G., Grewe, P. M., Clabby, C., Powell, R. & Ward, R. D. 1999. Genetic differentiation between Tasmanian cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and their

- ancestral Canadian population: comparison of microsatellite DNA and allozyme and mitochondrial DNA variation. *Aquaculture*. 173: 459-469.
- Rico, C., Zadworny, D., Kunhlein, U. & Fitzgerald, J. G. 1993. Characterization of microsatellite loci in the three-spine stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Molecular Ecology*. 2: 271-272.
- Rico, C., Rico, I. & Hewitt, G. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of Royal Society of London*. 263: 549-557.
- Rico, C., Ibrahim, K. M., Rico, I., & Hewitt, G. 1997. Stock composition in North Atlantic populations of whiting, *Merlangius merlangus* L. using microsatellite marker. *Journal of Fish Biology*. 51: 462-475.
- Roberts, C. M. & Hawkins, J. P. 1999. Extinction risk in the sea. *Trends Ecol. Evol.* 14: 241-246.
- Robertson, D. R. 2001. Population maintenance among tropical reef fishes: inferences from small-island endemics. *Proceedings of the National Academy of Science*. 98: 5667-5670.
- Robins, C. R., Ray, G. C. & Douglass, J. F. 1986. *Peterson Field Guides: Atlantic coast fishes*. Houghton Mifflin Company. New York, USA: 128-129.
- Rocha, L. A., Rosa, I. A. & Rosa, R. S. 1998. Peixes recifais da costa da Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 15 (2): 553-566.
- Rocha, L. A., Bass, A. L., Robertson, R. & Bowen, B. W. 2002. Adult habitat preferences, larval dispersal, and the comparative phylogeography of three Atlantic surgeonfishes (Teleostei: Acanthuridae). *Molecular Ecology*. 11: 243-252.
- Rohlf, J. 1993. *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. NTSYS-pc. Manual. Version 1.80*. Applied Biostatistic. Steauket. New York: State University of New York.
- Rosa, R.S., Rosa, I.L. & Rocha, L.A. 1997. Diversidade da ictiofauna de poças de maré da praia do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil. *Revta. Bras. Zool.* 14 (1): 201-212.

- Ryder, O. A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends Ecol. Evol.* 1: 9-10.
- Ryskov, A. P. 1999. Multilocus DNA fingerprinting in the genetic studies of biodiversity. *Molecular Biology.* 33 (6): 880-892.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S. S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. 1988. *Primer*-direct enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487-494.
- Sakai, Y. & Kohda, M. 1997. Harem structure of the protogynous angelfish, *Centropyge ferrugatus* (Pomacanthidae). *Environmental Biology of Fishes.* 49: 333-339.
- Sale, P. F. 1977. Maintenance of high diversity in coral reef fish communities. *American Naturalist.* 111: 337-359.
- Sale, P. F. 1978. Coexistence of coral reef fishes – a lottery for living space. *Environmental Biology of Fishes.* 3: 85-102.
- Sale, P. F. 1991. Ecology of coral reef fishes. In: Sale, P. F. (ed.), *The Ecology of fishes on coral reefs*. Academic Press, California, pp. 3-8.
- Sales, G. 1992. Plano de implantação da Reserva Biológica do Atol das Rocas. *Relatório IBAMA-RN.* 12 p.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2<sup>nd</sup> ed. Cold-Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sanches, A. 2002. *Análise de RAPD em Brycon microlepis (Characidae): um estudo populacional e suas implicações na conservação da espécie.* Dissertação de mestrado. Departamento de Genética e Evolução – UFSCar, São Carlos/SP. 91p.
- Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463 - 5467.

- Sazima, I., Moura, R. L. & Sazima, C. 1999. Cleaning activity of juvenile angelfish, *Pomacanthus paru*, on the reefs of the Abrolhos Archipelago, western South Atlantic. *Environmental Biology of Fishes*. 56: 399-407.
- Scheltema, R. S. 1986. On dispersal and planktonic larvae of benthic invertebrates: an eclectic overview and summary of problems. *Bull. Mar. Sci.* 39: 290-322.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. 2000. ARLEQUIN ver 2.000: a software for population genetics data analysis (software). University of Geneva, Genetic and Biometry Laboratory, Geneva. <http://anthropologie.unige.ch/arlequin> (31 março 2003).
- Shaklee, J. B. & Bentzen, P. 1998. Genetic identification of marine fish and shellfish. *Bulletin of Marine Science*. 62 (2): 589-621.
- Shaw, P. W., Turan, C., Wright, J. M., O'Connell & Carvalho, G. R. 1999. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*), with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analyses. *Heredity*. 83: 490-499.
- Shulman, M. J. & Bermingham, E. 1995. Early life histories, ocean currents and the population genetics of Caribbean reef fishes. *Evolution*. 49 (5): 897-910.
- Silva, E. P. Especiação no ambiente marinho. 2002. In: Pereira, R. C. & Soares-Gomes, A. (ed.), *Biologia Marinha*. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, p. 35-47.
- Sinclair, M. 1988. *Marine populations*. An essay on population regulation and speciation. Books in recruitment fishery oceanography. 252 pp.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution*. 47: 264-279.
- Smith, C. L. 1982. Patterns of reproduction in coral reef fishes. In: Huntsman, G. R., Nicholson, W. R. & Fox, W. W. (eds.) *The biological bases for reef fishery management*. NOAA Tech. Mem. NMFS-SEFC-80. U.S. Dept., Commerce, Washington, D. C., USA.
- Smith P. J. and Fujio Y. 1982. Genetic variation in marine teleosts: high variability in habitat specialists and low variability in habitat generalists. *Marine Biology*. 69: 7-20.

- Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. 1973. *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman Ed. San Francisco, California.
- Solé-Cava, A. M., Russo, C. A. M. & Silva, E. P. 1992. Fluxo gênico e estruturação em populações de invertebrados marinhos bênticos. *Rev. Bras. Gen.* 15 (Suppl.): 274-279.
- Solé-Cava, A. M., Thorpe, J. P. & Todd, C. D. 1994. High genetic similarity between geographically distant populations in a sea anemone with low dispersal capabilities. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 74: 895-202.
- Stalling, R. L., Ford, A. F., Nelson, D., Torney, D. C., Hildebrand, C. E. & Moyzis, R. K. 1991. Evolution and distribution of (GT)<sub>n</sub> repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*. 10: 807-815.
- Stepien, C.A. & Rosenblatt, R.H. 1996. Genetic divergence in antitropical pelagic marine fishes (*Trachurus*, *Merluccius*, and *Scomber*) between North and South America. *Copeia*. 3: 586-598.
- Stobutzki, I. C. 1998. Interspecific variation in sustained swimming ability of late pelagic stage reef fish from two families (Pomacentridae and Chaetodontidae). *Coral Reefs*. 17: 111-119.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Tree*. 15 (5): 199-203.
- Swearer, S. E., Caselle, J. E., Lea, D. W. & Warner, R. R. 1999. Larval retention and recruitment in an island population of coral-reef fish. *Nature*. 402: 799-802.
- Taberlet, P. 1998. Biodiversity at the intraspecific level: the comparative phylogeographic approach. *Journal of Biotechnology*. 64: 91-100.
- Takagi, M. & Taniguchi, N. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of three species of *Anguilla*, *A. japonica*, *A. australis* and *A. bicolor*. *Fisheries Science*. 61 (5); 884-885.
- Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Rimphanitchayakit, V., Jarayabhand, P. & Boonsaeng, V. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination in

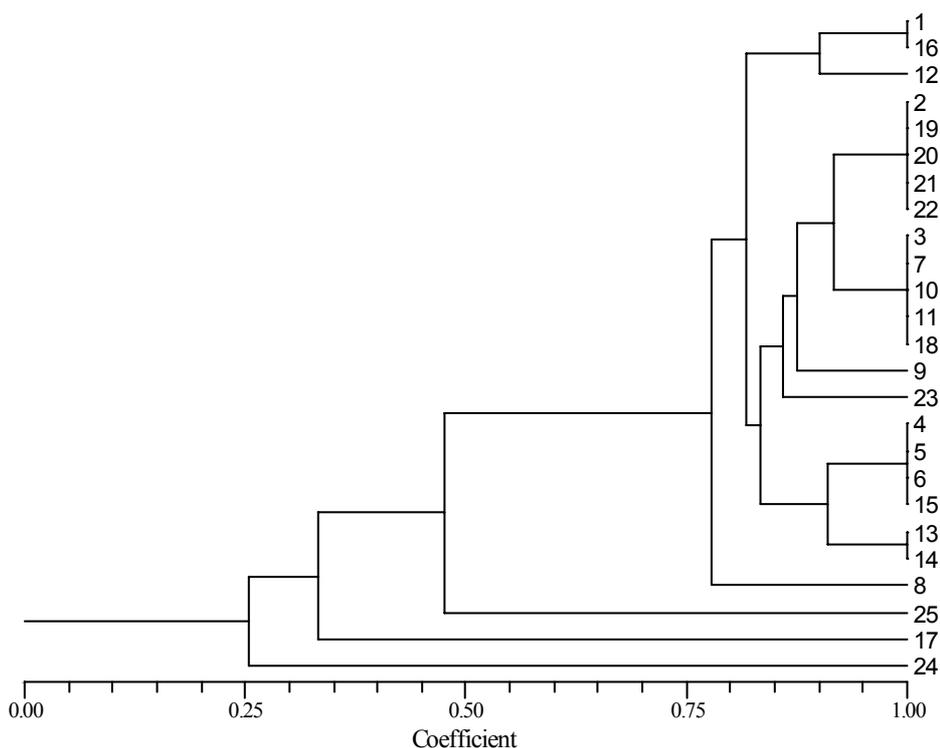
- wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 6 (2): 110-115.
- Tassanakajon, A., Tiptawonnukul, A., Supungul, P., Rimphanitchayakit, V., Cook, D., Jarayabhand, P., Klinbunga, S. & Boonsaeng, V. 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 7(1): 55-61.
- Thresher, R. E. & Brothers, E. B. 1985. Reproductive ecology and biogeography of Indo-West Pacific angelfishes (Pisces: Pomacanthidae). *Evolution*. 39 (4): 878-887.
- Tringali, M. D. & Bert, T. M. 1996. The genetic structure of common snook (*Centropomus undecimalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 53: 974-984.
- Vazzoler, A. E.A. M., Soares, L. S. H. & Cunningham, P. T. M. 1999. Ictiofauna da costa brasileira. In: Lowe-McConnell, R. H. (ed.), *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. Edusp, São Paulo, pp. 424-468.
- Victor, B. C. 1991. Settlement strategies and biogeography of reef fishes. In: Sale, P. F. (ed.), *The Ecology of fishes on coral reefs*. Academic Press, California, pp. 247-252.
- Waldman, J. R. 1999. The importance of comparative studies in stock analysis. *Fisheries Research*. 43: 237-246.
- Waples, R. S. 1998. Separating the wheat from the chaff; patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *J. Heredity*. 89: 438-450.
- Ward, R.D. 1995. Population genetics of tunas. *J. Fish Biol.* 47: 259-280.
- Ward, R. D., Woodwark, M. & Skibinski, D. O. F. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*. 44: 213-232.
- Ward, R. D. & Grewe, P. M. 1995. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. In: *Molecular Genetics in Fisheries* (Carvalho, G. R. & Oitcher, T. J., ed.). Chapman & Hall, Londres, pp. 29-54.

- Warner, R. R. 1997. Evolutionary ecology: how to reconcile pelagic dispersal with local adaptation. *Coral Reefs*. 16 (suppl.): S115-S120.
- Wasko, A. P. & Galetti Jr., P. M. 2002. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia* 474 (1-3): 131-137.
- Waters, J. M., Deijkstra, L. H. & Wallies, G. P. 2000. Biogeography of a Southern hemisphere freshwater fish: how important is marine dispersal? *Molecular Ecology*. 9 (11): 1815-1821.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Wellington, G. M. & Victor, B. C. 1989. Planktonic larval duration of one hundred species of Pacific and Atlantic damselfishes. *Marine Biology*. 101: 557-567.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eugen*. 15: 323-354.
- Wright, S. 1978. *Evolution and genetics of populations. Vol.2: the theory of gene frequencies*. University of Chicago Press, Londres, 511 p.
- Wright, J. M. 1993. DNA fingerprinting of fishes. *In*: Hochachka & Mommsen (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 2. Elsevier Science Publishers. 57-91.
- Yap I. V. & Nelson, R. J. 1996. *WINBOOT: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms* IRRI Discussion paper Series No. 14, International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- Yeh, F., Yang, R. & Boyle, T. 1999. POPGENE VERSION 1.31 Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. 2002. Strategies from microsatellites isolation: a review. *Molecular Ecology*. 11: 1-16.

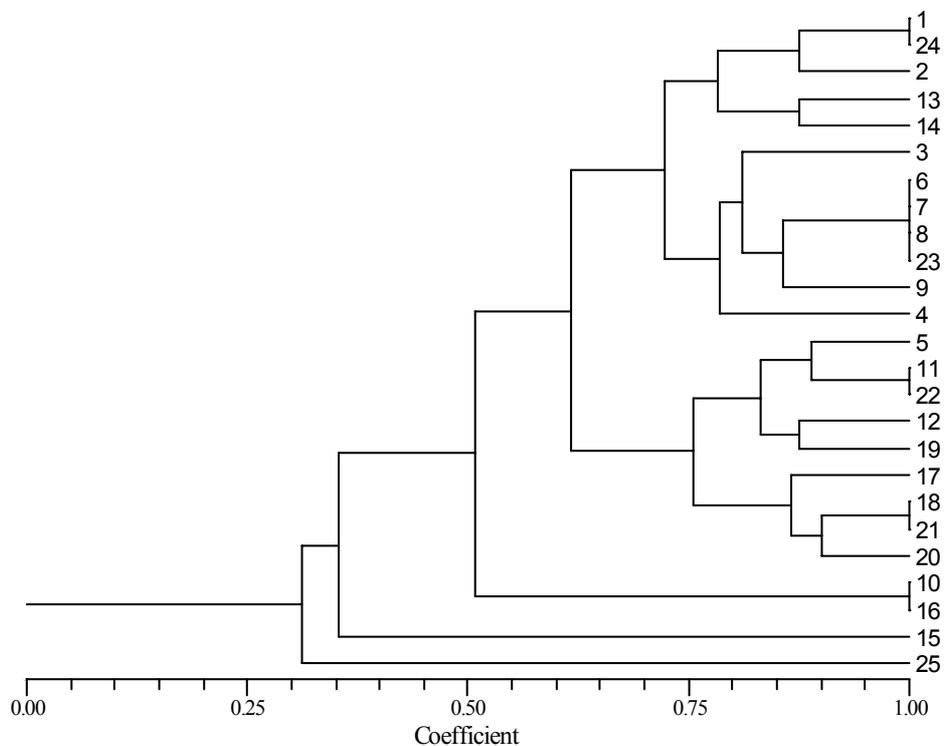
## 8. Apêndice



Exemplares juvenis de *Pomacanthus paru*

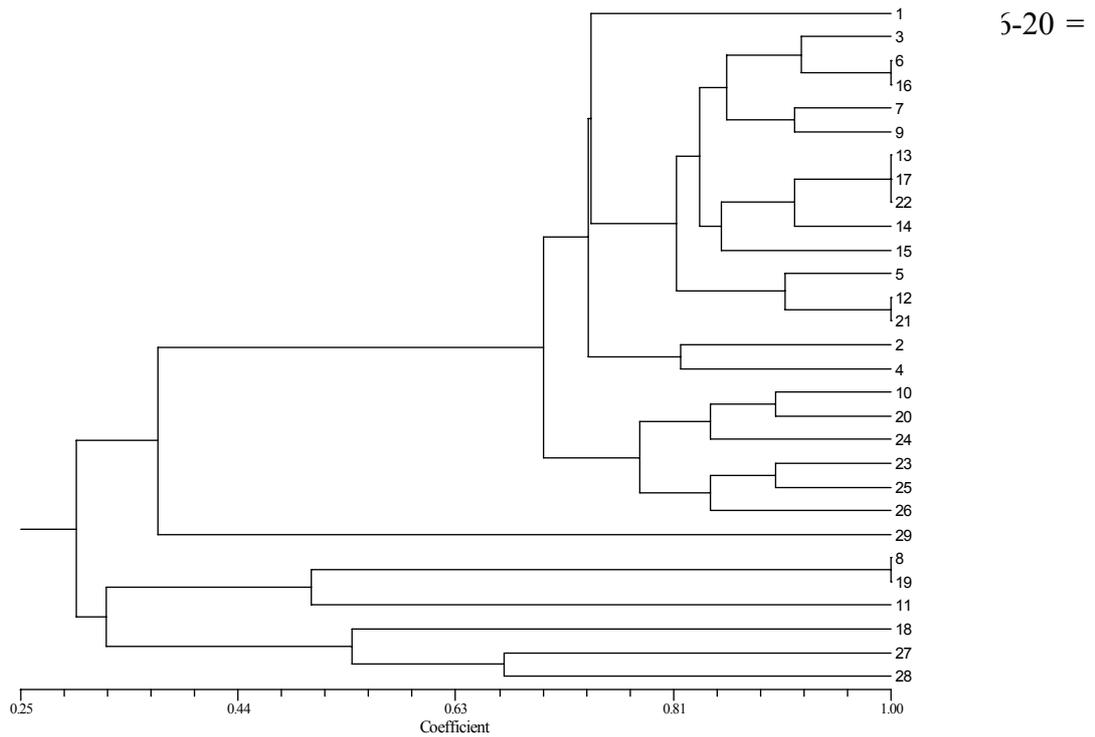


**Apêndice I:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard com o *primer* C-05 em indivíduos de *H. ciliaris* (1-11 = pop. Ceará, 12-16 = pop. Nordeste, 17-21 = pop. Bahia, 22 = pop. Sudeste e 23-25 = Arquipélago de São Pedro e São Paulo)

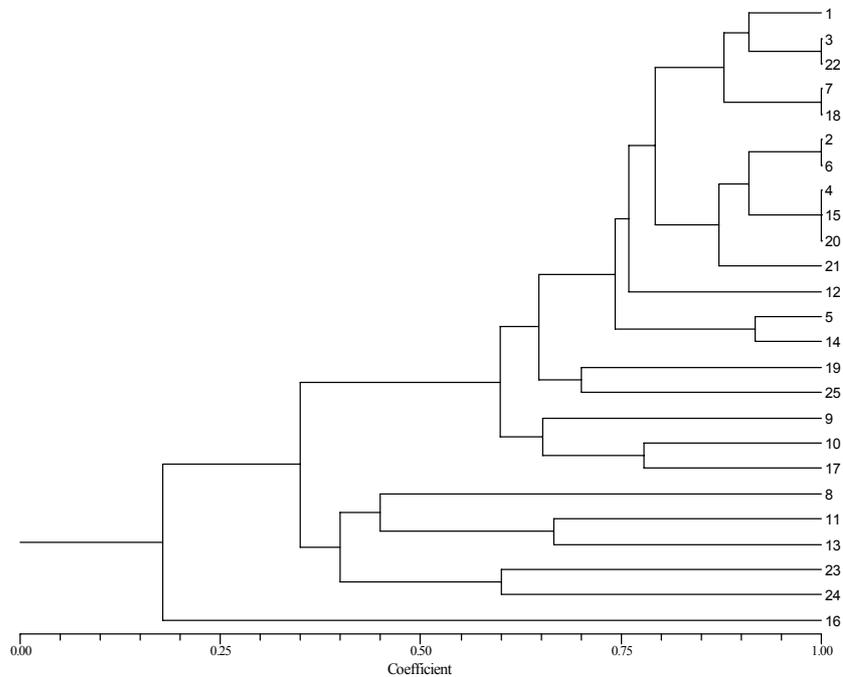


**Apêndice II:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard com o *primer*

C-1  
pop



**Apêndice III:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard com o *primer* D-02 em indivíduos de *H. ciliaris* (1-13 = pop. Ceará, 14-17, 26 = pop. Nordeste, 18-22 = pop. Bahia, 23 = pop. Sudeste e 24-25, 28-29 = Arquipélago de São Pedro e São Paulo)



**Apêndice IV:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard com o *primer* D-03 em indivíduos de *H. ciliaris* (1-12, 21 = pop. Ceará, 13-15, 22, 25 = pop.

Nordeste, 16-17, 23-24 = pop. Bahia, 18 = pop. Sudeste e 19-20 = Arquipélago de São Pedro e São Paulo)

**Apêndice V:** Valores de frequências gênicas em *H. ciliaris*, considerando apenas a região do Ceará; valores de diversidade gênica =  $h$  (Nei, 1973) e estimativa de locos polimórficos.

Alelo	Frequência gênica	$h$
B7-1	0,6985	0,4212
B7-2	0,2023	0,3227
B7-3	1,0	0,0
B7-4	0,2615	0,3862
B7-5	0,6985	0,4212
B7-6	1,0	0,0
B7-7	0,2023	0,3227
B7-8	0,2023	0,3227
B7-9	0,0955	0,1727
B7-10	0,3970	0,4788
C5-1	1,0	0,0
C5-2	0,6985	0,4212
C5-3	1,0	0,0
C5-4	1,0	0,0
C5-5	1,0	0,0
C5-6	1,0	0,0
C5-7	0,3970	0,4788
C5-8	0,4778	0,4990
C5-9	1,0	0,0
C5-10	1,0	0,0
C5-11	0,5736	0,4892
C5-12	1,0	0,0
C10-1	1,0	0,0
C10-2	0,0513	0,0974
C10-3	0,4523	0,4954
C10-4	1,0	0,0
C10-5	1,0	0,0
C10-6	1,0	0,0
C10-7	0,1056	0,1889
C10-8	1,0	0,0
C10-9	0,1056	0,1889
C10-10	0,4523	0,4954
C10-11	0,1633	0,2733
D2-1	0,6078	0,4768
D2-2	0,5196	0,4992
D2-3	0,6078	0,4768
D2-4	1,0	0,0
D2-5	0,2662	0,3907
D2-6	0,6078	0,4768
D2-7	0,3798	0,4711
D2-8	1,0	0,0
D2-9	0,3798	0,4711
D2-10	0,7226	0,4009
D2-11	0,1229	0,2157
D2-12	0,7226	0,4009
D2-13	0,3206	0,4357
D3-1	0,2929	0,4142
D3-2	0,4226	0,4880
D3-3	0,3545	0,4577
D3-4	0,0426	0,0815

D3-5	0,2929	0,4142
D3-6	0,5918	0,4832
D3-7	0,1340	0,2321
D3-8	1,0	0,0
D3-9	1,0	0,0
D3-10	0,5918	0,4832
D3-11	0,4226	0,4880
D3-12	1,0	0,0
D3-13	0,7113	0,4107
<hr/>		
<b>Média/desvio-padrão de h</b>	0,2567/0,2093	
<hr/>		
<b>Porcentagem de locos polimórficos</b>	66,1%	
<hr/>		

**Apêndice VI:** Valores de frequências gênicas em *H. ciliaris*, considerando apenas a região denominada “Nordeste”; valores de diversidade gênica = h (Nei,1973) e estimativa de locos polimórficos.

<b>Alelo</b>	<b>Frequência gênica</b>	<b>h</b>
B7-1	0,2254	0,3492
B7-2	0,2254	0,3492
B7-3	0,5528	0,4944
B7-4	0,3675	0,4649
B7-5	0,5528	0,4944
B7-6	1,0	0,0
B7-7	0,2254	0,3492
B7-8	0,2254	0,3492
B7-9	0,5528	0,4944
B7-10	1,0	0,0
C5-1	1,0	0,0
C5-2	0,1056	0,1889
C5-3	1,0	0,0
C5-4	1,0	0,0
C5-5	1,0	0,0
C5-6	1,0	0,0
C5-7	0,1056	0,1889
C5-8	0,3675	0,4649
C5-9	1,0	0,0
C5-10	1,0	0,0
C5-11	1,0	0,0
C5-12	1,0	0,0
C10-1	0,3675	0,4649
C10-2	1,0	0,0
C10-3	0,2254	0,3492
C10-4	1,0	0,0
C10-5	1,0	0,0
C10-6	1,0	0,0
C10-7	0,2254	0,3492
C10-8	1,0	0,0
C10-9	0,1056	0,1889
C10-10	1,0	0,0
C10-11	0,5528	0,4944

D2-1	1,0	0,0
D2-2	0,5528	0,4944
D2-3	1,0	0,0
D2-4	0,3675	0,4649
D2-5	1,0	0,0
D2-6	1,0	0,0
D2-7	1,0	0,0
D2-8	0,5528	0,4944
D2-9	0,1056	0,1889
D2-10	1,0	0,0
D2-11	0,3675	0,4649
D2-12	1,0	0,0
D2-13	1,0	0,0
D3-1	0,5	0,5
D3-2	0,2929	0,4142
D3-3	0,5	0,5
D3-4	0,2929	0,4142
D3-5	0,5	0,5
D3-6	0,5	0,5
D3-7	0,2929	0,4142
D3-8	1,0	0,0
D3-9	0,5	0,5
D3-10	0,5	0,5
D3-11	0,5	0,5
D3-12	1,0	0,0
D3-13	0,5	0,5
<hr/>		
<b>Média/desvio-padrão de h</b>	0,2269/0,2236	
<b>Porcentagem de locos polimórficos</b>	54,24%	

**Apêndice VII:** Valores de frequências gênicas em *H. ciliaris*, considerando apenas a região da Bahia; valores de diversidade gênica =  $h$  (Nei,1973) e estimativa de locos polimórficos.

<b>Alelo</b>	<b>Frequência gênica</b>	<b>h</b>
B7-1	0,5528	0,4944
B7-2	0,5528	0,4944
B7-3	0,2224	0,3492
B7-4	0,5528	0,4944
B7-5	1,0	0,0
B7-6	0,3675	0,4649
B7-7	0,1056	0,1889
B7-8	0,2254	0,3492
B7-9	0,2254	0,3492
B7-10	0,2254	0,3492
C5-1	1,0	0,0
C5-2	0,5528	0,4944
C5-3	0,5528	0,4944
C5-4	0,5528	0,4944
C5-5	0,5528	0,4944
C5-6	1,0	0,0

C5-7	1,0	0,0
C5-8	0,1056	0,1889
C5-9	0,5528	0,4944
C5-10	0,5528	0,4944
C5-11	0,5528	0,4944
C5-12	1,0	0,0
C10-1	0,1056	0,1889
C10-2	0,3675	0,4649
C10-3	0,2254	0,3492
C10-4	1,0	0,0
C10-5	0,5528	0,4944
C10-6	0,5528	0,4944
C10-7	0,3675	0,4649
C10-8	1,0	0,0
C10-9	0,2254	0,3492
C10-10	0,3675	0,4649
C10-11	0,3675	0,4649
D2-1	0,5528	0,4944
D2-2	0,2254	0,3492
D2-3	0,3675	0,4649
D2-4	1,0	0,0
D2-5	0,2254	0,3492
D2-6	0,3675	0,4649
D2-7	0,3675	0,4649
D2-8	1,0	0,0
D2-9	0,2254	0,3492
D2-10	0,5528	0,4944
D2-11	0,0	0,0
D2-12	1,0	0,0
D2-13	0,2254	0,3492
D3-1	0,0	0,0
D3-2	0,4226	0,4880
D3-3	0,1835	0,2997
D3-4	0,0	0,0
D3-5	1,0	0,0
D3-6	0,4226	0,4880
D3-7	0,0	0,0
D3-8	0,4226	0,4880
D3-9	0,4226	0,4880
D3-10	0,1835	0,2997
D3-11	0,4226	0,4880
D3-12	1,0	0,0
D3-13	0,4226	0,4880
<b>Média/desvio-padrão de h</b>		0,3089/0,2058
<b>Porcentagem de locos polimórficos</b>		72,88%

**Apêndice VIII:** Valores de frequências gênicas em *H. ciliaris*, considerando apenas a região denominada “Sudeste”; valores de diversidade gênica = h (Nei,1973) e estimativa de locos polimórficos.

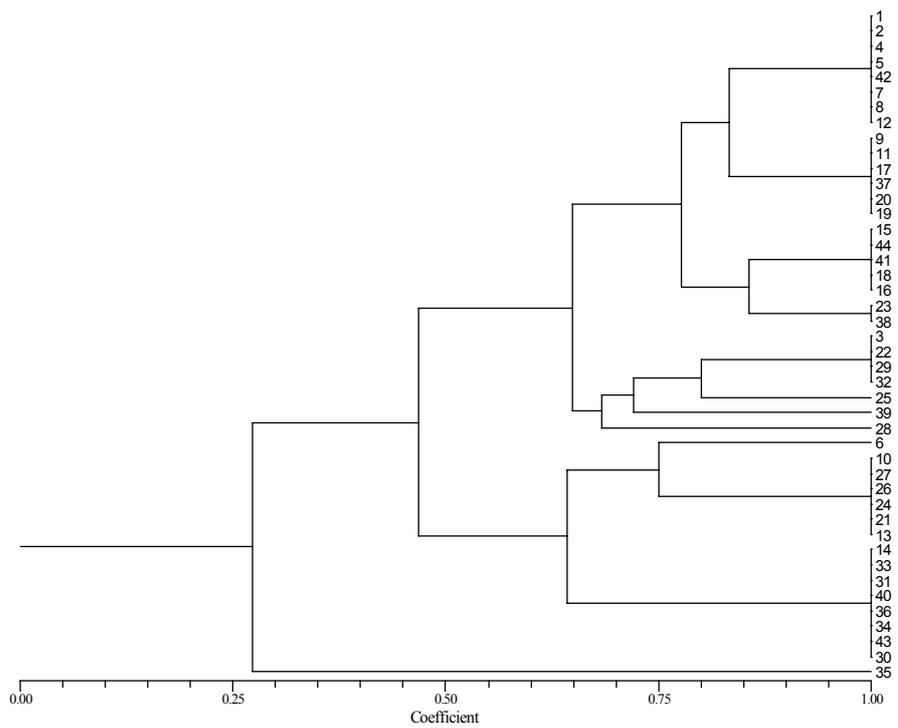
<b>Alelo</b>	<b>Frequência gênica</b>	<b>h</b>
B7-1	0,2929	0,4142
B7-2	0,0	0,0
B7-3	0,2929	0,4142
B7-4	0,2929	0,4142
B7-5	0,2929	0,4142
B7-6	1,0	0,0
B7-7	0,0	0,0
B7-8	0,0	0,0
B7-9	0,0	0,0
B7-10	1,0	0,0
C5-1	0,2929	0,4142
C5-2	0,2929	0,4142
C5-3	0,2929	0,4142
C5-4	0,2929	0,4142
C5-5	0,2929	0,4142
C5-6	0,2929	0,4142
C5-7	0,2929	0,4142
C5-8	0,0	0,0
C5-9	1,0	0,0
C5-10	0,2929	0,4142
C5-11	1,0	0,0
C5-12	1,0	0,0
C10-1	0,0	0,0
C10-2	0,0	0,0
C10-3	0,2929	0,4142
C10-4	0,2929	0,4142
C10-5	0,2929	0,4142
C10-6	0,2929	0,4142
C10-7	0,2929	0,4142
C10-8	1,0	0,0
C10-9	0,2929	0,4142
C10-10	1,0	0,0
C10-11	1,0	0,0
D2-1	0,2929	0,4142
D2-2	0,0	0,0
D2-3	0,2929	0,4142
D2-4	0,2929	0,4142
D2-5	0,2929	0,4142
D2-6	0,2929	0,4142
D2-7	0,2929	0,4142
D2-8	0,2929	0,4142
D2-9	0,2929	0,4142
D2-10	0,2929	0,4142
D2-11	0,2929	0,4142
D2-12	1,0	0,0
D2-13	0,2929	0,4142
D3-1	0,2929	0,4142
D3-2	0,0	0,0
D3-3	0,2929	0,4142

D3-4	0,2929	0,4142
D3-5	0,0	0,0
D3-6	0,2929	0,4142
D3-7	0,0	0,0
D3-8	1,0	0,0
D3-9	0,0	0,0
D3-10	0,0	0,0
D3-11	0,2929	0,4142
D3-12	1,0	0,0
D3-13	1,0	0,0
<b>Média/desvio-padrão de h</b>	<b>0,2387/0,2064</b>	
<b>Porcentagem de locos polimórficos</b>	<b>57,63%</b>	

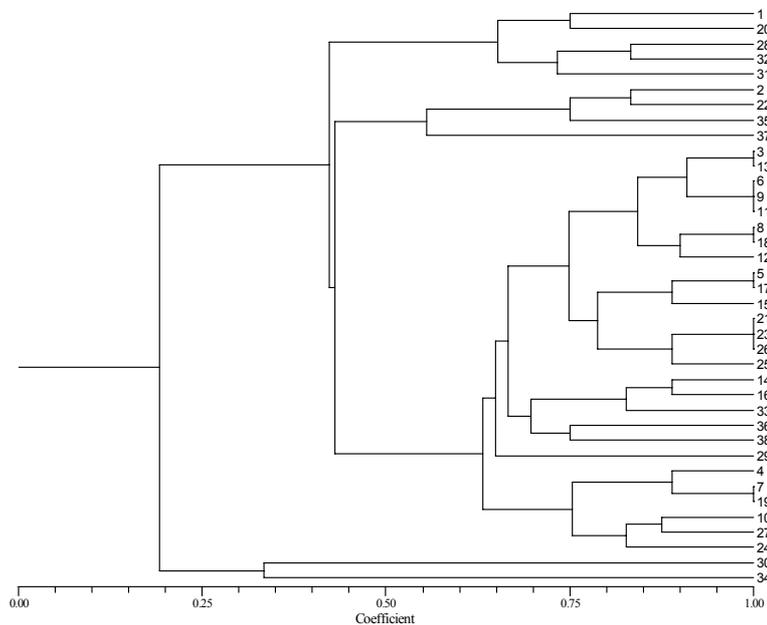
**Apêndice IX:** Valores de frequências gênicas em *H. ciliaris*, considerando apenas o Aquipélago de São Pedro e São Paulo; valores de diversidade gênica = h (Nei,1973) e estimativa de locos polimórficos

<b>Alelo</b>	<b>Frequência gênica</b>	<b>h</b>
B7-1	0,2929	0,4142
B7-2	0,0	0,0
B7-3	0,5	0,5
B7-4	0,1340	0,2321
B7-5	1,0	0,0
B7-6	1,0	0,0
B7-7	0,1340	0,2321
B7-8	0,1340	0,2321
B7-9	0,1340	0,2321
B7-10	1,0	0,0
C5-1	0,2929	0,4142
C5-2	1,0	0,0
C5-3	0,0	0,0
C5-4	1,0	0,0
C5-5	1,0	0,0
C5-6	1,0	0,0
C5-7	1,0	0,0
C5-8	0,0	0,0
C5-9	0,2929	0,4142
C5-10	0,2929	0,4142
C5-11	0,2929	0,4142
C5-12	0,2929	0,4142
C10-1	0,1835	0,4767
C10-2	0,1835	0,4767
C10-3	0,4226	0,4880
C10-4	1,0	0,0
C10-5	1,0	0,0
C10-6	1,0	0,0
C10-7	0,4226	0,4880
C10-8	1,0	0,0
C10-9	0,4226	0,4880

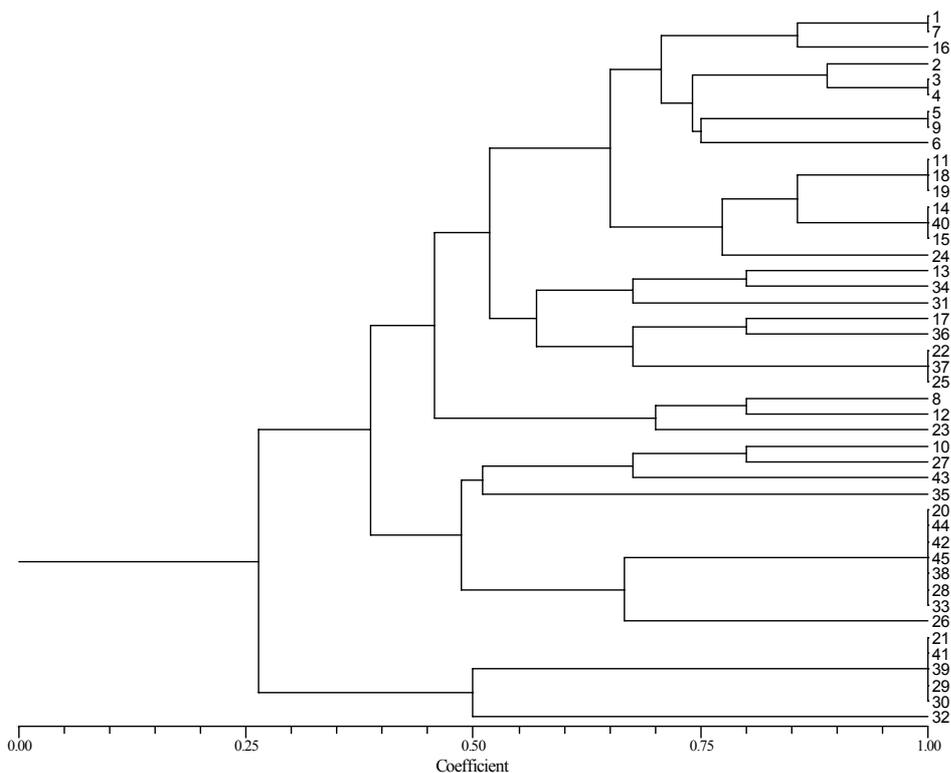
C10-10	1,0	0,0
C10-11	1,0	0,0
D2-1	1,0	0,0
D2-2	0,0	0,0
D2-3	1,0	0,0
D2-4	0,0	0,0
D2-5	0,2929	0,4142
D2-6	0,5	0,5
D2-7	1,0	0,0
D2-8	0,2929	0,4142
D2-9	0,0	0,0
D2-10	1,0	0,0
D2-11	0,0	0,0
D2-12	0,5	0,5
D2-13	0,5	0,5
D3-1	0,5	0,5
D3-2	0,2929	0,4142
D3-3	0,5	0,5
D3-4	0,5	0,5
D3-5	0,0	0,0
D3-6	1,0	0,0
D3-7	0,0	0,0
D3-8	1,0	0,0
D3-9	0,5	0,5
D3-10	0,2929	0,4142
D3-11	1,0	0,0
D3-12	1,0	0,0
D3-13	0,5	0,5
<b>Média/desvio-padrão de h</b>		<b>0,1972/0,2190</b>
<b>Porcentagem de locos polimórficos</b>		<b>47,46%</b>



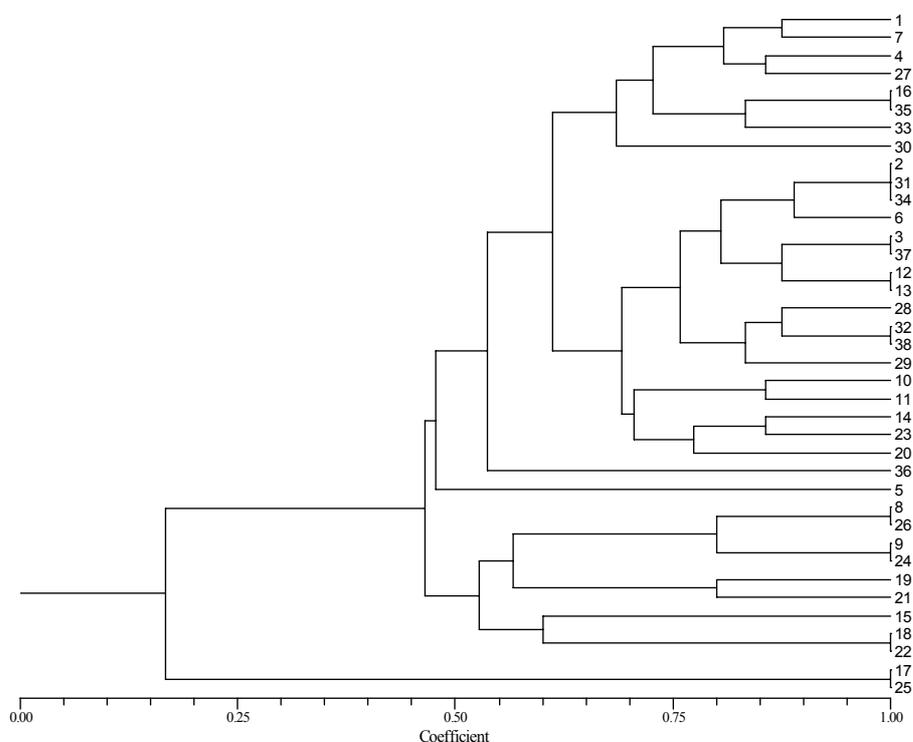
**Apêndice X:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard com o *primer* B-07 em indivíduos de *P. paru* (1-9, 21-38 = pop. Nordeste, 10-19 = pop. Bahia e 20, 39-44 = pop. Sudeste).



**Apêndice XI:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard com o *primer* C-10 em indivíduos de *P. paru* (1-18, 29-30 = pop. Nordeste, 19-28 = pop. Bahia e 31-38 = pop. Sudeste)



**Apêndice XII:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard com o primer D-02 em indivíduos de *P. paru* (1-9, 20-35 = pop. Nordeste, 10-18 = pop. Bahia e 19, 36-44 = pop. Sudeste)



**Apêndice XIII:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard com o primer D-03 em indivíduos de *P. paru* (1-8, 19-33 = pop. Nordeste, 9-17 = pop. Bahia e 18, 34-38 = pop. Sudeste)

**Apêndice XIV:** Valores de frequências gênicas em *P. paru*, considerando apenas a região denominada “Nordeste”; valores de diversidade gênica =  $h$  (Nei, 1973) e estimativa de locos polimórficos

Alelo	Frequência gênica	$h$
B7-1	0,2155	0,3382
B7-2	0,5196	0,4992
B7-3	1,0	0,0
B7-4	0,0595	0,1118
B7-5	0,0194	0,0381
B7-6	0,3496	0,4547
B7-7	0,7226	0,4009
C5-1	0,5736	0,4892
C5-2	0,1210	0,2126
C5-3	0,2023	0,3227
C5-4	0,2929	0,4142

C5-5	0,1743	0,2878
C5-6	0,6307	0,4658
C5-7	0,3970	0,4788
C5-8	0,7868	0,3355
C10-1	0,3745	0,5685
C10-2	0,5830	0,4862
C10-3	0,2727	0,4012
C10-4	0,5337	0,4977
C10-5	0,7915	0,3301
C10-6	1,0	0,0
C10-7	0,2777	0,4012
C10-8	0,3745	0,4685
C10-9	0,4102	0,4839
C10-10	0,2482	0,3732
C10-11	0,4102	0,4839
D2-1	1,0	0,0
D2-2	0,1229	0,2157
D2-3	0,3496	0,4547
D2-4	0,2662	0,3907
D2-5	0,5615	0,4924
D2-6	0,1451	0,2482
D2-7	0,2155	0,3382
D2-8	0,1451	0,2482
D2-9	0,2404	0,3653
D3-1	0,5636	0,4919
D3-2	0,0	0,0
D3-3	0,7818	0,3412
D3-4	0,3453	0,4522
D3-5	0,1548	0,4617
D3-6	0,2132	0,3355
D3-7	0,3453	0,4522
D3-8	0,5636	0,4919
D3-9	0,2763	0,3999
D3-10	0,3099	0,4278
<hr/>		
<b>Média/desvio-padrão de h</b>	0,3478/0,1521	
<hr/>		
<b>Porcentagem de locos polimórficos</b>	91,11%	
<hr/>		

**Apêndice XV:** Valores de frequências gênicas em *P.paru*, considerando apenas a região Bahia; valores de diversidade gênica = h (Nei, 1973) e estimativa de locos polimórficos

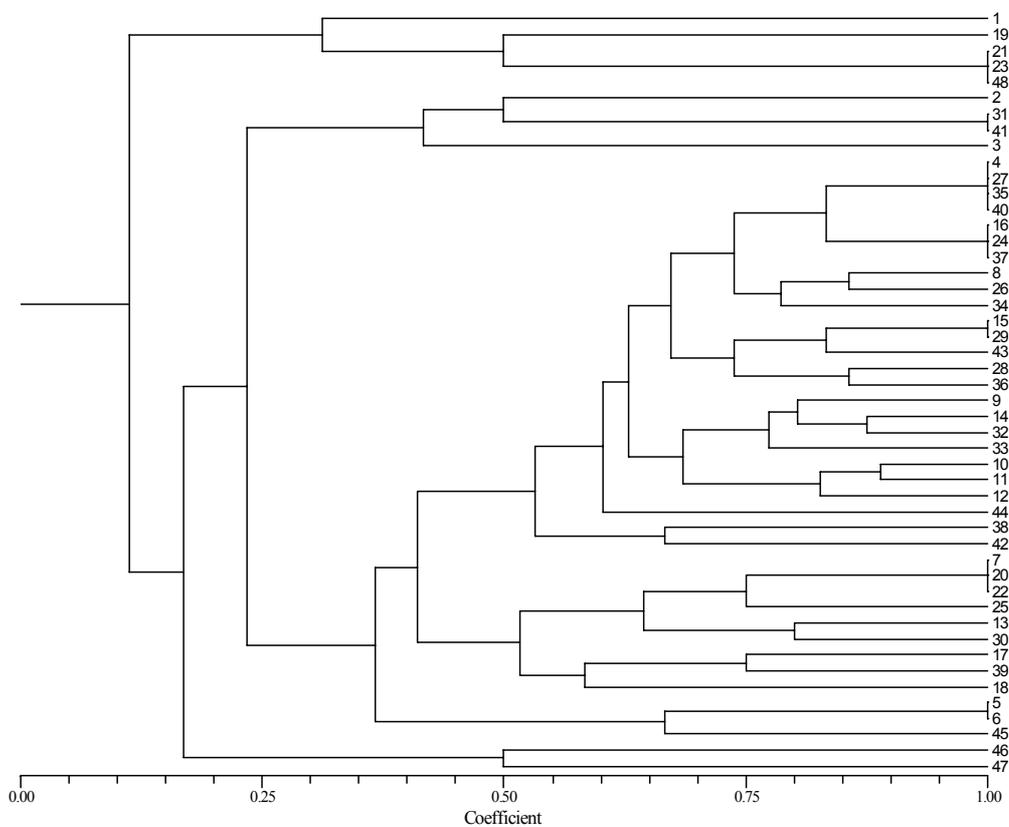
<b>Alelo</b>	<b>Frequência gênica</b>	<b>h</b>
B7-1	0,4523	0,4954
B7-2	0,6838	0,4325
B7-3	1,0	0,0
B7-4	0,3675	0,4649
B7-5	0,1633	0,2733
B7-6	0,4523	0,4954
B7-7	1,0	0,0
C5-1	0,6667	0,4444

C5-2	0,0572	0,1078
C5-3	0,1835	0,2997
C5-4	0,4226	0,4880
C5-5	0,0572	0,1078
C5-6	0,6667	0,4444
C5-7	0,6667	0,4444
C5-8	1,0	0,0
C10-1	0,3876	0,4747
C10-2	1,0	0,0
C10-3	0,2929	0,4142
C10-4	1,0	0,0
C10-5	1,0	0,0
C10-6	1,0	0,0
C10-7	0,6464	0,4571
C10-8	0,3876	0,4747
C10-9	1,0	0,0
C10-10	0,5	0,5
C10-11	0,3876	0,4747
D2-1	1,0	0,0
D2-2	0,4226	0,4880
D2-3	1,0	0,0
D2-4	0,4226	0,4880
D2-5	0,6667	0,4444
D2-6	0,6667	0,4444
D2-7	0,5286	0,4984
D2-8	0,0	0,0
D2-9	0,0572	0,1078
D3-1	1,0	0,0
D3-2	0,1835	0,2997
D3-3	1,0	0,0
D3-4	0,5286	0,4984
D3-5	0,1835	0,2997
D3-6	0,1181	0,2083
D3-7	0,3333	0,4444
D3-8	1,0	0,0
D3-9	0,6667	0,4444
D3-10	0,1835	0,2997
<b>Média/desvio-padrão de h</b>		0,2724/0,2114
<b>Porcentagem de locos polimórficos</b>		68,89%

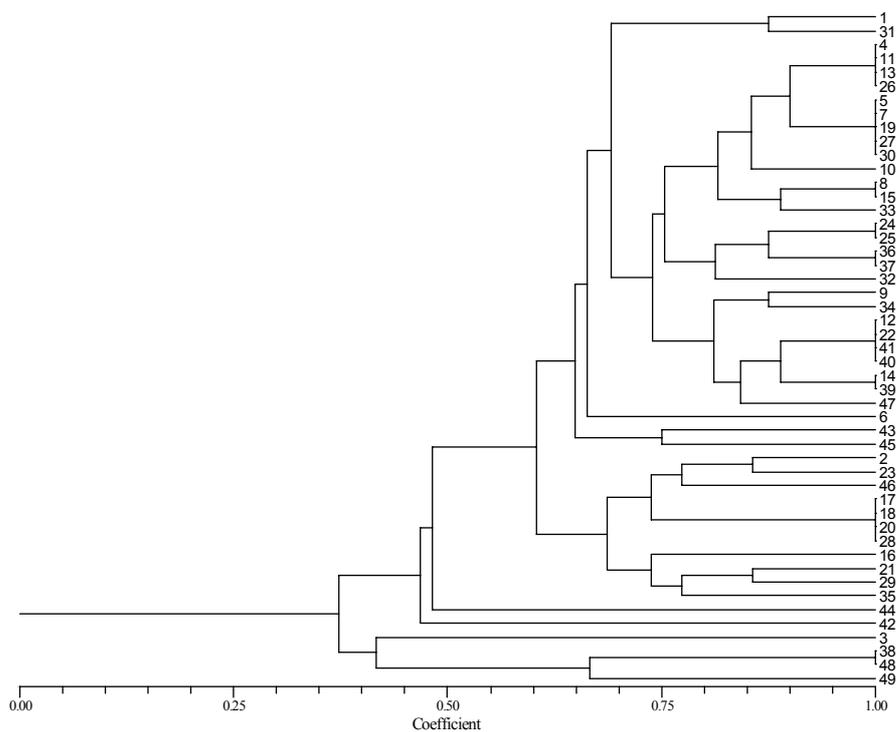
**Apêndice XVI:** Valores de frequências gênicas em *P.paru*, considerando apenas a região denominada “Sudeste”; valores de diversidade gênica = h (Nei,1973) e estimativa de locos polimórficos

<b>Alelo</b>	<b>Frequência gênica</b>	<b>h</b>
B7-1	0,3876	0,4747

B7-2	0,3876	0,4747
B7-3	1,0	0,0
B7-4	0,2094	0,3311
B7-5	0,2094	0,3311
B7-6	0,5	0,5
B7-7	1,0	0,0
C5-1	0,4523	0,4954
C5-2	0,1056	0,1889
C5-3	0,1633	0,2733
C5-4	0,1633	0,2733
C5-5	0,0513	0,0974
C5-6	0,4523	0,4954
C5-7	0,3675	0,4649
C5-8	0,6838	0,4325
C10-1	0,0742	0,1374
C10-2	0,6220	0,4702
C10-3	0,4655	0,4976
C10-4	0,4655	0,4976
C10-5	0,6220	0,4702
C10-6	0,6220	0,4702
C10-7	0,3453	0,4522
C10-8	0,0742	0,1374
C10-9	0,2441	0,3690
C10-10	0,1548	0,2617
C10-11	0,2441	0,3690
D2-1	1,0	0,0
D2-2	0,1056	0,1889
D2-3	0,1633	0,2733
D2-4	0,1056	0,1889
D2-5	0,5528	0,4944
D2-6	0,1633	0,2733
D2-7	0,0513	0,0974
D2-8	0,0	0,0
D2-9	0,0	0,0
D3-1	1,0	0,0
D3-2	0,0646	0,1208
D3-3	0,6464	0,4571
D3-4	0,3876	0,4747
D3-5	0,2094	0,3311
D3-6	0,0646	0,1208
D3-7	1,0	0,0
D3-8	1,0	0,0
D3-9	0,3876	0,4747
D3-10	1,0	0,0
<hr/>		
<b>Média/desvio-padrão de h</b>	<b>0,2769/0,1891</b>	
<hr/>		
<b>Porcentagem de locos polimórficos</b>	<b>80,0%</b>	



**Apêndice XVII:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard com o *primer* B-07 em indivíduos de *C. striatus* (1-24 = pop. Nordeste, 25-28 = pop. Bahia e 29-48 =pop. Sudeste)

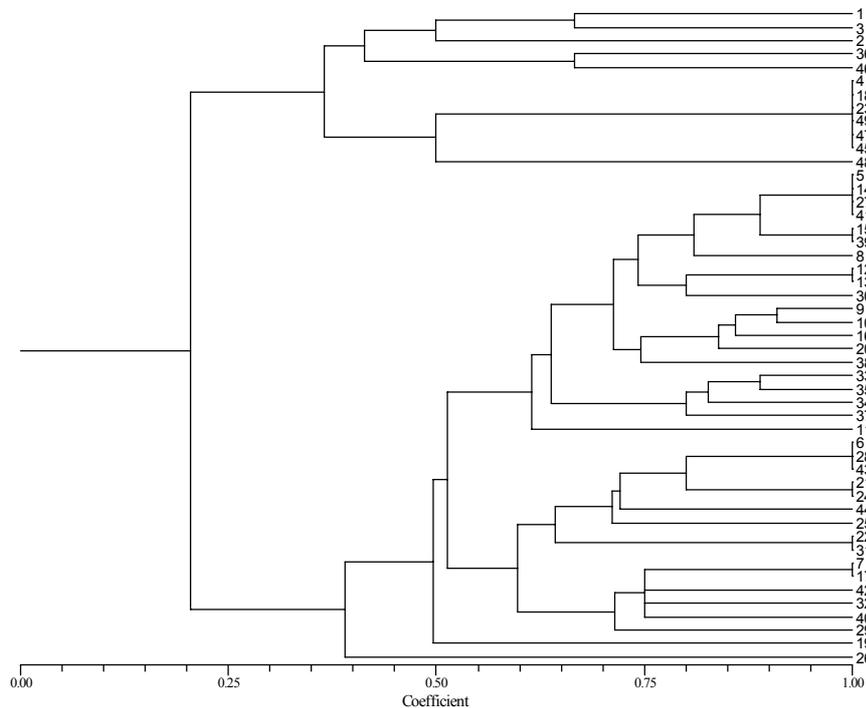


**Apêndice XVIII:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard com o

*prin*

=po

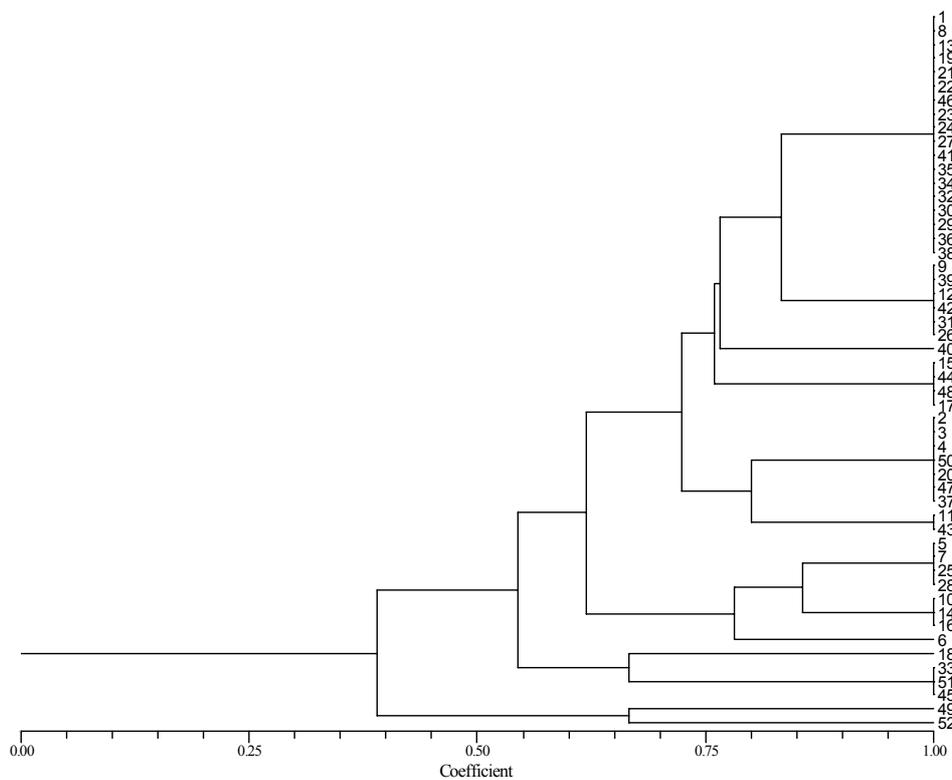
ia e 30-49



**Apêndice XIX:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard com o

*primer* C-10 em *C. striatus* (1-25 = pop. Nordeste, 26-29 = pop. Bahia e 30-49 =pop.

Sudeste)



**Apêndice XX:** Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard com o *primer* D-03 em indivíduos de *C. striatus* (1-25 = pop. Nordeste, 26-28 = pop. Bahia e 29-52 = pop. Sudeste)

**Apêndice XXI:** Valores de freqüências gênicas em *C. striatus*, considerando apenas a região denominada “Nordeste”; valores de diversidade gênica =  $h$  (Nei,1973) e estimativa de locos polimórficos.

Alelo	Freqüência gênica	$h$
B7-1	0,3876	0,4747
B7-2	0,5918	0,4832
B7-3	0,1835	0,2997
B7-4	0,2362	0,3609
B7-5	0,2094	0,3311
B7-6	0,5	0,5
B7-7	0,1835	0,2997
B7-8	0,1340	0,2321
B7-9	0,1584	0,2666
C5-1	0,7172	0,4057
C5-2	0,2789	0,4022
C5-3	0,8	0,3200
C5-4	0,4343	0,4914
C5-5	1,0	0,0
C5-6	0,3072	0,4256
C5-7	0,3367	0,4466
C5-8	0,2789	0,4022
C5-9	0,8	0,3200
C5-10	1,0	0,0
C10-1	0,5101	0,4998
C10-2	0,5101	0,4998
C10-3	0,2517	0,3767
C10-4	0,2	0,3200
C10-5	0,2789	0,4022
C10-6	0,2	0,3200
C10-7	0,5101	0,4998
C10-8	1,0	0,0
C10-9	0,4	0,4800
C10-10	0,0619	0,1162
C10-11	0,1515	0,2571
C10-12	0,1056	0,1889
D2-1	0,1229	0,2157
D2-2	0,6078	0,4768
D2-3	0,6078	0,4768
D2-4	0,1451	0,2482
D2-5	0,4453	0,4940
D2-6	0,1013	0,1820
D2-7	0,8039	0,3153

D2-8	0,8039	0,3153
D2-9	0,0501	0,1474
D2-10	1,0	0,0
D2-11	0,0194	0,0381
D2-12	0,0392	0,0754
D3-1	0,2302	0,3544
D3-2	0,1393	0,2398
D3-3	0,8075	0,3108
D3-4	0,6667	0,4444
D3-5	0,3914	0,4764
D3-6	1,0	0,0
D3-7	0,8075	0,3108
<b>Média/desvio-padrão de h</b>		0,3109/0,1570
<b>Porcentagem de locos polimórficos</b>		90,0%

**Apêndice XXII:** Valores de frequências gênicas em *C. striatus*, considerando apenas a região Bahia; valores de diversidade gênica = h (Nei, 1973) e estimativa de locos polimórficos.

<b>Alelo</b>	<b>Frequência gênica</b>	<b>h</b>
B7-1	1,0	0,0
B7-2	1,0	0,0
B7-3	0,5	0,5
B7-4	0,5	0,5
B7-5	0,2929	0,4142
B7-6	1,0	0,0
B7-7	0,2929	0,4142
B7-8	0,1340	0,2321
B7-9	0,1340	0,2321
C5-1	1,0	0,0
C5-2	0,5	0,5
C5-3	1,0	0,0
C5-4	0,5	0,5
C5-5	1,0	0,0
C5-6	0,2929	0,4142
C5-7	0,2929	0,4142
C5-8	0,1340	0,2321
C5-9	0,5	0,5
C5-10	0,5	0,5
C10-1	1,0	0,0
C10-2	0,5	0,5
C10-3	0,5	0,5
C10-4	0,2929	0,4142
C10-5	0,2929	0,4142
C10-6	0,1340	0,2321
C10-7	0,2929	0,4142
C10-8	1,0	0,0
C10-9	0,5	0,5
C10-10	0,0	0,0

C10-11	0,0	0,0
C10-12	0,0	0,0
D2-1	0,2929	0,4142
D2-2	0,5	0,5
D2-3	1,0	0,0
D2-4	0,1340	0,2321
D2-5	0,5	0,5
D2-6	0,0	0,0
D2-7	0,2929	0,4142
D2-8	1,0	0,0
D2-9	0,0	0,0
D2-10	1,0	0,0
D2-11	0,0	0,0
D2-12	0,0	0,0
D3-1	0,2929	0,4142
D3-2	0,1340	0,2321
D3-3	1,0	0,0
D3-4	1,0	0,0
D3-5	0,5	0,5
D3-6	1,0	0,0
D3-7	1,0	0,0
<b>Média/desvio-padrão de h</b>		<b>0,2307/0,2203</b>
<b>Porcentagem de locos polimórficos</b>		<b>56,0%</b>

**Apêndice XXIII:** Valores de frequências gênicas em *C. striatus*, considerando apenas a região denominada “Sudeste”; valores de diversidade gênica = h (Nei,1973) e estimativa de locos polimórficos.

<b>Alelo</b>	<b>Frequência gênica</b>	<b>h</b>
B7-1	0,3292	0,4416
B7-2	0,6127	0,4746
B7-3	0,3675	0,4649
B7-4	0,4084	0,4832
B7-5	0,1340	0,2321
B7-6	0,4084	0,4832
B7-7	0,1938	0,3125
B7-8	0,0780	0,1439
B7-9	0,2584	0,3832
C5-1	0,3675	0,4649
C5-2	0,0513	0,0974
C5-3	1,0	0,0
C5-4	0,2929	0,4142
C5-5	0,7764	0,3472
C5-6	0,2584	0,3832
C5-7	0,3292	0,4416
C5-8	0,4084	0,4832
C5-9	0,5	0,5
C5-10	0,6838	0,4325
C10-1	0,4523	0,4954

C10-2	0,4523	0,4954
C10-3	0,1633	0,2733
C10-4	0,2584	0,3832
C10-5	0,1056	0,1889
C10-6	0,2254	0,3492
C10-7	0,4084	0,4832
C10-8	1,0	0,0
C10-9	0,3292	0,4416
C10-10	0,1938	0,3125
C10-11	0,0513	0,0974
C10-12	0,0513	0,0974
D2-1	0,0741	0,1374
D2-2	0,2763	0,3999
D2-3	0,6914	0,4267
D2-4	0,0742	0,1374
D2-5	0,1003	0,1804
D2-6	0,1003	0,1804
D2-7	0,3828	0,4725
D2-8	0,6914	0,4267
D2-9	0,0	0,0
D2-10	1,0	0,0
D2-11	0,0241	0,0470
D2-12	0,0241	0,0470
D3-1	0,0742	0,1374
D3-2	0,0	0,0
D3-3	1,0	0,0
D3-4	0,4655	0,4976
D3-5	0,4655	0,4976
D3-6	0,6914	0,4267
D3-7	0,6220	0,4702
<hr/>		
<b>Média/desvio-padrão de h</b>	<b>0,3017/0,1800</b>	
<hr/>		
<b>Porcentagem de locos polimórficos</b>	<b>88,0%</b>	
<hr/>		