

Sistemática bioquímica de *Menticirrhus americanus* e *Menticirrhus littoralis* (Teleostei: Perciformes: Sciaenidae)

Vicente P. F. CASSANO* & José A. LEVY

Laboratório de Bioquímica Marinha, Departamento de Química
Fundação Universidade do Rio Grande
(Caixa Postal 474, 96.200 Rio Grande, RS)

- **Abstract:** Populations of two congeneric species of southwestern Atlantic sciaenid fish, *Menticirrhus americanus* and *Menticirrhus littoralis*, analysed electrophoretically to detect isoenzyme variability, showed very little genetic variation and a moderately high similarity in their allelic composition. A total of 22 alleles encoded by 17 loci were observed. Interspecific variability were found for the loci G6pdh-A, G6pdh-B, Hbdh-B, Mdh-B and Sod-A. Intraspecific variation was observed only for Mdh-B in *M. littoralis*. The genetic similarity between *M. americanus* and *M. littoralis* (INEI +0.76) is congruent with the high level of morphological similarity showed by these two congeneric species.
- **Descriptors:** Biochemical systematics, Fishes, *Menticirrhus americanus*, *Menticirrhus littoralis*, Sciaenidae, Electrophoresis, Isoenzymes, South coast: Brazil.
- **Descritores:** Sistemática bioquímica, Peixes, *Menticirrhus americanus*, *Menticirrhus littoralis*, Sciaenidae, Eletroforese, Isoenzimas, Costa sul: Brasil.

Introdução

O gênero *Menticirrhus* é constituído por nove espécies de peixes marinhos, com distribuição nas regiões tropicais e temperadas. Seis espécies ocorrem a leste do Oceano Pacífico e três a oeste do Oceano Atlântico (Chao, 1978).

Das espécies do Atlântico Sul, *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) e *Menticirrhus littoralis* (Holbrook, 1855) são encontradas no litoral brasileiro. São peixes demersais de tamanho médio, bentófagos de epifauna e ocorrem em águas de pouca profundidade das regiões costeiras e estuarinas (Menezes & Figueiredo, 1980; Jardim, 1988).

A identificação destas duas espécies baseia-se, principalmente, no tamanho das escamas da região peitoral em relação ao da região situada à linha lateral, no padrão de coloração e no comprimento das nadadeiras peitorais em relação às pélvicas (Chao, 1978; Menezes & Figueiredo, 1980). Outros caracteres morfométricos,

rotineiramente utilizados para a identificação de peixes, não discriminam estas duas espécies que apresentam grande semelhança morfológica.

A aplicação de métodos bioquímicos no estudo das macromoléculas informacionais em organismos estreitamente relacionados, tem produzido informações relevantes e, em certos casos, crítica para o estabelecimento de relações filogenéticas (Dobzhansky *et al.*, 1977). Dentre as técnicas mais empregadas, o fracionamento eletroforético de isoenzimas em géis destaca-se pela simplicidade, rapidez e reduzido custo em relação às técnicas de seqüenciamento, e tem servido para estimar a diferenciação genética entre espécies de diversos tipos de organismos. Vários estudos com marcadores genéticos em peixes têm procurado inferir a estrutura gênica das populações (Grant, 1985; Gyllensten, 1985); estabelecer a relação entre variabilidade morfológica e genética (McAndrew *et al.*, 1982; Hadfield *et al.*, 1979); definir as relações filogenéticas (Hudom & Guderley, 1984) e propor evidências de isolamento reprodutivo em espécies simpátricas (Sole-Cava *et al.*, 1983; Ferguson & Mason, 1981). Nos últimos anos, os métodos eletroforéticos têm-se mostrado de grande utilidade e têm sido preconizados para a análise genética dos recursos pesqueiros (FAO/UNEP, 1981).

(*) Bolsista do CNPq. Department of Biology, University of California at Los Angeles, 405 Hilgard Avenue. Los Angeles, California, 90024 - 1606, U.S.A.

O objetivo deste trabalho é verificar e estimar a variabilidade genética em populações de duas espécies do gênero *Menticirrhus* do litoral sul-brasileiro através do emprego da eletroforese de isoenzimas.

Material e métodos

Os exemplares utilizados foram capturados pelo N/Oc. "Atlântico Sul", em 1984, na região de pesca de Rio Grande, RS, entre 30°40' e 33°28'S, por meio de arrasto de fundo com redes de porta.

Foram analisados dez exemplares adultos, de ambos os sexos de cada espécie. Este número amostral está de acordo com Nei (1978) e com Gorman & Renzi (1979) para o estudo das relações interespecíficas.

Amostras de músculo e fígado foram retiradas de cada exemplar e homogeneizadas em tampão tris-HCl 0,02 M, pH 7,5 na proporção 1:1 de peso/volume. O

homogeneizado foi centrifugado por 20 minutos a 20.000 rpm, em centrífuga refrigerada. O sobrenadante obtido foi aplicado sobre membranas de acetato (Cellogel-Chemetron) ou sobre géis de poliácridamida 7% e submetido a eletroforese a 5°C.

As enzimas ensaiadas com os respectivos números de classificação, os tecidos empregados, bem como as condições da corrida eletroforética utilizadas para a análise das populações, estão apresentadas na Tabela 1. As soluções empregadas para a revelação da atividade enzimática foram as recomendadas por Brewer, 1970 e Shaw & Prasad, 1970. Os produtos alélicos foram considerados expressão do mesmo alelo em um mesmo gene estrutural quando apresentaram idêntica mobilidade eletroforética sob às mesmas condições de corrida (Dobzhansky *et al.*, 1977). O sistema de nomenclatura para os loci e alelos é o proposto por Allendore & Utter (1979). A mobilidade relativa dos produtos alélicos dos loci polimórficos foi determinada tendo como referência o alelo de maior frequência na amostra de *M. americanus* ao qual atribui-se o valor de 100.

Tabela 1. Sistemas enzimáticos estudados, tecidos e tampões utilizados

Enzimas	EC	Tecido	Tampões
Álcool-desidrogenase	ADH EC 1.1.1.1	fígado	I
Aspartato-aminotransferase	AAT EC 2.6.1.1	fígado	II
Enzima Málica	ME EC 1.1.1.40	músculo	II
Esterase	EST EC 3.1.1.1	músculo	III
Glucose-6-fosfato-desidrogenase	G6PDH EC 1.1.1.49	fígado	I
Glutamato-desidrogenase	GDH EC 1.4.1.3	fígado	I
Hidroxi-butirato-desidrogenase	HBDH EC 1.1.1.31	fígado	I
Isocitrato-desidrogenase	IDH EC 1.1.1.42	fígado	II
Malato-desidrogenase	MDH EC 1.1.1.37	fígado	III
Superóxido-dismutase	SOD EC 1.15.1.1	músculo	III
Xantina-desidrogenase	XDH EC 1.2.1.37	fígado	I

I - 0,5 M tris-verseno-borato pH 8.0 (Shaw & Prasad, 1970); II - veronal pH 8.7 (Brewer, 1970); III - tris-citrato pH 8.65 (Poulik, 1957)

Resultados

Foram detectados vinte e dois alelos, atribuíveis a dezessete *loci*. Três diferentes padrões de distribuição alélica nos *loci* gênicos foram encontrados: 1) as espécies exibem os seguintes *loci* monomórficos para o mesmo alelo: Adh-A, Aat-A, Aat-B, Est-A, Est-B, Est-C, Gdh-A, Hbdh-A, Idh-A, Mdh-A, Me-A e Xdh-A; 2) as espécies compartilham o mesmo alelo no *locus* dialélico Mdh-B e *M. littoralis* apresenta um segundo alelo exclusivo; 3) os *loci* G6pdh-A, G6pdh-B, Hbdh-B e Sod-A, são diagnósticos para as duas espécies de *Menticirrhus* examinadas. Todos os produtos alélicos revelados apresentaram migração anódica nas condições experimentais empregadas, com exceção do produto do alelo 100 do *locus* Aat-1, que migra no sentido do cátodo.

As freqüências alélicas para os *locus* gênicos examinados, resumidos na Tabela 2, foram empregadas para o cálculo dos índices de Identidade Genética de Nei (1972) e de Similaridade Genética de Thorpe (1979), respectivamente, 0,763 e 0,761.

Tabela 2. Freqüências alélicas para dezessete *loci* em populações de *Menticirrhus americanus* (a) e *Menticirrhus littoralis* (b)

<i>Loci</i>	Alelos	(a)	(b)
Adh-A	100	1,0	1,0
Aat-A	100	1,0	1,0
Aat-B	100	1,0	1,0
Est-A	100	1,0	1,0
Est-B	100	1,0	1,0
Est-C	100	1,0	1,0
Gdh-A	100	1,0	1,0
G6pdh-A	100	1,0	-
	70	-	1,0
G6pdh-B	100	1,0	-
	65	-	1,0
Hbdh-A	100	1,0	1,0
Hbdh-B	100	1,0	-
	80	-	1,0
Idh-A	100	1,0	1,0
Mdh-A	100	1,0	1,0
Mdh-B	100	1,0	0,94
	85	-	0,06
Me-A	100	1,0	1,0
Sod-A	100	1,0	-
	80	-	1,0
Xdh-A	100	1,0	1,0

Discussão

A análise dos resultados obtidos revela a grande semelhança genética entre as duas espécies congênicas de *Menticirrhus*. Doze, dos dezessete *loci* examinados, são idênticos nas amostras das populações estudadas, um *locus*, Mdh-B, apresenta certa semelhança, já que as duas espécies compartilham um dos alelos, sendo o segundo alelo exclusivo para *M. littoralis* e apenas quatro *loci* são diagnósticos. *Loci* diagnósticos são definidos por Bucklin & Hedgecock (1982) como *loci* que apresentam alelos diferentes fixados para amostras de populações de diferentes espécies. Tais *loci* teriam resultado da fixação gradual de alelos raros na população original, por pressões seletivas direcionais diferentes, ou pela ação da deriva genética sobre populações formadas originalmente por pequeno número de indivíduos (Mayr, 1970). A observação de *loci* diagnósticos comprova a inexistência de fluxo gênico entre as populações destas duas espécies simpátricas de peixes demersais, evidenciando o isolamento reprodutivo (Ayala, 1983).

O *locus* Mdh-B, com o alelo 100, comum às duas espécies e o alelo 85, exclusivo para a população de *M. littoralis*, encontra-se em processo de diferenciação que tende a torná-lo um *locus* diagnóstico. O tempo necessário para que esta diferenciação se complete vai depender do grau de conservatividade do *locus*.

Os *loci* monomórficos para o mesmo alelo nas duas espécies de *Menticirrhus* são *loci* que, por efeito do acaso, por serem mais conservativos ou por terem sido submetidos às mesmas pressões seletivas (Lucotte & Lefebvre, 1980; Avise, 1977), mantiveram constantes e inalteradas as freqüências de seus alelos desde o momento da separação da população original em vários demes. Thorpe (1979) sugere que a identidade genética entre a maioria das espécies congênicas situa-se entre os valores de 0,25 e 0,85. O valor obtido para tal índice entre *M. americanus* e *M. littoralis* (INEI = 0,76), sugere que estas espécies apresentam similaridade genética moderadamente elevada.

Conclusões

A análise eletroforética de *Menticirrhus americanus* e *Menticirrhus littoralis* revela que seus genomas acumularam um número de mutações insuficientes para produzir diferenciação significativa dos *loci* gênicos estruturais codificadores das isoenzimas analisadas, o que explicaria a elevada similaridade genética. O estudo comparativo da morfologia externa destas duas espécies de ciêfdeos, por outro lado, evidencia sua grande semelhança fenotípica.

Os resultados indicam que o evento cladogênico separador da população ancestral em duas sub-populações, e a subsequente evolução das linhagens que deram origem às duas espécies atuais de *Menticirrhus*, ocorreram de tal modo que as pequenas modificações da morfologia foram acompanhadas por igualmente pequena diferenciação isoenzimática. Existe, portanto, congruência entre a evolução genotípica e fenotípica de *M. americanus* e *M. littoralis*.

Resumo

Populações de duas espécies congênicas de peixes cêntricos do Atlântico Sul-Oriental, *Menticirrhus americanus* e *Menticirrhus littoralis*, analisados eletroforéticamente para detectar a variabilidade isoenzimática, mostraram muito pouca variação genética e uma moderadamente alta similaridade em sua composição alélica. Um total de 22 alelos constituídos por 17 loci foram observados. Variabilidade interespecífica foi encontrada para os loci G6pdh-A, G6pdh-B, Hbdh-B, Mdh-B e Sod-A. Variação intraespecífica foi observada somente para Mdh-B em *M. littoralis*. A similaridade genética entre *M. americanus* e *M. littoralis* (INEI = 0,76) é congruente com o alto nível de similaridade morfológica mostrado por estas duas espécies congênicas.

Agradecimentos

Agradecemos a Leo Lacerda e Maria Regina Casartelli pela colaboração e à Dra Anna Emília A. de M. Vazzoler e Dr. Antonio Sole-Cava pela leitura crítica e sugestões apresentadas. Este trabalho contou com o auxílio do CNPq (Proc. 40.5654/83) e FURG.

Referências bibliográficas

- ALLENDORF, F. W. & UTTER, F. M. 1979. Population genetics. In: Hoar, S. et al., eds Fish physiology. New York, Academic Press. v.8, p.407-454.
- AVISE, J. C. 1977. Genetic differentiation during speciation. In: Ayala, F. J., ed. Molecular evolution. Sunderland, Sinauer Assoc. p.106-122.
- AYALA, F. J. 1983. Enzymes as taxonomic characters. In: Oxford, G. S. & Rollinson, D., eds Protein polymorphism: adaptative and taxonomic significance. London, Academic Press. (Systematics Association Special Volume nº 24).
- BREWER, G. J. 1970. An introduction to isozymes techniques. New York, Academic Press.
- BUCKLIN, A. & HEDGECOCK, D. 1982. Biochemical genetic evidence for a third species of *Metridium* (Coelenterata: Actiniaria). Mar. Biol., 66:1-7.
- BUTH, D. G. 1983. Duplicate isozyme loci in fishes: origins, distribution, phyletic consequences, and locus nomenclature. In: Isozymes. New York, Alan R. Liss. p. 381-400.
- CHAO, L. N. 1978. A basis for classifying western Atlantic Sciaenidae (Teleostei: Perciformes). Tech. Rept natn. mar. Fish. Serv. U.S., Circ., (415):1-64.

- DOBZHANSKY, T. G.; AYALA, F. J.; STEBBINS, G. L. & VALENTINE, J. W. 1977. Evolution. San Francisco, W. H. Freeman.
- FAO/UNEP. 1981. Conservation of the genetic resources of fish: problems and recommendations. Report of the Expert Consultation on the Genetic Resources of Fish. Rome, 9-13 June 1980. FAO Fish. tech. Pap., (217):1-43.
- FERGUSON, A. & MASON, F. M. 1981. Allozyme evidence for reproductively isolated sympatric populations of brown trout *Salmo trutta* L. in Lough Melvin, Ireland. J. Fish Biol., 18:629-642.
- GORMAN, G. C. & RENZI, J. 1979. Genetic distance and heterozygosity estimates in electrophoretic studies: effects of sample size. Copeia, (2):242-249.
- GRANT, W. S. 1985. Biochemical genetic stock structure of the southern African enchovy, *Engraulis capensis* Gilchrist. J. Fish Biol., 27:23-29.
- GYLLENSTEN, U. 1985. The genetic structure of fish: differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous, and freshwater species. J. Fish Biol., 26:691-699.
- HADFIELD, A. J.; IVANTSOFF, V. & JOHNSTON, P. G. 1979. Clinal variation in electrophoretic and morphological characters between two nominal species of the genus *Pseudomugil* (Pisces: Atheriniformes: Pseudomugilidae). Aust. J. mar. Freshw. Res., 30:375-386.
- HUDON, J. & GUDERLEY, H. 1984. An electrophoretic study of the phylogenetic relationships among four species of sticklebacks (Pisces: Gasterosteidae). Can. J. Zool., 62:2313-2316.
- JARDIM, L. F. A. 1988. Sinopse das espécies de *Menticirrhus* Gill, 1861 (Osteichthyes, Sciaenidae) do Atlântico Ocidental. Revta bras. Zool., 5(2):179-187.
- LUCOTTE, G. & LEFEBVRE, J. 1980. Distances électrophorétiques entre les cinq espèces de babouins du genre *Papio* basées sur les mobilités des protéines et enzymes sérriques. Biochem. Syst. Ecol., 5:61-63.
- MAYR E. 1970. Populations, species and evolution: an abridgement of animal species and evolution. Cambridge, Harvard University Press. 453p.
- McANDREW, B. J.; WARD, R. D. & BEARDMORE, J. A. 1982. Lack of relationship between morphological variance and enzyme heterozygosity in the plaice *Pleuronectes platessa*. Heredity, 48:117-125.

- MENEZES, N. A. & FIGUEIREDO, J. L. 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV. Teleostei. (3). São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. 96p.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Naturalist*, 106:283-291.
- _____. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89:583-590.
- POULIK, M. D. 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature, Lond.*, 180:1477-1479.
- SHAW, C. R. & PRASAD, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. *Biochem. Genetics*, 4:297-320.
- SOLE-CAVA, A. M.; VOOREN, C. M. & LEVY, J. A. 1983. Isozyme differentiation of two sibling species of *Squatina* (Chondrichthyes) in south Brazil. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75B:355-358.
- THORPE, J. P. 1979. Enzyme variation and taxonomy: the estimation of sampling errors in measurements of interspecific genetic similarity. *Biol. J. Linn. Soc.*, 11:369-386.

(Recebido em 02-02-89;
aceito em 19-02-90)